

Mikrofluidischer Zellkultur-Chip  
mit integrierter Verdünnungsreihe  
für *in vitro*-Tests

**Dissertation**

ZUR ERLANGUNG DES GRADES  
DER DOKTORIN DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN  
DER NATURWISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHEN FAKULTÄT II  
- PHYSIK UND MECHATRONIK -  
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

von

**Heike Kreher**

Saarbrücken

2016

Tag des Kolloquiums: 25.05.2016

Dekan: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Georg Frey

Mitglieder des  
Prüfungsausschusses:

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Matthias Nienhaus

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Helmut Seidel

Prof. Dr. sc. techn. Andreas Manz

Akademischer Mitarbeiter: Dr.-Ing. Lutwin Klein

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

---

(Ort, Datum)

---

(Heike Kreher)

# Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein mikrofluidischer Zellkultur-Chip zur Optimierung von *in vitro*-Tests entwickelt. Auf dem Chip wird eine binär-logarithmische Verdünnungsreihe einer beliebigen Flüssigkeit durch ein System von Mikrokanälen passiv erzeugt, wodurch Kontaminationen minimiert und Untersuchungen zu Wechselwirkungen verschiedener chemischer Komponenten auf Zellen für viele Anwendungsbereiche ermöglicht werden, wie z. B. in der Medikamentenentwicklung und bei Toxizitätstests. Der Chipherstellung gingen analytische und numerische Berechnungen, die Auswahl der Herstellungsmethoden sowie die Entwicklung einer neuen Eckenkompensation für das anisotrope Ätzen voraus. Die Luftblasenbildung während des Befüllvorgangs wurde bei zwei unterschiedlichen SiO<sub>2</sub>-Oberflächenbeschichtungen untersucht. Eine neue Befüllmethode in der Unterdruckatmosphäre eines evakuierbaren Exsikkators wurde erfolgreich entwickelt. Außerdem wurde ein Versuchsaufbau zur Probengewinnung an jedem Well realisiert und geeignete Analysemethoden zur Ermittlung der Konzentrationen untersucht. Die Ergebnisse zweier Chipdesigns werden miteinander verglichen und die Funktionstauglichkeit der Siliziumchips wird durch Erfüllung dreier Kernfunktionen demonstriert: einer einheitlichen Flussrate an den Ausgängen, der Erzeugung einer binär-logarithmischen Verdünnungsreihe sowie der Kultivierung von lebenden Zellen in Kavitäten auf dem Chip bei kontinuierlicher Mediumzufuhr.

# Abstract

In this work, a microfluidic cell culture chip is developed for optimization of *in vitro* tests. A binary logarithmic dilution profile of an arbitrary fluid is passively generated on such a chip by a system of microchannels, reducing contaminations and enabling a broad range of applications by analyzing the interaction of different chemical compounds on cells—for example, in drug development and toxicity tests. The manufacturing process was preceded by analytical and numerical calculations, a selection of manufacturing methods as well as the development of a new convex corner compensation for anisotropic etching. Formation of air bubbles during the filling process of the chip was analyzed with respect to two different SiO<sub>2</sub> surface coatings. A new filling method was developed successfully, using the low pressure environment in a vacuum desiccator. Furthermore, a test setup for extracting one sample per well was engineered, and suitable methods of analysis for measuring the concentrations were investigated. The results of two chip designs are compared with each other, and the functionality of the silicon chip is demonstrated by achieving three core functions: a uniform flow rate at the outlets, the generation of a binary logarithmic dilution gradient, and the cultivation of living cells inside on-chip cavities with continuous media perfusion.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Motivation . . . . .	1
1.1.1	Mikrofluidik . . . . .	1
1.1.2	<i>In vitro</i> -Zellkultur . . . . .	1
1.1.3	Mikrofluidische Zellkultur . . . . .	2
1.2	Mikrofluidische Chips für Zellkulturen . . . . .	2
1.3	Der mikrofluidische Chip . . . . .	3
1.3.1	Zielsetzung . . . . .	3
1.3.2	Anforderungen . . . . .	5
1.3.3	Chipdesign . . . . .	5
1.4	Inhalt und Aufbau der Arbeit . . . . .	6
<b>2</b>	<b>Theorie</b>	<b>7</b>
2.1	Mikrofluidik . . . . .	7
2.1.1	Skalierung . . . . .	7
2.1.2	Strömungsmechanik . . . . .	8
2.1.3	Laminarer Fluss . . . . .	9
2.1.4	Diffusion . . . . .	10
2.1.5	Benetzbarkeit . . . . .	11
2.1.6	Concus-Finn-Effekt . . . . .	12
2.1.7	Hydrodynamische Netzwerke . . . . .	14
2.2	Silizium . . . . .	16
2.2.1	Kristallstruktur . . . . .	16
2.2.2	Nasschemisches Ätzen von Silizium . . . . .	17
2.2.3	Kompensationsstrukturen . . . . .	21
<b>3</b>	<b>Auslegung des mikrofluidischen Chips</b>	<b>25</b>
3.1	Konzept . . . . .	25
3.2	Materialauswahl . . . . .	27
3.3	Modellierung: Fluidik . . . . .	29
3.3.1	Analytische Berechnung der Konzentrationsreihe . . . . .	29
3.3.2	Computergestützte Simulationsmethoden . . . . .	31
3.4	Modellierung: Kompensationsstrukturen . . . . .	42
3.5	Maskendesign . . . . .	44
3.6	Zusammenfassung . . . . .	46

<b>4</b>	<b>Herstellung</b>	<b>49</b>
4.1	Herstellungsprozess . . . . .	49
4.2	Herstellungstechnologien . . . . .	50
4.2.1	Siliziumstrukturierung . . . . .	50
4.2.2	Plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung . .	52
4.2.3	Thermische Oxidation . . . . .	53
4.2.4	Anodisches Bonden . . . . .	53
4.2.5	Elektrochemisches Funkenerodieren von Borsilikatglas . .	55
4.2.6	Fluidische Anschlüsse . . . . .	56
4.3	Spritzgussverfahren . . . . .	57
4.4	Zusammenfassung . . . . .	58
<b>5</b>	<b>Testaufbau und Analysemethoden</b>	<b>59</b>
5.1	Befüllen des Chips . . . . .	59
5.2	Versuchsaufbau des Flusstests . . . . .	62
5.3	Oberflächenprofilometer . . . . .	65
5.4	Statische Kontaktwinkelmessung . . . . .	65
5.5	Volumenmessung . . . . .	67
5.6	Konzentrationsanalysen . . . . .	67
5.6.1	Chromatographie mit Massenspektrometrie . . . . .	68
5.6.2	Bradford-Test . . . . .	69
5.6.3	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie . . . . .	70
5.6.4	pH-Messungen . . . . .	72
5.7	Visualisierung des Flusses . . . . .	73
5.8	Zellkultur . . . . .	73
5.9	Statistische Auswertung . . . . .	75
5.10	Zusammenfassung . . . . .	75
<b>6</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>79</b>
6.1	Kontaktwinkel der Oberflächenbeschichtungen . . . . .	79
6.1.1	Ergebnisse . . . . .	79
6.1.2	Diskussion . . . . .	81
6.2	Kompensationsstrukturen . . . . .	84
6.2.1	Ergebnisse . . . . .	84
6.2.2	Diskussion . . . . .	86
6.3	Auswahl der Chips . . . . .	86
6.4	Volumenfluss . . . . .	91
6.4.1	Ergebnisse . . . . .	91
6.4.2	Diskussion . . . . .	92
6.5	Konzentrationsverteilung . . . . .	94
6.5.1	Ergebnisse . . . . .	94
6.5.2	Diskussion . . . . .	104
6.6	Zellkultur . . . . .	108
6.6.1	Ergebnisse . . . . .	108

6.6.2 Diskussion . . . . .	111
<b>7 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>113</b>
7.1 Zusammenfassung . . . . .	113
7.2 Ausblick . . . . .	115
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>Eigene Publikationen</b>	<b>129</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>131</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>135</b>
<b>Verwendete Abkürzungen, Symbole und Formelzeichen</b>	<b>137</b>
<b>Danksagung</b>	<b>141</b>
<b>A Berechnung <math>C_R</math> für gleichschenkliges Dreieck</b>	<b>143</b>
<b>B Chipdesign</b>	<b>145</b>
B.1 Reynolds-Zahlen . . . . .	145
B.2 Parameter der numerischen Simulationen . . . . .	145
<b>C Prozessparameter</b>	<b>147</b>
C.1 Siliziumwafer . . . . .	147
C.2 Borsilikatglas . . . . .	150
C.3 Glas-Silizium-Glas-Stack . . . . .	151
<b>D Protokoll der Zellkultur</b>	<b>153</b>
<b>E Ergebnisse der Analysen</b>	<b>155</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

### 1.1.1 Mikrofluidik

Die Mikrosystemtechnik hat durch die Realisierung verschiedener Prozesse – allen voran der gezielten Strukturierung von Silizium [1] – einen Weg zur Verwendung physikalischer Effekte in der Mikrowelt geebnet. Ein daraus resultierendes Teilgebiet ist die Arbeit mit Flüssigkeitsmengen im Mikroliterbereich und darunter. Dieses Teilgebiet wird als Mikrofluidik bezeichnet. Durch die Miniaturisierung fluidischer Systeme ändern sich deren physikalische Eigenschaften. Beispielsweise umfasst ein Würfel mit einer Kantenlänge von einem Zentimeter ( $10^{-2}$  m) einen Milliliter ( $10^{-3}$  l) Flüssigkeit. Wird die Kantenlänge um eine Größenordnung auf einen Millimeter ( $10^{-3}$  m) reduziert, verkleinert sich sein Volumen um drei Größenordnungen auf einen Mikroliter ( $10^{-6}$  l). Dies führt dazu, dass das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zunimmt, wodurch sich die Interaktion mit den Wänden erhöht und Oberflächeneffekte, wie z. B. der Kapillareffekt, an Bedeutung gewinnen. Zusätzlich fließen unterschiedliche Flüssigkeiten im Kanal meistens ohne Wirbelbildung, d. h. laminar, nebeneinander her. Die außergewöhnlichen Effekte führen zu innovativen und meist interdisziplinären Einsatzmöglichkeiten, wie z. B. dem Tintenstrahldrucker, medizinischen Implantaten, Elektrosprays, Mikrolinsen, Displaytechniken, chemischen Mikroreaktoren und molekularen Sensoren.

Vor allem an der Optimierung der Arbeitsprozesse in der Biologie und in der Pharmazie wird vermehrt gearbeitet [2, 3], unter anderem an *Point-of-Care*-Produkten (z. B. Blutzucker-Teststreifen) und an kompletten Prozessabläufen auf einem Chip ( $\mu$ TAS – *micro total analysis system*) [4, 5].

### 1.1.2 *In vitro*-Zellkultur

Die in 1912 eingeführte [6] und inzwischen etablierte *in vitro*-Zellkultur ist ein grundlegendes Instrument für unterschiedlichste Untersuchungen in der Biologie bzw. in der Pharmazie [7]. Dabei werden Zellen außerhalb eines Organismus in einer Schale (*in vitro*) unter kontrollierten künstlichen Umgebungsbedingungen in Nährmedium kultiviert, so dass deren typische Zellfunktionen erhalten bleiben und das Zellverhalten bei variierender Umgebung, wie z. B. bei unterschiedlichen Substanzkonzentrationen, untersucht werden kann. Dadurch können beispielsweise Tierversuche in der Medikamentenentwicklung reduziert, aber aufgrund der

stark vereinfachten Komplexität im Vergleich mit der physiologischen Umgebung noch nicht gänzlich ersetzt werden [8].

Seit der Einführung der Zellkultur wurden hauptsächlich die verwendeten Materialien verbessert und die Kontamination mit Bakterien und Hefen verringert. Der grundlegende material- und arbeitsaufwendige Prozessablauf mit vielen Pipettierschritten ist allerdings in der Forschung und Entwicklung immer noch der gleiche und konnte noch nicht vereinfacht werden [7].

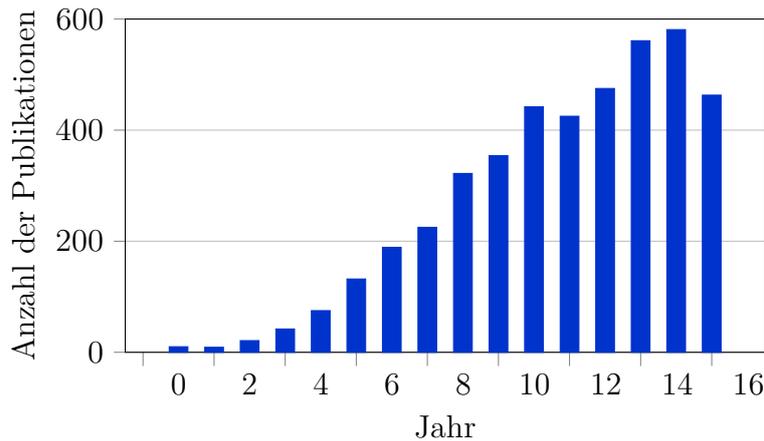
### 1.1.3 Mikrofluidische Zellkultur

Durch die Mikrofluidik ist es möglich, den Größenmaßstab einiger Laborprozesse zu verringern und dadurch zu optimieren. Bei einer Verkleinerung der *in vitro*-Zellkultur auf Chipgröße ergeben sich mehrere Vorteile: Aufgrund der minimierten Größe sind geringere Substanzmengen sowie eine geringere Anzahl von Zellen nötig, zusätzlich verringert sich die Versuchsdauer. Im Gegensatz zur konventionellen Zellkultur, bei der mehrmals pro Woche das Nährmedium gewechselt wird, ist eine kontinuierliche Mediumzufuhr möglich und der Arbeitsaufwand wird durch eine Automatisierung zusätzlich reduziert. Aufgrund des abgeschlossenen Systems ergibt sich eine gute Reproduzierbarkeit der Umgebungsbedingungen [3, 7, 9, 10].

Eine zusätzlich integrierte Erzeugung einer Verdünnungsreihe auf einem Zellkultur-Chip minimiert Kontaminationen und ermöglicht ein breites Einsatzgebiet des Chips [11], wie z. B. in der Medikamentenentwicklung, für Toxizitätstests und für Optimierungsuntersuchungen von Nährmedien. Da wegen einer Stagnation der Medikamenten-Neuzulassungen neue Testansätze gesucht werden [3, 12], ist die Entwicklung eines mikrofluidischen Chips für Zellkulturen mit integrierter Konzentrationsreihe vielversprechend.

## 1.2 Mikrofluidische Chips für Zellkulturen

Beim Vergleich der veröffentlichten Publikationen über die Jahre (Abb. 1.1) ist zu erkennen, dass das Interesse zur Optimierung der Zellkultur mit Hilfe der Mikrofluidik seit einigen Jahren nahezu stetig wächst. Die Systeme wurden dabei häufig für eine ganz spezifische Anwendung und nicht für eine breite Verwendung entwickelt. Inzwischen wurden mehrere Übersichtsartikel zu aktuellen Arbeiten und zu zukünftigen Herausforderungen verfasst [7–11, 13, 14]. Einige einfache Konzepte werden kommerziell vertrieben (BellBrook Labs [15], Ibidi [16]). Der Durchbruch zu standardisierten und vergleichbaren Verfahren ist jedoch noch nicht geschafft [17, 18], da viele Chips jeweils nur ein spezielles Problem lösen, das Design keine Massenproduktion zulässt, die Kompatibilität unter verschiedenen Systemen noch nicht gewährleistet oder die Auswertung der Ergebnisse noch nicht einheitlich ist [18].



**Abbildung 1.1:** Anzahl der Publikationen pro Jahr bei der Suche in der Zitationsdatenbank Scopus von Elsevier ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)) mit der Wortkombination  $\{(microfluidic\ OR\ microchip)\ AND\ cell\ AND\ culture\}$  am 10.12.2015.

Eine Auswahl mikrofluidischer Chips mit integrierter Zellkultur und Konzentrationsgradienten, die bisher von anderen Gruppen entwickelt wurden, sind in Tabelle 1.1 aufgeführt. Diese sind hauptsächlich aus PDMS (Polydimethylsiloxan) produziert, wodurch sich Einschränkungen hinsichtlich der Chemikalienresistenz und der Formstabilität ergeben. Die Zellkultur ist normalerweise für adhärenente oder für nicht-adhärenente Zellen geeignet und nur selten für beides. Die meisten Gruppen, mit Ausnahme von Greve *et. al.* [19], arbeiten mit linearen Verdünnungsreihen. Logarithmische Reihen werden etwas häufiger verwendet, wenn auf dem Chip keine Zellkultur vorhanden ist [20–22]. Ein zentraler Kritikpunkt ist, dass bei keinem der Chips eine Probenentnahme pro Inkubatorwell möglich ist, um den Überstand analysieren zu können. Damit kann die erreichte Konzentration nur mittels optischer Detektion ausgelesen werden und es lässt sich erklären, warum in die bisherigen Zellkultur-Chips keine logarithmischen Verdünnungen integriert wurden, denn eine optische Analyse in solch niedrigen Konzentrationsbereichen wäre zu ungenau. Der Chip von Zou *et al.* [23] ist der kleinste der hier aufgeführten Strukturen und deckt ohne Anschlüsse eine Fläche von  $0,3 \times 0,2\text{ cm}^2$  ab. Alle anderen, bei denen eine Größe angegeben wurde, benötigen eine wesentlich größere Fläche ab  $9\text{ cm}^2$ .

## 1.3 Der mikrofluidische Chip mit integrierter Konzentrationsreihe für Zellkulturen

### 1.3.1 Zielsetzung

Das wesentliche Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines mikrofluidischen Chips, auf welchem eine Zellkultur sowie eine Konzentrationsreihe, die

**Tabelle 1.1:** Literaturübersicht zu unterschiedlichen mikrofluidischen Zellkultur-Chips mit integrierter Verdünnungsreihe.

Autoren		Konzentrationsbereich	Chip-material	Zellen	adhärent/ nicht-adh.	Energieverbrauch	Überstand pro Well	Fläche
Chang <i>et al.</i>	[24]	lin	PDMS	A549	adh.	passiv	–	$5 \times 4 \text{ cm}^2$
Dai <i>et al.</i>	[25]	lin	PDMS	HeLa-C3	adh.	aktiv	–	$9 \times 2 \text{ cm}^2$
Greve <i>et al.</i>	[19]	lin log (0,1 – 100%)	Silizium/ PDMS	NHDF	adh.	passiv	–	$3 \times 3 \text{ cm}^2$
Ruan <i>et al.</i>	[26]	lin	PDMS/ Glas	MCF-7	adh.	passiv	–	
Somaweera <i>et al.</i>	[27]	lin	PDMS	Ramos	beides	passiv	–	
Toh <i>et al.</i>	[28]	lin	PDMS	Hepatozyten	adh.	passiv	–	
Walker <i>et al.</i>	[29]	lin	PDMS	HEK	adh.	passiv	–	
Xu <i>et al.</i>	[30]	lin	PDMS	SMMC-7721 HL-60 LINCαP	beides	passiv	–	
Zheng <i>et al.</i>	[31]	lin	PDMS	Mikroalgen	n.-adh.	aktiv	–	
Zou <i>et al.</i>	[23]	lin	PDMS	LCSC	adh.	passiv	–	$0,3 \times 0,2 \text{ cm}^2$

einen großen Bereich abdeckt, integriert werden sollen, um die Wechselwirkung verschiedener chemischer Komponenten auf Zellen analysieren zu können. Dadurch sollen komplexe *in vitro*-Tests vereinfacht werden. Außerdem soll der Chip ein breites Einsatzgebiet abdecken.

### 1.3.2 Anforderungen

Der Chip soll die Kultivierung von adhärennten und nicht-adhärennten Zellen unter definiert abgestuften Umgebungsbedingungen für mehrere Tage und mit kontinuierlicher Mediumzufuhr erlauben, weshalb chemikalienbeständige, formstabile, biokompatible und sterilisierbare Materialien zu verwenden sind. Ein Array von Inkubatorwells (-kavitäten) soll durch ein fluidisches Netzwerk aus Kanälen so verknüpft werden, dass bei gleichen Umgebungsbedingungen (z. B. gleicher Flussrate) unterschiedliche Konzentrationen von Nährstofflösungen oder Testsubstanzen in die einzelnen Wells eingespeist werden können, wobei jedes Well über einen eigenen Ausgang verfügt, um dessen Überstand analysieren zu können. Zusätzlich ist die Möglichkeit einer optischen Kontrolle der Zellen in den Wells wichtig. Aus kommerziellen Gründen ist ein geringer Flächenbedarf pro Chip inklusive Anschlüsse vorteilhaft, um die Verbrauchsmengen kostenintensiver oder seltener Substanzen zu reduzieren. Außerdem soll das Design für die Massenproduktion tauglich sein sowie weitere Funktionen integrierbar bzw. anschließbar sein, so dass der Chip für unterschiedliche Zellen, Tests und Analysen verwendet werden kann.

### 1.3.3 Chipdesign

Im Speziellen wird in der vorliegenden Arbeit ein passives und platzsparendes Design ohne Ventile für Silizium-Glas-Chips vorgestellt. Die Struktur wurde für eine Abdeckung eines weiten Konzentrationsbereichs mit zehn binär-logarithmisch abnehmenden Verdünnungen mit Wirkstoffverhältnissen von  $1/2^m$  ( $m=1, \dots, 10$ ) berechnet. Der Chip deckt mit einer minimalen Verdünnung von  $1 : 1$  ( $\cong 50\%$ ) und einer maximalen von  $1 : 1023$  ( $\cong 0,098\%$ ) einen für biologische Testreihen relevanten Bereich ab [32]. Für andere Anwendungen können nach dem gleichen Prinzip auch Chips für Wirkstoffverhältnisse von  $1/x^m$  mit  $x \neq 2$  hergestellt werden. Für die Analyse können die Zellen direkt im Well mit Hilfe von optischen Mikroskopen untersucht werden. Die Fläche des Chips beträgt inklusive der reversiblen Anschlüsse ca.  $20 \times 32 \text{ mm}^2$ , die der Leiterstruktur auf der Rückseite inklusive Zellwells ca.  $2 \times 20 \text{ mm}^2$ . Das Fluidvolumen des Chips ohne die Anschlüsse entspricht ca.  $5 \text{ }\mu\text{l}$ , wovon in jedem Zellwell ca.  $370 \text{ nl}$  enthalten sind.

## 1.4 Inhalt und Aufbau der Arbeit

Die Grundlagen zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten physikalischen und chemischen Prinzipien der Mikrofluidik und der Siliziumstruktur werden in Kapitel 2 beschrieben. Die Concus-Finn-Bedingung wird an dieser Stelle herausgestellt, da diese in der vorliegenden Arbeit verwendet wird, um die Ursache der Blasenbildung während des Befüllvorgangs des Chips zu untersuchen.

Das Konzept sowie das Prinzip des Chipdesigns, die analytische Berechnung mittels fluidischer Netzwerke und die verschiedenen computergestützten Simulationen werden in Kapitel 3 besprochen. Das Flussfeld, die Druck- und die Konzentrationsverteilung in den Kanälen sowie die Diffusion der Nährstoffe und die Partikelverteilung in den Wells werden simuliert. Danach wird die entwickelte Kompensationsstruktur, welche einen geringen Flächenbedarf aufweist sowie für gegenüberliegende konvexe Ecken ausgelegt ist, erläutert. Ebenso wird auf die verschiedenen Maskendesigns mit unterschiedlichen Ätztiefen eingegangen.

In Kapitel 4 wird die Herstellung der Prototypen aus Silizium und Glas der verschiedenen Designs dargestellt und auf unkonventionelle Methoden, wie z. B. der Zweistufen-Lithographie für unterschiedliche Ätztiefen in Silizium, der elektrochemischen Funkenerodierung von Borsilikatglas und dem Aufbau der reversiblen fluidischen Anschlüsse, eingegangen. Außerdem wird das Spritzgussverfahren besprochen, mit welchem eine Massenproduktion des Chips möglich ist.

Mehrere Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit zur Durchführung der Versuche und der Analysen werden in Kapitel 5 besprochen. Das entscheidende blasenfreie Befüllen des mikrofluidischen Chips wird beschrieben. Einerseits werden verschiedene Siliziumdioxid-Schichten als Kanaloberflächen getestet, da laut Concus-Finn-Bedingung dadurch ein besseres Befüllverhalten erreicht werden kann, andererseits wird der Chip mit einer modifizierten Methode mittels Unterdruckatmosphäre in einem Exsikkator befüllt. Darauf folgen die Konzeption sowie der Aufbau des Messstandes für die Flusstests, das Ermitteln geeigneter Analysemethoden, die den weiten Konzentrationsbereich abbilden können, und die Vorgehensweise für die Zellkultur-Versuche mit HeLa-Zellen.

Die Ergebnisse der hergestellten Chips und der Analysen werden in Abhängigkeit der unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen und Designs in Kapitel 6 diskutiert. Zuerst wird auf die Kontaktwinkelmessung der Oberflächen und die Kompensationsstrukturen eingegangen. Vor den Chipanalysen werden die Defekte gezeigt, die zum Ausschluss eines Chips führen. Danach wird der Machbarkeitsnachweis (*Proof of Concept*) der Kernfunktionalitäten des mikrofluidischen Chips erbracht. Diese Kernfunktionalitäten setzen sich aus einer einheitlichen Flussrate an den Ausgängen, der Erzeugung einer binär-logarithmischen Konzentrationsreihe und die Durchführbarkeit von HeLa-Zellkulturen zusammen.

In Kapitel 7 sind die wichtigsten Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit und ein Ausblick zu weiterführenden Optimierungsmöglichkeiten und Analysen beschrieben.

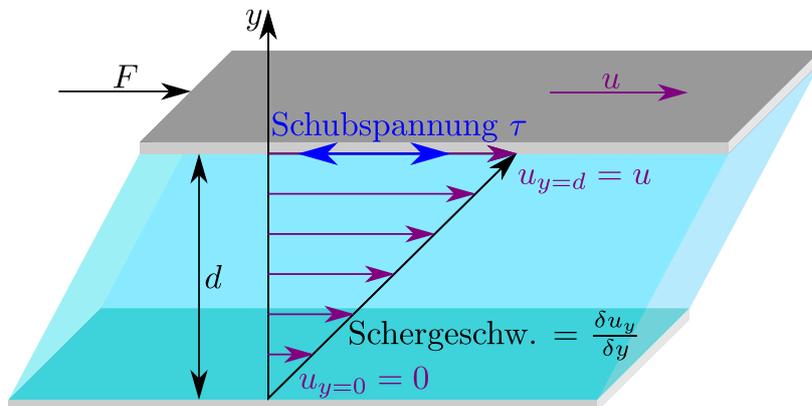
# 2 Theorie

## 2.1 Mikrofluidik

Im Chip werden ein kontinuierliches und stabiles Flussprofil und damit eine präzise Konzentrationsverteilung angestrebt. Aufgrund des passiven Designs ohne Ventile ist beides abhängig von den Kanalgeometrien, den verwendeten Materialien und den Flusseigenschaften der Eingangsflüssigkeiten. Somit ist die Strömungslehre im Mikrometerbereich ein wichtiger Schwerpunkt in der Chipentwicklung. Im Folgenden werden die Strömungsmechanik und die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gleichungen betrachtet. Außerdem werden die Effekte in der Mikrofluidik und die Randbedingungen erläutert.

### 2.1.1 Skalierung

Durch Miniaturisierung eines Systems ändern sich dessen physikalische Eigenschaften. Einige sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Zum Beispiel nimmt das Verhältnis von Oberfläche  $A$  zu Volumen  $V$  mit Verkleinerung der charakteristischen Länge  $L$  zu [33, 34]. Dadurch erhöht sich die Interaktion mit den Kanalwänden und Oberflächeneffekte dominieren in mikrofluidischen Systemen, die Einflüsse von Trägheit und Gravitation nehmen dagegen ab [35].



**Abbildung 2.1:** Laminare Couette-Strömung einer inkompressiblen viskosen Flüssigkeit zwischen zwei Platten. Die untere Platte ist stationär, die obere bewegt sich mit der Geschwindigkeit  $u$ . Die Scherbewegung wird zwischen den Flüssigkeitsschichten aufgrund von intermolekularer Reibung von oben nach unten abgeschwächt. Die Schubspannung  $\tau$  ist proportional zum Gradienten der Schergeschwindigkeit  $\frac{\partial u_y}{\partial y}$  mit der Viskosität  $\mu$  als Faktor.

**Tabelle 2.1:** Bei Miniaturisierung durch Verkleinerung der Länge  $L$  ändern sich die physikalischen Eigenschaften des fluidischen Systems [34, 36–39].

Effekt	Skalierung
Oberfläche $A$	$L^2$
Volumen $V$	$L^3$
$A/V$	$L^{-1}$
Reynolds-Zahl $Re$	$L^2$
Kapillarität	$L^{-1}$
Fluidischer Widerstand $R$	$L^{-3}$
Gravitation / Trägheit	$L^3$
Diffusionszeit $t_D$	$L^2$

### 2.1.2 Strömungsmechanik

Unter dem Begriff Fluide werden Gase und Flüssigkeiten zusammengefasst. Wichtige Eigenschaften von Fluiden sind die Dichte und die Viskosität. Die Viskosität  $\mu$  wirkt einer Scherbewegung aufgrund von intermolekularer Reibung entgegen [38]. Befindet sich eine Flüssigkeit zwischen zwei Platten, von denen sich die obere mit der Geschwindigkeit  $u$  bewegt, dann gibt die Flüssigkeit der Scherbewegung nach und in ihrem Innern gleiten einzelne Schichten übereinander, wie in Abb. 2.1 zu sehen ist. Dabei ist die Schubspannung  $\tau$  proportional zum Gradienten der Schergeschwindigkeit  $\frac{\partial u_y}{\partial y}$  mit der Viskosität  $\mu$  als Faktor:

$$\tau = \mu \frac{\partial u_y}{\partial y}. \quad (2.1)$$

Flüssigkeiten haben eine höhere Viskosität als Gase, da die Flüssigkeitsmoleküle einen geringeren Abstand zueinander haben und deshalb stärker miteinander wechselwirken [39]. Die Moleküle bilden eine Nahordnung aus. Bei Erwärmung entfernen sich die Moleküle voneinander und die Viskosität nimmt mit steigender Temperatur ab [40]. Die Viskosität von Wasser bei 20 °C beträgt z. B. 1,002 mPa s, während sie bei 40 °C bei 0,653 mPa s liegt [39, 41].

Aufgrund ihrer Viskosität werden Fluide unterteilt in Newtonsche Fluide, welche eine konstante Viskosität haben, und Nicht-Newtonsche Fluide, deren Viskosität mit der Schergeschwindigkeit variiert [35, 39]. Flüssigkeiten können im Gegensatz zu Gasen in vielen Fällen als inkompressibel angesehen werden [33, 39, 42], d. h. die Dichte bleibt bei konstanter Temperatur trotz äußerer Druckänderung konstant. Die Dynamik von Newtonschen Flüssigkeiten wird durch die Navier-Stokes-Gleichungen beschrieben, die sich aus der Impuls-, der Massen- und der Energieerhaltung zusammensetzen [35, 42].

Die Impulsgleichung wird mit Hilfe des zweiten Newtonschen Gesetzes gebildet [35]:

$$F = \dot{p} = ma, \quad (2.2)$$

mit der Kraft  $F$ , der zeitlichen Ableitung des Impulses  $p$ , der Masse  $m$  und der Beschleunigung  $a$ . Für inkompressible Flüssigkeiten bei konstanter Temperatur ergibt sich für die Impulsbilanz eines Fluidelements:

$$\rho \left( \underbrace{\frac{\partial \vec{v}}{\partial t}}_{\text{lokal}} + \underbrace{(\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v}}_{\text{konvektiv}} \right) = \underbrace{-\nabla p}_{\text{Druckgradient}} + \underbrace{\mu \nabla^2 \vec{v}}_{\text{Reibung}} + \underbrace{\rho \vec{g}}_{\text{Gravitation}} \quad [33, 35], \quad (2.3)$$

mit der Dichte  $\rho$ , der Geschwindigkeit  $\vec{v}$ , der Zeit  $t$ , dem Druck  $p$ , der dynamischen Viskosität  $\mu$  und der Erdbeschleunigung  $\vec{g}$ . Sie sagt aus, dass die Änderung des Impulses in einem Teilvolumen der Summe der Kräfte auf dieses Teilvolumen entspricht (linke Seite der Gleichung: die Beschleunigung in einem Punkt  $\frac{\partial \vec{v}}{\partial t}$  bzw. entlang einer Stromlinie  $\vec{v} \cdot \nabla \vec{v}$ ; rechte Seite: die Differenz der Druckkräfte  $\nabla p$ , die Differenz der Reibungskräfte  $\mu \nabla^2 \vec{v}$  und die Gravitationskraft  $\rho \vec{g}$  [33, 43]).

Für die Massenerhaltung bei inkompressiblen Flüssigkeiten ergibt sich die Kontinuitätsgleichung [35]:

$$\nabla \cdot \vec{v} = 0. \quad (2.4)$$

Somit stehen vier Differentialgleichungen zur Bestimmung des Geschwindigkeitsvektors  $\vec{v}$  und des Drucks  $p$  zur Verfügung [43].

Die Impulsgleichung (2.3) kann für den mikrofluidischen Chip in der vorliegenden Arbeit zusätzlich vereinfacht werden, z. B. fallen einerseits aufgrund des stationären Flusses sowohl die zeitliche Ableitung  $\frac{\partial \vec{v}}{\partial t}$  als auch der konvektive Anteil  $(\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v}$  weg [35, 44]. Zum anderen kann, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, die Gravitation vernachlässigt werden und es ergibt sich [35, 44]:

$$0 = -\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{v}. \quad (2.5)$$

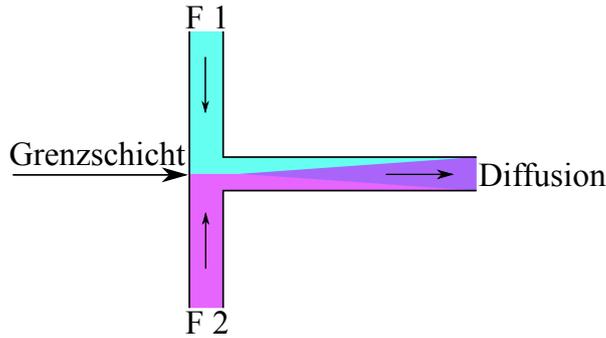
Unter Angabe von Randbedingungen kann dieses Gleichungssystem gelöst werden [45]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Randbedingungen werden in Kapitel 3.3.2 aufgeführt.

### 2.1.3 Laminarer Fluss

Durch Entdimensionierung der Navier-Stokes-Gleichung (2.3) wird die Reynolds-Zahl hergeleitet [35, 39], welche das Verhältnis zwischen den Trägheitskräften in Form des dynamischen Drucks und den viskosen Reibungskräften in Form des Scherstress innerhalb der Flüssigkeit angibt [34]:

$$Re = \frac{\text{dynamischer Druck}}{\text{Scherstress}} = \frac{\rho v_0^2 / L_0}{\mu v_0 / L_0^2} = \frac{\rho v_0 L_0}{\mu}, \quad (2.6)$$

mit der Reynolds-Zahl  $Re$ , der Dichte  $\rho$ , der mittlere Geschwindigkeit  $v_0$ , der charakteristischen Länge  $L_0$  und der dynamischen Viskosität  $\mu$ . Die Trägheitskräfte dominieren den Fluss umso stärker, je größer  $Re$  ist und turbulente Strömungen



**Abbildung 2.2:** Vermischung zweier Flüssigkeiten bei laminarem Fluss durch Diffusion.

können entstehen. Fällt  $Re$  unter einen geometrieabhängigen kritischen Wert  $Re_{krit}$ , der für Rohrströmungen zwischen 2100 und 2300 [33, 46, 47] liegt, dominieren die viskosen Kräfte und die Strömung ist laminar. Dabei kreuzt ein Partikel in der Flüssigkeit nie den Strömungspfad eines anderen Teilchens [42] und ein zum Fluss senkrecht ausgerichteter Stofftransport entsteht ausschließlich aufgrund von Diffusion [35]. Mit Hilfe der Reynolds-Zahl ist also auch eine Aussage über das Verhältnis von konvektivem zu diffusivem Stofftransport möglich [35]. In der Mikrofluidik ist die Reynolds-Zahl wegen der geringen charakteristischen Länge (Breite)  $L_0$  der Kanäle und der geringen Geschwindigkeit  $v_0$  meistens sehr klein und weit unterhalb  $Re_{krit}$ , so dass sich keine Turbulenzen ausbilden können. Wie bereits in Kapitel 2.1.1 beschrieben, dominieren bei Mikrosystemen die Oberflächeneffekte, während der Einfluss der Trägheit, der zu Turbulenzen führt, abnimmt. Somit stellt sich ein laminarer Fluss ein. Bei einer druckgetriebenen, voll entwickelten, laminaren Strömung ist die Geschwindigkeitsverteilung in einem zylindrischen Rohr parabolisch, wobei die Geschwindigkeit Null an der Oberfläche des Rohres als typische Randbedingung angenommen wird [39].

### 2.1.4 Diffusion

In laminaren Strömungen mischen sich Flüssigkeiten nur durch Diffusion, da keine Konvektion quer zum Kanal stattfindet (Abb. 2.2). Dabei werden Konzentrationsunterschiede verschiedener Substanzen mit der Zeit ausgeglichen. Dieser irreversible Prozess beruht auf der ungerichteten thermischen Bewegung der Flüssigkeitsmoleküle [39], welche nach ihrem Entdecker im Jahr 1827 als Brownsche Molekularbewegung bezeichnet wird [48]. Bei ungleichmäßiger Verteilung bewegen sich statistisch mehr Moleküle in Richtung der niedrigeren Konzentration. Mit der Zeit wird im betrachteten Volumen eine konstante mittlere Konzentration erreicht [46].

Die Diffusionszeit  $t_D$  in mikrofluidischen Kanälen ist wesentlich kürzer als im Makrobereich, wie in folgender Gleichung zu erkennen ist:

$$t_D = \frac{L_D^2}{6D_{iff}} [39]. \quad (2.7)$$

Für Fluorescein mit der Diffusionskonstante  $D_{iff} = 3 \cdot 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$  [35, 48] ergibt sich z. B. bei einer Diffusionslänge  $L_D$  über die Kanalbreite mit 1 mm ein Wert von 555,6 s und reduziert sich auf 5,6 s bei einer Kanalbreite von 0,1 mm. Für größere Moleküle kann die Diffusionszeit auch Minuten oder Stunden betragen [39]. Die reine Diffusion wird durch die Fickschen Gesetze beschrieben. Zusätzlich entsteht durch das Pumpen der Flüssigkeit erzwungene Konvektion längs der Kanäle. Die Flussdichte  $\vec{J}$  in der Gleichung (2.10) setzt sich somit aus dem diffusiven (2.8) und dem konvektiven (2.9) Term zusammen [38]. Durch Ableitung der Gleichung (2.10) und Einsetzen in die Kontinuitätsgleichung (2.11) leitet sich die Konvektions-Diffusions-Gleichung (2.12) her [38, 48], die auch bei den numerischen Simulationen in Kapitel 3.3.2 verwendet wird:

$$\text{1. Ficksches Gesetz} \quad \vec{J} = -D_{iff} \nabla c, \quad (2.8)$$

$$\text{Konvektion} \quad \vec{J} = \vec{v}c, \quad (2.9)$$

$$\text{Gesamte Flussdichte} \quad \vec{J} = \vec{v}c - D_{iff} \nabla c, \quad [38], \quad (2.10)$$

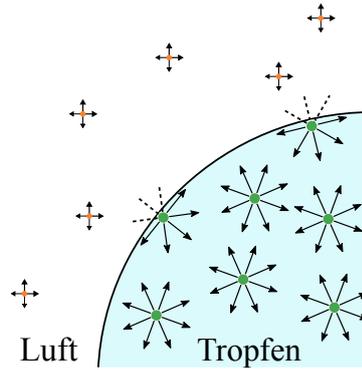
$$\text{Kontinuitätsgl.} \quad \frac{\partial c}{\partial t} = -\nabla \vec{J}, \quad (2.11)$$

$$\text{Konvektions-Diffusions-Gl.} \quad \frac{\partial c}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla c = D_{iff} \nabla^2 c + r(\vec{x}, t) \quad [38, 48], \quad (2.12)$$

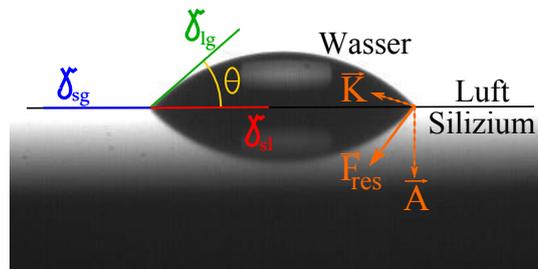
mit der Konzentration  $c(\vec{x}, t)$ , der Flussgeschwindigkeit  $\vec{v}$ , der Diffusionskonstante  $D_{iff}$  und einer Quelle bzw. Senke  $r(\vec{x}, t)$  für die Teilchen.

### 2.1.5 Benetzbarkeit

Moleküle innerhalb einer Flüssigkeit ziehen sich aufgrund von Kohäsionskräften gegenseitig an. Dadurch wird die Flüssigkeit zusammengehalten [42]. Auf ein Molekül in der Mitte der Flüssigkeit (Abb. 2.3), welches komplett von Nachbarmolekülen umgeben ist, wirken diese Kräfte isotrop von allen Seiten. Ein Molekül an der Grenzfläche zu Luft hat hingegen weniger Nachbarmoleküle und die von den Gasmolekülen wirkenden Kräfte sind gering. Die daraus resultierende Nettokraft auf das Molekül ziehen es in Richtung Flüssigkeit [34, 35]. Die Bildung einer Oberfläche benötigt also Energie, weshalb eine kleinstmögliche Oberfläche, wie z. B. bei einem Wassertropfen, energetisch am günstigsten ist [35, 39]. In Tabelle 2.2 werden Werte für die Oberflächenspannung von Wasser an Luft aufgeführt, die mit der *Pendant-Drop*-Methode bestimmbar sind. Befindet sich dieser Tropfen auf einer festen Oberfläche, konkurrieren Adhäsionskräfte, die von den Feststoffmolekülen auf die Flüssigkeitsmoleküle wirken, mit den Kohäsionskräften innerhalb der Flüssigkeit. Ist die Adhäsion größer als die Kohäsion, wird die Substratoberfläche von der Flüssigkeit benetzt [42]. Ein Kontaktwinkel  $\theta$  ausgehend von der Kontaktlinie zwischen Tropfen und Oberfläche bildet sich aus, wie in Abb. 2.4 dargestellt. Er ist temperaturabhängig [39, 42] und charakteristisch für die drei beteiligten Phasen, wenn sich die Kräfte durch die



**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung von Molekülen an der Grenzfläche Wasser/Luft. Im Tropfen wechselwirken die Moleküle in alle Richtungen mit ihren Nachbarmolekülen. An der Grenzfläche fehlen Nachbarn, wodurch die Kräfte asymmetrisch auf das Molekül wirken. Die Ausbildung einer Grenzfläche benötigt also Energie und wird deshalb minimiert (in Anlehnung an [39, 49]).



**Abbildung 2.4:** Wasser benetzt Silizium unter Bildung des Kontaktwinkels  $\theta$ , da die Adhäsion zum Substrat größer ist als die Kohäsion innerhalb der Flüssigkeit.

Grenzflächenspannungen im Gleichgewicht befinden. Für diesen Fall gilt die Youngsche Gleichung (2.13):

$$\gamma_{sl} + \gamma_{lg} \cos\theta = \gamma_{sg}, \quad (2.13)$$

d. h. die Grenzflächenspannung fest/flüssig  $\gamma_{sl}$  zusammen mit der Richtungskomponente der Grenzflächenspannung flüssig/gasförmig  $\gamma_{lg}$  entsprechen der Oberflächenspannung fest/gasförmig  $\gamma_{sg}$  [46]. Die Flüssigkeit benetzt das Substrat für  $0^\circ < \theta < 90^\circ$ . Für  $90^\circ < \theta < 180^\circ$  gilt die Flüssigkeit als nicht benetzend. Das Substrat wird dementsprechend bei Wasser als hydrophil bzw. als hydrophob bezeichnet [35]. Je rauer eine Oberfläche ist, desto stärker wird der jeweilige Effekt [35]. Einige relevante Kontaktwinkel werden in Tabelle 2.2 genannt.

### 2.1.6 Concus-Finn-Effekt

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kanäle haben hauptsächlich drei- oder viereckige Querschnittsflächen, weshalb das Ausbreitungsverhalten von

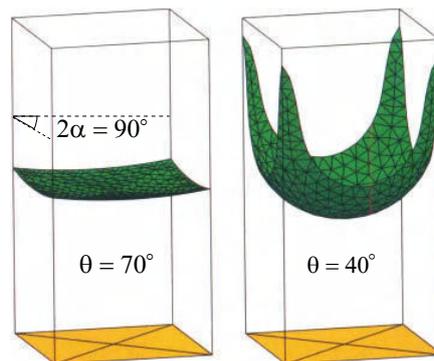
**Tabelle 2.2:** Einige Werte für Oberflächenspannungen  $\gamma_{lg}$  und Kontaktwinkel  $\theta$  an Luft und bei 20 °C.

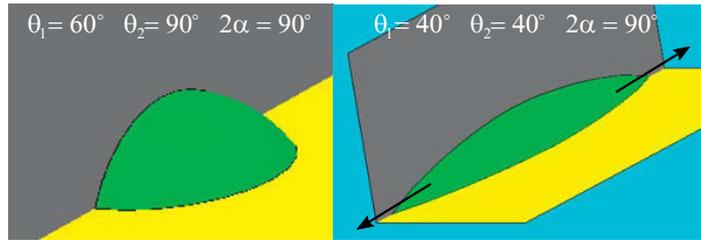
$\gamma_{\text{Wasser}}$	72,8 mN/m	[34, 50]
$\gamma_{\text{Ethanol}}$	22,1 mN/m	[34, 49]
$\gamma_{\text{Isopropanol}}$	23 mN/m	[34, 49]
$\gamma_{\text{Aceton}}$	25,2 mN/m	[34, 49]
$\gamma_{\text{Methanol}}$	22,7 mN/m	[34, 49]
$\theta_{\text{Wasser/Si}}$	ca. 90°	[51]
$\theta_{\text{Wasser/nat. SiO}_2 < 100 \text{ \AA}}$	$\leq 40^\circ$	[51, 52]
$\theta_{\text{Wasser/SiO}_2 = 30 \text{ nm}}$	ca. 40°	[52]
$\theta_{\text{Wasser/SiO}_2 > 500 \text{ nm}}$	ca. 50°	[39, 52, 53]
$\theta_{\text{Wasser/Glas}}$	25°	[39]

Flüssigkeiten in Ecken genauer betrachtet wird. Der Concus-Finn-Effekt besagt, dass sich Flüssigkeiten aufgrund der erhöhten Kapillarkräfte in Kanalecken weiter ausbreiten können [34]. In Abb. 2.5 ist dieser Effekt dargestellt. Ein Tropfen läuft in der Ecke breiter auseinander, wenn bei hydrophilen Oberflächen die von Concus und Finn aufgestellte Bedingung

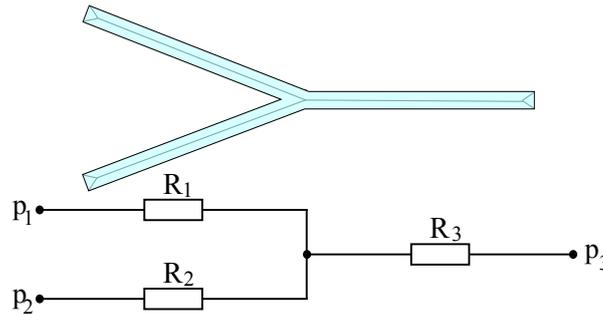
$$\theta < \frac{\pi}{2} - \alpha \quad (2.14)$$

für das Auftreten dieser kapillaren Bewegung in Ecken mit dem Winkel  $2\alpha$  in Abhängigkeit des Kontaktwinkels  $\theta$  erfüllt wird [34]. Da die Siliziumkanäle bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chip durch einen Glasdeckel verschlossen werden, liegen in einigen Ecken zwei unterschiedliche Kontaktwinkel an der Flüssigkeit an, wie es in Abb. 2.6 zu sehen ist. Für diesen Fall hat Brakke

**Abbildung 2.5:** Wasseroberfläche in einem Mikro-Becherglas mit Eckwinkeln  $2\alpha = 90^\circ$ : Das Wasser wird in den Ecken hochgezogen, wenn der Kontaktwinkel  $\theta$  unter dem in diesem Fall gültigen Concus-Finn-Grenzwert von  $45^\circ$  liegt (bearbeitet aus [49]).



**Abbildung 2.6:** Ein Tropfen läuft aufgrund von Kapillarkräften in einer Ecke breiter auseinander, wenn die Kontaktwinkel  $\theta_1$  und  $\theta_2$  die von Brakke erweiterte Concus-Finn-Bedingung erfüllen [54].



**Abbildung 2.7:** Bei dem fluidischen Netzwerk werden analog zum elektrischen Netzwerk die Kanäle durch drei Widerstände  $R$  mit anliegenden Drücken  $p$  dargestellt.

eine erweiterte Bedingung für die Bewegung der Flüssigkeit entwickelt [49]:

$$\frac{\theta_1 + \theta_2}{2} < \frac{\pi}{2} - \alpha. \quad (2.15)$$

Diese Eigenschaft von Flüssigkeiten beeinflusst die Blasenbildung beim Befüllen des mikrofluidischen Chips und wird in Kapitel 5.1 beschrieben.

### 2.1.7 Hydrodynamische Netzwerke

Die gewünschten Strömungen bei ventillosen Systemen werden durch die fluidischen Kanalwiderstände bestimmt. Diese müssen beim Chipdesign in Form von Kanalparametern, wie zum Beispiel Höhe, Breite und Länge, genau bestimmt werden. Für die Berechnung können fluidische Netzwerke analog zu elektrischen Netzwerken in Ersatzschaltungen dargestellt (Abb. 2.7) und die nötigen Kanalwiderstände ermittelt werden [32, 55]. Dabei korrelieren beim Ohmschen Gesetz

$$R = \frac{\Delta U_e}{I_e} \hat{=} \frac{\Delta p}{I_m} \quad (2.16)$$

die fluidischen Größen mit den elektrischen wie folgt: die Druckdifferenz  $\Delta p$  über einen Kanal entspricht der Spannungsdifferenz  $\Delta U_e$ , der Massenfluss  $I_m$  dem elektrischen Strom  $I_e$  und der Flusswiderstand  $R$  dem elektrischen Widerstand [56]. In Tabelle 2.3 sind die Maßeinheiten der fluidischen Variablen

**Tabelle 2.3:** Maßeinheiten der fluidischen Variablen [38].

$R$	$p$	$I_m$
$(ms)^{-1}$	$\frac{kg}{s^2m}$	$\frac{kg}{s}$

aufgelistet. Für die Ersatzschaltung werden den Voraussetzungen entsprechend fluidische Widerstände, Kapazitäten (Kompressibilität, z. B. eine Luftblase) und Induktivitäten definiert. Mit Hilfe der Kirchhoffschen Regeln können das fluidische Netzwerk analysiert und benötigte Widerstandswerte berechnet werden. Die Regeln unterteilen sich in zwei Sätze: Die Summe aller Massenströme an einem Knoten ist gleich Null und die Summe aller Spannungen in einer geschlossenen Masche ist gleich Null [38, 55]. Daraus ergeben sich die nötigen Kanalwiderstände für den Chip, aus welchen wiederum die Kanalparameter berechnet werden, um die vorgegebenen Flüsse zu erhalten.

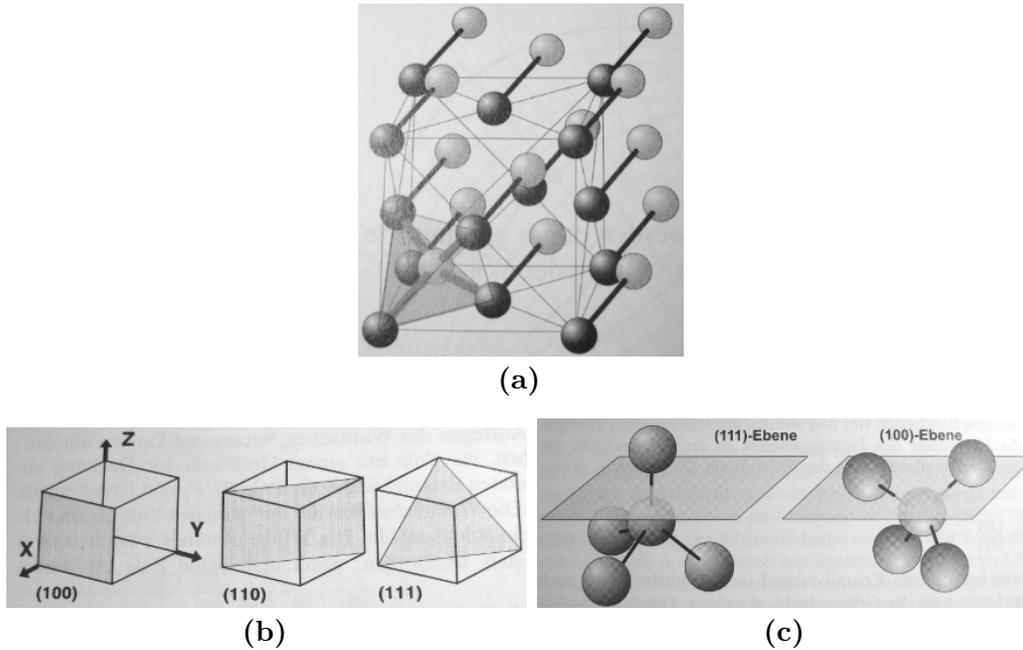
Für laminare Flüsse wird der fluidische Widerstand  $R_{lam}$  für unterschiedliche Kanalgeometrien wie folgt beschrieben [55, 57]:

$$R_{lam} = C_R \frac{\mu l}{\rho A^2}, \quad (2.17)$$

wobei  $\mu$  die dynamische Viskosität,  $\rho$  die Dichte,  $l$  die Kanallänge und  $C_R$  der Widerstandsfaktor der Querschnittsfläche  $A$  des Kanals ist. Einige Werte für  $C_R$  sind in Tabelle 2.4 angegeben. Die Berechnung von  $C_R$  für Kanäle mit einem gleichschenkligen Dreieck mit einem Basiswinkel von  $54,74^\circ$  als Querschnittsfläche  $A$  mit Umfang  $U$  ist in Anhang A zu finden.

**Tabelle 2.4:** Einige Werte für den Widerstandsfaktor für Kanäle verschiedener Querschnittsgeometrien [55, 57, 58].

Querschnittsgeometrie	$C_R$
Rund	$8\pi = 25,13$
Rechteck $B = \frac{h}{b}$	$\frac{2}{B} \left( \sum_{i=1}^{\infty} \frac{B}{\alpha_i^5} \left( \frac{\alpha_i}{B} - \tanh \frac{\alpha_i}{B} \right) \right)^{-1}$
KOH geätztes Dreieck	$35,12$
KOH geätztes Trapez $C = \frac{T}{\frac{(b_1+b_2)}{2}}$	$\frac{12 - 1,38C + 4C^2}{C - 0,85C^2 + 0,28C^3}$



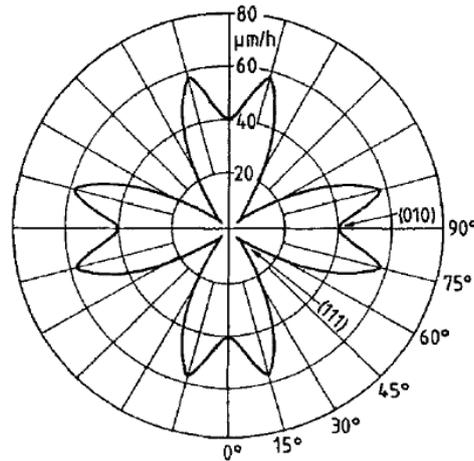
**Abbildung 2.8:** a) Elementarzelle des Si-Kristalls: die Diamantgitterstruktur. Unten links ist die tetraedrische Bindung eines Zentralatoms mit vier Nachbaratomen eingezeichnet; b) Die drei wichtigsten Si-Kristall-Ebenen:  $\{100\}$ ,  $\{110\}$ ,  $\{111\}$ ; c) Beim Ätzen von Si-Atomen an der Oberfläche einer  $\{100\}$ -Ebene müssen nur zwei Bindungen zum Kristallinneren aufgelöst werden, während bei der  $\{111\}$ -Ebene drei Bindungen aufgebrochen werden müssen. Deshalb werden  $\{111\}$ -Ebenen langsamer geätzt. Alle Abbildungen entnommen aus [59].

## 2.2 Silizium

Silizium ist das am häufigsten verwendete Substratmaterial in der Mikrosystemtechnik und entfaltet seine vollen Vorteile insbesondere dann, wenn elektrische Funktionen (z. B. zur Signalauslesung) integriert werden. In der Mikrofluidik werden neben Silizium auch häufig Polymere (z. B. PDMS) als Substrate verwendet, da sie bei größerem Flächenbedarf preisgünstiger sein können. Im vorliegenden Fall ist es vorteilhaft, Silizium als Substrat zu verwenden, da damit das Potential der kristallographisch anisotropen Ätztechnik für die schwierige Dimensionierung des fluidischen Netzwerkes voll genutzt und somit der Flächenbedarf minimiert werden kann. In diesem Abschnitt wird auf die Besonderheit der Si-Kristallstruktur, das nasschemische Ätzen und die während der Herstellung benötigten Kompensationsstrukturen eingegangen.

### 2.2.1 Kristallstruktur

Silizium kommt als Festkörper in unterschiedlichen Formen vor: monokristallin, polykristallin und amorph. Bei amorphem Silizium sind die Atome ohne erkennbare Fernordnung angeordnet. Das polykristalline Silizium setzt sich aus vielen ein-

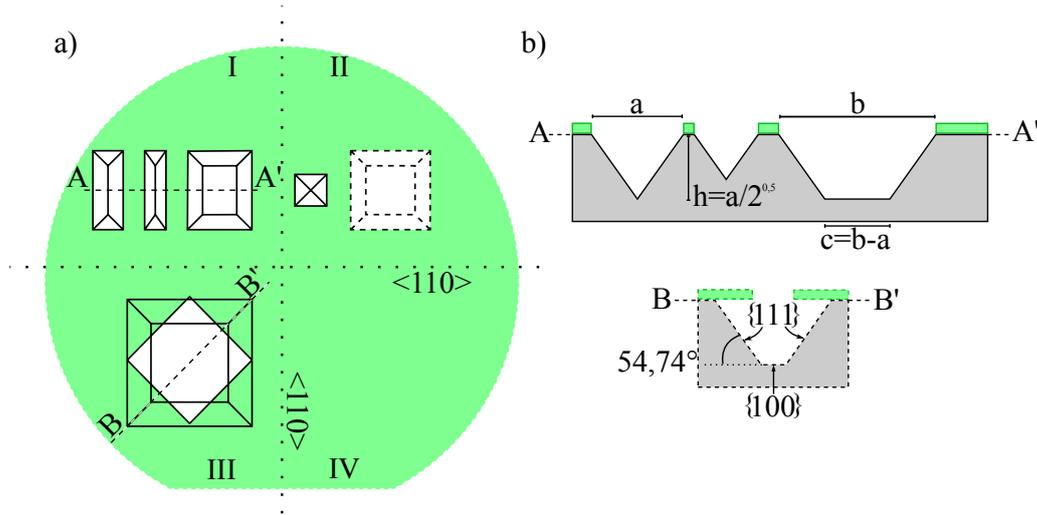


**Abbildung 2.9:** Ätzraten der unterschiedlichen Ebenen eines  $\{100\}$ -Wafers in 50%iger KOH bei  $78^\circ\text{C}$  [1].

zelen Kristallen zusammen, wohingegen sich monokristallines Silizium homogen aus streng periodisch angeordneten Atomen zusammensetzt, dessen Elementarzelle aus einer Diamantgitterstruktur mit tetraedrisch angeordneten kovalenten Bindungen jedes Atoms zu seinen vier Nachbarn besteht [35, 60] (Abb. 2.8a). Dabei sind zwei flächenzentrierte kubische Gitter zueinander um  $\frac{z}{4}$  verschoben, wobei  $z$  die Kantenlänge des Würfels ist [59]. Die drei wichtigsten Gitterebenen für die Chipherstellung sind die  $\{100\}$ -,  $\{110\}$ - und  $\{111\}$ -Ebenen, welche in Abb. 2.8b dargestellt sind. Je nach Kristallausrichtung wirken auf die Atome einer freien Siliziumoberfläche unterschiedliche Bindungskräfte. Wie in Abb. 2.8c zu sehen ist, haben Siliziumatome an der Oberfläche von  $\{100\}$ -Ebenen nur zwei Bindungen zum Kristallinneren, während die der  $\{111\}$ -Ebenen drei Bindungen haben [59] und eine höhere atomare Dichte aufweisen [35]. Daraus ergeben sich eine höhere erforderliche Energie zum Herauslösen eines Atoms im Gegensatz zu anderen Ebenen [61] und folglich unterschiedliche Eigenschaften während des nasschemischen Ätzens [62].

### 2.2.2 Nasschemisches Ätzen von Silizium

Beim nasschemischen Ätzen wird in einer basischen oder sauren Lösung Material von der Substratoberfläche durch chemische Reaktionen zwischen den Oberflächen- und den Ätzmedium-Atomen abgetragen [63]. Diese Reaktionen können isotrop oder anisotrop erfolgen, also unabhängig bzw. abhängig von der Kristallorientierung [63]. Beide in der vorliegenden Arbeit angewandten und im Folgenden erläuterten Methoden beruhen auf einer basischen Lösung und ätzen bei Silizium anisotrop, d. h. die Ätzraten (Materialabtrag je Zeiteinheit) für unterschiedliche Orientierungen des Si-Kristalls sind verschieden. In Abb. 2.9 und Tabelle 2.5 sind einige Ätzraten dargestellt. Die dichter gepackten  $\{111\}$ -Ebenen begrenzen die Ätzstrukturen, da der Energiebedarf zum Auslösen der Atome hö-



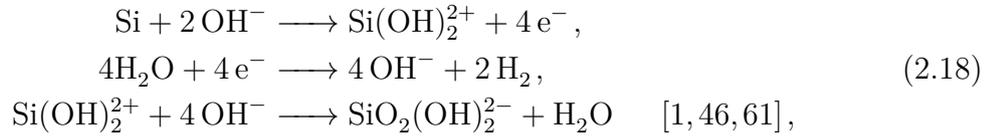
**Abbildung 2.10:** Strukturen nach anisotropem Ätzen eines (100)-Wafers. Je nach Ätztiefe entstehen V-Gräben, Pyramiden oder Kegelstümpfe; weiß: geätztes Si; grün: Maskierung. a) *I*: Strukturen durch zum Flat ausgerichtete, rechteckige Maskenöffnungen; *II*: wie bei *I* mit quadratischen Maskenöffnungen, *III*: Unterätzung der Maske aufgrund ungenauer Ausrichtung der Strukturen zur  $\langle 110 \rangle$ -Richtung; b) Querschnitte durch den geätzten Wafer mit Maskierung.

her und damit die Ätzrate niedriger ist. Sie werden deshalb als Ätzstopp-Ebenen bezeichnet. Im Vergleich dazu ätzen die  $\{100\}$ -Ebenen wesentlich schneller. Der Winkel zwischen diesen beiden Ebenen beträgt  $\alpha_{KOH} = 54,74^\circ$  und bestimmt beim (100)-Wafer die realisierbaren Strukturen. Je nach Maskenöffnung und Ätztiefe sind beim  $\{100\}$ -Wafer Kegelstümpfe, Pyramiden, Trapezformen oder V-Gräben mit Kanten in  $\langle 110 \rangle$ -Richtung möglich (Abb. 2.10). Bei der Designerstellung sind sowohl die selbst begrenzte Tiefe der Strukturen als auch die Unterätzung an Kanten und an konvexen Ecken zu berücksichtigen. Um die zu ätzenden Strukturen genau kontrollieren zu können, ist eine exakte Positionierung der geöffneten Maskenstrukturen zur Si-Orientierung in  $\langle 110 \rangle$ -Richtung notwendig, da die Maske ansonsten unterätzt wird, wie in Abb. 2.10 III dargestellt ist. Eine ständige Kontrolle der Ätzrate ist wichtig, da diese zusätzlich zur Kristallorientierung auch vom Ätzmedium, der Temperatur, der Konzentration, der Si-Dotierung und Lösungszusätzen abhängt. Aufgrund ihrer guten Selektivität gegenüber den beiden Ätzlösungen können sowohl Siliziumnitrid  $\text{Si}_3\text{N}_4$  als auch mit Einschränkungen Siliziumdioxid  $\text{SiO}_2$  als Ätzmasken verwendet werden.

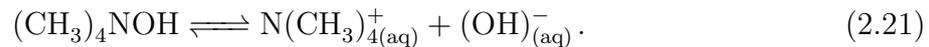
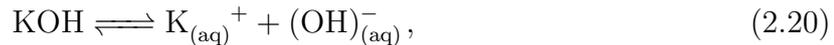
Der Materialabtrag entsteht durch eine Redox-Reaktion, bestehend aus einem Oxidationsschritt des Siliziums und einer Reduktion des Wassers unter Entstehung von freiem Wasserstoff. Die Reaktionsprodukte sind schließlich in der basischen Ätzsubstanz löslich [1, 59].

In den Reaktionsgleichungen (2.18) ist folgendes dargestellt: Zuerst lösen zwei Hydroxidionen  $\text{OH}^-$  aus der Ätzlösung ein an der Kristalloberfläche gebundenes Siliziumatom heraus, das danach aufgrund seiner Ladung noch an der Oberfläche

anlagert. Dabei werden vier Elektronen in den Kristall injiziert. Vier weitere  $\text{OH}^-$ -Ionen, die aus der Reduktion von vier Wassermolekülen unter Aufnahme der vier vorher in den Kristall injizierten Elektronen stammen, lagern sich daran an und bilden dabei sowohl den bei hohen pH-Werten löslichen Komplex  $\text{SiO}_2(\text{OH})_2^{2-}$  als auch den gasförmigen Wasserstoff  $\text{H}_2$  unter Blasenbildung [60, 61]. Daraus ergibt sich für den gesamten Ätzzvorgang die Reaktionsgleichung (2.19):



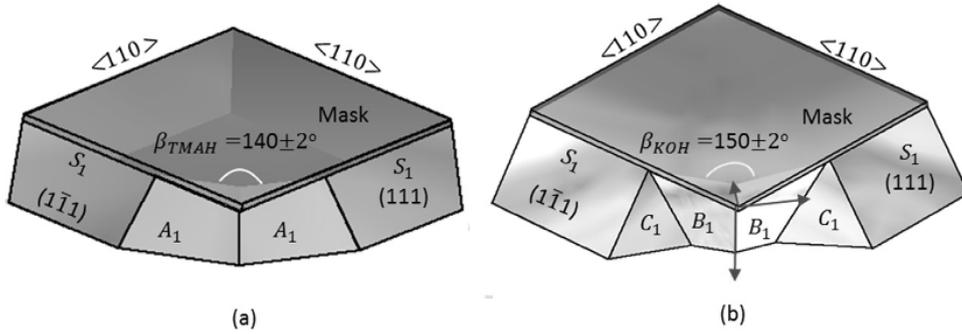
In der vorliegenden Arbeit werden zwei unterschiedliche Lösungen zum anisotropen Ätzen von Silizium verwendet. Kaliumhydroxid (KOH) ist eine anorganische, Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH,  $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ ) eine organische alkalische Ätzlösung. Die Gleichungen (2.20) und (2.21) zeigen jeweils die Dissoziation von KOH und TMAH, wodurch die zum Ätzen nötigen Hydroxidionen zur Verfügung gestellt werden:



In Tabelle 2.5 sind verschiedene Ätzraten von KOH und TMAH aufgelistet. Die Ätzrate bei TMAH in  $\langle 100 \rangle$ -Richtung ist wesentlich niedriger als bei KOH, genau wie das Ätzratenverhältnis von  $\{100\}$  zu  $\{111\}$ . Dies weist auf eine geringere Selektivität zwischen den Ebenen hin [61, 75]. Nachteilig bei TMAH ist die vermehrte Bildung von pyramidenförmigen Ätzhügeln (*hillocks*) auf

**Tabelle 2.5:** Vergleich der Ätzraten und -verhältnisse von KOH und TMAH mit Triton-X-100. Die linken Werte entsprechen jeweils Auswertungen eigener Messungen, die rechten entsprechen Literaturwerten unter vergleichbaren Umgebungsbedingungen.

Ätzrate	KOH		TMAH	TMAH + Triton-X-100	
	40 %, 85 °C	40 - 45 %, 85 °C	25 %, 85 °C	25 %, 90 °C	25 %, 80 °C
$\{100\} / \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$	1 - 1,12	1 - 1,6 [1, 64]	ca. 0,8 [65]	0,6 - 0,77	ca. 0,43 [66]
$\{110\} / \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$	2,6 - 2,77	1,9 - 2,8 [1, 64]	1,4 - 1,6 [65]	0,25	ca. 0,08 [66]
$\{111\} / \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$	0,011	0,004 - 0,005 [64]	ca. 0,02 [65]	0,012	
$\{100\} / \{111\}$	90 - 100	300 - 400 [63, 64]	32 [65]	50 - 65	
$\{110\} / \{100\}$	2,3 - 2,77	1,6 - 2,8 [1, 64]	1,75 - 2 [65]	0,3 - 0,4	ca. 0,19 [66]



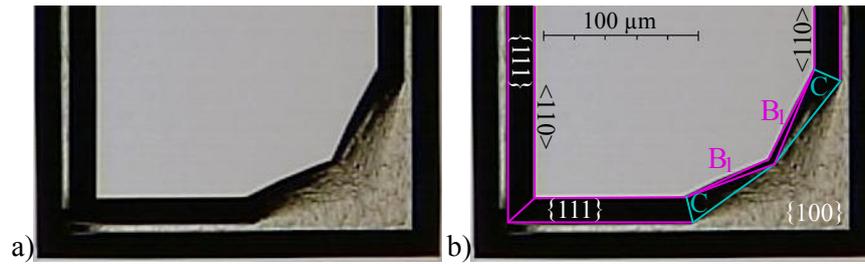
**Abbildung 2.11:** Schematische Darstellung der beteiligten Ebenen und Winkel bei der Unterätzung konvexer Ecken. Bei der Verwendung von TMAH (a) wird die Unterätzung durch glatte Flächen höherer Indizes  $A_1$  mit einem Winkel von  $140^\circ$  zueinander geformt. Bei KOH (b) sind unterschiedlich orientierte Ebenen höherer Indizes  $B_1$  mit einem Winkel von  $150^\circ$  zueinander und rauhen Flächen  $C_1$  an der Unterätzung beteiligt [67].

geätzten Si-Flächen. Dieser Effekt reduziert sich bei Konzentrationen oberhalb von 22 % [75].

Durch die Zugabe von Triton-X-100 (Octoxynol 9,  $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ ,  $n = 9 - 10$  [76]) zu TMAH werden die Ätzraten teilweise stark verändert, da sich die Tensidmoleküle unterschiedlich dicht auf den Oberflächen anlagern, z. B. ist die Schicht auf  $\{110\}$ -Ebenen fast viermal dicker als die auf  $\{100\}$ -Ebenen [66]. Die Ätzrate der  $\{100\}$ -Ebenen ändert sich dadurch kaum, während sich die der  $\{110\}$ -Ebene stark reduziert (Tabelle 2.5), da die Hydroxidionen langsamer zur Si-Oberfläche durchdringen können [60, 76, 77]. Als Konsequenz ist auch die Unterätzung an konvexen Ecken reduziert [77, 78], weshalb bei gleicher Ätztiefe eine kleinere Kompensationsstruktur als bei purem TMAH oder KOH ausreicht. Ein Nachteil ist wiederum die begünstigte Bildung von Ätzhügeln [63] durch eingeschlossene Wasserstoffblasen zwischen der Si-Oberfläche und der Tensidschicht [79].

**Tabelle 2.6:** Vergleich der Literaturwerte für Winkel und Ebenen, die an der Unterätzung konvexer Ecken bei KOH, purem TMAH oder TMAH mit Triton-X-100 beteiligt sind.

	Winkel	Beteiligte Ebenen
KOH (40 %, 85 °C)	$150^\circ$ , $152^\circ$ [67, 68]	$\{310\}$ $\{311\}$ $\{410\}$ $\{411\}$ $\{727\}$ $\{771\}$ [63, 68–72]
TMAH (25 %, 90 °C)		$\{311\}$ $\{211\}$ $\{331\}$ $\{301\}$ [70, 73]
TMAH + Triton-X-100	$140^\circ$ [67]	$\{441\}$ $\{331\}$ $\{221\}$ [74]



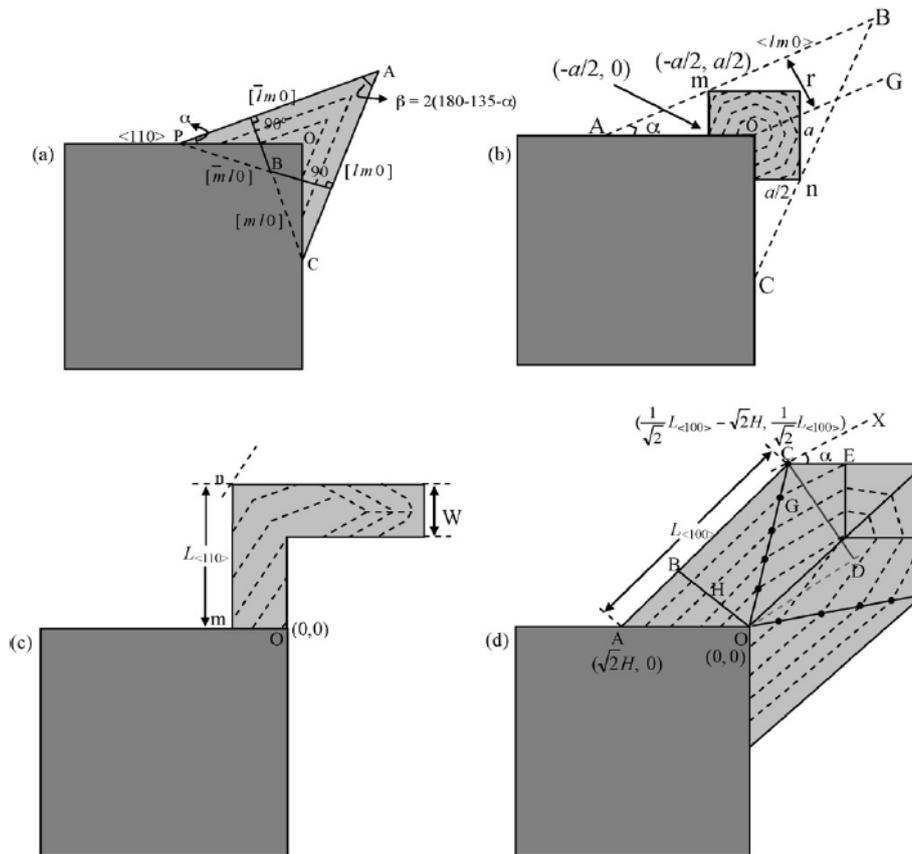
**Abbildung 2.12:** a) KOH-geätzte Struktur; b) Gleiche Struktur mit eingezeichneten Markierungen für die schnell ätzenden Ebenen höherer Indizes  $B_1$ , welche die Unterätzung verursachen, und den rauen Flächen  $C$ . Die linke konvexe Ecke wurde durch Kompensation geschützt, während die rechte Ecke ohne Kompensation unterätzt wurde (in Anlehnung an [80]).

### 2.2.3 Kompensationsstrukturen

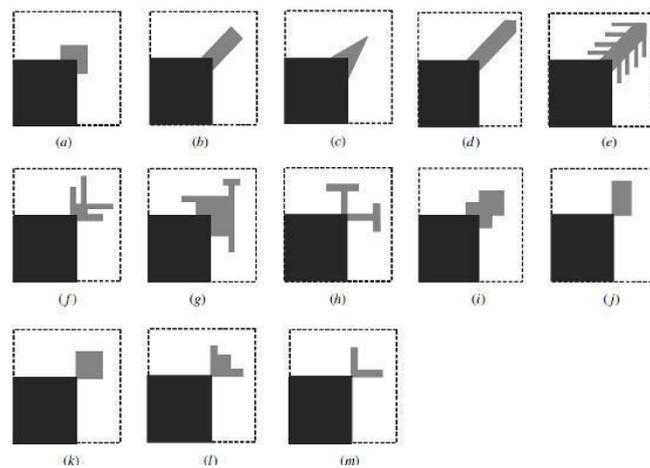
Bei konkaven Maskenöffnungen, wie sie in Abb. 2.10 zu sehen sind, wird der Ätzprozess durch die  $\{111\}$ -Ebenen begrenzt. Im Gegensatz dazu schneiden sich bei konvexen Ecken unterschiedliche höher indizierte Kristallebenen [63], wobei diejenigen mit der größten Ätzrate am schnellsten zurückweichen (Abb. 2.11 und Abb. 2.12). Die Maske wird an diesen Stellen unterätzt und die Ecke abgerundet. In Tabelle 2.6 sind die unterschiedlichen Ebenen aufgelistet, die laut Literatur [67–74] in Abhängigkeit vom Ätzmedium [67, 70] an diesem Prozess beteiligt sein können.

Um exakte konvexe Ecken zu erhalten, wird die Maskenstruktur an diesen Stellen zum Schutz der Ecken während der Ätzzeit vergrößert. Diese speziellen Strukturen heißen Kompensationsstrukturen und setzen sich aus vier Grundformen zusammen, die mit den jeweiligen Ätzfronten in Abb. 2.13 dargestellt sind: Dreiecke, Quadrate,  $\langle 110 \rangle$ - und  $\langle 100 \rangle$ -orientierte Stege. Sie werden so dimensioniert, dass bei Erreichen der gewünschten Strukturtiefe eine konvexe Ecke stehen bleibt, benötigen dafür aber zusätzliche Fläche. Sind die Maskenöffnungen zu klein, um Kompensationsstrukturen darin unterzubringen, ist eine optimale konvexe Ecke nicht realisierbar. Für das den Umständen entsprechend bestmögliche Ergebnis wurden daher von verschiedenen Forschungsgruppen die Grundstrukturen unterschiedlich umgesetzt und kombiniert [70]. Eine Übersicht verschiedener Beispiele wird in Abb. 2.14 gezeigt.

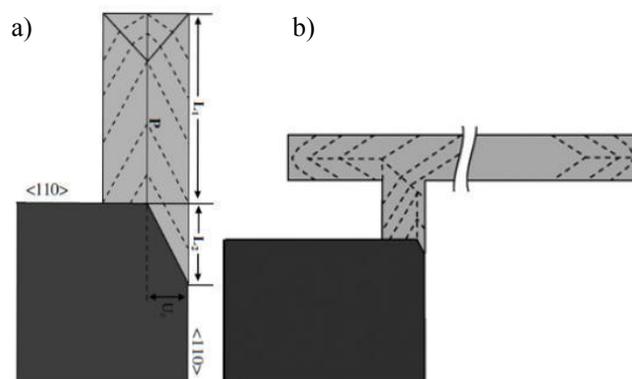
In der vorliegenden Arbeit werden bei besonders schmalen Maskenöffnungen platzsparende Kompensationsstrukturen benötigt, die aus einer Variante von  $\langle 110 \rangle$ -Stegen entwickelt sind (Kapitel 3.4). Wie in Abb. 2.15 eingezeichnet ist, laufen bei einem einfachen  $\langle 110 \rangle$ -Steg die Ätzfronten von den Ecken spitz in Richtung der angestrebten konvexen Ecke. An der einen Seite trifft die Ätzfront auf eine  $111$ -Ebene und stoppt, während die zweite weiter ätzt. Dadurch wird die konvexe Ecke einseitig unterätzt [70, 81]. Durch eine asymmetrische Variante in T-Form kann diese Unterätzung minimiert werden, indem die Ätzfront, die durch die  $111$ -Ebene gestoppt wird, vergrößert wird [70, 81].



**Abbildung 2.13:** Schematische Darstellung der Ätzfronten bei häufig verwendeten Kompensationsstrukturen: (a) Dreieck, (b) Quadrat, (c)  $\langle 110 \rangle$ - und (d)  $\langle 100 \rangle$ -orientierter Steg [78].



**Abbildung 2.14:** Zusammenstellung verschiedener Kompensationsstrukturen, die sich aus den Grundformen zusammensetzen [70].

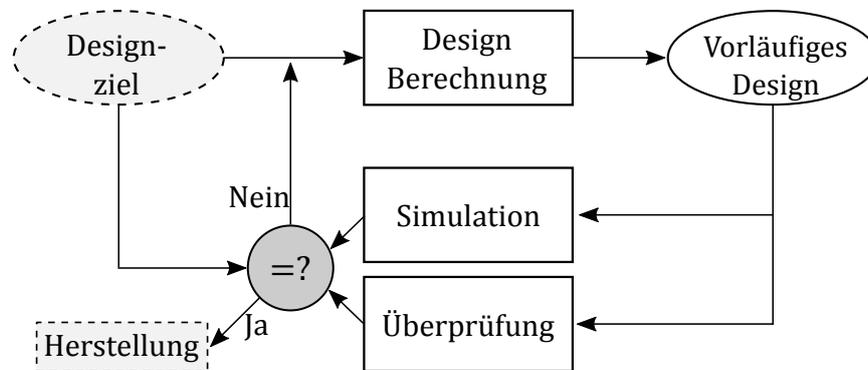


**Abbildung 2.15:** <100>-Stege als Kompensationsstrukturen mit den Ätzfronten; a) Einfacher symmetrischer Steg: die Ecke wird immer einseitig unterätzt [70]; b) Asymmetrischer Steg: die Unterätzung wird minimiert [70, 81].



# 3 Auslegung des mikrofluidischen Chips

Auf dem Weg zum Prototypen müssen das Design und die Modellierung des mikrofluidischen Chips aus den folgenden Teilen entwickelt werden: der analytischen Berechnung, der computergestützten Simulation sowie einem mit dem Herstellungsprozess und den Materialien kompatiblen Maskendesign. Der Ablauf mit den einzelnen Schritten des Entwurfsprozesses ist in Abb. 3.1 dargestellt und wird im folgenden Kapitel für den Chip erläutert. Zum Schluss wird auf die sich daraus ergebenden Designs eingegangen.

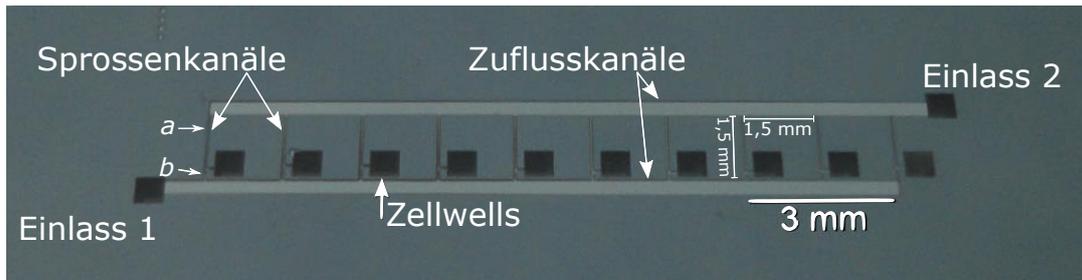


**Abbildung 3.1:** Designentwicklung mittels analytischer Berechnung, Simulationen und Überprüfung der Realisierbarkeit (in Anlehnung an [82]).

## 3.1 Konzept

Ziel des Chips ist eine Vereinfachung komplexer Testprozesse, bei denen viele unterschiedliche Parameter von chemischen Komponenten auf Zellen analysiert werden. Die Integration mehrerer Zellkulturwells auf einem Chip führt zu einer geringeren Kontamination, zu reproduzierbareren Daten und zu einer Zeitersparnis bei den damit durchgeführten Versuchen. Die allgemeinen Anforderungen an den Chip und das System wurden ausführlich in Kapitel 1 dargestellt. Für einen Chip mit binär-logarithmischer Konzentrationsreihe mit zehn Konzentrationen resultieren daraus folgende Designvorschriften für die Kanäle und die Wells:

- Mindestens zwei Eingänge: jeweils einen für die Testsubstanz- und die Pufferlösung



**Abbildung 3.2:** Kanalordnung auf der Chiprückseite: Die Leiterstruktur zur passiven Erzeugung der Verdünnungsreihe mit zwei Zuflusskanälen und zehn unterschiedlich breiten Sprossenkanälen, die zu insgesamt zehn zueinander versetzten Ausgängen mit je einem angeschlossenen Well führen. Die ineinander übergehenden Sprossenkanäle *a* und *b* sind gleich breit, die Sprossenabstände und -längen betragen 1,5 mm (in Anlehnung an [83]).

- Zehn Zellreservoirs (Wells) mit jeweils gleichem Volumenfluss
- Ein Ausgang pro Well
- Minimal mögliche Kanallängen
- Materialien: dreilagiger Stack aus Glas/Si/Glas
- Ventillos

Ein wesentlicher Bestandteil des Chips ist die Rückseite mit der Kanalordnung zur Erzeugung einer Verdünnungsreihe mit zehn Konzentrationen in einem Bereich von 50 % bis 0,098 % binär-logarithmisch abgestuft. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte passive Struktur ähnelt einer Leiter (Abb. 3.2), deren Prinzip in Abb. 3.3 dargestellt ist. Während eines *in vitro*-Tests fließt die Testsubstanz von Einlass 1 über den Zuflusskanal in die unterschiedlich breiten Sprossenkanäle. Gleichzeitig fließt auch die Pufferlösung von Eingang 2 in die Sprossenkanäle und gleicht die Mengendifferenz zum Ausgangsfluss  $I_0$  aus, damit in allen anschließenden Wells die gleichen Umgebungsbedingungen herrschen. So können beide Eingänge für das Einspeisen des Nährmediums während der Zellkultur verwendet werden.

Für eine einfache Herstellung und ein zuverlässiges Flussprofil müssen die zusammenlaufenden Sprossenkanäle, wie z. B. die Kanäle *a* und *b* in Abb. 3.2 und Abb. 3.3, jeweils gleich breit sein. Jede Sprosse wird durch den Ausgang zum Well in unterschiedlichen Verhältnissen aufgeteilt, da die fluidischen Widerstände der Kanäle auch über die Länge variiert werden. Die Abstände zwischen den Sprossen und die Länge jeder Sprosse betragen 1,5 mm, damit je ein quadratisches Zellreservoir mit einer Kantenlänge von 0,6 mm an der Unterseite und einem Volumen von 370 nl realisiert werden kann. Diese Größe ist ein Kompromiss zwischen Platz für die Zellen, geringer Flüssigkeitsmenge und ausreichender Nährstoffzufuhr der Zellen. Diese wird durch die Anordnung der Kanäle sowohl auf der Vorder- als auch auf der Rückseite des Chips begünstigt (Abb. 3.4). Ein zusätzlicher Vorteil der Anordnung ist der Fluss durch das Well, der das Absinken der nicht-adhären Zellen auf den Boden verhindern soll. Um vergleichbare



**Tabelle 3.1:** Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile von Silizium und PDMS.

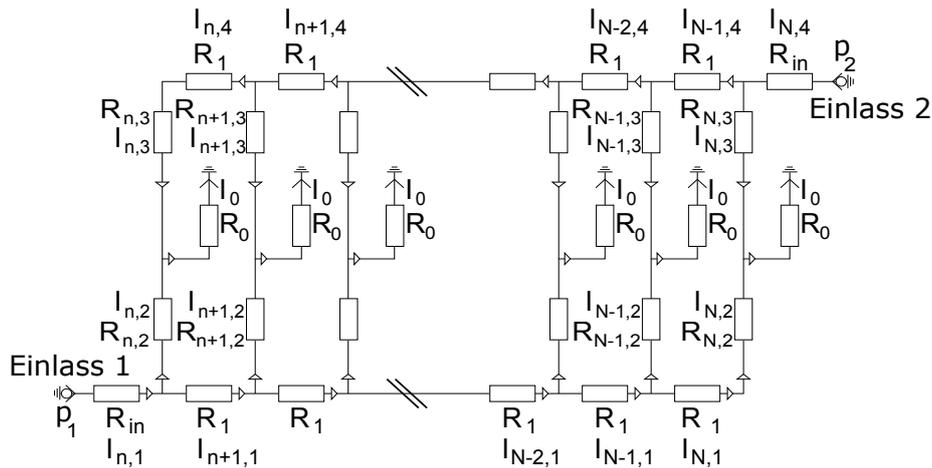
	Silizium	PDMS
Formstabil	✓	-
Sterilisierbar	mit Alkohol	unter UV-Licht
Luftundurchlässig	✓	-
Chemikalienbeständigkeit	✓	-
CO <sub>2</sub> -Zufuhr gewährleistet	✓	✓
Minimale Fläche möglich	✓	-
Hydrophil	✓	-
Herstellungsprozess	aufwendiger	einfacher
Befüllbar ohne Luftblasen	✓	✓
Reversible Anschlüsse	aufwendiger	einfacher

produziert und später Zellen im Well optisch analysiert werden.

Das häufig verwendete Polymer PDMS [9, 84, 85] (Kapitel 1.2) hat für die Verwendung bei diesem Chip gegenüber Silizium mehrere Nachteile: während der Herstellung schrumpft es [85, 86] und bei der Sterilisierung des Chips mit Alkohol für die Zellkultur quillt es auf [84, 87, 88]. Damit sind die Stromverhältnisse im Chip instabil und nur unzureichend vorhersehbar. Außerdem ist PDMS durchlässig für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) [84, 88], wodurch sich einerseits störende Luftblasen im Chip bilden können, andererseits die nötige CO<sub>2</sub>-Zufuhr während der Zellkultur gewährleistet werden könnte. Diese kann jedoch auch durch kontinuierliche Mediumzufuhr im Si-Chip erreicht werden, wenn das Medium vorher mit CO<sub>2</sub> gesättigt wird. Der wesentliche Nachteil von Silizium ist der aufwendigere Bearbeitungsprozess. Durch diesen wird aber anisotropes Ätzen ermöglicht und damit der Flächenbedarf des Chips minimiert. Die Vor- und Nachteile sind in Tabelle 3.1 noch einmal zusammengefasst. Andere Polymere wären aufgrund ihrer Formstabilität zwar als Chipmaterial geeignet, benötigen allerdings das Spritzgussverfahren, das nicht zur Prototypenherstellung geeignet ist. Diese Polymere werden in Kapitel 4.3 besprochen.

Die Si-Kanäle mancher Chips wurden mit einer 100 nm dicken Schicht thermischem Siliziumdioxid (SiO<sub>2</sub>) beschichtet, um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Benetzbarkeit der Oberflächen eine Auswirkung auf das Befüll- und Fließverhalten im Chip hat.

Alle verwendeten Materialien sind biokompatibel und nicht toxisch [89, 90], wobei SiO<sub>2</sub> etwas besser in Tests zu akuten und chronischen Entzündungsreaktionen abschneidet als Silizium [91].



**Abbildung 3.5:** Allgemeines Ersatzschaltbild des fluidischen Netzwerks für den Chip mit der Gesamtanzahl der Verdünnungen  $N$ , dem jeweiligen Verdünnungsschritt ( $m = n \dots N$ ) und der Anfangsverdünnung  $n$ . Die Kanalwiderstände  $R$  lassen sich über die Ströme  $I$  und die Drücke  $p$  mittels Knoten- und Maschengleichungen analog zu elektrischen Netzwerken berechnen (in Anlehnung an [92, 93]).

### 3.3 Modellierung: Fluidik

In einem passiven Chip wird die binär-logarithmische Konzentrationsverteilung durch die definierten Flusswiderstände der Kanäle und damit durch ihre Abmessungen (Breite, Tiefe, Länge, Querschnittsform) bestimmt. Diese Parameter werden für die Leiterstruktur (Abb. 3.2) analytisch mittels Netzwerkanalyse berechnet. Wegen der teuren und zeitaufwendigen Herstellung des Prototyps ist eine vorherige Evaluation der Werte zur Designentwicklung wichtig. In der vorliegenden Arbeit wird eine Kombination von computergestützten Simulationsmethoden auf Systemebene sowie auf physikalischer Ebene verwendet. Bei letzteren werden neben dem Flussfeld, der Druck- und der Konzentrationsverteilung in den Kanälen auch die Diffusion und die Zellverteilung in Form von Partikeln in den Wells betrachtet.

#### 3.3.1 Analytische Berechnung der Konzentrationsreihe

Zur analytischen Berechnung der benötigten Kanalabmessungen wird die in Kapitel 2.1.7 beschriebene Analogie zwischen fluidischen und elektrischen Netzwerken angewendet. Durch die Verwendung von anisotrop mit KOH geätzten Kanälen in Silizium wird die Eigenschaft des Siliziums ausgenutzt, dass sich unterschiedlich breite Kanäle aufgrund des festgelegten Ätzwinkels von  $\alpha_{KOH} = 54,74^\circ$  nach einer ausreichenden Ätzzeit in der Tiefe selbst begrenzen und einen dreieckigen Querschnitt bilden. Somit kann die Kanaltiefe  $T$  durch die Kanalbreite  $b$  des jeweiligen Si-Kanals bestimmt werden. Für den fluidischen Widerstand  $R_{lam}$  von Gleichung (2.17) gilt für diese Kanäle der Widerstandsfaktor  $C_R = 35,12$  (Tabelle 2.4) und ein reziprok proportionales Verhältnis des fluidischen Widerstandes

des Kanals zur Breite  $b$  zur vierten Potenz, wie in Gleichung (3.1) angegeben. Wird die Ätzdauer und damit die Ätztiefe vor der Ausbildung einer Dreiecksstruktur unterbrochen, ergeben sich Kanäle mit trapezförmigem Querschnitt. Deren Widerstand in Gleichung (3.2) wird auch durch Einsetzen der Fläche und des Widerstandsfaktors aus Tabelle 2.4 bestimmt. Bei dreieckigen Kanälen ist der Widerstand hauptsächlich von einer Breitenänderung abhängig, wohingegen er bei Trapezkanälen zusätzlich von der Tiefe  $T$  beeinflusst wird. Letztere sind deshalb schwieriger herzustellen.

$$\text{Dreieck} \quad R_{lam} = 35,12 \cdot \frac{\mu l}{\rho \left( \frac{b^2}{4} \cdot \tan(54,74^\circ) \right)^2}, \quad (3.1)$$

$$\text{Trapez} \quad R_{lam} = \frac{12 - 1,38 C + 4 C^2}{C - 0,85 C^2 + 0,28 C^3} \cdot \frac{\mu l}{\rho \left( \frac{(b_1 + b_2)}{2} T \right)^2}. \quad (3.2)$$

In Abb. 3.5 ist die fluidische Ersatzschaltung zur Berechnung der Struktur für eine Konzentrationsreihe mit  $N$  Verdünnungen veranschaulicht; dabei ist jeder Kanal als elektrischer Widerstand dargestellt. Die Eingangsflüsse werden durch Gleichspannungsquellen mit vorgegebenem konstanten Volumenfluss ausgedrückt, da diese durch Spritzenpumpen kontinuierlich zugeführt werden. Die Ausgänge werden als Erdung angenommen, da sie an Atmosphärendruck angeschlossen sind. Zusätzlich sind die Auslassflüsse  $I_0$  alle gleich. Die Eingangskanäle einerseits und die Ausgangskanäle andererseits haben jeweils die gleichen Flusswiderstände  $R_{in}$  bzw.  $R_0$ . Damit ergeben sich folgende Gleichungen (3.3) für die Flüsse  $I$  in einer Leiterstruktur mit einer binär-logarithmischen Verdünnung:

$$I_{m,1} = I_0 \sum_m^N 2^{-i}, \quad I_{m,2} = I_0 \cdot 2^{-m}, \quad (3.3)$$

$$I_{m,3} = I_0 \left( 1 - 2^{-m} \right), \quad I_{m,4} = I_0 \left( m - \sum_n^m 2^{-i} \right), \quad (3.4)$$

wobei  $N$  der Gesamtanzahl der Verdünnungen,  $m$  dem jeweiligen Verdünnungsschritt ( $m = n \dots N$ ) und  $n$  der Anfangsverdünnung entspricht. Für den in dieser Arbeit entwickelten Chip mit zehn Konzentrationen gelten damit folgende Eingangsflüsse in Bezug auf die Ausgangsflüsse  $I_0$ :

$$n = 1, \quad (3.5)$$

$$N = 10, \quad (3.6)$$

$$I_{1,1} = I_0 \sum_1^{10} 2^{-i} = 0,999 \cdot I_0, \quad (3.7)$$

$$I_{10,4} = I_0 \left( 10 - \sum_1^{10} 2^{-i} \right) = 9,001 \cdot I_0. \quad (3.8)$$

Die Widerstände  $R_1$ ,  $R_{in}$  und  $R_0$  (Abb. 3.5) werden vorgegeben. Zusammen mit den Maschengleichungen lassen sich über die Gleichung (2.16) die benötigten

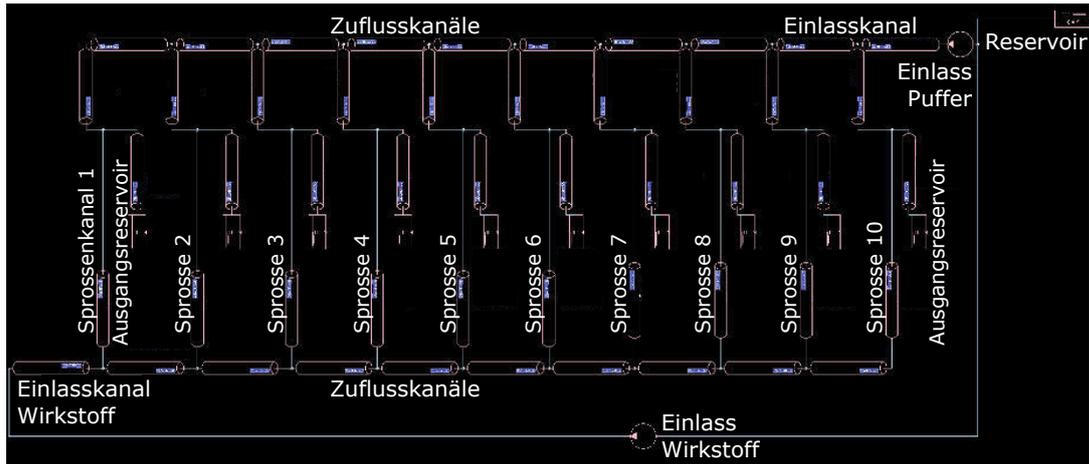
**Tabelle 3.2:** Werte der analytisch berechneten Widerstände  $R_{m,2}$  und  $R_{m,3}$ . Daraus werden die Kanalabmessungen in Tabelle 3.7 berechnet.

<b>m</b>	<b>Widerstand (<math>10^{-12}</math> 1/<math>\mu\text{ms}</math>)</b>	
	<b><math>R_{m,2}</math></b>	<b><math>R_{m,3}</math></b>
<b>1</b>	3,450	17,478
<b>2</b>	3,455	12,802
<b>3</b>	3,472	13,439
<b>4</b>	3,520	16,454
<b>5</b>	3,642	21,379
<b>6</b>	3,941	28,107
<b>7</b>	4,647	36,609
<b>8</b>	6,274	46,873
<b>9</b>	9,959	58,891
<b>10</b>	18,192	72,656
<b><math>R_1</math></b>	1,726	

fluidischen Widerstände  $R_{m,2}$  und  $R_{m,3}$  der einzelnen Kanäle bestimmen. Mit Hilfe des Computeralgebrasystems Maple<sup>TM</sup>, das unter anderem lineare Gleichungssysteme lösen und Rechnungen mit Matrizen durchführen kann, ergeben sich die Widerstände aus Tabelle 3.2. Daraus können die benötigten Breiten und Längen der Kanäle mit den Gleichungen (3.1) und (3.2) berechnet werden. Verschiedene Chipdesigns können mit unterschiedlichen Kanalabmessungen abgeleitet werden, wobei die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Designs in Tabelle 3.7 aufgeführt sind.

### 3.3.2 Computergestützte Simulationsmethoden

Eine Überprüfung der analytisch berechneten Werte wird mit Hilfe von computergestützten Simulationsmethoden sowohl auf Systemebene als auch auf physikalischer Ebene durchgeführt. Der Vorteil der ersten Methode ist die sehr schnelle Rechenzeit im Sekundenbereich. Von Nachteil sind die stark vereinfachten Annahmen, die auf Systemebene getroffen werden, wodurch eine ungenauere Annäherung an das exakte Ergebnis möglich ist. Im Gegensatz dazu kann die Berechnung einer Fluidik-Simulation des Chips auf physikalischer Ebene über eine Woche benötigen. Hier werden jedoch exaktere Anfangs- und Randbedingungen getroffen und so die Ergebnisannäherung möglicherweise verbessert. Zusätzlich können neben dem Flussfeld weitere Informationen zu den Kanälen und Wells betrachtet werden, wie z. B. die Diffusion und die Zellverteilung in Form von Partikeln in einer Strömung.



**Abbildung 3.6:** Netzwerk der Coventor Architect Simulation auf Systemebene, Beschriftungen überarbeitet.

### Modellierung und Simulation auf Systemebene

Die Simulation auf Systemebene basiert auf der Analogie zwischen fluidischen und elektrischen Netzwerken, wie bereits in den Kapiteln 2.1.7 und 3.3.1 beschrieben. Mikrofluidische Komponenten wie Kanäle und Pumpen eines Fluidik-Chips werden durch Modelle ersetzt [38], welche das Verhalten der einzelnen Komponenten in Form von gewöhnlichen Differentialgleichungen beschreiben [94]. Das mikrofluidische System des Chips und die Wechselwirkungen zwischen den Komponenten werden als Netzwerk beschrieben. Diese Methode ist besonders für komplexe Systeme geeignet, da der Zeitaufwand wesentlich geringer ist als bei numerischen Berechnungen.

Zum Erstellen des Netzwerks (Abb. 3.6) wird CoventorWare<sup>®1</sup> mit der dazugehörigen Materialdatenbank verwendet. Die einzelnen Komponenten werden der fluidischen Bibliothek des Programms entnommen und die in Tabelle 3.3 angegebenen Parameter angepasst. Die Breiten der dreieckigen Kanäle werden in die entsprechenden Durchmesser runder Kanäle mit dem Faktor  $f = 0,6171$  umgerechnet, damit die Kanalwiderstände im Netzwerk äquivalent repräsentiert werden.

Die sich ergebenden Werte für die Konzentrationen und die Ausgangsflüsse sind in Tabelle 3.5 für die unterschiedlichen Designs bei den Eingangsflüssen 54,01 nl/min und 5,99 nl/min aufgelistet.

### Numerische Strömungssimulation auf physikalischer Ebene

Analytisch ist das System der partiellen Differentialgleichungen, bestehend aus der Kontinuitätsgleichung (2.4), der Impulsgleichung (2.5) und der Konvektions-Diffusions-Gleichung (2.12) aus Kapitel 2.1, nur für einzelne Fälle lösbar. Die

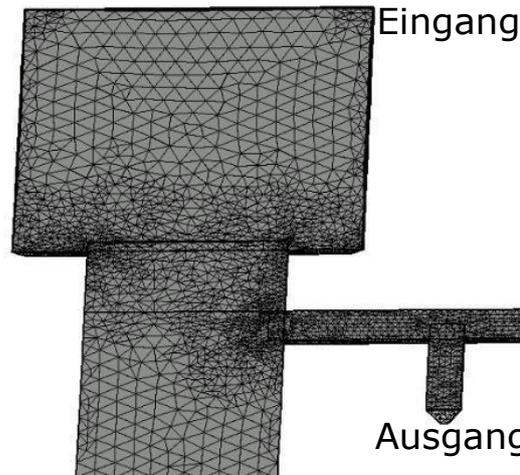
<sup>1</sup>Version 2010 mit integriertem Architect3D<sup>™</sup> und der Synopsys<sup>®</sup> Saber Plattform

**Tabelle 3.3:** Variierbare Parameter der Netzwerkkomponenten auf Systemebene.

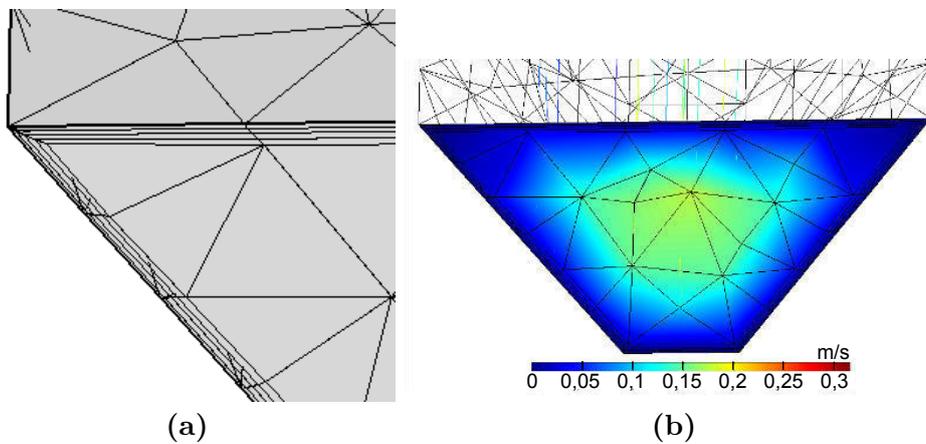
Reale Komponente	Netzwerk-Komponente	Variierbare Parameter
Spritzenpumpe	Spannungsquelle	Gleichspannung: Massenfluss
Kanalausgang	Erdung	$p =$ Atmosphärendruck
Gerader dreieckiger Kanal	Gerader runder Kanal: Widerstand	Länge, Durchmesser

computergestützte numerische Strömungssimulation ist für solche komplexe Fälle ein approximativer Ansatz, um die Strömung im Chip zu berechnen [45, 95]. Dabei wird das Fluid mit entsprechenden Erhaltungsgleichungen modelliert und daraus mit Hilfe von numerischen Methoden die Strömungsverhältnisse im Chip berechnet [38]. Von den unterschiedlichen Methoden zur numerischen Berechnung wird in der vorliegenden Arbeit die Finite-Element-Methode (FEM) verwendet. Dabei wird für die Lösung der partiellen Differentialgleichungen eine Diskretisierung der kontinuierlichen Gleichungen in ein Matrix-Problem angewendet [39], welches mit einem Löser (*Solver*) berechnet und der exakten Lösung angenähert wird. Für die Diskretisierung wird die Strömungsgeometrie durch Vernetzung (*Mesh*) in kleinere Elemente mit strukturierter oder unstrukturierter Anordnung und unterschiedlichen Formen unterteilt (Abb. 3.7). An den Berührungspunkten, den Knoten, werden die partiellen Differentialgleichungen gelöst [82], weshalb das Mesh an kritischen Stellen fein sein sollte. Bei komplexen Modellen muss ein Kompromiss zwischen einem sehr feinen Mesh mit hoher Genauigkeit der Ergebnisse und der benötigten Rechenzeit getroffen werden. Neben der Geometrie und den zugrundeliegenden physikalischen Modellen (z. B. Kopplung von laminarem Fluss mit Konvektion/Diffusion) werden zusätzlich die Fluideigenschaften, die Diffusionskoeffizienten sowie die Anfangsbedingungen des Systems vorgegeben [96]. Außerdem werden Randbedingungen benötigt, um das System der partiellen Differentialgleichungen lösen zu können. Dafür werden an den Rändern des Strömungsfeldes entweder Strömungsgeschwindigkeiten, Drücke oder deren Ableitungen vorgegeben [45]. Zuletzt werden im Löser die zur Berechnung benötigten Parameter ergänzt, u. a. der numerische Algorithmus, die Iterationsanzahl, die Konvergenzkriterien und das zeitabhängige Verhalten, d. h. die Simulationen können stationär oder transient durchgeführt werden. Daraus ergeben sich Annäherungen an das Strömungsfeld, die Konzentrationsverteilung sowie die Partikeltrajektorien im Chip. Wegen der möglichen Fehlerquellen, wie z. B. falsche oder zu einfache Annahmen, ist eine Verifikation der Simulationsergebnisse mittels anderer Simulationsmethoden sowie Messungen erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit werden die Module *Heat Transfer*, *Microfluidics* und



**Abbildung 3.7:** Mesh eines Teilabschnitts der Leiterstruktur: am Eingang für die Testsubstanz und am ersten Ausgang. An kritischen Stellen wie den Kanalübergängen und den Kanten ist das Mesh stark verfeinert. Das Mesh der gesamten Struktur besteht aus ca. 6 Mio. Elementen.



**Abbildung 3.8:** Mesh am ersten Ausgang; a) Vergrößerte Darstellung des sehr feinen, strukturierten Netzes aus Quadern mit vier Schichten, um die Grenzschicht an den Kanaloberflächen zu berechnen, kombiniert mit einem unstrukturierten Tetraedernetz für das Kanalvolumen; b) Ergebnis der Geschwindigkeitssimulation am Ausgang, bei der die partiellen Differentialgleichungen für die Strömung an den Knoten des Netzes gelöst werden.

*Particle Tracing* der FEM-Software COMSOL Multiphysics<sup>®2</sup> für die numerische Strömungssimulation inkompressibler Fluide mit laminarem Fluss verwendet, da die Reynolds-Zahlen im Chip mit der schnellsten verwendeten Flussgeschwindigkeit weit unter  $Re_{krit}$  liegen. Die Reynolds-Zahlen bei maximaler Flussgeschwindigkeit werden in Tabelle B.1 in Anhang B aufgeführt. Für bestmögliche Ergebnisse bei akzeptabler Rechenzeit werden verschiedene Netze miteinander kombiniert (Abb. 3.8): die Grenzschicht an den Kanaloberflächen wird durch ein sehr feines geordnetes Netz aus Quadern abgebildet, während das Volumen durch ein unstrukturiertes und an den Kanalübergängen verfeinertes Netz aus Tetraedern dargestellt wird. Folgende Randbedingungen werden angegeben:

- Kanalwände sind undurchlässig
- Entlang der Wände gilt die Haftbedingung:  $u_{Wand} = 0$  m/s
- An den Eingängen wird ein Volumenfluss vorgegeben
- An den Ausgängen herrscht Atmosphärendruck

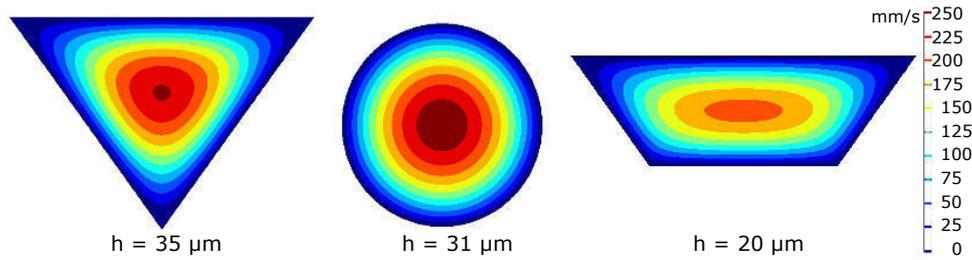
Die komplexesten Simulationen der Leiterstruktur mit den anschließenden Wells beinhalten sowohl das stationäre Flussprofil mit zusätzlicher Konvektion/Diffusion als auch die transiente Berechnung der Partikeltrajektorien. Für genauere Ergebnisse durch ein feineres Mesh kann das System in die Leiterstruktur und einzelne Wells unterteilt werden. Um das System anschaulich zu beschreiben, wird auf die Simulationen und Ergebnisse der Geschwindigkeiten, die Konzentrationsverteilung, der Diffusion im Well und der Partikeltrajektorien der Designs 1, 2 und 3 eingegangen. Die jeweiligen Simulationsparameter sind in Tabelle B.2 in Anhang B aufgeführt.

**Geschwindigkeiten** In Kapitel 2.1.3 wird die parabolische Geschwindigkeitsverteilung in einem zylindrischen Rohr angesprochen. Für dreieckige und trapezförmige Querschnitte bilden sich abweichende Flussprofile aus, welche in Abb. 3.9 zusammen mit dem parabolischen Profil dargestellt sind, dabei haben die Kanäle trotz der unterschiedlichen Geometrie den selben fluidischen Widerstand. In Tabelle 3.4 sind die dazugehörigen mittleren und maximalen Geschwindigkeiten bei gleichem Volumenfluss angegeben, da sich diese aufgrund der verschiedenen großen Querschnittsflächen unterscheiden, d. h. der Fluss in den Sprossenkanälen von Design 1 mit trapezförmigen Querschnitten ist langsamer als in den dreieckigen Kanälen von Design 2.

In Abb. 3.10 fließt die Testsubstanz (grün) von links in die Sprossenkanäle, die Pufferlösung (magenta) von rechts. An den Ausgängen treffen diese sich und fließen zum Well. Bei Ausgang 1 wird die Substanz im Verhältnis 1:1 auf 50 % verdünnt, d. h. von beiden Seiten fließt die gleiche Menge Flüssigkeit in Richtung Well, dementsprechend haben sie auch übereinstimmende Geschwindigkeiten. Bei der zweiten Sprosse wird die Substanz im Verhältnis 1:3 auf 25 % verdünnt,

---

<sup>2</sup>Version 4.4



**Abbildung 3.9:** Geschwindigkeitsprofil dargestellt durch Konturlinien bei unterschiedlichen Kanalquerschnittsformen der jeweiligen Strukturhöhe  $h$  mit gleichem fluidischen Widerstand. Die mittleren und maximalen Geschwindigkeiten bei gleichem angelegten Volumenfluss sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

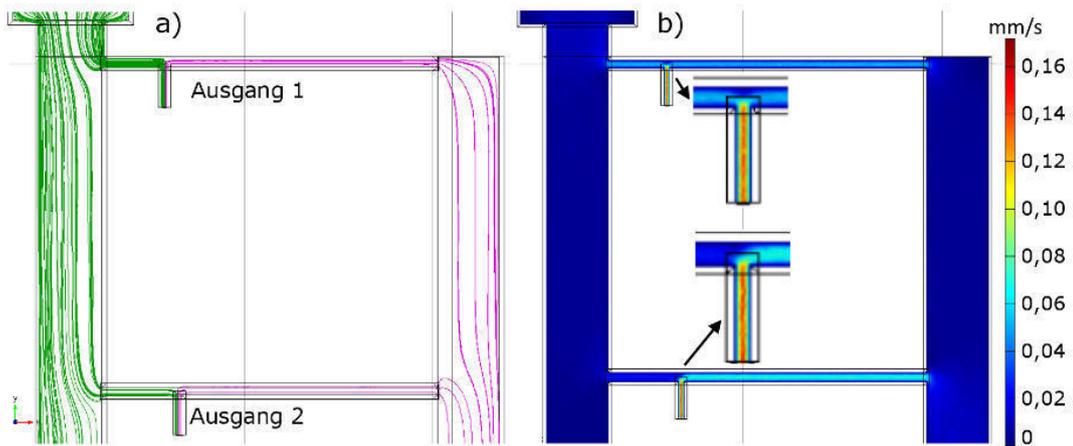
**Tabelle 3.4:** Fluss- und Geometriewerte zu Abb. 3.9 mit unterschiedlichen Kanalquerschnitten bei gleichem Volumenfluss.

	Dreieck	Kreis	Trapez
Mittlere Geschw. in mm/s	113,2	133,8	103,4
Max. Geschw. in mm/s	252,3	267,6	208,9
Volumenfluss in $\mu\text{l}/\text{min}$	6	6	6
Fläche in $\mu\text{m}^2$	884	747	967
Widerstandsfaktor $C_R$	35,12	25,13	42,1

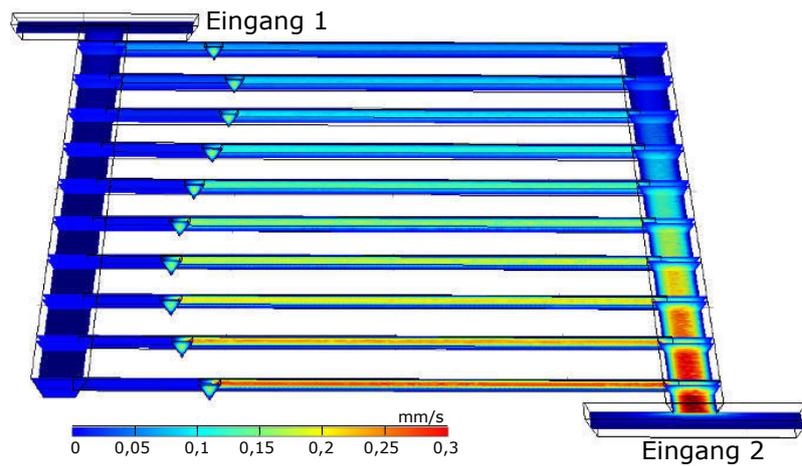
wodurch sich eine höhere Geschwindigkeit für die Pufferlösung ergibt. Auch bei den übrigen Sprossen in Abb. 3.11 ist die Pufferlösung schneller als die Testsubstanz. Bei der Auswertung der kompletten Leiterstruktur ergeben sich für Design 1 für den angestrebten Fluss zum Well von  $6 \text{ nl}/\text{min}$  Abweichungen bis zu 4,4 %, für Design 2 bis zu 1,4 % und für Design 3 bis zu 3,9 % (Tabelle 3.6).

**Druckverteilung** In Abb. 3.12 ist die Druckverteilung in der Leiterstruktur von Design 1 zu sehen. An den Ausgängen wurde Atmosphärendruck angenommen. Die Druckdifferenzen zwischen den Ein- und Ausgängen liegen in den Simulationen der unterschiedlichen Designs bei den höchsten Eingangsflüssen ( $5,94 \mu\text{l}/\text{min}$  und  $54,06 \mu\text{l}/\text{min}$ ) bei maximal 8 mbar an Eingang 1 bzw. 95 mbar an Eingang 2.

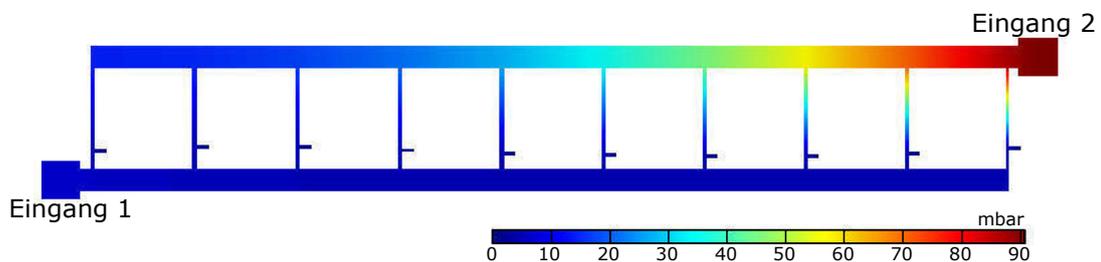
**Konzentrationsverteilung** In Abb. 3.13 ist die Verteilung der Flüssigkeiten in der Leiterstruktur von Design 2 zu sehen, zusätzlich werden die Ausgänge 1, 4, 7 und 10 von Design 1 in Abb. 3.14 vergrößert dargestellt. Die Ergebnisse der Konzentrationen an den Ausgängen sind in Tabelle 3.5 für die Simulationen auf Systemebene und in Tabelle 3.6 für die Simulationen auf physikalischer Ebene angegeben.



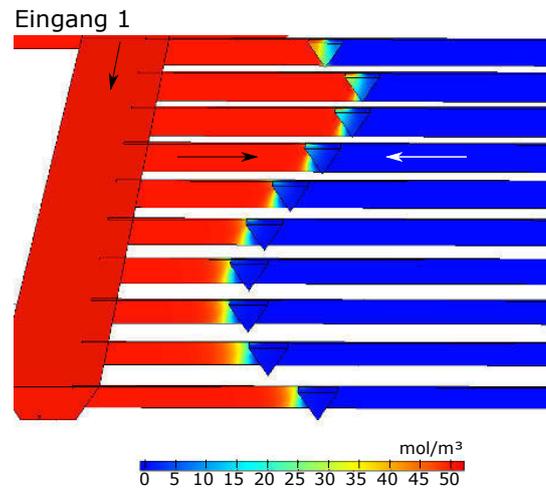
**Abbildung 3.10:** Flussdarstellungen an den Ausgängen 1 und 2 eines Chips mit Design 1; a) Flusslinien zeigen das Zusammenfließen der Testschubstanz (grün) und der Pufferlösung (magenta) an den Ausgängen zu den Wells; b) Flussgeschwindigkeiten mit den größten verwendeten Eingangsflüssen (54,06  $\mu\text{l}/\text{min}$  und 5,94  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). In Sprosse 1 fließen die Flüssigkeiten gleich schnell, in Sprosse 2 ist die Pufferlösung schneller und in den Ausgängen fließen die Flüssigkeiten gleich schnell mit einem Fluss von ca. 6  $\mu\text{l}/\text{min}$ .



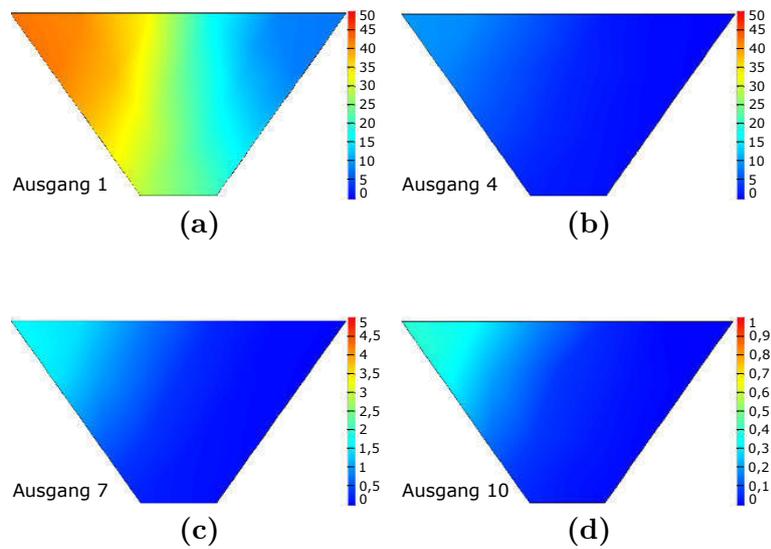
**Abbildung 3.11:** Simulation der Geschwindigkeiten in der Leiterstruktur von Design 2.



**Abbildung 3.12:** Simulation der Druckverteilung in der Leiterstruktur von Design 1.



**Abbildung 3.13:** Simulation der Konzentrationen in den mikrofluidischen Kanälen von Design 2 mit den Eingangsflüssen 54,01 nl/min und 5,99 nl/min.



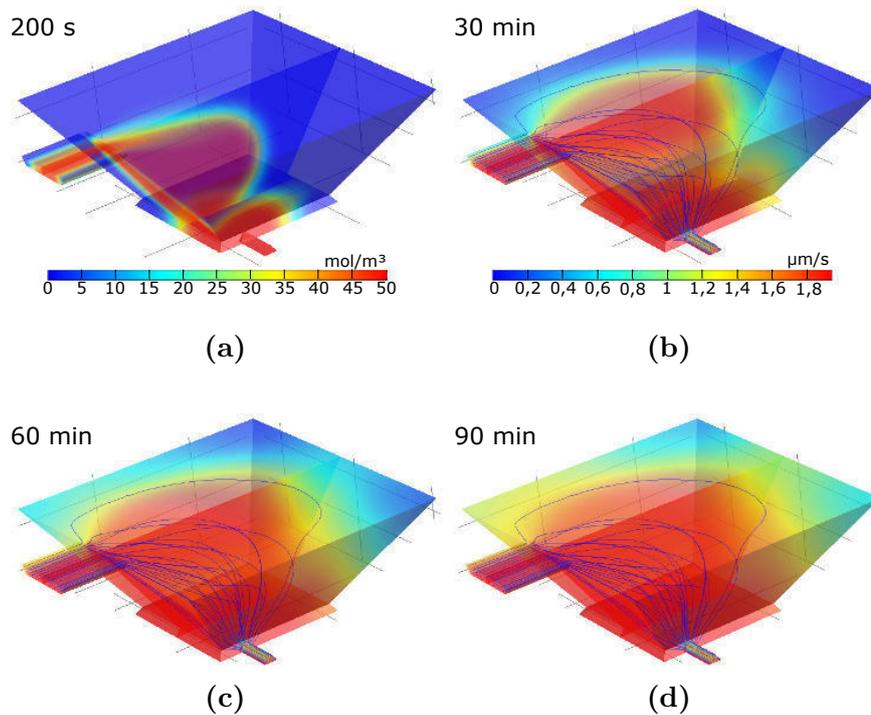
**Abbildung 3.14:** Konzentrationsverteilung an den Ausgängen bei Design 1 simuliert mit den Eingangsflüssen 54,06 nl/min und 5,94 nl/min: a) Ausgang 1: 50,05 %; b) Ausgang 4: 6,46 %; c) Ausgang 7: 0,92 %; d) Ausgang 10: 0,20 %; Maßstab-Bereiche unterschiedlich, in mol/m<sup>3</sup>.

**Tabelle 3.5:** Ergebnisse der Simulationen auf Systemebene für die Konzentrationen und Flüsse an den Ausgängen der drei Designs im Vergleich mit den analytischen Werten.

Ausgang	Konzentrationen in %				Fluss in nl/min			
	Analytischer Wert	Maske			Analytischer Fluss	Maske		
		1	2	3		1	2	3
1	50	49,99	50,0	49,94	6	6,00	6	6
2	25	24,99	24,99	24,9	6	6,00	6	6
3	12,5	12,49	12,5	12,82	6	6,00	6	5,99
4	6,25	6,24	6,25	6,18	6	6,00	6	6
5	3,125	3,13	3,13	3,08	6	6,00	6,00	6
6	1,563	1,57	1,56	1,54	6	6,00	6,00	6
7	0,781	0,77	0,78	0,77	6	6	6,00	6
8	0,391	0,39	0,39	0,39	6	6	6,00	6
9	0,195	0,178	0,198	0,195	6	6	6,00	6
10	0,098	0,082	0,100	0,097	6	6	6,00	6

**Tabelle 3.6:** Ergebnisse der Simulationen auf physikalischer Ebene für die Konzentrationen und Flüsse an den Ausgängen der drei Designs im Vergleich mit den analytischen Werten.

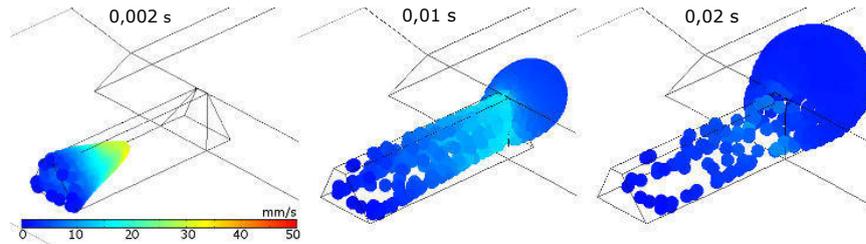
Ausgang	Konzentrationen in %				Fluss in nl/min			
	Analytischer Wert	D			Analytischer Fluss	Design		
		1	2	3		1	2	3
1	50	50,05	48,71	49,90	6	5,83	5,97	5,96
2	25	27,05	25,29	26,86	6	5,91	6,04	5,95
3	12,5	14,25	13,14	14,47	6	5,94	6,04	5,97
4	6,25	6,46	6,59	7,29	6	5,94	6,05	5,98
5	3,125	3,27	3,68	4,00	6	6,03	6,10	6,04
6	1,563	1,73	2,00	3,09	6	6,08	6,07	6,09
7	0,781	0,92	1,24	1,68	6	6,12	6,09	6,11
8	0,391	0,46	0,89	0,48	6	6,17	6,05	6,12
9	0,195	0,48	0,51	0,25	6	6,20	6,07	6,16
10	0,098	0,20	0,63	0,36	6	6,25	6,07	6,23



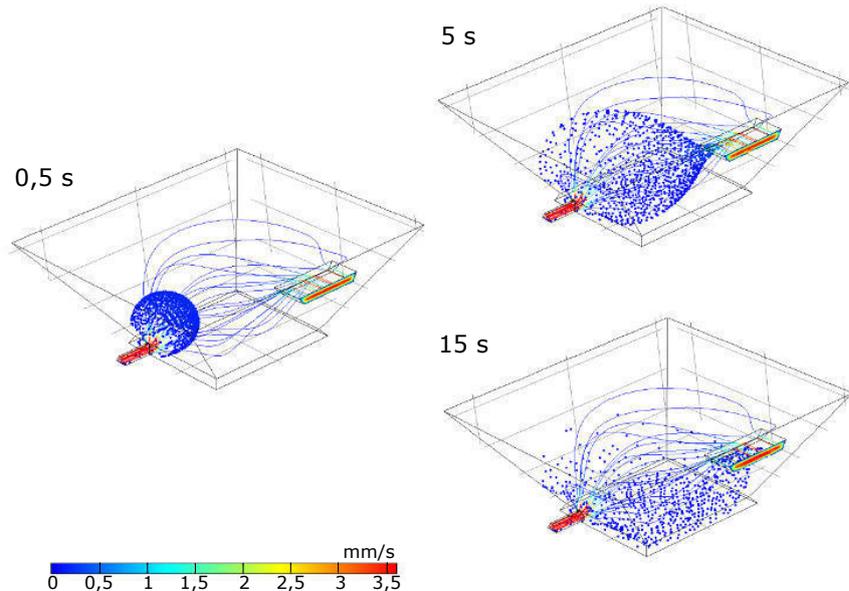
**Abbildung 3.15:** Transiente Simulation der Verteilung der Testsubstanz durch Konvektion und Diffusion in Well 7, welches den kürzesten Abstand zwischen Well-Einlass und -Auslass hat. Der Volumenfluss an Ein- und Ausgang beträgt entsprechend der Mediumzufuhr während der durchgeführten Zellkultur 60 nl/min. Die Flusslinien sind gemäß der lokalen Geschwindigkeit gefärbt.

**Diffusion in Wells** Um zu überprüfen, ob nach 1,5 h Zellkultur die Nährstoffzufuhr bei einem Volumenfluss von 60 nl/min überall im Well möglich ist, wurde die Diffusion in den Wells simuliert. Aufgrund des laminaren Flusses kann eine Durchmischung der Flüssigkeiten nur durch Diffusion stattfinden. Die Simulation von Well 7 (Abb. 3.15) ist ausschlaggebend, da der Einlass sehr nah am Auslass liegt und so die zur Verfügung stehende Zeit für die Diffusion vor dem Ausfließen am kürzesten ist. Zusätzlich müssen die Moleküle weitere Strecken innerhalb des Wells zurücklegen, um eine einheitliche Verteilung zu erhalten. Nach 1,5 h ist die Verteilung im Well größtenteils erfolgt und eine kontinuierliche Nährstoffversorgung möglich. Für zwei der oberen Ecken benötigen die Moleküle mehr Zeit, allerdings ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass sich an diesen Stellen Zellen aufhalten. In den übrigen Wells ist die Verteilung der Moleküle schneller und somit kann von einer ausreichenden Nährstoffzufuhr in allen Wells ausgegangen werden.

**Partikelverteilung** Das Einströmen der Partikel in ein Well und deren Verteilung darin wird für Hefezellen mit 5 µm und für HeLa-Zellen mit 20 µm Durchmesser transient simuliert. Für beide Zelltypen wird eine Dichte von 1,1 g/cm<sup>3</sup>

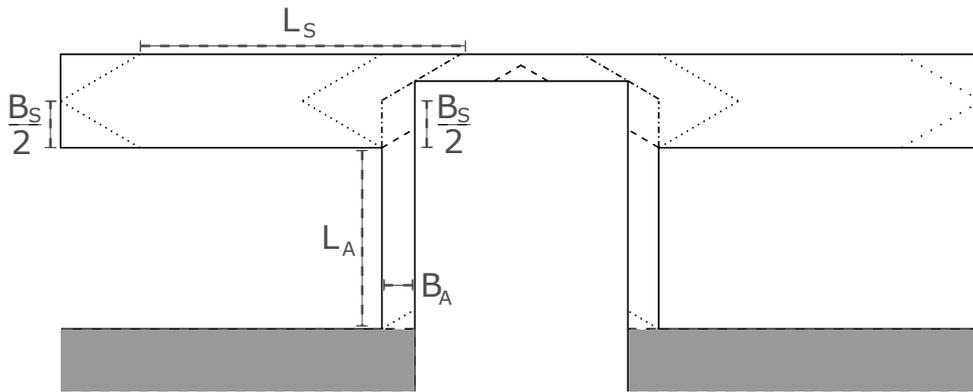


**Abbildung 3.16:** Numerische Simulation des Einströmverhaltens der Partikel mit einem Fluss von  $1,2 \mu\text{l}/\text{min}$  entsprechend des Einströmens von Zellen für die Zellkultur. Die Partikel sind gemäß der lokalen Geschwindigkeit gefärbt.



**Abbildung 3.17:** Numerische Simulation der Partikel bei einem Fluss mit  $60 \text{ nl}/\text{min}$  entsprechend der Nährmediumzufuhr während der Hefe-Zellkultur. Die Partikel und die zusätzlich dargestellten Flusslinien sind gemäß der lokalen Geschwindigkeit gefärbt.

angenommen. Am Einfließverhalten (Abb. 3.16) der Partikel ist die bereits beschriebene Geschwindigkeitsverteilung bei Kanälen mit dreieckigem Querschnitt gut zu erkennen, in der Mitte schnell und zu den Wänden hin langsamer werdend. Dadurch werden die meisten Partikel in der Mitte befördert. Sobald sie in das Well strömen, verlangsamt sich die Geschwindigkeit wegen der größeren Querschnittsfläche, die dort zur Verfügung steht. Bei der Einströmmenge von  $60 \text{ nl}/\text{min}$ , entsprechend der Nährmediumzufuhr während der Zellkultur, bleiben einige Hefe-Zellen in der Schwebe und einige sinken auf den Boden (Abb. 3.17). Die HeLa-Zellen setzen sich aufgrund ihrer Größe wesentlich stärker auf dem Boden ab.

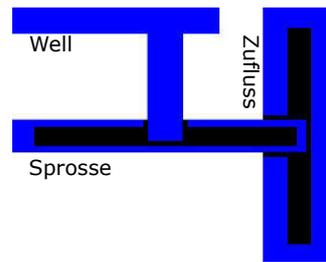


**Abbildung 3.18:** Neu entworfene Struktur aus  $\langle 110 \rangle$ -Stegen für kleine Flächen und sich gegenüberliegende konvexe Ecken. Theoretisch erarbeitete KOH-Ätzfronten und die zur Ätzlänge zählenden Abmessungen sind eingezeichnet. Die Zielstruktur aus Silizium ist grau eingefärbt (in Anlehnung an [80]).

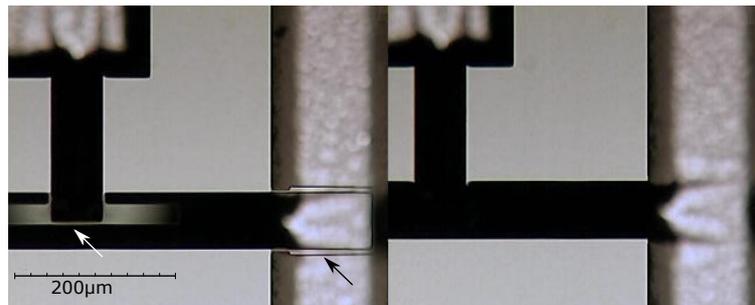
### 3.4 Modellierung: Kompensationsstrukturen

Durch nasschemisches Ätzen mit TMAH konnten zwar gute konvexe Ecken aber keine glatten Si-Kanalwände erzielt werden. Aufgrund der Unterätzung der konvexen Si-Ecken der Leiterstruktur beim Strukturieren mit KOH, die sich durch den Herstellungsprozess ergibt, werden Kompensationsstrukturen benötigt. Hierfür verwendete Strukturen sind in Kapitel 2.2.3 beschrieben, welche allerdings für die zur Verfügung stehende Fläche in den Kanälen von Design 3 zu groß sind. Besonders die Übergänge der Zuflusskanäle zu den Sprossen (Zuflussecken) und von den Sprossen in Richtung der Wells (Sprossenecken) sind kritisch, da die Kanäle im Vergleich zur Ätztiefe von  $88,2 \mu\text{m}$  schmal sind ( $46,41 \mu\text{m}$  bis  $71,35 \mu\text{m}$ ). Außerdem liegen sich jeweils zwei Ecken gegenüber, wodurch sich die Fläche zusätzlich halbiert. Die benötigte Kantenlänge der Strukturen, um nach ca. 80 min Ätzdauer eine konvexe Ecke zu bilden, übertrifft bei allen  $100 \mu\text{m}$  und ist damit zu groß. Deshalb wurde aus den  $\langle 110 \rangle$ -Stegen in Abb. 2.15 eine neue Struktur entworfen [80], die in Abb. 3.18 mit den theoretischen KOH-Ätzfronten gezeigt ist. Diese Struktur hat die Vorteile, dass sie für zwei gegenüberliegende Ecken geeignet ist und die ursprüngliche einseitige Unterätzung der Ecken bei Verwendung eines  $\langle 110 \rangle$ -Steges aufgrund des verbindenden Balkens verhindert wird. Außerdem kann sie gut in den Kanälen positioniert werden (Abb. 3.19) und bildet exakte Ecken aus (Abb. 3.20a). Die Ergebnisse zum TMAH-Ätzen und der Kompensationsstruktur sind in Kapitel 6 aufgeführt. Durch Analysen des Oberflächenprofils werden allerdings Ablagerungen in den Kanälen sichtbar (Abb. 3.20b), die aufgrund der verschiedenen Kanalbreiten nicht einheitlich sind und den Fluss unkontrolliert beeinflussen.

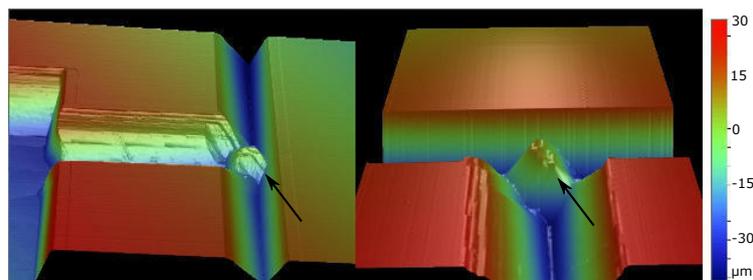
Zwei weitere Designs (Beschreibungen in Kapitel 3.5) mit geringeren Ätztiefen werden erarbeitet, um einerseits die Kompensationsstrukturen zu verkleinern und andererseits die eventuell auftretenden Eckenunterätzungen in den Sprossen



**Abbildung 3.19:** Maske von Design 3 mit der Anordnung der  $\langle 110 \rangle$ -Stege; blau: zu ätzendes Silizium, schwarz: neue Kompensationsstruktur aus  $\langle 110 \rangle$ -Stegen.



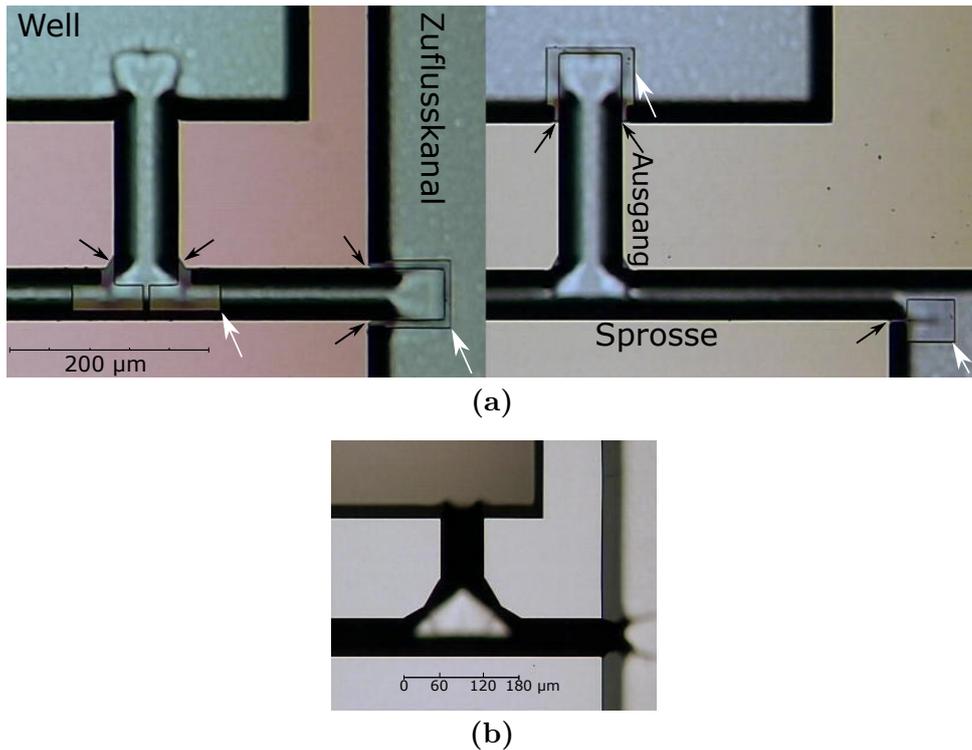
(a)



(b)

**Abbildung 3.20:** Design 2; a) Geätztes Silizium, links mit Ätzmaske und zwei unterätzten Kompensationsstrukturen (Pfeile) für vier Ecken, rechts: nach Entfernen der Ätzmaske, alle Ecken sind gut kompensiert; b) Oberflächenprofil des Sprossenkanals (weißer Pfeil) aus a). Si-Reste (Pfeile) befinden sich im Kanal und beeinflussen den fluidischen Widerstand.

kontrolliert und in immer gleicher Form zu erzielen. Bei Design 1 mit einer Ätztiefe von  $32,8 \mu\text{m}$  werden die Ecken gut kompensiert (Abb. 3.21a). Bei Design 2 mit einer Ätztiefe von  $50,46 \mu\text{m}$  können die Zuflussecken zwar gut kompensiert werden, allerdings müssen an den Sprossenecken zu kleine Kompensationsstrukturen (Abmessungen wie bei Design 1) verwendet werden, welche die Ecken zwar so lange wie möglich, jedoch nicht ausreichend schützen. Auf diese Weise werden die Sprossenecken immer um  $60 \mu\text{m}$  kontrolliert unterätzt (Abb. 3.21b). Um die fluidischen Widerstände der Sprossen dadurch nicht zu beeinflussen, werden diese um die Breite des Ausgangskanals und die Unterätzung pro Ecke (insgesamt  $180 \mu\text{m}$ ) verlängert (Abb. 3.22c).



**Abbildung 3.21:** Teile von KOH geätzten Leiterstrukturen; a) Design 1 mit größtenteils exakten Ecken und trapezförmigen Kanälen. Auf der Waferoberfläche befindet sich noch die Ätzmaske mit unterätzten Kompensationsstrukturen (weiße Pfeile) an den konvexen Ecken (schwarze Pfeile). Die Sprossenecken sind leicht unterätzt, da aufgrund der kleinen Fläche nur symmetrische  $\langle 110 \rangle$ -Stege in Frage kommen; b) Design 2 mit exakten Ecken im Zuflusskanal und zum Well. Die Sprossenecken sind wegen den zu kleinen Kompensationsstrukturen (die gleichen wie in a) unterätzt. Die Strecke von 180 µm ist eingezeichnet, um welche die Sprossen wegen der fluidischen Widerstände verlängert werden.

### 3.5 Maskendesign

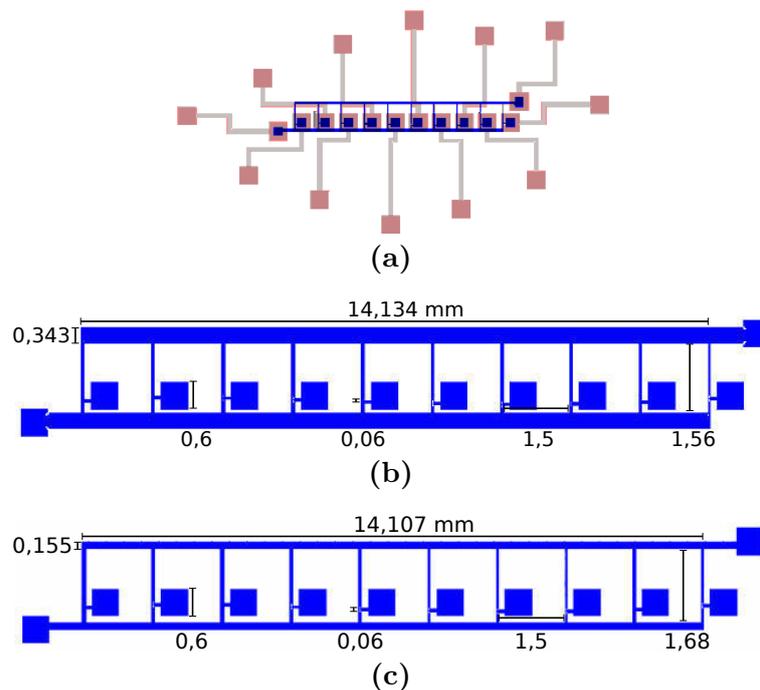
Für die drei Photolithographieschritte des Herstellungsprozesses, die in Kapitel 4 beschrieben sind, werden drei Lithographiemasken benötigt (Abb. 3.22a): zwei für den zweistufigen Lithographieschritt der Wells und der Ein- und Auslässe auf der Wafer-Oberseite (grau, orange) sowie eine für die Leiterstruktur auf der Wafer-Rückseite (blau).

Für die Leiterstruktur wurden drei Designs mit jeweils unterschiedlich viel Platz für Kompensationsstrukturen und unterschiedliche Herstellungstoleranzen in Bezug zur Äztiefe entwickelt. Die entsprechenden Kanäle der Designs haben dabei äquivalente fluidische Widerstände (Tabelle 3.2) und Längen aber unterschiedliche Äztiefen und Kanalbreiten, welche in Tabelle 3.7 aufgeführt sind. Design 1 (Abb. 3.22b) hat die geringste Äztiefe mit 32,8 µm und die breitesten Kanäle, somit können die Kompensationsstrukturen die konvexen Ecken ausreichend schützen. Allerdings werden sämtliche Kanalwiderstände der trapezförmigen Kanäle bei Abweichungen von der exakten Tiefe beeinflusst,

dadurch ist die verwertbare Chipausbeute nach dem Herstellungsprozess am geringsten. Für Design 2 (Abb. 3.22c) wurde die Ätztiefe ( $50,46\ \mu\text{m}$ ) so gewählt, dass alle Sprossenkanäle eine dreieckige Querschnittsfläche bilden und ihre Tiefe dadurch selbst begrenzen. Daraus ergibt sich eine bessere Toleranz gegenüber Abweichungen der Ätztiefe. Allerdings sind die Zuflusskanäle auch bei diesem Design trapezförmig, um die Ätzdauer und damit die Kompensationsstrukturen so klein wie möglich zu halten. Diese zwei Designs bilden jeweils einen Kompromiss aus Eckenkompensation und Herstellungstoleranz, weshalb beide hergestellt und analysiert werden. Abb. 6.10 zeigt eine Gegenüberstellung der beiden Kanaldesigns. Design 3 hat hingegen aufgrund der längsten Ätzzeit bei einer Tiefe von  $88,2\ \mu\text{m}$  und damit den größten benötigten Kompensationsstrukturen zu wenig Platz für diese und wird im Rahmen dieser Arbeit zwar hergestellt, wegen der starken Unterätzung an den Sprossenecken aber nicht analysiert. Durch die dreieckige Querschnittsfläche aller Kanäle hat dieses Design jedoch die beste Herstellungstoleranz bezüglich der Kanaltiefen.

Die Chipflächen der Designs sind ungefähr gleich und betragen inklusive der reversiblen Anschlüsse ca.  $20 \times 32\ \text{mm}^2$ . Die Fläche der Leiterstruktur auf der Chiprückseite beträgt inklusive Zellwells ca.  $2 \times 20\ \text{mm}^2$ . Das Fluidvolumen des Chips ohne die Anschlüsse entspricht ca.  $5\ \mu\text{l}$ , wovon in jedem Zellwell ca.  $370\ \text{nl}$  enthalten sind.

Die Herstellung der Chrommasken wird in Anhang C beschrieben.



**Abbildung 3.22:** CleWin-Zeichnungen der Lithographiemasken; a) Alle drei Masken des Herstellungsprozesses zur Strukturierung der Wafer-Oberseite mit Wells, Ein- und Ausgängen (orange, grau) und der Wafer-Rückseite mit der Leiterstruktur (blau); b) Leiterstruktur des Designs 1 ( $32,8\ \mu\text{m}$ ); c) Leiterstruktur des Designs 2 ( $50,46\ \mu\text{m}$ ).

**Tabelle 3.7:** Werte der analytisch berechneten Kanalabmessungen der Widerstände  $R_1$ ,  $R_{in}$ ,  $R_0$ ,  $R_{m,2}$  und  $R_{m,3}$  aus Tabelle 3.2 und aus Abb. 3.5 für unterschiedliche Ätztiefen mit den davon abhängigen Kanalbreiten und -formen, wobei die Breiten der sich gegenüberliegenden Kanäle mit  $R_{m,2}$  und  $R_{m,3}$  gleich sind, Angaben in  $\mu\text{m}$  (für Design 3 übernommen aus [92]).

Ätztiefe in $\mu\text{m}$ Design:	Kanalbreiten			Kanallängen	
	32,8 1	50,46 2	88,2 3	für alle Designs gleich	
$R_1$	342,71	154,67	125	1500	
$R_{in}$	342,71	154,67	125	750	
Zuflussquerschnitt	Trapez		Dreieck		
$R_0$	60			150	
m				$R_{m,2}$	$R_{m,3}$
1	71,02	66,98		247,26	1252,74
2	78,50	71,35		318,78	1181,22
3	77,23	70,65		307,98	1192,02
4	72,29	67,77		264,33	1235,67
5	66,61	64,06		218,36	1281,64
6	61,43	60,21		184,47	1315,53
7	57,02	56,53		168,95	1331,05
8	53,25	53,06		177,07	1322,93
9	49,88	49,74		216,97	1283,03
10	46,59	46,41		300,38	1199,62
Sprossenquerschnitt	Trapez	Dreieck			

### 3.6 Zusammenfassung

Auf einem mikrofluidischen Chip sollen eine Zellkultur sowie eine Konzentrationsreihe, die einen großen Bereich abdeckt, integriert werden, um die Wechselwirkung verschiedener chemischer Komponenten auf Zellen analysieren zu können. Zur Chipauslegung gehören das Konzept, Auswahl der Materialien, analytische Berechnungen, computergestützte Simulationen sowie ein mit dem Herstellungsprozess und den Materialien kompatibles Maskendesign.

Speziell wird aus den vorgegebenen Anforderungen ein Design konzipiert, bei welchem eine binär-logarithmisch abnehmende Konzentrationsreihe im Bereich von 50 % bis 0,098 % auf der Chiprückseite auf passive Weise durch eine leiterähnliche Kanalstruktur entsteht. Die einzelnen Konzentrationslösungen fließen von den Sprossen mit der jeweils gleichen Flussrate zu je einem Zellkulturwell, das mittels optischem Mikroskop untersucht werden kann. Ermöglicht wird dies aufgrund der Materialauswahl aus KOH-geätzttem Silizium und Borsilikatglas, so dass die Wells und Kanäle von oben und unten mit Glas abgedeckt sind. Auf der Vorderseite sind die Anschlüsse der Ein- und Ausgänge angebracht. Silizium zeigt

einige Vorteile gegenüber dem häufig verwendeten PDMS. Zum Beispiel ist es formstabil, mit Alkohol sterilisierbar, luftundurchlässig und chemikalienbeständig. Anisotropes Ätzen mittels KOH ermöglicht einen minimalen Flächenbedarf des Chips. Die CO<sub>2</sub>-Zufuhr während der Zellkultur kann trotz Luftundurchlässigkeit durch eine frühzeitige Mediumsättigung erreicht werden. Alle verwendeten Materialien, auch die aufgewachsene SiO<sub>2</sub>-Schicht, sind biokompatibel und nicht toxisch.

Aufgrund der passiven Flussregelung wird die binär-logarithmische Konzentrationsverteilung durch die definierten Flusswiderstände der Kanäle und damit durch ihre Abmessungen (Breite, Tiefe, Länge, Querschnittsform) bestimmt. Diese Parameter werden für die Leiterstruktur der Kanäle auf der Chiprückseite analytisch mittels Netzwerkanalyse berechnet. Damit kann das in dieser Arbeit entwickelte Kanaldesign leicht an andere Verdünnungsreihen, wie z. B. eine lineare Konzentrationsabnahme, angepasst und mit dem verwendeten Herstellungsprozess produziert werden, ohne den restlichen Chip ändern zu müssen. Auf der Vorderseite werden die Ein- und Ausgänge so dimensioniert, dass diese jeweils den gleichen Flusswiderstand haben. Wegen der zeitaufwendigen Herstellung des Prototyps ist eine vorherige Evaluation der Werte zur Designentwicklung wichtig. In der vorliegenden Arbeit wird eine Kombination von computergestützten Simulationsmethoden auf Systemebene sowie auf physikalischer Ebene verwendet. Bei letzterem werden neben dem Flussfeld, der Druck- und der Konzentrationsverteilung in den Kanälen auch die Diffusion der Nährstoffe und die Zellverteilung in Form von Partikeln in den Wells betrachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass das berechnete Kanaldesign für die binär-logarithmische Konzentrationsreihe und die anschließende Zellkultur in den Wells geeignet ist.

Aufgrund der Unterätzung der konvexen Si-Ecken der Leiterstruktur während des KOH-Ätzens wird eine Kompensationsstruktur mit <110>-Stegen entwickelt, die einen geringeren Flächenbedarf als bekannte Strukturen hat und für zwei sich gegenüberliegende Ecken geeignet ist. Da an Kanalböden der schmalsten Kanäle trotzdem Ablagerungen, die den Fluss unkontrolliert beeinflussen, entstehen, werden zwei weitere Designs mit geringeren Ätztiefen erarbeitet, um einerseits die Kompensationsstrukturen zu verkleinern und andererseits die eventuell auftretenden Eckenunterätzungen in den Sprossen kontrolliert und in immer gleicher Form zu erzielen. Die zwei Designs bilden jeweils einen Kompromiss aus Qualität der Eckenkompensation und Reproduzierbarkeit der Ätztiefe. Design 1 mit der geringsten Ätztiefe führt zu einer guten Eckenkompensation mit einer schlechter reproduzierbaren Ätztiefe aufgrund der trapezförmigen Querschnittsfläche der Kanäle. Design 2 ergibt eine schlechtere Eckenkompensation, welche durch längere Kanäle ausgeglichen wird, und eine gute Reproduzierbarkeit der Ätztiefe aufgrund der dreieckigen Querschnittsfläche der Kanäle.

Die Fläche des Chips beträgt inklusive der reversiblen Anschlüsse ca.  $20 \times 32 \text{ mm}^2$ , die der Leiterstruktur auf der Rückseite inklusive Zellwells ca.  $2 \times 20 \text{ mm}^2$ . Das Fluidvolumen des Chips ohne die Anschlüsse entspricht ca. 5  $\mu\text{l}$ , wovon in jedem Zellwell ca. 370 nl enthalten sind.

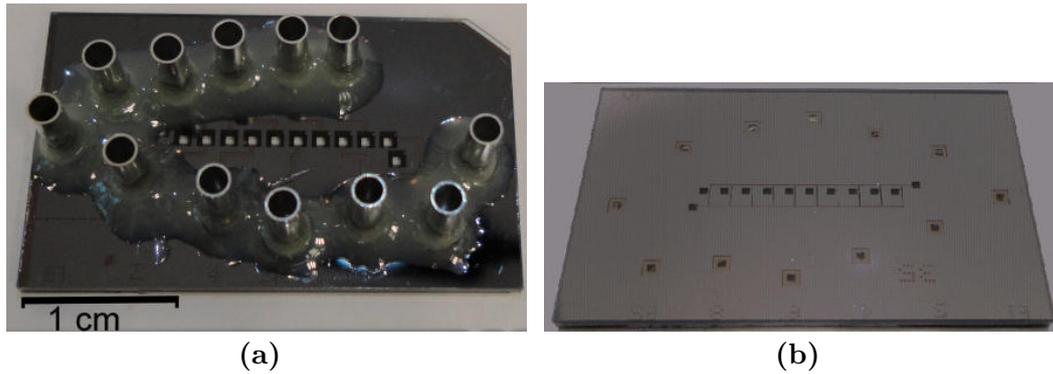


# 4 Herstellung

## 4.1 Herstellungsprozess

Für den Herstellungsprozess wurde einerseits auf eine gute Reproduzierbarkeit und andererseits auf eine kostengünstige Fertigung der Prototypen geachtet. Dadurch können die Ergebnisse der anschließenden unterschiedlichen Analysemethoden miteinander verglichen und das Chipdesign optimiert werden. Mit dem hier vorgestellten Herstellungsprozess können acht Chips, wie in Abb. 4.1 zu sehen, pro 100 mm Si-Wafer hergestellt werden. Dieser wird beidseitig prozessiert und mit Borsilikatglas anodisch gebonded. Der komplette Fabrikationsprozess besteht aus den unten aufgeführten Teilschritten und ist schematisch in Abb. 4.2 dargestellt. Je nach gewähltem Maskendesign (1 oder 2) ändern sich dabei die KOH-Ätztiefen, wie in Kapitel 3.5 beschrieben. Für die TMAH-Versuche wurde Schritt *g* verwendet. Bei der Chipvariante mit natürlichem Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) (Kapitel 5.1) wird der Schritt *i* zur thermischen  $\text{SiO}_2$ -Beschichtung weggelassen. Die verwendeten Materialien und Parameter der einzelnen Schritte sind im Prozessprotokoll in Anhang C detailliert zu finden.

- Beidseitige Si-Oxidation 100 nm (*a*)
- Beidseitige Si-Nitrid-Abscheidung mittels PECVD (*a*)
  - Oberseite: 800 nm
  - Unterseite: 350 nm
- Zweistufiger Lithographieschritt der Wafer-Oberseite (*b*, *c*, *e*)
- KOH-Ätzen des Si an der Wafer-Oberseite (*d*)
- Entfernen des Si-Nitrids ( $\text{Si}_x\text{N}_y$ ) von den Kanälen auf der Oberseite (*e*)
- Lithographie der Wafer-Rückseite (*f*)
- Beidseitiges KOH-Ätzen von Si (*g*)
- $\text{Si}_x\text{N}_y$  entfernen mittels HF-Ätzschritt (*h*)
- Beidseitige Si-Oxidation (*i*)
- Elektrochemisches Funkenerodieren zur Erzeugung von Löchern in Glas
- Beidseitiges anodisches Bonden (*j*)
- Aufkleben von fluidischen Anschlüssen



**Abbildung 4.1:** a) Vorderseite eines Chips mit aufgeklebten Verbindungen; b) Rückseite des Chips mit der Struktur (Design 2) für die Konzentrationsreihe.

## 4.2 Herstellungstechnologien

Die verwendeten Materialien und Parameter der einzelnen Schritte sind im Prozessprotokoll in Anhang C zu finden.

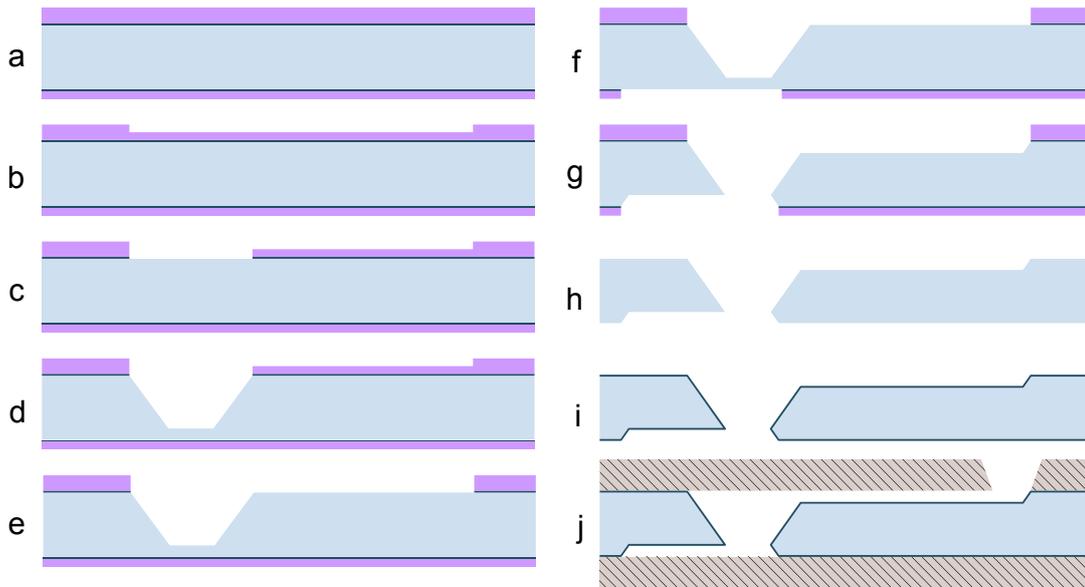
### 4.2.1 Siliziumstrukturierung

#### Photolithographie

Die Photolithographie wird in der Mikrosystemtechnik verwendet, um Strukturen in Schichten oder Substrate zu übertragen. Um Silizium zu strukturieren, werden folgende Prozessschritte benötigt:

- Hartmaske erzeugen:
  - Schicht (hier:  $Si_xN_y$ ) durch additives Verfahren (hier: *PECVD*) aufbringen
  - Auftragen einer photosensitiven Schicht (hier: *Positivlack*)
  - Partielle Belichtung dieser Schicht
  - Entwickeln der Schicht
  - Strukturieren der am Anfang aufgebrachten Schicht (hier: *HF-Ätzen*)
  - Entfernen der photosensitiven Schicht
- Strukturieren des Siliziums (hier: *KOH-Ätzen*)
- Entfernen der Hartmaske (hier: *HF-Ätzen*)

In dieser Arbeit wird zuerst eine  $Si_xN_y$ -Schicht als Maskierung auf dem Si-Wafer durch ein additives Verfahren, die plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung (*PECVD*), abgeschieden. Diese Schicht wird wiederum mit einem photosensitiven Positivlack beschichtet. Der Lack wird durch eine Chrommaske hindurch mit UV-Licht belichtet und danach entwickelt. Dabei lösen sich die belichteten Bereiche des Positivlacks, und die  $Si_xN_y$ -Schicht wird stellenweise freigelegt. An diesen Stellen kann Flußsäure (*HF*) das komplette  $Si_xN_y$  bis zur

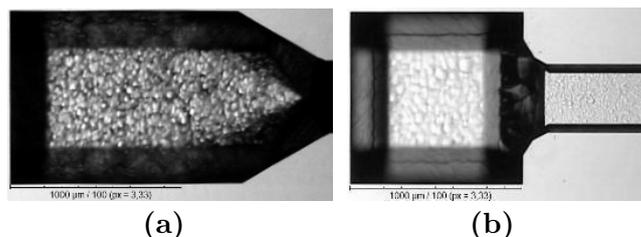


**Abbildung 4.2:** Herstellungsprozess des Chips; blau: Si, lila:  $\text{Si}_x\text{N}_y$ , dunkelblau:  $\text{SiO}_2$ , schraffiert: Borsilikatglas. Bei der Herstellung ohne  $\text{SiO}_2$ -Beschichtung wird Schritt  $i$  übersprungen (in Anlehnung an [83]).

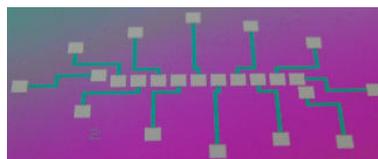
Freilegung des Si ätzen. Nach der Entfernung des Lacks kann durch einen KOH- oder TMAH-Ätzschritt die verbliebene  $\text{Si}_x\text{N}_y$ -Struktur in das Silizium übertragen werden. Zum Schluss wird die Hartmaske durch einen HF-Ätzschritt entfernt.

### Zweistufen-Lithographie für unterschiedliche Ätztiefen in Silizium

Für die Zuflüsse, die Abflüsse und die Durchkontaktierungen (Kavitäten) von der Ober- zu der Unterseite des Si-Wafers werden unterschiedlich tief geätzte Strukturen auf der oberen Waferseite benötigt (Abb. 4.2). Durch einen einzigen KOH-Ätzschritt können die selbst begrenzenden Eigenschaften der  $\{111\}$ -Ebenen von Si genutzt werden. So werden die Kavitäten zwar tiefer als die Kanäle, allerdings verändert sich die ursprünglich vorgegebene Struktur der quadratischen Kavität durch Unterätzung an den konvexen Ecken in eine rechteckige Form (Abb. 4.3a). Durch diese Strukturänderung kann es zu unerwünschten Kurzschlüssen zwischen den Flüssigkeitskanälen auf der Ober- und der Unterseite des Wafers kommen. Dieses Problem kann durch eine Zweistufen-Lithographie mit zwei Masken umgangen werden. Das bedeutet, dass das  $\text{Si}_x\text{N}_y$  in zwei Schritten geätzt wird (Abb. 4.4 und Abb. 4.5): während es auf den Kavitäten komplett entfernt wird, wird es auf den Kanälen nur dünner (Abb. 4.2c). So können die Kavitäten beim ersten KOH-Schritt vorgeätzt werden (Abb. 4.2d). Danach wird das  $\text{Si}_x\text{N}_y$  auf den Kanälen entfernt (Abb. 4.2e) und sowohl die Kanäle als auch die Kavitäten tiefer geätzt (Abb. 4.2g). Da die konvexen Ecken nur kurz vom KOH angegriffen werden, behalten die Kavitäten die quadratische Struktur (Abb. 4.3b) und Kurzschlüsse werden vermieden.



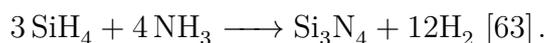
**Abbildung 4.3:** a) Die Kavität wird durch einen einzelnen KOH-Schritt 351  $\mu\text{m}$  tief geätzt, wohingegen die Kanaltiefe durch die (111)-Ebenen begrenzt ist. Die konvexen Ecken werden angegriffen und es entsteht eine rechteckige Kavität anstelle einer quadratischen; b) Durch Zweistufen-Lithographie werden die konvexen Ecken für einen kurzen Zeitraum angegriffen und es bildet sich eine quadratische Kavität mit einer Tiefe von 323  $\mu\text{m}$ , wohingegen der Kanal 25  $\mu\text{m}$  tief ist.



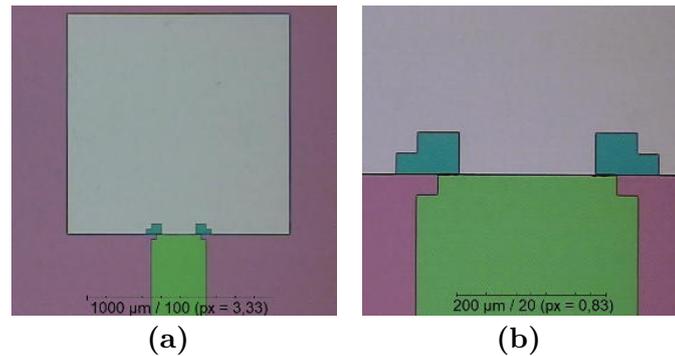
**Abbildung 4.4:** Vorderseite eines Si-Wafers nach der Zweistufen-Lithographie, beim ersten HF-Ätzen (grünes  $\text{Si}_x\text{N}_y$ ) wurde ca. 220 nm tief geätzt, beim zweiten (grau) wurde die Schicht komplett entfernt.  $\text{Si}_x\text{N}_y$ -Dicken: rosa: ca. 760 nm, grün: ca. 540 nm, grau: 0 nm.

## 4.2.2 Plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung

Die chemische Gasphasenabscheidung (CVD – *chemical vapour deposition*) ist ein additives Verfahren. Das Beschichtungsmaterial bildet sich durch eine chemische Reaktion in der Gasphase, wobei die Reaktionsgase über das Substrat geleitet werden. Die gasförmigen Restprodukte werden über das System wieder abgeführt [97]. Die Anregungsenergie für diese Reaktion kann unterschiedlich erzeugt werden. Bei thermisch aktivierter CVD findet zur Erzeugung von  $\text{Si}_3\text{N}_4$  folgende Reaktion bei 800 °C zwischen Monosilan ( $\text{SiH}_4$ ) und Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) statt [63]:



In der vorliegenden Arbeit wird plasmaunterstützte CVD (PECVD – *plasma enhanced CVD*), verwendet, deren Vorteile eine schnelle Abscheiderate und eine reduzierte Prozesstemperatur sind. Das Plasma wird durch Anlegen einer hochfrequenten Wechspannung erzeugt: die Atome der Reaktionsgase werden teilweise ionisiert. Dadurch kann die Temperatur auf 300 °C – 400 °C reduziert werden. Die abgeschiedene Phase ist selten stöchiometrisch zusammengesetzt, da die chemischen Reaktionen aufgrund von Anregung, Bindungsbrüchen und Radikalbildung nicht thermodynamisch kontrolliert ablaufen und die Schicht verunreinigt wird [97]:  $\text{Si}_x\text{N}_y\text{H}_z$  wird gebildet [63]. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb für Siliziumnitrid die Summenformel  $\text{Si}_x\text{N}_y$  verwendet.



**Abbildung 4.5:** a) Wafer nach Zweistufen-Lithographie mit unterschiedlichen Si<sub>x</sub>N<sub>y</sub>-Dicken; rosa: 780 nm, hellgrün: 540 nm, grau: 0 nm; b) Vergrößert.

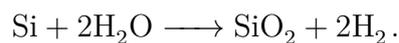
### 4.2.3 Thermische Oxidation

Bei der thermischen Oxidation wächst bei Temperaturen zwischen 800 °C und 1200 °C eine Oxidschicht auf der Substratoberfläche. Das Oxidwachstum besteht aus drei Abschnitten [60]:

- O<sub>2</sub>-Moleküle werden an die Oberfläche transportiert.
- O<sub>2</sub>-Moleküle diffundieren durch die bereits vorhandene Oxidschicht zur Substratoberfläche.
- Dort reagieren die Moleküle mit dem Substrat.

Damit ergibt sich eine abfallende Wachstumsrate während des Prozesses, da die Sauerstoffmoleküle durch die immer dicker werdende SiO<sub>2</sub>-Schicht diffundieren müssen [62].

Es gibt zwei Methoden: die feuchte und die trockene Oxidation. Bei der feuchten Oxidation wird der Sauerstoff zusätzlich mit Wasserdampf versetzt:



In der vorliegenden Arbeit wird die trockene Oxidation für die Herstellung von SiO<sub>2</sub>-Schichten verwendet. Dabei strömt reiner Sauerstoff über die Si-Wafer und reagiert mit dem Silizium:

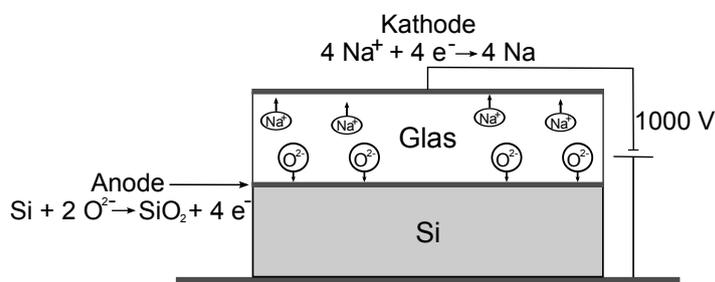


Die Wachstumsrate ist niedriger, dafür ist die Schichtqualität zum Beispiel in Bezug auf Dichte und Durchschlagfestigkeit besser [62].

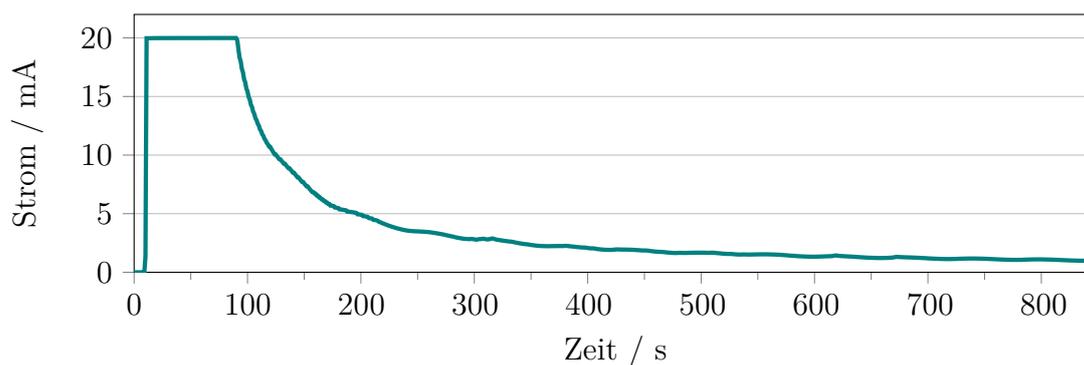
### 4.2.4 Anodisches Bonden

Anodisches Bonden verbindet Silizium mit Glas durch die Ausbildung von kovalenten Bindungen hermetisch dicht. Dieser elektrochemische Prozess basiert auf der Polarisierung von alkalihaltigem Glas [60, 98], wie zum Beispiel dem hier

verwendeten Borsilikatglas, das einen hohen Anteil an Natrium-Ionen enthält (Zusammensetzung in Anhang C.2), wodurch es bei der Prozesstemperatur von 450 °C gering leitfähig wird. Eine Spannung wird zwischen Glas (negativ) und Siliziumsubstrat (positiv) angelegt (Abb. 4.6). Dabei wandern die Kationen ( $\text{Na}^+$ ) im Glas zur Kathode und von der Grenzfläche der Wafer weg, während die Sauerstoff-Ionen ( $\text{O}^{2-}$ ) im Glas in Richtung Anode und damit zu der Grenzfläche hin wandern [98]. Da das Siliziumsubstrat positiv aufgeladen ist, entsteht an den Grenzflächen zwischen den Wafern eine starke elektrostatische Anziehung, und der Spalt zwischen ihnen verkleinert sich bis zum kompletten Kontakt [60]. Aufgrund der  $\text{O}^{2-}$ -Ionen im Glas wird das Silizium an der Grenzfläche oxidiert und verbindet beide Wafer durch kovalente Bindungen miteinander [96]. Ein typischer Stromverlauf des Bondprozesses zeigt aufgrund der Wanderung der Kationen erst einen starken Anstieg. Danach fällt der Strom ab, bis dieser stabil und der Prozess beendet ist [60]. In Abb. 4.7 ist eine Stromkurve des Prozesses zu sehen.



**Abbildung 4.6:** Prinzip des anodischen Bondens. Ein Silizium- und ein Borsilikatglas-Wafer werden bei 450 °C in Kontakt gebracht und eine Spannung angelegt. Die Ionen wandern zu den jeweiligen Elektroden. Durch das resultierende elektrostatische Feld ziehen sich die Waferoberflächen an und die Si-Atome oxidieren. Diese kovalenten Bindungen verbinden die Wafer hermetisch dicht miteinander (in Anlehnung an [96]).



**Abbildung 4.7:** Bondkurve bei 450 °C und 1000 V.

### 4.2.5 Elektrochemisches Funkenerodieren von Borsilikatglas

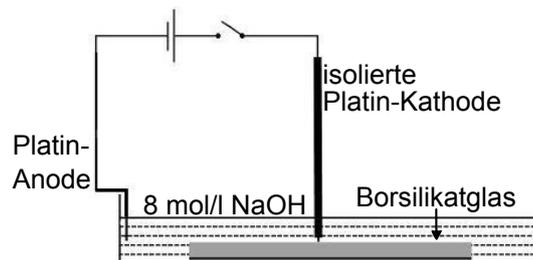
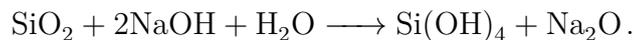
Für die fluidischen Verbindungen der Chips werden Löcher im oberen Borsilikatglas benötigt, welches später auf die Si-Struktur gebonded wird (Abb. 4.2j). Um eine schnelle Designänderung während der Entwicklungsphase zu ermöglichen, wurde das elektrochemische Funkenerodieren (ECDM – *electrochemical discharge machining*) von Borsilikatglas etabliert [99].

Das ECDM wurde aus der Funkenerosion (EDM – *electrical discharge machining*) und dem elektrochemischen Abtragen (ECM – *electrochemical machining*) entwickelt, um nichtleitende Materialien zu bearbeiten [100]. 1925 hat Taylor die elektrochemische Funkenbildung bei der Elektrolyse von geschmolzenem Natriumchlorid beschrieben [100, 101] und 1950 konnte Kellog diese in wässrigen Elektrolyten beobachten [102]. Im Jahr 1968 haben Karafuji und Suda nichtleitendes Material mittels ECDM bearbeitet [100, 101].

Der Prozess wurde inzwischen oft untersucht und für die Mikrofluidik-Herstellung verwendet [100, 101, 103]. Trotzdem sind die Vorgänge nicht komplett aufgeklärt [104]. Der Materialabtrag entsteht aus einer komplexen Kombination von elektrischen Entladungen und elektrochemischen Reaktionen [100, 104]. Werden zwei Elektroden, an denen eine Spannung anliegt, in einen wässrigen Elektrolyten gehalten, startet die Wasserelektrolyse. Dabei handelt es sich um die folgende Redoxreaktion:

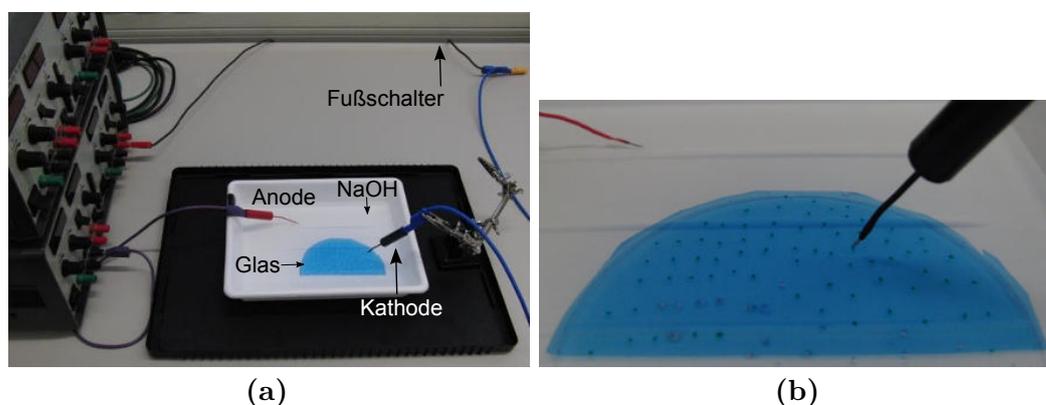


An der Kathode entstehen Wasserstoffblasen, an der Anode Sauerstoffblasen. Dadurch bildet sich eine isolierende Schicht zwischen Elektrode und Glas. Bei Überschreiten einer Grenzspannung entstehen durch die Blasen hindurch elektrische Entladungen. Dadurch wird das Glas kurzzeitig erhitzt und geschmolzen [100, 104]. Yang *et al.* [100] konnten zeigen, dass sich bei den erhöhten Temperaturen zusätzlich ein chemischer Materialabtrag durch die Elektrolytlösung addiert, indem die Natronlauge (NaOH) das  $\text{SiO}_2$  aus dem Borsilikatglas löst:



**Abbildung 4.8:** Schematischer Aufbau zum elektrochemischen Funkenerodieren bei Borsilikatglas, um Löcher für fluidische Anschlüsse zu erzeugen (in Anlehnung an [99]).

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Aufbau wird in Abb. 4.8 schematisch dargestellt. Dieser besteht aus zwei Platin-Elektroden, einer Spannungsquelle, einem Fußschalter und 8 mol/l NaOH in einer Schale (Abb. 4.9). Das Borsilikatglas (Zusammensetzung in Anhang C.2) wird in das NaOH gelegt und die Anode eingetaucht. Die Kathode wird ohne direkten Kontakt knapp über dem Glas positioniert. Durch Betätigen des Fußschalters wird eine Spannung in Höhe von 55 V angelegt. Eine Blasen- und Funkenbildung ist an der Kathode zu beobachten. Das Glas wird abgetragen und die Elektrode stetig nachgeführt. Sobald das Glas durchbohrt ist, wird der Stromkreis mittels Fußschalter unterbrochen, um das trichterförmige Loch mit einem unteren Durchmesser von ca. 0,8 mm nicht zu vergrößern. Dies ist eine kosten- und zeitsparende Methode, um flexibel positionierbare Löcher als fluidische Durchkontaktierungen in Glas mit einem Zeitaufwand von ca. 1 min pro Loch zu erzeugen.



**Abbildung 4.9:** a) Experimenteller Aufbau der elektrochemischen Funkenerosion von Borsilikatglas mit NaOH, um Löcher für fluidische Anschlüsse zu erhalten; b) Vergrößerung der Elektrodenanordnung.

Das Borsilikatglas wird nach der ECDM bei 520 °C (untere Kühltemperatur: 518 °C, Transformationstemperatur: 525 °C [105]) ausgeheizt, um interne Spannungen zu verringern. Dieser Schritt ist für das anschließende anodische Bonden wichtig, da das Glas währenddessen sonst durch die internen Spannungen bricht.

#### 4.2.6 Fluidische Anschlüsse

Um den Chip an Spritzenpumpen anschließen und die Flüssigkeiten an den Ausgängen auffangen zu können, wurde eine kostengünstige und reversible Anschlussmethode entwickelt. Dazu werden pro Chip 12 Aderendhülsen aus verzinnem Kupfer mit zwei Spezialklebern auf das Glas geklebt und danach ausgeheizt (Abb. 4.1). Der Außendurchmesser der Aderendhülsen ist größer als der Innendurchmesser der verwendeten Silikonschläuche. Die Verbindung zwischen

**Tabelle 4.1:** Einige relevante Materialeigenschaften von drei Thermoplasten, die für die Massenproduktion des Chips mittels Spritzgussverfahren geeignet sind.

	PC [106]	Topas [106, 107]	Zeonor [106, 108]
Transparenz	✓	✓	✓
Fluoreszenz	hohe Eigenfluoreszenz	✓	✓
Desinfizieren mit Aceton oder Isopropanol	Isopropanol	beides	beides
Chemikalienresistenz	gut	gut	gut
Wasserabsorption	wenig	weniger	weniger
Hydrophobizität	weniger	stark	stark

Schläuchen und Spritzen wird mit Adaptern realisiert. Beide Anschlüsse sind unter den für die Versuche relevanten Drücken dicht.

### 4.3 Spritzgussverfahren

Für den kommerziellen Einsatz und die zukünftige Massenproduktion der Chips empfiehlt sich das Spritzgussverfahren, da hiermit ebenfalls eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht wird und sich die teure Erstinvestition in eine Masterform aufgrund hoher Stückzahlen in der Produktion lohnt. Dafür wird ein thermoplastisches Polymer verwendet, welches erhitzt und unter Druck in einen Hohlraum einer Form gegossen wird. Um zu schnelles Abkühlen zu vermeiden, wird die Form während des Vorgangs erwärmt und danach langsam abgekühlt. Ein Herstellungszyklus dauert normalerweise mehrere Sekunden [96]. Nachteile sind einerseits die aufwendige und teure Gussform und andererseits der entstehende Stress im Werkstück während des Abkühlens [63].

Als Chipmaterial für das Spritzgussverfahren sind Thermoplaste geeignet. In Tabelle 4.1 sind die Eigenschaften von PolyCarbonat (PC), Topas (ein Cyclo-Olefin-Copolymer) und Zeonor (ein Cyclo-Olefin-Polymer) gegenübergestellt. Alle drei Materialien können für den Chip verwendet werden. Topas und Zeonor sind jedoch auch gegen Aceton beständig und haben eine geringere Eigenfluoreszenz sowie eine geringere Wasserabsorption. Alle drei Materialien werden bereits für massenproduzierte Mikrofluidik-Chips verwendet [106].

## 4.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel werden der zur Herstellung des Prototyps benötigte Gesamtprozess, sowie die erforderlichen Einzeltechnologien und das Spritzgussverfahren als zukünftige Herstellungsmethode zur Massenproduktion des Chips beschrieben.

Der Gesamtprozess setzt sich aus der Siliziumstrukturierung der Vorder- und Rückseite des Siliziumwafers, der Borsilikatglas-Bearbeitung, dem anodischen Bonden und dem Anbringen der fluidischen Anschlüsse zusammen. Die Siliziumstrukturierung wurde mit nasschemischem KOH-Ätzen durchgeführt. Dabei ist die Zweistufen-Lithographie zu erwähnen, mit welcher unterschiedliche Ätztiefen auf der Wafer-Oberseite erreicht werden konnten.

Für die fluidische Anbindung der Chips an Pumpen und Probenbehälter wurde die elektrochemische Funkenerosion etabliert, welche in der Entwicklungsphase flexible Designänderungen zuließ und mit welcher 96 Löcher pro Borsilikatglas-Wafer hergestellt werden konnten. Anschließend wurde der Wafer ausgeheizt, um interne Spannungen zu verringern, durch die beim anschließenden anodischen Bonden der Wafer brechen würde. Für die fluidischen Anschlüsse wurde eine kostengünstige und reversible Methode mit aufgeklebten Aderendhülsen entwickelt, auf welche Silikonschläuche gesteckt werden.

Für den kommerziellen Einsatz und die zukünftige Massenproduktion der Chips empfiehlt sich das Spritzgussverfahren, da hiermit eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht wird und sich die teure Erstinvestition in eine Masterform aufgrund hoher Stückzahlen in der Produktion lohnt. Als Material eignen sich besonders die Thermoplasten Topas und Zeonor aufgrund ihrer geringen Eigenfluoreszenz und der Sterilisierbarkeit mit Aceton.

# 5 Testaufbau und Analysemethoden

## 5.1 Befüllen des Chips

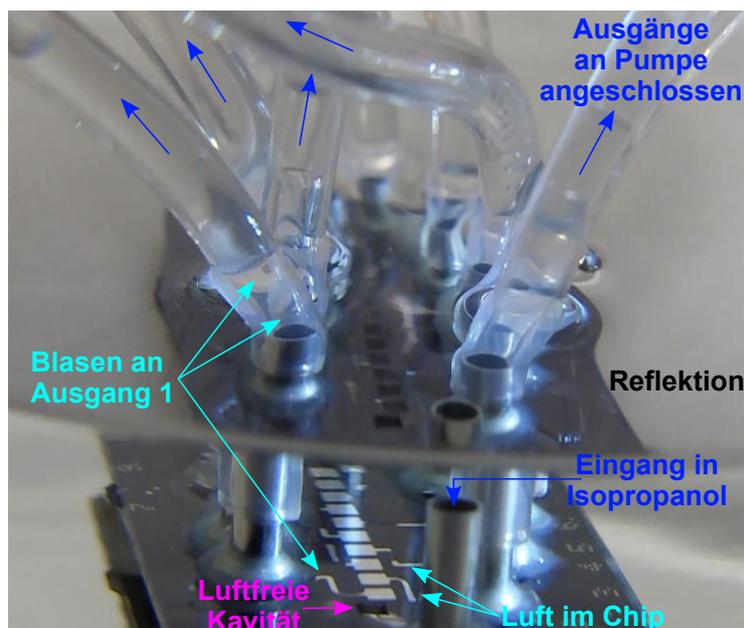
Das blasenfreie Befüllen des Chips ist grundlegend für eine aussagekräftige Analyse des Fließverhaltens der Flüssigkeit im mikrofluidischen Chip, da Luftblasen in den Kanälen oder Kavitäten als zusätzliche Widerstände den Fluss beeinflussen würden. Deshalb muss die Flüssigkeit beim Befüllen die Luft aus dem Chip verdrängen. Bei runden Kanälen mit einem parabolischen Flussprofil wird die Luft vor der einfließenden Flüssigkeit her und damit aus dem Chip heraus geschoben. Bei den in diesem Chip vorliegenden eckigen Kanälen wird die Flüssigkeit stattdessen wahrscheinlich aufgrund der Concus-Finn-Bedingung (Beschreibung in Kapitel 2.1.6, Ergebnisse in Kapitel 6.1) in den eckigen Kanälen in den Kanalecken stark nach vorne gezogen, umgibt die Luft und schnürt diese zu Luftblasen ab. Abb. 5.1 zeigt beide Fälle in einer schematischen Darstellung. Der Einfluss, den der Concus-Finn-Effekt auf das Befüllen hat, kann durch den Kontaktwinkel zwischen Substrat und Flüssigkeit modifiziert werden, indem unterschiedliche Oberflächenbeschichtungen oder Flüssigkeiten verwendet werden.

Um Luftblasen aufgrund der dreidimensionalen Anordnung der Kanäle und der Concus-Finn-Bedingung zu vermeiden, werden verschiedene Methoden zum Befüllen überprüft:

- Verwenden unterschiedlicher **Flüssigkeiten** mit verschiedenem Benetzungsverhalten
- Anlegen von **Überdruck** an Eingängen
- Anlegen von **Unterdruck** an Ausgängen
- Variieren der Oberflächenbenetzbarkeit durch verschiedene **Oberflächenbeschichtungen**: natürliches und thermisch aufgewachsenes  $\text{SiO}_2$
- Befüllen des Chips durch **Unterdruckatmosphäre**



**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung einer parabolischen Strömung in einem kreisrunden Rohr (links) und des Concus-Finn-Effekts in einem eckigen Kanal (rechts), dabei wird die Flüssigkeit in den Ecken weiter nach vorne gezogen und verbreitet sich dort schneller als in der Kanalmitte. Auf diese Weise kann Luft eingeschlossen werden.



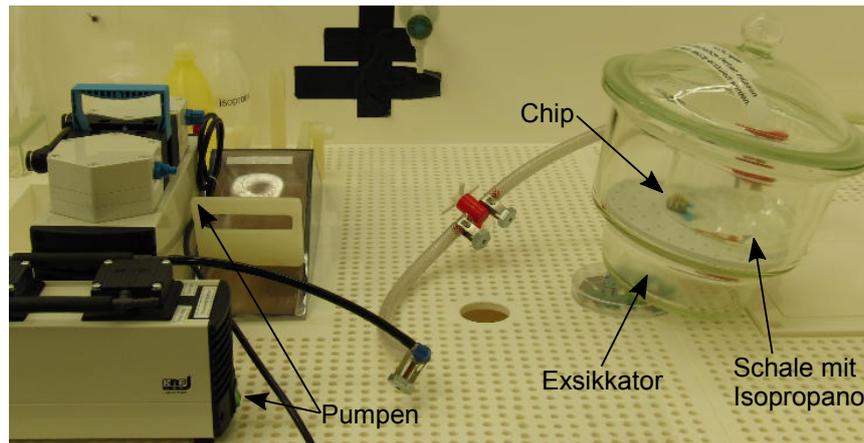
**Abbildung 5.2:** Chip in Isopropanol (Reflektionskante sichtbar) während des Befüllens mittels Unterdruck an den Ausgängen. Die entgaste Flüssigkeit wird durch die Eingänge gesogen und die Luftblasen dehnen sich durch den Unterdruck aus, wodurch teilweise Luft aus dem Chip entweicht.

Alle während den Tests verwendeten Flüssigkeiten werden zum Entgasen für 5 min in Ultraschall behandelt und direkt danach entweder in Unterdruckatmosphäre gelagert oder in eine verschlossene Spritze gefüllt, um eine erneute Luftaufnahme zu minimieren.

**Verwenden unterschiedlicher Flüssigkeiten** Als Flüssigkeiten wurden Isopropanol, Ethanol, DI-Wasser, phosphatgepufferte Salzlösung (PBS<sup>1</sup> – *phosphate buffered saline*) und Dimethylsulfoxid-Lösung getestet. Bei letzteren ist die Oberflächenspannung und damit der Kontaktwinkel von Flüssigkeit zu Glas und Silizium größer als bei Isopropanol, wodurch der Concus-Finn-Effekt und damit die Luftblasenentstehung geringer ist. Der Nachteil ist jedoch die schwierigere Entgasung. Aus diesem Grund wurde zum Befüllen letztendlich Isopropanol verwendet, welches zugleich den Chip sterilisiert.

**Überdruck an Eingängen** Mit Hilfe zweier Spritzenpumpen wird entgaste Flüssigkeit an den Eingängen in den Chip gepumpt. Für keine der Flüssigkeiten konnte bei dieser Methode ein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht werden.

<sup>1</sup>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich



**Abbildung 5.3:** Exsikkator-Aufbau zum Evakuieren und anschließendem Befüllen des Chips.

**Unterdruck an Ausgängen** Mit Hilfe einer Membranpumpe<sup>2</sup> wird für 2 h an den Ausgängen Luft aus dem Chip gepumpt und anschließend entgaste Flüssigkeit durch die Eingänge gesogen (Abb. 5.2). Um die verbliebenen Luftblasen zu entfernen, wird für weitere 24 h an den Ausgängen Unterdruck erzeugt. Nach Anlegen von Atmosphärendruck werden die Blasen zwar kleiner, bleiben aber in den Kavitäten. Durch diese Methode werden bessere Ergebnisse erreicht als durch Anlegen eines Überdrucks, das grundlegende Problem wird aber nicht behoben. Zudem ist diese Methode zeit- und arbeitsaufwendiger als die Überdruckvariante.

**Oberflächenmodifikation mittels Siliziumdioxid-Schicht** Wie oben beschrieben kann der Einfluss, den der Concus-Finn-Effekt auf das Befüllen hat, durch unterschiedliche Oberflächenbeschichtungen variiert werden. Da die Schichten biokompatibel und in den Herstellungsprozess integrierbar sein müssen, werden Chips mit natürlichem und mit thermisch hergestelltem 90 nm dickem  $\text{SiO}_2$  verwendet. Die mit Wasser gebildeten Kontaktwinkel der Schichten wurden mit der in Kapitel 5.4 beschriebenen Methode auf geätztem Si der  $\{100\}$ -Ebene und der  $\{111\}$ -Ebene für natürliches  $\text{SiO}_2$  und für thermisches  $\text{SiO}_2$  bestimmt. Beide Oberflächen sind gut benetzbar (Kapitel 6.1), wobei der Concus-Finn-Effekt aufgrund der geringeren Benetzbarkeit bei thermischem  $\text{SiO}_2$  weniger ausgeprägt ist. Die Blasenanzahl kann bei den bisher genannten Methoden durch die zusätzliche Schicht jedoch nur reduziert und nicht komplett beseitigt werden.

**Unterdruckatmosphäre** Diese Methode basiert auf dem Vorgehen von Monahan *et al.* [109] für einen PDMS-Chip. Dabei wird die Gasdurchlässigkeit von PDMS ausgenutzt, wodurch sich verbliebene Blasen nach einiger Zeit reduzieren. Für den gasundurchlässigen Si/Glas-Chip sind deshalb einige Prozessmodifikationen nötig, um ihn in Unterdruckatmosphäre befüllen zu können,

<sup>2</sup>KNF Laboport N820.3FT.18



**Abbildung 5.4:** Schematische Zeichnung des Exsikkators während des Luftabpumpens. Er wird gekippt und die Glasschale so mit Isopropanol befüllt, dass der Chip nicht eingetaucht ist.

wie z. B. die Änderung der Reihenfolge: in der vorliegenden Arbeit wird zuerst Unterdruck angelegt und erst danach werden die Chipanschlüsse in Flüssigkeit eingetaucht. Außerdem werden die Ausgangsanschlüsse abgeklebt. Dadurch können Chips reproduzierbar blasenfrei befüllt werden.

Wie in Abb. 5.3 und Abb. 5.4 zu sehen ist, wird ein Exsikkator schräg aufgestellt. In einer darin stehenden Glasschale wird ein Chip fixiert, dessen Ausgangsanschlüsse zuvor mit Kapton-Klebeband<sup>3</sup> verschlossen wurden. Die Schale wird bis zum untersten Rand des Chips mit entgastem Isopropanol gefüllt und der Exsikkator verschlossen (Abb. 5.4). Im Exsikkator wird in zwei Schritten mit zwei Membranpumpen<sup>4</sup> auf einen definierten Unterdruck abgepumpt, zuerst in 30 min auf ca. 100 mbar und in weiteren 2 min bis knapp über den Dampfdruck von Isopropanol bei 42,6 mbar. Danach wird der Exsikkator zurückgekippt, so dass die Eingänge des Chips komplett mit Isopropanol bedeckt sind. Durch Anlegen von Atmosphärendruck wird die Flüssigkeit in den Chip gedrückt und die im Chip verbliebene Luft zu den Ausgängen hin verdrängt. Dort sammelt sie sich in Form von Blasen (Abb. 5.5) und wird durch Abziehen der Klebefolie entfernt. Der Chip kann daraufhin optisch auf Blasenfreiheit überprüft (Abb. 5.6) und für anschließende Tests mit entgastem PBS gespült werden.

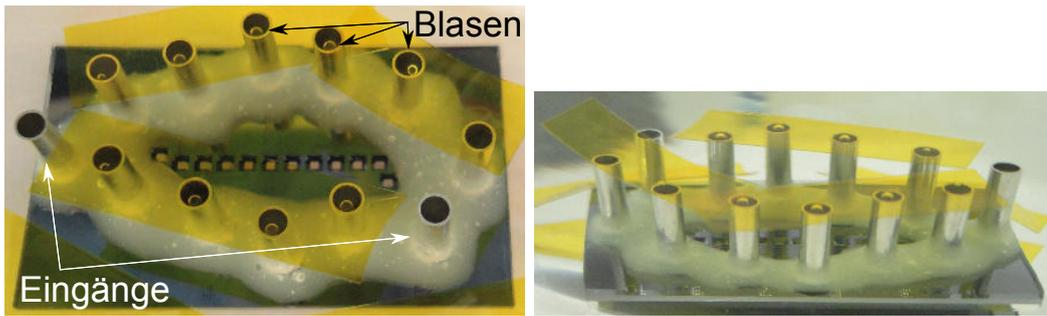
## 5.2 Versuchsaufbau des Flusstests

Für die Flusstests wird der befüllte und mit PBS gespülte Chip verwendet. Das verwendete Zubehör ist in Tabelle 5.1 aufgeführt und der Aufbau ist in Abb. 5.7 zu sehen. An den Chipeingängen sind Spritzen angeschlossen, die in Spritzenpumpen eingespannt und über je einen Dreiwegehahn und einen

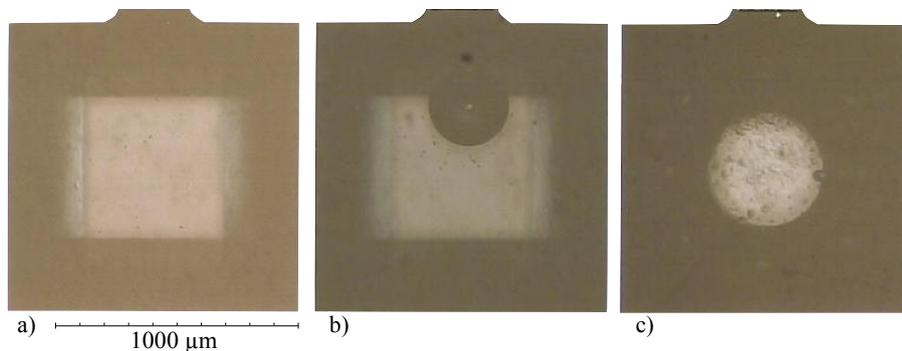
---

<sup>3</sup>Micronova, Polyimid mit Silikonkleber

<sup>4</sup>Beide von KNF Laboport, N816.1.2 und N820.3FT.18

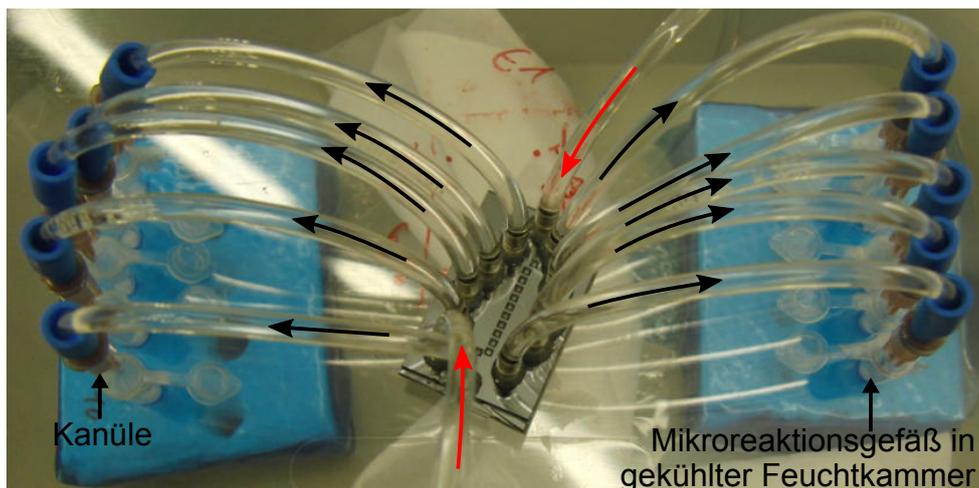


**Abbildung 5.5:** Chip nach dem Befüllen mit Isopropanol. Zu diesem Zeitpunkt ist der Chip noch komplett in Isopropanol eingetaucht. Durch den Überdruck nach Anlegen des Atmosphärendrucks wird Isopropanol an den Eingängen in die Kanäle gedrückt und die restliche Luft im Chip zu den Ausgängen hin verdrängt. Dort sind unter dem Kapton-Band (gelb) Luftblasen zu erkennen, die durch Abziehen der Folie entfernt werden.



**Abbildung 5.6:** Optische Kontrolle der mit Isopropanol befüllten Kavitäten auf dem Chip: a) ohne Blase, b) mit kleiner Blase, c) mit großer Blase. Obwohl die Wände der Kavitäten unter dem Mikroskop dunkel erscheinen, sind die Blasen gut zu erkennen.

Luer-Adapter mit Schläuchen verbunden sind (Abb. 5.8). Auch an den zehn Ausgängen werden Schläuche aufgesteckt und über Knickschutztüllen mit Kanülen zu Mikroreaktionsgefäßen in einer gekühlten Feuchtkammer angeschlossen. Auf diese Weise wird die Verdunstung der Probenflüssigkeiten während der Versuchsdurchführung und somit eine Verfälschung der Ergebnisse minimiert. An Einlass 1 werden die in PBS gelösten Testsubstanzen und an Einlass 2 pures PBS angelegt. Wenn bei der Analysemethode keine anderen Werte angegeben werden, liegen dabei an Eingang 1 und Eingang 2 die Flussraten bei  $5,99 \mu\text{l}/\text{min}$  bzw.  $54,01 \mu\text{l}/\text{min}$ . Nachdem das Isopropanol aus dem Chip und den Ausgangsschläuchen verdrängt ist (ca. 100 min), stellt sich im Chip ein stabiler Fluss ein und die Probenflüssigkeiten werden kontinuierlich über einen definierten Zeitraum in den Mikroreaktionsgefäßen für jeden Ausgang einzeln gesammelt. Danach werden die Gefäße verschlossen und bis zur Analyse bei  $7^\circ\text{C}$  gekühlt. Zur Gewährleistung von Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird für jeden Test ein neuer Chip verwendet.



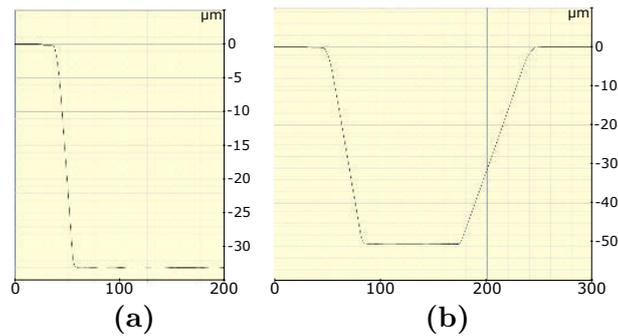
**Abbildung 5.7:** Messaufbau für die Flusstests. Die Schläuche werden auf die Anschlüsse aufgesteckt und an den Ausgängen werden die Proben einzeln in einem Mikroreaktionsgefäß gesammelt. Diese befinden sich in einer gekühlten Feuchtkammer, um die Verdunstung der Probenflüssigkeiten zu minimieren. Die Proben werden danach mit Hilfe unterschiedlicher Testmethoden analysiert; rot: Eingangsflüsse; schwarz: Ausgangsflüsse (in Anlehnung an [83]).

**Tabelle 5.1:** Auflistung des verwendeten Zubehörs für den Flusstest.

	Hersteller	Bezeichnung	Beschreibung
Spritzen	Becton Dickinson	BD Plastipak	1 ml - 5 ml
Dreiwegehahn	B. Braun	Discofix <sup>®</sup> -3	
Luer-Adapter	Upchurch Scientific	P-870	
TYGON <sup>®</sup> Schläuche mit Innendurchmesser und Außendurchmesser	VWR	R3607	1,52 ml x 3,22 ml
	VWR	R3603	1,6 ml x 3,2 ml
	VWR	E3603	1,6 ml x 3,2 ml
Knickschutztüllen	Telegärtner	B00080A0002	
Spritzenpumpe 1	kdScientific	KDS 210	
Spritzenpumpe 2	kdScientific	KDS Legato 180	



**Abbildung 5.8:** Verbindung einer Spritze mit einem Dreiwegehahn, um Blasen entfernen zu können, bevor sie in den Schlauch gelangen. Dahinter wird der Dreiwegehahn über einen Luer-Adapter mit dem Schlauch in Richtung Eingang verbunden.



**Abbildung 5.9:** Messung der Ätztiefe an der Kante der Zufusskanäle mittels Oberflächenprofilometer von a) Design 1: Solltiefe 32,8  $\mu\text{m}$  und b) Design 2: Solltiefe 50,46  $\mu\text{m}$ .

## 5.3 Oberflächenprofilometer

Mit einem Oberflächenprofilometer<sup>5</sup> können Aussagen über die Topographie einer Oberfläche getroffen werden. Hierzu tastet eine Diamantnadel die Probe ab und ihre Auslenkung wird elektromechanisch erfasst. Damit können z. B. die Oberflächenrauigkeit oder die Ätztiefe einer Kavität bestimmt und mit einer Software<sup>6</sup> analysiert werden. Zwei Beispielmessungen zur Bestimmung der Ätztiefe der beiden Chipdesigns sind in Abb. 5.9 zu sehen. Die verwendete Nadel hatte einen Spitzenradius von 5  $\mu\text{m}$  und als Druckkraft auf die Probe wurden 7 mg eingestellt.

## 5.4 Statische Kontaktwinkelmessung

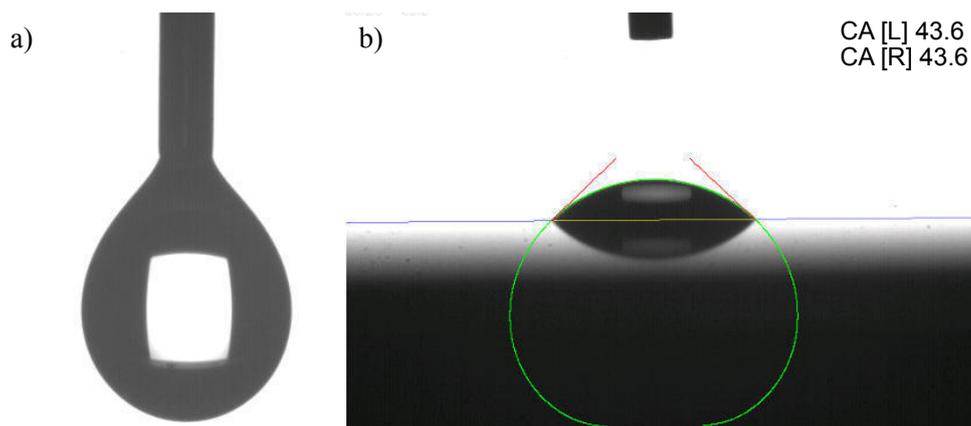
Die statische Kontaktwinkelmessung wird mit einer Tropfenkonturanalyse<sup>7</sup> durchgeführt. Diese kann entweder die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit an Luft mittels hängendem Tropfen (*Pendant-Drop-Methode*) oder den Kontaktwinkel und somit die Benetzbarkeit einer Substratoberfläche mit einer bestimmten Flüssigkeit mittels liegendem Tropfen (*Sessile-Drop-Methode*) bestimmen. Dabei wird der Tropfen jeweils optisch erfasst und mit Hilfe der Software eine Graustufenanalyse des Bildes durchgeführt [110]. An die dabei erkannte Kontur wird ein geometrisches Modell angepasst, mit dem der erwünschte Parameter berechnet wird.

Die *Pendant-Drop-Methode* (Abb. 5.10a) wird zur Bestimmung der Oberflächenspannung (Kapitel 2.1.5) von Flüssigkeiten an Luft verwendet. Dabei wird ein festgelegtes Volumen der Flüssigkeit aus einer Spritze automatisiert abgegeben. Zwei Kräfte wirken auf den so entstandenen Tropfen und beeinflussen seine Form: die Gravitation und die Oberflächenspannung [49]. Die Gravitation zieht den Tropfen wegen seines Gewichts in die Länge, wohingegen die Oberflächenspannung

<sup>5</sup>Veeco Instruments Inc. DEKTAK 150

<sup>6</sup>Veeco Instruments Inc. Dektak V9.2

<sup>7</sup>Krüss Drop Shape Analyzer DSA 100S, Software DSA3

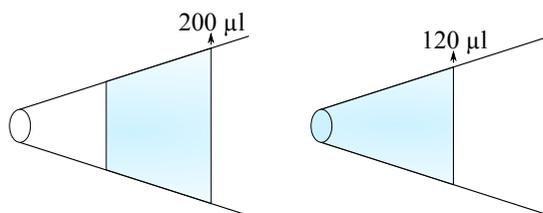


**Abbildung 5.10:** Die zwei Methoden der Tropfenkonturanalyse; a) Der Tropfen an der Spritzenkanüle während der *Pendant-Drop*-Methode zur Bestimmung der Oberflächenspannung von DI-Wasser an Luft; b) *Sessile-Drop*-Tropfenkonturanalyse mit Young-Laplace-Fit (grün) zur Bestimmung des Kontaktwinkels  $\theta$  (rot) von DI-Wasser an Luft. Die Basislinie (blau/gelb) wird vorher festgelegt. Die Substratoberfläche ist eine ca. 90 nm dicke  $\text{SiO}_2$ -Schicht auf einem mit KOH geätzten (111)-Si-Wafer. Oben ist die Kanüle zu sehen, rechts sind die Werte der Winkel angegeben.

versucht, die Grenzfläche zu minimieren und ihn in eine Kugelform zu bringen. Der Grad der Abweichung von der Kugelform gibt das Verhältnis zwischen der Gewichtskraft des Tropfens und dessen Oberflächenspannung wieder [111]. Mit Hilfe der Young-Laplace-Gleichung kann von der Tropfenkontur auf die Oberflächenspannung geschlossen werden [49].

Durch die *Sessile-Drop*-Methode (Abb. 5.10b) wird der Kontaktwinkel am Dreiphasenpunkt einer Flüssigkeit auf einer Oberfläche an Luft bestimmt. Daraus kann auf die Benetzbarkeit der Substratoberfläche mit der Flüssigkeit geschlossen werden, wie in Kapitel 2.1.5 beschrieben ist. Ein festgelegtes Flüssigkeitsvolumen wird aus einer Spritze automatisiert abgegeben und auf der Substratoberfläche platziert. Nach Bestimmung der Basislinie zwischen Tropfen und Substrat wird die Konturanalyse mit einem Young-Laplace-Fit durchgeführt und die Kontaktwinkel werden angezeigt.

Vor den Winkelmessungen wird täglich frisches DI-Wasser aufgefüllt und dessen Oberflächenspannung an Luft durch drei Messungen bestimmt, um Unregelmäßigkeiten zu erkennen. Zusätzlich werden die Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur notiert. Für jedes Material, dessen Benetzbarkeit mit DI-Wasser bestimmt werden soll, werden drei Proben hergestellt. Jede Probe wird an drei unterschiedlichen Tagen vermessen, um Schwankungen der Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit auszugleichen. Zwischen diesen Messungen wird die Probe im Ultraschallbad für jeweils 5 min zuerst in Aceton, anschließend in Isopropanol und in DI-Wasser gereinigt, um vergleichbare Ausgangsbedingungen zu erhalten. Für jede Probenmessung werden die Kontaktwinkel von 10 Tropfen mit einem Volumen von 3  $\mu\text{l}$  bestimmt. Das arithmetische Mittel eines Materials besteht folglich aus insgesamt 90 Messungen.



**Abbildung 5.11:** Volumenmessung zur Bestimmung der Flussraten an den einzelnen Chipausgängen. Die Flüssigkeit wird ohne Luftblasen mit einer Pipette aufgesogen, in der das Volumen zu hoch eingestellt ist, z. B. 200 µl. Danach wird das Volumen der Pipette minimiert, bis der Flüssigkeitspfropfen die Spitze erreicht. Das Messvolumen beträgt hier z. B. 120 µl.

## 5.5 Volumenmessung

Für die Messungen der Flussrate werden die Flüssigkeitsmengen pro Chipausgang nach einer bestimmten Zeiteinheit gemessen. Die Volumenbestimmung wird mit Hilfe einer Pipette<sup>8</sup> durchgeführt. Dabei wird die Pipette auf ein größeres Volumen eingestellt und die komplette Flüssigkeit ohne Blasen aus dem Mikroreaktionsgefäß aufgesaugt (Abb. 5.11). Das Pipettenvolumen kann so lange minimiert werden, bis der Flüssigkeitspfropfen die Spitze erreicht und das Volumen an der Pipette abgelesen werden kann.

Pro Chip werden direkt hintereinander zwei Probensätze gesammelt: dem ersten (Test 1) wird ein definiertes Volumen für die Massenspektrometrie entnommen, der zweite (Test 2) ist ausschließlich zur Volumenbestimmung vorgesehen. Um die Konzentrationen der im ersten Probensatz enthaltenen Substanzen nicht zu beeinflussen, wird deren Volumen erst nach der massenspektroskopischen Analyse bestimmt.

## 5.6 Konzentrationsanalysen

Im Chip sollen passiv zehn verschiedene Verdünnungen einer Substanz erzeugt werden, die jeweils zu einer Zellokavität fließen. Die Probenflüssigkeiten werden mit dem Versuchsaufbau des in Kapitel 5.2 beschriebenen Flusstests für jeden Ausgang gesammelt und bis zur anschließenden Analyse gekühlt. Ob die geplanten Substanzmengen darin enthalten sind, wird durch Konzentrationsanalysen festgestellt. Da bei den Messungen ein sehr weiter Konzentrationsbereich von 0,098 % bis 50 % abgedeckt werden muss und dabei unbekannte Effekte, wie z. B. Wechselwirkungen zwischen der Substanz und den Chip- bzw. Schlauchmaterialien, auftreten können, werden die Analysen mit insgesamt vier verschiedenen Methoden und unterschiedlichen Substanzen durchgeführt. Im Folgenden wird auf die jeweilige Theorie und die Besonderheiten während des Flusstests eingegangen.

<sup>8</sup>LTS™ Pipet - Lite™ L200

### 5.6.1 Chromatographie mit Massenspektrometrie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC – *high performance liquid chromatography*) mit anschließender Massenspektrometrie (MS) wird hauptsächlich zur Ionenbestimmung aber auch zur Mengenbestimmung von Molekülen verwendet. Die HPLC<sup>9</sup> dient dabei der Trennung verschiedener Ionen oder Moleküle [48]. So werden für die darauffolgende MS<sup>10</sup> verschiedene Massenspektren der im Analyten enthaltenen Verbindungen erreicht [112]. Die MS dient zur Quantifizierung der Menge der Substanzen, wobei Ionen erzeugt, getrennt und detektiert werden [112]. Der Aufbau einer HPLC-MS ist schematisch in Abb. 5.12 dargestellt.

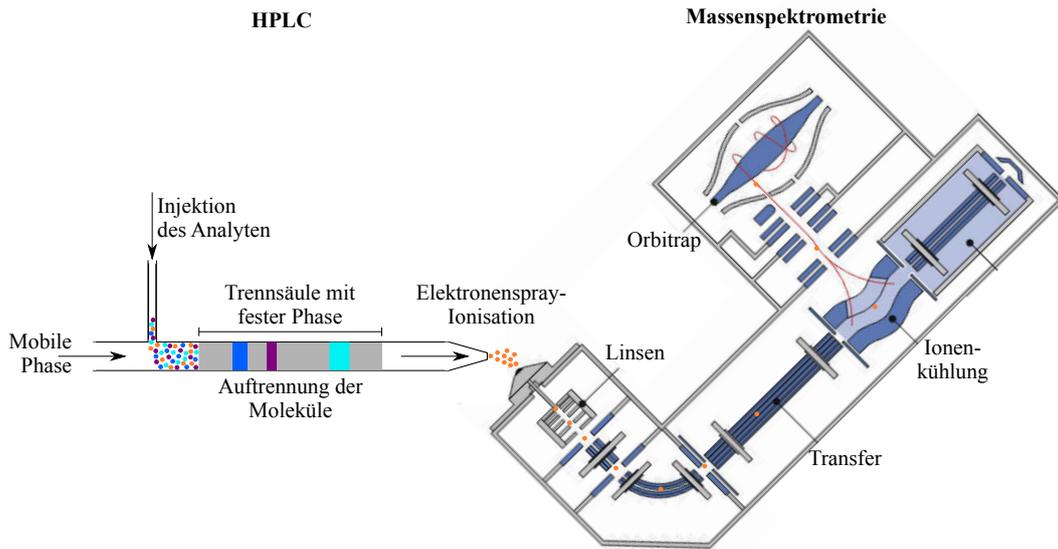
Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Adsorptionschromatographie wird das *Reversed-Phase*-Verfahren angewendet, bei welchem die feste stationäre Phase der Trennsäule unpolar und die mobile Phase polar (PBS mit Methanol) ist. Die verschiedenen Moleküle in der mobilen Phase werden durch deren unterschiedliche Wechselwirkungen mit der stationären Phase voneinander getrennt. Die Kopplung der auf Flüssigkeit basierenden HPLC zu der auf Gasphase basierenden MS wird durch die Elektronenspray-Ionisation realisiert [112]. Als Ionenfalle in der MS wird ein *Orbitrap* verwendet (Abb. 5.13). Darin umkreisen die Ionen eine spindelförmige Elektrode in einem elektrostatischen Feld und schwingen in axialer Richtung. Diese Oszillationsfrequenzen von Ionen unterschiedlicher Masse können detektiert, mit Hilfe einer Fourier-Transformation analysiert und ihr Masse-zu-Ladung-Verhältnis  $m/q$  bestimmt werden [113]. Bei der Ionisierung können einige Verbindungen gegenüber anderen bevorzugt oder unterdrückt werden. Deshalb werden die Proben in Bezug zu einer Kalibrierkurve gemessen [115]. Diese wird durch vorheriges Messen bekannter Mengen der Probensubstanz ermittelt und durch Auftragen der gemessenen Intensitäten über die bekannten Substanzkonzentrationen dargestellt. Das Ergebnis der Quantifizierung kann durch Driften der Geräteempfindlichkeit, z.B. aufgrund einer fortschreitenden Verunreinigung der Ionenquelle, beeinträchtigt werden [115].

Für die von der Firma Pharmacelsus GmbH in Saarbrücken durchgeführten Analysen wurden in PBS die Substanzen Diclofenac (500  $\mu\text{mol/l}$ ), Metoprolol (100  $\mu\text{mol/l}$ ) und Verapamil (100  $\mu\text{mol/l}$ ) gelöst. Die letztgenannte Substanz ist allerdings nicht für die Messung geeignet, da sie entweder mit den Testmaterialien wechselwirkt oder in der MS Fehler verursacht. Die 100  $\mu\text{l}$ -Proben wurden nach 20 min Flusstest gewonnen. Davon wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  mit Methanol vermischt und automatisiert vermessen. Für jede Messreihe wurde eine pipettierte Konzentrationsreihe der Substanzen zweimal gemessen und daraus mit Hilfe einer Software ein Fit für die Kalibrierkurve berechnet. Die Probenergebnisse wurden darauf bezogen und als Prozent der positiven Kontrolle angegeben.

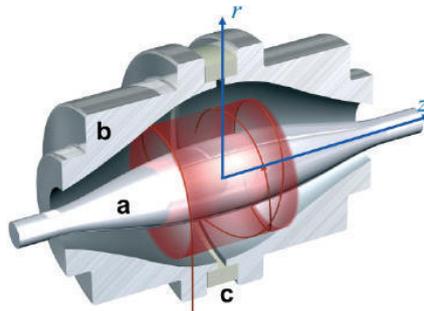
---

<sup>9</sup>Thermo Scientific Accela

<sup>10</sup>Thermo Scientific Exactive<sup>TM</sup> Orbitrap<sup>TM</sup> mass spectrometer



**Abbildung 5.12:** Schematischer Aufbau der HPLC mit gekoppelter Massenspektrometrie. Die im Analyten enthaltenen Moleküle werden in der HPLC voneinander getrennt. Die Verbindung zwischen der HPLC und der MS wird durch ein Elektronenspray realisiert, welches die Ionen für die MS erzeugt. Danach werden die Ionen durch Linsen gebündelt, in die Ionenfalle *Orbitrap* geleitet und die Menge quantifiziert. Abbildung der MS in Anlehnung an [114].



**Abbildung 5.13:** Schematische Darstellung der Ionenfalle *Orbitrap*. In der Mitte ist die spindelförmige Elektrode (a) angebracht, die von den Ionen im elektrostatischen Feld umkreist wird. Die äußeren Elektroden (b) werden durch einen isolierenden Keramikring (c) geteilt [113].

### 5.6.2 Bradford-Test

Der Bradford-Test (BPA – *Bradford protein assay*) ist eine photometrische Methode, um Proteinkonzentrationen mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau in einer Lösung quantitativ zu bestimmen und wurde 1976 von Marion Bradford [116] entwickelt. In saurer Lösung verfärbt sich die rote Verdünnung durch Bindung von Proteinen blau und das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 470 nm zu 595 nm. Im Photospektrometer kann durch Intensitätsmessung

**Tabelle 5.2:** Ergebnisse der pH-Wert-Analysen mit Indikatorstreifen und Potentiometer einer pipettierten Konzentrationsreihe mit Essigsäure. Dabei wurden für die Verdünnung jeweils alternativ DI-Wasser (DI) bzw. Leitungswasser (LW) verwendet.

Konzentrationen	Soll	Indikatorstreifen		Potentiometer	
		DI	LW	DI	LW
Ausgangslösung	3,8	3,8	3,8	2,8	2,75
50 %	4,1	4,1	3,8	2,86	3,06
25 %	4,4	4,1-4,4	4,1-4,4	2,92	3,38
12,5 %	4,7	4,1-4,4	4,4	3,04	3,72
6,25 %	5	4,4	4,7	3,13	4,08
3,125 %	5,3	4,4	5	3,25	4,5
1,563 %	5,6	4,4-4,7	5,3	3,39	5,22
0,781 %	5,9	4,7	5,9	3,52	6,22
0,391 %	6,2	5-5,3	6,2	3,69	6,77
0,195 %	6,5	5,3	6,2-6,5		7,06

der Absorption die Menge der gebundenen Proteine und damit die Proteinkonzentration in der Lösung bestimmt werden.

Als Testsubstanz wurden 100 mg/ml Rinderalbumin (BSA<sup>11</sup> – *bovine serum albumin*) in PBS verwendet. Eine Standardkurve wurde mit Hilfe einer pipettierten Konzentrationsreihe dieser zwei Substanzen erstellt und analysiert. Mittels Flusstest wurden in 45 min jeweils 200 µl Probenflüssigkeit an den Chipausgängen gesammelt und gekühlt aufbewahrt. Die BPA-Analysen wurden für jeden Chip an aufeinander folgenden Tagen am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik<sup>12</sup> zweimal vermessen. Die Ergebnisse wurden gemittelt und in Prozent der positiven Kontrolle, dem Mittelwert der Substanzmessungen zwischen den Tests am selben Tag, dargestellt.

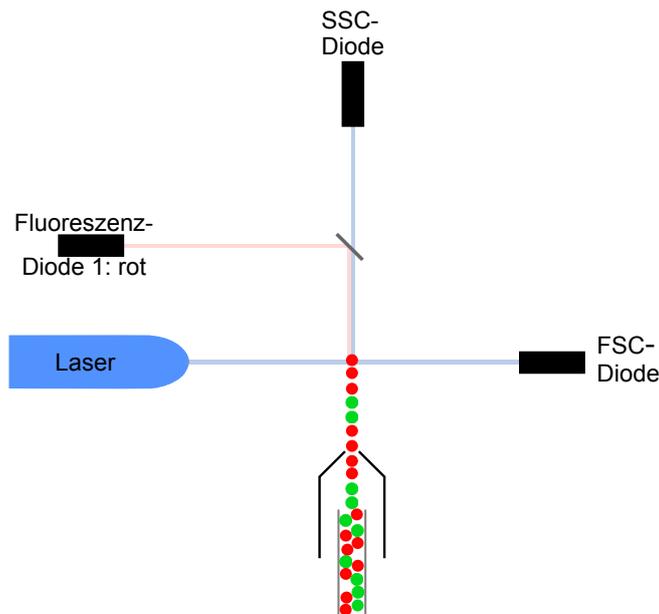
### 5.6.3 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie wird normalerweise zur Analyse von Zellen verwendet. In dieser Arbeit wird damit die Menge fluoreszierender Partikel gemessen, die in den Probenflüssigkeiten enthalten sind, um auf das Fließverhalten im Chip schließen zu können.

Das Prinzip der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie ist in Abb. 5.14 vereinfacht mit nur einem Fluoreszenzdetektor dargestellt. Die zu messende Flüssigkeit wird hydrodynamisch zu einem dünnen Strahl fokussiert, so dass die Partikel einzeln einen Laserstrahl passieren. Auf diese Weise können sowohl die Lichtstreuung als

<sup>11</sup>Sigma-Aldrich, 200 mg/ml

<sup>12</sup>Arbeitsgruppe In-Vitro-Kulturtechniken, Dr. Erwin Gorjup, IBMT, St. Ingbert



**Abbildung 5.14:** Schematische Darstellung der Messmethode einer Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. Nach hydrodynamischer Fokussierung werden die Partikel einzeln mit einem Laserstrahl angestrahlt, wodurch sich das Licht unterschiedlich streut: FSC (Partikelgröße), SSC (Granularität), Fluoreszenz (hier vereinfacht mit nur einem Detektor dargestellt).

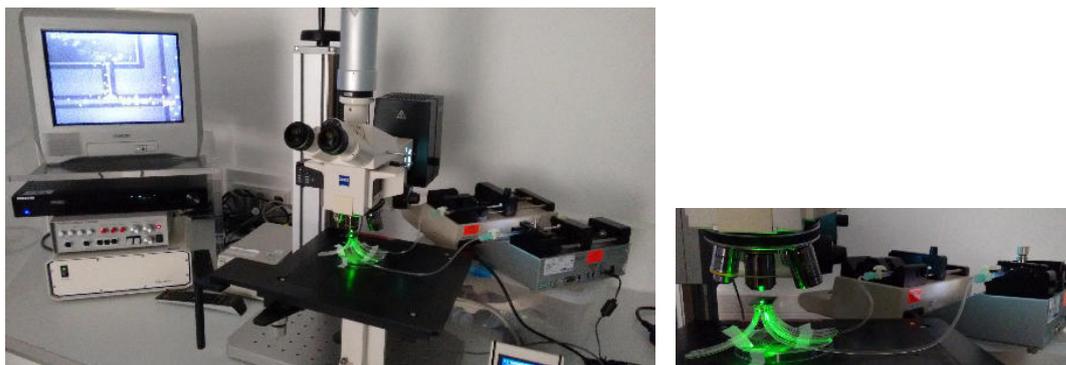
auch das emittierte Fluoreszenzlicht jedes einzelnen Teilchens detektiert werden. Das vorwärts gestreute Licht (FSC – *forward-scattered*) ist ein Maß für die Größe der Zellen/Partikel, wodurch festgestellt werden kann, ob die Partikel vereinzelt oder als Agglomerat vorliegen. Das seitwärts gestreute Licht (SSC – *side-scattered*) gibt die Granularität wieder, wodurch Zellen voneinander unterschieden werden können.

Unterschiedlich fluoreszierende 1  $\mu\text{m}$ -Partikel wurden in PBS mit unterschiedlichen Dichten suspendiert: rote<sup>13</sup> an Eingang 1 mit ca.  $15,2 \cdot 10^6$  Partikel/ml, grüne<sup>14</sup> an Eingang 2 mit ca.  $1,7 \cdot 10^6$  Partikel/ml. Somit ergibt sich für beide Eingänge eine ähnliche Partikelanzahl pro Minute mit ca.  $9 \cdot 10^4$  Partikel/min. Zur Gewinnung der Probenflüssigkeiten fließen im Flusstest diese zwei Suspensionen für 45 min durch den Chip. Pro Chip werden direkt hintereinander zweimal Proben genommen, um die Stabilität des Flusses zu überprüfen. Die Analysen wurden noch am gleichen Tag mit einem Durchflusszytometer<sup>15</sup> an definierten Probenvolumina durchgeführt und mit Hilfe der computergestützten Datenauswertung Streudiagramme erstellt. Zu Beginn der Messungen wurde das Gerät anhand der reinen Partikelsuspensionen kalibriert und ein Schwellenwert eingestellt.

<sup>13</sup>Fluoresbrite®, Polysciences, Polychromatic Red, max. Lichtabsorption: 491 nm, max. Emission: 565 nm [117]

<sup>14</sup>Fluoresbrite®, Polysciences, YG, max. Lichtabsorption: 441 nm, max. Emission: 486 nm [117]

<sup>15</sup>BD FACSCanto™, Software BD FACSDiva™



**Abbildung 5.15:** Aufbau des Fluoreszenzmikroskops, um den Fluss im Chip zu visualisieren; links: Mikroskop mit Chip und angeschlossenen Spritzenpumpen während einer Messung mit Fluoresbrite<sup>®</sup>-Partikeln; rechts: Vergrößerung des Chips.

### 5.6.4 pH-Messungen

Der pH-Wert gibt an, wie sauer oder alkalisch eine wässrige Lösung ist. Bei sauren Lösungen überwiegt die Menge der Oxoniumionen ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) gegenüber der Hydroxidionen ( $\text{HO}^-$ ), bei alkalischen Lösungen ist es umgekehrt. Durch Verdünnung einer Säure ändert sich das Ionenverhältnis und damit auch der pH-Wert, der mit Hilfe eines Potentiometers oder mit Indikatorfarbstoff-Papierstreifen messbar ist. Bei halbiertter Konzentration, also doppelter Verdünnung der Ausgangskonzentration  $c_a$ , müsste sich nach den Gleichungen (5.1) bis (5.4) der pH-Wert immer um den Wert 0,3 erhöhen:

$$\text{pH-Wert} \quad pH = -\log(c_a), \quad (5.1)$$

$$\text{mit halbiertter Konzentration} \quad pH = -\log(c_a \cdot 1/2), \quad (5.2)$$

$$= -\log(c_a) - \log(1/2), \quad (5.3)$$

$$= -\log(c_a) + 0,30. \quad (5.4)$$

Diese theoretische Berechnung wird mit Indikatorstreifen<sup>16</sup> an einer pipettierten Konzentrationsreihe mit Essigsäure überprüft. Die berechneten Werte werden in Testmessungen mit Leitungswasser annähernd erreicht (Tabelle 5.2), allerdings ist der Ausgangswert der Lösung nicht exakt bestimmbar und die Indikatorstreifen zeigen bei Abweichungen keinen exakten Wert an, weshalb Rückschlüsse auf den Fluss im Chip kaum möglich sind. Die mit dem Potentiometer<sup>17</sup> gemessenen Werte weichen stark von den Ergebnissen der Indikatorstreifen ab. Damit ist diese Methode zu ungenau.

<sup>16</sup>DOSATEST<sup>®</sup>, Messbereich: 3,5-6,8 in 0,3 Schritten

<sup>17</sup>VWR, pH100

## 5.7 Visualisierung des Flusses

Um den Fluss im Chip zu visualisieren, werden zwei verschieden fluoreszierende Substrate verwendet: die Partikel der Durchflusszytometrie in PBS und eine Lösung bestehend aus PBS und FITC (Fluoresceinisothiocyanat). FITC absorbiert ein Lichtmaximum bei der Wellenlänge 495 nm und emittiert bei 519 nm [118].

Bei der Fluoreszenz wird Licht eines für den jeweiligen Stoff charakteristischen Wellenlängenbereichs absorbiert, wobei Elektronen in ein höheres Energieniveau angehoben werden. Beim Übergang zurück zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon, das als Fluoreszenz bezeichnet wird. Als Absorptionsspektrum wird dasjenige bezeichnet, über das eine fluoreszierende Verbindung angeregt werden kann. Da beim Absorptionsübergang immer mehr Energie aufgenommen als beim Fluoreszenzübergang abgegeben wird, ist das abgestrahlte Licht langwelliger als das Anregungslicht und bildet das Emissionsspektrum.

Die Chips werden wie in Abb. 5.15 an zwei Spritzenpumpen angeschlossen und unter einem Mikroskop<sup>18</sup> mit einem Filter für grüne bzw. rote Lichtemission optisch untersucht. Aufgrund des großen Arbeitsabstandes werden „long-distance“-Objektive mit 4-, 5-, 10- und 20-facher optischer Vergrößerungen verwendet. Die Aufnahmen werden mit einer Videokamera<sup>19</sup> aufgezeichnet.

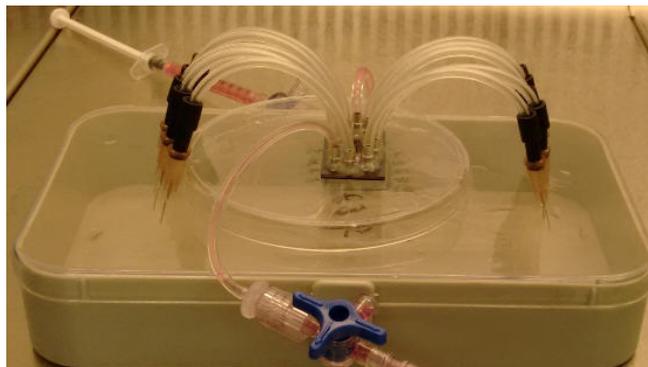
## 5.8 Zellkultur

Die *in vitro*-Tests werden für 24 h mit HeLa-Zellen in einem Chip des Designs 1 und einer 90 nm dicken SiO<sub>2</sub>-Beschichtung durchgeführt. Dieses Design hat durch die breiteren Kanäle den Vorteil, dass die Gefahr geringer ist, die Zellen beim Einfließen zu beschädigen.

Der Chip und sämtliches Zubehör werden mit Isopropanol oder Ethanol sterilisiert und alle weiteren Schritte werden unter der Sterilbank durchgeführt. Nach dem Befüllen des Chips wird er nacheinander für jeweils 25 min mit sterilem PBS und der Zellsuspension gespült. Diese besteht aus HeLa-Zellen (Zervixkarzinom) und RPMI-Nährmedium mit 10 % fetalem Kälberserum sowie 100 units/ml Penicillin/Streptomycin. Die Zellkerne aller Zellen wurden zuvor mit Bisbenzimid (blau) gefärbt, als zusätzliche Färbung wird für die Zellen von Einlass 1 PKH67 (grün, Dichte:  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml, Volumenfluss: 1,198  $\mu$ l/min) und für die Zellen von Einlass 2 PKH26 (rot, Dichte:  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml, Volumenfluss: 10,802  $\mu$ l/min) verwendet. Während der Zellkultur wird der Chip für 4 h bei 37 °C ohne zusätzliche Mediumzufuhr gelagert, damit die Zellen sich auf den Glasböden der Kavitäten absetzen können. Danach wird in einem 37 °C-Raum für weitere 20 h über zwei Spritzenpumpen kontinuierlich Medium zugeführt (Eingangsströme 1 bzw. 2: 59,9 nl/min bzw. 540,1 nl/min). In Abb. 5.16 ist der Aufbau

<sup>18</sup>Axiotech Zeiss, 100 W-Quecksilberdampfampe

<sup>19</sup>FK 6990, Pieper



**Abbildung 5.16:** Versuchsaufbau der HeLa-Zellkultur zur kontinuierlichen Mediumzufuhr für 20 h bei 37 °C, nachdem die Zellen sich vorher bereits für 4 h bei 37 °C ohne zusätzliche Mediumzufuhr in den Kavitäten absetzen konnten.

**Tabelle 5.3:** Optimierung der Zellkultur in drei Versuchen für unterschiedliche Parameter.

Parameter		Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Zelldichte in Zellen/ml	rot	$10^3$	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$
	grün	$10^4$	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$
Kontamination	nach 4 h	stark	steril	steril
	nach 24 h	-	steril	leicht
Fluoreszenz der Zellen	rot	PKH26	PKH26	PKH26
	grün	BCECF	BCECF	PKH67
	blau	-	-	Bisbenzimid
Zellmedium		DMEM	DMEM	RPMI
Eingangsrflüsse		-	5,99	59,9
Medium in nl/min		-	54,01	540,1

hierfür ohne Spritzenpumpen gezeigt. Das Nährmedium wird vorher in einer Umgebung mit 5 % CO<sub>2</sub> gelagert und direkt in Spritzen gefüllt, um auch ohne CO<sub>2</sub>-Austausch mit der Umgebung eine physiologische Umgebung für die Zellen zu ermöglichen. Die Ergebnisse werden mittels digitalem Fluoreszenzmikroskop<sup>20</sup> nach 4 h und 24 h der Zellkultur festgehalten.

Zusätzlich wird mittels Trypanblau in PBS die Zellviabilität überprüft, da die Farbe nur von Zellen mit geschädigter Membran aufgenommen werden, ungeschädigte Zellen bleiben ungefärbt. Die Auswertung unter dem Mikroskop muss sehr schnell erfolgen, da nach kurzer Zeit auch die gesunden Zellen von dem toxischen Farbstoff geschädigt werden. Aus diesem Grund wird die Lösung mit zwei Spritzen sehr schnell in den Chip gegeben, wobei sich die Zellen durch den Scherstress verschieben können. Zum Zeitpunkt der Bildaufnahmen ist das Ergebnis der Zellviabilität womöglich negativ verfälscht. Die Protokolle für die Zellkultur der HeLa-Zellen vor den Chipversuchen sowie die Färbung der Zellen

<sup>20</sup>BIOZERO-8000, Keyence Corporation

sind in Anhang D aufgeführt. Die Methode wurde in drei Versuchen optimiert, indem die in Tabelle 5.3 aufgeführten Parameter angepasst wurden.

Die Fluoreszenzbilder der Zellen wurden mit Hilfe der Software ImageJ bearbeitet und zusammengeführt.

## 5.9 Statistische Auswertung

Für jede Analysemethode werden mehrere Messungen durchgeführt und ein arithmetischer Mittelwert berechnet. Um verschiedene Methoden und Werte miteinander vergleichen zu können, wird hauptsächlich der t-Test für unabhängige Proben verwendet, dabei wird zwischen normalverteilten Stichproben mit gleicher und ungleicher Varianz unterschieden. Als Nullhypothese wird angenommen, dass die arithmetischen Mittelwerte ( $M$ ) zweier Stichproben gleich sind und aus einer Grundgesamtheit stammen. Liegt die Signifikanzwahrscheinlichkeit  $p_S$  über dem Signifikanzniveau von  $\alpha_S = 0,05$  gilt die Nullhypothese, ansonsten wird die Nullhypothese verworfen und von signifikant unterschiedlichen Werten ausgegangen [119]. In einem Fall wird der t-Test für abhängige Proben verwendet. Dabei werden die Proben eines Chips mit später gesammelten Proben des gleichen Chips verglichen. Für die aufgeführten Ergebnisse werden in dieser Arbeit folgende Werte angegeben: arithmetisches Mittel  $M$ , Standardabweichung  $SD$ , t-Wert mit Freiheitsgraden  $t(df)$  und Signifikanzwahrscheinlichkeit  $p_S$ .

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der Software IBM® SPSS® Statistics<sup>21</sup> durchgeführt.

Bei den Konzentrationsanalysen werden zusätzlich die Differenz  $D$  zwischen dem gemessenen Mittelwert  $M$  und dem Sollwert  $S$  der Konzentration angegeben sowie die prozentuale Differenz  $D\%$ , welche dem Prozentwert der Differenz bezogen auf den jeweiligen Sollwert entspricht, d. h. bei einer prozentualen Differenz von 50 % entspricht die Differenz  $D$  dem 0,5-fachen des Sollwerts  $S$ :

$$\text{Differenz} \quad D = |S - M|, \quad (5.5)$$

$$\text{prozentuale Differenz} \quad D\% = \frac{D \cdot 100}{S}. \quad (5.6)$$

## 5.10 Zusammenfassung

In diesem Kapitel werden der Messaufbau, verschiedene Analysemethoden und die statistische Auswertung beschrieben.

Die Entwicklung einer unkonventionellen Methode zum blasenfreien Befüllen des Chips mit Flüssigkeit war grundlegend, da Luftblasen in den Kanälen oder Kavitäten als zusätzliche fluidische Widerstände den Fluss beeinflussen würden. Die starke Blasenbildung beim Befüllen mit konventionellen Methoden wird durch den Concus-Finn-Effekt begründet, bei dem die Flüssigkeit in den Kanalecken

<sup>21</sup>Version 23

stark nach vorne gezogen wird, die Luft umgibt und diese zu Luftblasen abschnürt. Zur Abschwächung des Effekts wurde auf den Si-Kanaloberflächen 90 nm dickes SiO<sub>2</sub> thermisch hergestellt. Die Luftblasen konnten jedoch erst durch eine neu entwickelte Methode, dem Befüllen in Unterdruckatmosphäre eines Exsikkators, verhindert werden. Zusätzlich wurden sämtliche Flüssigkeiten mittels Ultraschall entgast und bis zur Verwendung in Unterdruck aufbewahrt.

Der Messaufbau für die Flusstests besteht aus zwei Spritzenpumpen an den Chipeingängen, je einem Dreiwegehahn, um Luftblasen aus dem Schlauch entfernen zu können, und Mikroreaktionsgefäßen zum Sammeln der Proben an den einzelnen Ausgängen. Diese Gefäße befinden sich in einer abgeschlossenen gekühlten Feuchtkammer, durch welche eine Verdunstung der Probenflüssigkeiten während der Versuchsdurchführung und somit eine Verfälschung der Ergebnisse minimiert wird. Bis zur Analyse werden die Proben gekühlt aufbewahrt. Dieser Versuchsaufbau zur Probengewinnung pro Well wurde neu entwickelt, da die Chips anderer Gruppen keine einzelnen Ausgänge pro Well aufwiesen, also eine Probenentnahme nicht vorgesehen war.

Mit dem Oberflächenprofilometer wurde die Ätztiefe bestimmt und mit der statischen Kontaktwinkelmessung der Einfluss der unterschiedlichen Kanaloberflächen auf den Concus-Finn-Effekt festgestellt. Für die Messungen der Flussrate wurden die Flüssigkeitsmengen pro Chipausgang nach einer bestimmten Zeiteinheit gemessen und die Volumenbestimmung mit Hilfe einer Pipette durchgeführt. Eine Visualisierung des Flusses im Chip wurde durch das Fluoreszenzmittel FITC realisiert.

Die Substanzmengen in den Probenflüssigkeiten jedes Ausganges wurden mit unterschiedlichen Methoden zur Konzentrationsbestimmung analysiert. Da bei den Messungen ein sehr weiter Konzentrationsbereich von 0,098 % bis 50 % abgedeckt werden muss und dabei unbekannte Effekte, wie z. B. Wechselwirkungen zwischen der Substanz und den Chip- bzw. Schlauchmaterialien, auftreten können, wurden die Analysen mit insgesamt vier verschiedenen Methoden und unterschiedlichen Substanzen durchgeführt: der HPLC-MS, dem BPA-Test, der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie und pH-Messungen. Bei letzteren zeigen die Indikatorstreifen bei Abweichungen allerdings keinen exakten Wert an, weshalb Rückschlüsse auf den Fluss im Chip kaum möglich sind, und die mit dem Potentiometer gemessenen Werte weichen stark von den Ergebnissen der Indikatorstreifen ab. Damit ist diese Methode zu ungenau.

Die *in vitro*-Tests wurden für 24 h mit HeLa-Zellen durchgeführt und mehrmals optimiert, um keine Kontamination und eine ausreichende Mediumzufuhr zu erreichen. Die Zellen wurden außerdem mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um sie je einem Eingang zuzuordnen und von Verunreinigungen unterscheiden zu können. Nach 24 h wurden die Zellen in den Wells mittels digitalem Fluoreszenzmikroskop untersucht und danach zusätzlich die Zellviabilität mit einer Trypanblau-Färbung überprüft.

Für jede Analysemethode wurden mehrere Messungen durchgeführt und ein arithmetischer Mittelwert  $M$  sowie die Standardabweichung  $SD$  berechnet. Bei

den Konzentrationsanalysen werden zusätzlich die Differenz  $D$  sowie die prozentuale Differenz  $D\%$  angegeben. Um verschiedene Werte miteinander vergleichen zu können, wurde bei ausreichender Probenanzahl der t-Test verwendet.



# 6 Ergebnisse und Diskussion

## 6.1 Kontaktwinkel der Oberflächenbeschichtungen

### 6.1.1 Ergebnisse

#### Statische Kontaktwinkel

Die Oberflächen von (100)- und (111)-Si-Wafern wurden mit der in Kapitel 5.4 beschriebenen Methode analysiert, um das Benetzungsverhalten der unterschiedlichen Kanaloberflächen, die während der Tests mit Flüssigkeit in Berührung kommen, abzubilden und um die Luftblasenbildung während des Befüllvorgangs bzw. den Fluss im Chip beeinflussen zu können. Bei dreieckigen Kanälen sind die {111}-Ebenen der Schrägen entscheidend, für trapezförmige ist zusätzlich die {100}-Ebene, die den Boden bildet, zu berücksichtigen. Beide Ebenen wurden in drei unterschiedlichen Zuständen untersucht: unbehandelt mit natürlichem  $\text{SiO}_2$ , KOH geätzt mit natürlichem  $\text{SiO}_2$  und zusätzlich mit thermisch hergestelltem 90 nm dickem  $\text{SiO}_2$  beschichtet. Außerdem wurde Borsilikatglas analysiert, da dieses als Kanalboden dient und den Concus-Finn-Effekt beeinflusst.

Im Folgenden werden die in Tabelle 6.1 aufgeführten Ergebnisse der Kontaktwinkel erläutert und mittels t-Test-Analyse, die in Kapitel 5.9 beschrieben ist, miteinander verglichen. Darüber hinaus sind die Umgebungsbedingungen der Messungen, Temperatur und Luftfeuchtigkeit, sowie die gemessene Oberflächenspannung von DI-Wasser angegeben. Diese unterscheidet sich mit dem Wert  $73,04 \text{ mN/m} \pm 0,35 \text{ mN/m}$  nicht signifikant von dem Literaturwert  $72,8 \text{ mN/m}$  ( $t(15) = 0,665$ ,  $p_S = 0,516$ ). In Abb. 6.1 und Abb. 6.2 ist zu sehen, dass der Kontaktwinkel bei beiden Ebenen durch KOH-Ätzen abnimmt und nach Abscheiden des thermischen  $\text{SiO}_2$  den Winkel der unbehandelten Probe übertrifft. Das Borsilikatglas hat einen Kontaktwinkel nahe der unteren Messgrenze des Gerätes von  $10^\circ$  (Abb. 6.3).

Bei beiden getesteten Si-Ebenen unterscheiden sich die Kontaktwinkel signifikant zwischen natürlichem und thermisch hergestelltem  $\text{SiO}_2$  auf KOH geätztem Silizium. Für die {100}-Ebene ergeben sich die Werte  $14,46^\circ \pm 2,72^\circ$  bzw.  $39,85^\circ \pm 3,65^\circ$  ( $t(16) = -16,75$ ,  $p_S < 0,001$ ) und für die {111}-Ebene entsprechend  $17,95^\circ \pm 1,96^\circ$  bzw.  $42,0^\circ \pm 3,68^\circ$  ( $t(12,2) = 17,31$ ,  $p_S < 0,001$ ). Bei einem Vergleich der Proben in Abhängigkeit von der Ebene ergeben sich für die geätzten und anschließend oxidierten Proben keine signifikanten Un-

**Tabelle 6.1:** Arithmetische Mittelwerte  $M$  der Kontaktwinkelmessungen mittels Tropfenkonturanalyse mit Standardabweichungen  $SD$ . Die Winkel wurden zwischen der jeweiligen Oberfläche, DI-Wasser und Luft gemessen. Pro Probe wurden an drei unterschiedlichen Tagen jeweils 10 Messungen durchgeführt. Die Menge  $N$  zur Bestimmung von  $M$  und  $SD$  entspricht der Anzahl der Tagesmittelwerte über je 10 Messungen. Arithmetische Mittelwerte der Oberflächenspannung von Wasser und die Umgebungsbedingungen (Temperatur und Luftfeuchtigkeit) wurden jeweils vor den Messungen bestimmt.

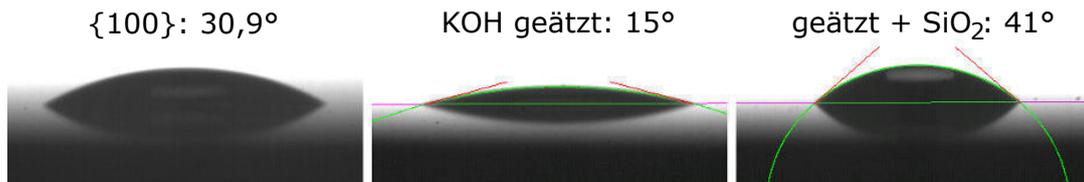
	Proben	N	M	SD
{100} + nat. SiO <sub>2</sub>	4	12	30,71°	5,79°
{100} geätzt + nat. SiO <sub>2</sub>	3	9	14,46°	2,72°
{100} geätzt + 90 nm SiO <sub>2</sub>	3	9	39,85°	3,65°
{111} + nat. SiO <sub>2</sub>	3	9	39,42°	2,63°
{111} geätzt + nat. SiO <sub>2</sub>	3	9	17,95°	1,96°
{111} geätzt + 90 nm SiO <sub>2</sub>	3	9	42,00°	3,68°
Borsilikatglas	3	9	12,73°	0,68°
SiO <sub>2</sub> auf {100}-Si	2	6	37,40°	10,29°
<b>Oberflächenspannung DI-Wasser</b>		16	73,04 mN/m	0,35 mN/m
<b>Temperatur</b>		16	23,59 °C	0,84 °C
<b>Luftfeuchtigkeit</b>		16	22,53 %	4,46 %

terschiede ( $t(16) = 1,24$ ,  $p_S = 0,232$ ), wohingegen sich die unbehandelten Ebenen ( $\{100\} = 30,71^\circ \pm 5,79^\circ$ ,  $\{111\} = 39,42^\circ \pm 2,63^\circ$ ,  $t(16, 19) = -4,61$ ,  $p_S < 0,001$ ) und die bereits aufgeführten geätzten Ebenen mit natürlichem SiO<sub>2</sub> ( $t(16) = 3,128$ ,  $p_S = 0,006$ ) signifikant unterscheiden.

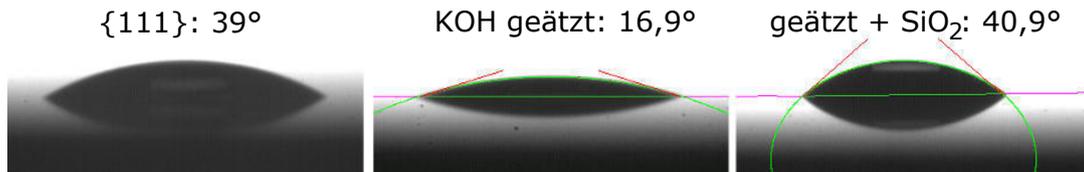
### Concus-Finn-Bedingung

Mit Hilfe der Gleichungserweiterung von Brakke (2.15) und den gemessenen Mittelwerten der Kontaktwinkel wurde berechnet (Tabelle 6.2), ob die Concus-Finn-Bedingung in den Ecken der Kanäle mit unterschiedlichen Querschnitten und unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen erfüllt wird. Bei der Berechnung wurden an den Kanalecken die unterschiedlichen angrenzenden Materialien berücksichtigt, z. B. grenzen unabhängig von der Querschnittsform des Kanals an einigen Ecken {111}-Silizium und Borsilikatglas aneinander und an Ecken der trapezförmigen Kanäle {100}- und {111}-Si. Nur bei der unteren Ecke der dreieckigen Kanäle bestehen beide Wände aus {111}-Si.

Der Concus-Finn-Effekt ist bei den {111}/{100}-Ecken der trapezförmigen Kanäle je nach Oberflächenbeschichtung entweder nicht vorhanden (90 nm dickes SiO<sub>2</sub>) oder nur schwach ausgeprägt (nat. SiO<sub>2</sub>). Auch bei {111}-Ecken der dreieckigen Kanäle ist der Effekt nur schwach ausgeprägt, wenn die Oberfläche

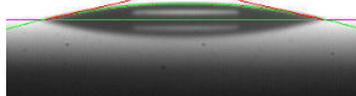


**Abbildung 6.1:** Kontaktwinkelmessung bei {100} Silizium mittels *Sessile-Drop*-Methode für unterschiedliche Oberflächenbehandlungen: unbehandelt, KOH geätzt, KOH geätzt und thermisch oxidiert. Der Tropfen wird an der Si-Oberfläche gespiegelt. Die eingezeichneten Linien werden von der Software zur Winkelbestimmung angegeben.



**Abbildung 6.2:** Kontaktwinkelmessung bei {111} Silizium mittels *Sessile-Drop*-Methode für unterschiedliche Oberflächenbehandlungen: unbehandelt, KOH geätzt, KOH geätzt und thermisch oxidiert. Der Tropfen wird an der Si-Oberfläche gespiegelt. Die eingezeichneten Linien werden von der Software zur Winkelbestimmung angegeben.

Glas: 12,7°



**Abbildung 6.3:** Kontaktwinkelmessung bei Borsilikatglas mittels *Sessile-Drop*-Methode. Der Tropfen wird an der Glasoberfläche gespiegelt. Die eingezeichneten Linien werden von der Software zur Winkelbestimmung angegeben.

mit 90 nm dickem SiO<sub>2</sub> beschichtet ist. In allen anderen Fällen tritt der Concus-Finn-Effekt unvermindert auf.

### 6.1.2 Diskussion

Durch Messungen der statischen Kontaktwinkel (Tabelle 6.1) wurde das Benetzungsverhalten der unterschiedlichen Kanaloberflächen untersucht, die während der Flusstests der Chips mit Flüssigkeit in Berührung kommen. Daraus kann auf den Concus-Finn-Effekt (Tabelle 6.2) und folglich auf dessen Einfluss auf das Befüllverhalten im Chip geschlossen werden.

#### Statische Kontaktwinkel

Die Oberflächenspannung  $\gamma_{lg}$  von DI-Wasser sollte, wie in Tabelle 2.2 aufgeführt, 72,8 mN/m betragen und ist nicht signifikant unterschiedlich von dem in der vorliegenden Arbeit gemessenen Wert, d. h., dass die gemessenen Kontaktwinkel

**Tabelle 6.2:** Die Berechnungen der Concus-Finn-Bedingung für die Ecken von dreieckigen und trapezförmigen Kanälen mit KOH-geätzter Oberfläche und natürlichem oder 90 nm dickem SiO<sub>2</sub>. Die Differenz zwischen den jeweiligen Zahlen gibt die Stärke der Ausprägung des Concus-Finn-Effekts an. Bei kleiner Differenz ist der Effekt schwächer ausgeprägt, bei großer Differenz wird die Flüssigkeit stärker in den Ecken nach vorne gezogen.

Querschnitt	SiO <sub>2</sub>	angrenzende Flächen		Differenz	Bedingung erfüllt?	
Dreieck	nat.	{111}-Si / Glas	15, 34°	< 62, 63°	47, 29°	✓
		{111}-Si-Wänden	17, 95°	< 54, 74°	36, 79°	✓
	90 nm	{111}-Si / Glas	27, 37°	< 62, 63°	35, 26°	✓
		{111}-Si-Wänden	42, 00°	< 54, 74°	12, 74°	✓
Trapez	nat.	{111}-Si / Glas	15, 34°	< 62, 63°	47, 29°	✓
		{111}-Si / {100}-Si	16, 21°	< 27, 37°	11, 16°	✓
	90 nm	{111}-Si / Glas	27, 37°	< 62, 63°	35, 26°	✓
		{111}-Si / {100}-Si	40, 93°	≠ 27, 37°		–

trotz schwankender Umgebungsbedingungen als zuverlässige Werte angesehen und diskutiert werden können.

Unbehandeltes {100}-Si ist direkt nach einem Flusssäure-Ätzschritt hydrophob [51]. Durch Lagerung an der Luft bildet sich eine wenige Nanometer dicke natürliche SiO<sub>2</sub>-Schicht [51, 120], wodurch sich der Kontaktwinkel ändert und es ergibt sich – in Übereinstimmung mit der Literatur [52, 121] – ein hydrophiles Benetzungsverhalten aufgrund der Hydroxylgruppen an der amorphen SiO<sub>2</sub>-Oberfläche. Bei thermisch hergestelltem SiO<sub>2</sub> findet bei hohen Temperaturen eine Dehydroxylierung an der Oberfläche statt und Siloxangruppen werden gebildet [53, 121, 122]. Die dadurch hydrophober werdende Oberfläche (Tabelle 6.1) konnte in den Messungen bestätigt werden.

Da der Si-Chip nach dem Herstellungsprozess bis zu seiner Verwendung an Luft lagert, bildet sich in den Si-Kanälen eine natürliche Oxidschicht aus. Allerdings werden die Wände der Kanäle nicht aus unbehandeltem Silizium gebildet, sondern aus geätzten Si-Ebenen der Orientierung {111} und {100}. Aus diesem Grund wurden zusätzlich nasschemisch mit KOH behandelte Proben mit einer natürlichen SiO<sub>2</sub>-Schicht vermessen. Bei beiden Ebenen nimmt der Kontaktwinkel ab, d. h. sie werden hydrophiler (Abb. 6.1 und 6.2). Eine mögliche Ursache dafür ist die Oberflächenrauigkeit von Silizium nach dem KOH-Ätzen (unter 50 nm für {100}-Si [48, 63, 123]), durch welche das Benetzungsverhalten intensiviert wird [35, 49]. Bei rauen oder inhomogenen Oberflächen wird der gemessene Winkel normalerweise mit Hilfe unterschiedlicher Theorien, wie z. B. der Wenzel-Theorie, korrigiert [124]. Da in der vorliegenden Arbeit die Concus-Finn-Bedingungen der Kanäle berechnet werden und dafür die direkt gemessenen Kontaktwinkel der verschiedenen Proben von Interesse sind, werden diese Theorien in

der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Eine weitere Möglichkeit für die hydrophileren Benetzungseigenschaften nach der KOH-Strukturierung ist die durch das KOH-Ätzen entstandene Oberflächenterminierung mit OH-Gruppen, die zu einem niedrigeren Kontaktwinkel führen könnte.

Nach Abscheiden einer thermisch hergestellten 90 nm dicken  $\text{SiO}_2$ -Schicht auf den zuvor geätzten Ebenen nehmen die Kontaktwinkel wieder zu und entsprechen dem Benetzungsverhalten der 90 nm dicken und thermisch auf einem unbehandelten  $\{100\}$ -Si-Wafer abgeschiedenen  $\text{SiO}_2$ -Schicht, die mit Literaturwerten im Bereich von  $40^\circ$  bis  $50^\circ$  [52] übereinstimmen (Tabelle 2.2). Die Angleichung der Werte ist durch die Schichtdicke zu erklären. Bei dünnen Schichten, wie dem natürlichen  $\text{SiO}_2$ , können die Rauigkeit und die Struktur des Substrats die Eigenschaften der Schicht beeinflussen [51]. Wenn die Schicht dicker ist als die Rauigkeit des Siliziums, spielt diese dann keine Rolle mehr. Auch die Benetzungseigenschaften der beiden Ebenen unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Substratstruktur, solange eine nur wenige Nanometer dicke natürliche  $\text{SiO}_2$ -Schicht vorhanden ist und noch keine dickere Schicht abgeschieden wurde. Erst nach der thermischen Oxidation unterscheiden sie sich nicht mehr, da die  $\text{SiO}_2$ -Eigenschaften überwiegen.

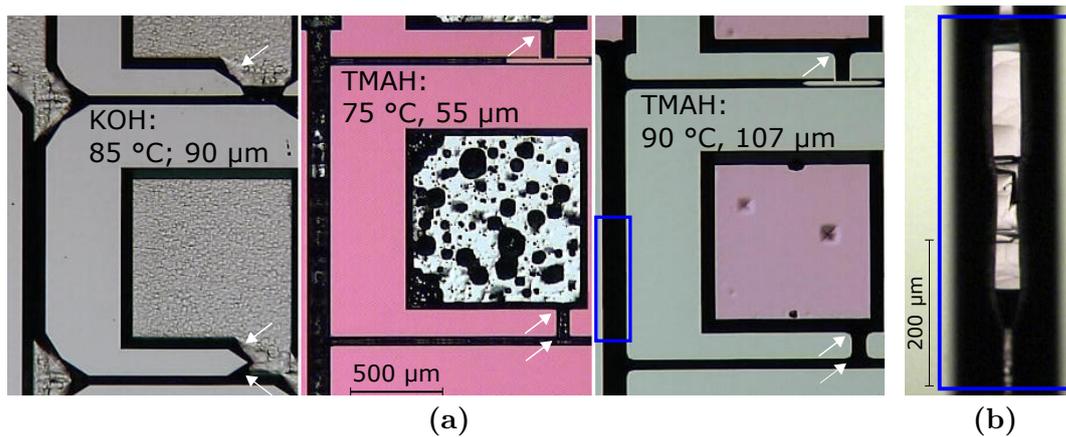
Insgesamt kann geschlossen werden, dass das Benetzungsverhalten der Kanalwände und -böden der Chips je nach  $\text{SiO}_2$ -Beschichtung variiert: bei natürlichem Oxid sind sie beinahe vollständig benetzbar, bei dickerem thermischem Oxid sind sie partiell benetzbar.

### Concus-Finn-Bedingung

Wird die Concus-Finn-Bedingung, wie in Kapitel 2.1.6 beschrieben, in den eckigen Kanälen erfüllt, zieht sich die Flüssigkeit beim Befüllvorgang des Chips in den Kanalecken stark nach vorne. Dadurch wird die im Kanal vorhandene Luft umschlossen und zu Luftblasen abgeschnürt. Da diese den Fluss im Chip verändern würden und deshalb unerwünscht sind, soll dieser Effekt idealerweise nicht auftreten. Aufgrund des hydrophilen Borsilikatglas-Deckels ist dies jedoch nicht zu umgehen, da dessen geringer Kontaktwinkel nur mit hydrophoben Materialien mit einem Kontaktwinkel über  $113^\circ$  auszugleichen wäre, wodurch sich wiederum Probleme beim Befüllen ergeben würden. Ziel war es deshalb, den Effekt durch Oberflächenmodifizierung zu reduzieren.

Für die Chips mit natürlichem  $\text{SiO}_2$  wird die Bedingung unabhängig von der Querschnittsform des Kanals für alle Ecken erfüllt, allerdings tritt bei den trapezförmigen Kanälen eine Abschwächung des Effekts an den  $\{111\}/\{100\}$ -Ecken aufgrund der geringeren berechneten Differenz auf. Das deckt sich mit den Beobachtungen, dass beim Befüllen mittels Spritzenpumpe viel Luft im Chip eingeschlossen wird und dieser dann nicht verwendet werden kann.

Durch größere Kontaktwinkel an den Kanalwänden kann der Effekt abgeschwächt werden, wofür Chips mit dickerer  $\text{SiO}_2$ -Schicht hergestellt wurden. Die Bedingung trifft in den  $\{111\}/\{100\}$ -Ecken der trapezförmigen Kanäle nicht



**Abbildung 6.4:** a) Vergleich der Ätzergebnisse von KOH bei 85 °C, TMAH + Triton-X-100 bei 75 °C und TMAH + Triton-X-100 bei 90 °C. Im Gegensatz zu KOH werden mit TMAH auch ohne Kompensationsstrukturen gute Ergebnisse für konvexe Ecken (Pfeile) erreicht, dafür entstehen jedoch *hillocks*, welche die Kanäle verengen (b) und den Fluss dadurch verändern.

mehr zu, in allen anderen Ecken wird sie jedoch noch immer erfüllt. Deshalb entstehen trotz zusätzlicher  $\text{SiO}_2$ -Beschichtung während des Befüllens mittels Spritzenpumpe Luftblasen. Beobachtungen konnten eine Abnahme der Anzahl der Luftblasen bei Design 1 bestätigen.

Da bei beiden Beschichtungen aufgrund des Concus-Finn-Effekts kein Befüllen mit bekannten Methoden ohne Luftblasen möglich war, wurde eine andere Befüllmethode in einer Unterdruckatmosphäre entwickelt, die unabhängig von beiden Beschichtungen funktioniert. Diese Methode ist in Kapitel 5.1 beschrieben.

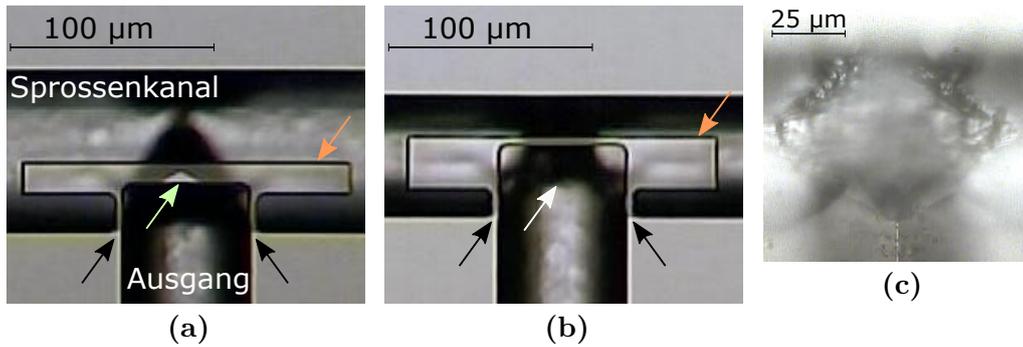
## 6.2 Kompensationsstrukturen

### 6.2.1 Ergebnisse

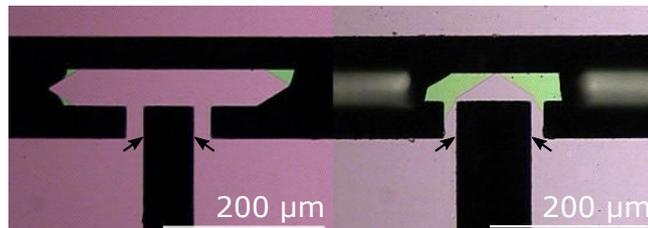
Die Kanalstrukturen des Chips bilden viele konvexe Ecken, die während des Herstellungsprozesses von KOH angegriffen werden. Durch nasschemisches Ätzen mit TMAH, welches mit dem Tensid Triton-X-100 angereichert wurde, kann die Unterätzung der Ecken gegenüber dem KOH-Prozess minimiert werden (Abb. 6.4), da das Verhältnis der Ätzraten der  $\{110\}$ - und  $\{100\}$ -Ebene von ca. 2,53 auf 0,35 verkleinert wird. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Ätzraten für KOH und TMAH sind in Tabelle 2.5 zu finden.

In Kapitel 2.2.2 sind die Nachteile des TMAH-Prozesses, wie z. B. die begünstigte Bildung von pyramidenförmigen Ätzhügeln (*hillocks*), beschrieben. Diese sind auch in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten TMAH-Prozess sichtbar und konnten durch eine Erhöhung der Temperatur reduziert, aber nicht eliminiert werden, so dass Verengungen in den Kanälen entstehen, die den Fluss verändern.

Aus diesem Grund wurde zur Chipherstellung der KOH-Prozess verwendet



**Abbildung 6.5:** Vergleich der Ätzergebnisse der entwickelten Kompensationsstruktur mit unterschiedlich breiten Balken zum Zeitpunkt, an dem sich perfekte konvexe Ecken (schwarze Pfeile) bilden. Die Struktur wird am Übergang von Sprossen- zu Ausgangskanal untersucht, da hier die geringste Fläche zur Verfügung steht. Die unterätzte Hartmaske aus  $\text{Si}_x\text{N}_y$  ist während des Prozesses erhalten geblieben und zeigt die Form der Kompensationsstruktur (orangefarbene Pfeile); a) Der Balken zwischen den sich gegenüberliegenden Ecken ist ungefähr  $15\ \mu\text{m}$  breit, so dass ein kanalhoher Si-Rest (grüner Pfeil) stehen bleibt; b) Bei schmalere Balken mit ca.  $7,5\ \mu\text{m}$  Breite bleiben niedrigere Rückstände (weißer Pfeil) am Kanalboden zurück; c) Vergrößerung der Siliziumreste aus b), die den Kanal verengen.



**Abbildung 6.6:** Der Verlauf der Ätzfronten während des Ätzprozesses der entwickelten Kompensationsstruktur aus  $\langle 110 \rangle$ -Stegen bevor die gewünschten konvexe Ecken (Pfeile) entstehen: schwarz: geätztes Si, rosa: nicht geätztes Si, grün: unterätzte  $\text{Si}_x\text{N}_y$ -Hartmaske.

und eine Kompensationsstruktur aus  $\langle 110 \rangle$ -Stegen für sich gegenüberliegende konvexe Ecken und einer kleinen zur Verfügung stehenden Fläche entwickelt. Beispiele für diese Struktur sind in Abb. 6.5a und Abb. 6.5b (orangefarbene Pfeile) zu sehen. In Abb. 6.6 sind die während des KOH-Ätzprozesses ausgebildeten Ätzfronten dargestellt. Um die Effektivität der Struktur zu untersuchen, wurden die Ecken am Übergang von Sprosse zu Ausgangskanal untersucht (Abb. 6.5), da hier die geringste Fläche für die Kompensationsstruktur zur Verfügung steht. Dabei wurde festgestellt, dass die Breite des Balkens, der die Struktur in der Mitte verbindet, schmal (hier:  $7,5\ \mu\text{m}$ ) sein sollte, um Si-Reste (grüner Pfeil) zu reduzieren. Allerdings bleiben noch immer Reste am Kanalboden zurück (Abb. 6.5c).

### 6.2.2 Diskussion

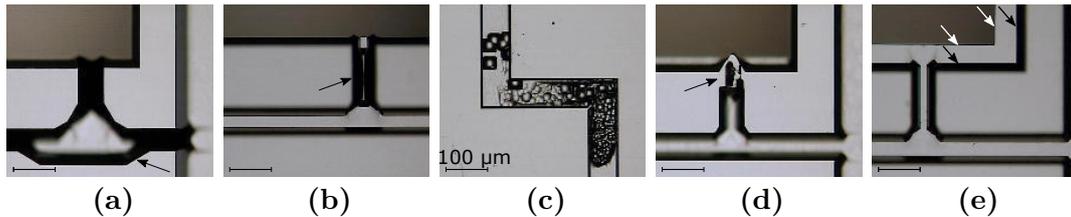
Eine Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse des nasschemischen Ätzens von Silizium hat gezeigt, dass sich im Gegensatz zu TMAH, welches mit dem Tensid Triton-X-100 angereichert wurde, bei KOH keine *hillocks* gebildet haben, wie sie in Abb. 6.4 bei TMAH geätztem Silizium zu sehen sind. Bei den KOH-geätzten Chips lag die Ausbeute bei sechs aus acht Chips pro Wafer, wohingegen bei allen TMAH-geätzten Chips mindestens ein Kanal trotz Prozessoptimierung so verengt war, dass der Fluss im Chip verändert und damit die Konzentrationsverteilung nicht repräsentativ war.

Der Nachteil von KOH ist jedoch die Unterätzung der konvexen Ecken, da bei dem ursprünglichen Design 3 mit einer Tiefe von  $88,2\ \mu\text{m}$  die Kanalübergänge zu wenig Fläche für bereits bekannte Kompensationsstrukturen (Abb. 2.14) bieten. Um diesen Nachteil zu umgehen, wurde eine neue Struktur aus  $\langle 110 \rangle$ -Stegen für sich gegenüberliegende konvexe Ecken entwickelt, die einen geringeren Flächenbedarf aufweist (Abb. 6.5, Beschreibung in Kapitel 3.4). In Ätzversuchen konnten die theoretisch erarbeiteten KOH-Ätzfronten [80] aus Abb. 3.18 bestätigt werden (Abb. 6.6). Da zum Zeitpunkt, an dem die konvexen Ecken eine optimale Form erreichten, noch Verunreinigungen in der Kanalmitte zurückblieben, wurde das Design der Struktur optimiert. So konnte z. B. gezeigt werden, dass durch eine Verjüngung des Balkens, der die Struktur in der Mitte verbindet, Verunreinigungen minimiert werden (Abb. 6.5). Da diese aufgrund der zu geringen Kanalbreite jedoch nicht komplett verhindert werden konnten, wurde das Design durch einen Kompromiss aus Wahl der Ätztiefe, daraus resultierender Unterätzung der konvexen Ecken sowie der erzielbaren Prozesssicherheit in Bezug auf die Kanaltiefen angepasst. Bei Design 1, welches  $32,8\ \mu\text{m}$  tief ist, können sämtliche Ecken aufgrund der breiteren Kanäle und der kurzen Ätzdauer gut kompensiert werden (Abb. 6.10e). Allerdings ist die exakte Ätztiefe der trapezförmigen Kanäle entscheidend und deren Reproduzierbarkeit eingeschränkt. Design 2, mit einer Tiefe von  $50,46\ \mu\text{m}$ , ist einfacher herzustellen, da die Ätztiefe der dreieckigen Sprossenkanäle aufgrund des anisotropen Ätzprozesses durch die Kanalbreite und nicht durch die Ätzdauer festgelegt wird. Dafür können wegen der schmalen Kanäle und der längeren Ätzdauer einige Ecken nicht vollständig geschützt werden (Abb. 6.10f). Beide Designs sind ausführlich in Kapitel 3.5 erläutert.

## 6.3 Auswahl der Chips

Bevor ein Chip für eine Fluss- oder Konzentrationsanalyse verwendet wird, muss sichergestellt werden, dass durch diesen keine Ergebnisse verfälscht werden. Mehrere Kriterien werden deshalb bei allen Chips überprüft, um nur die besten für die aufwendigen Tests einzusetzen.

Strukturdefekte, die den fluidischen Widerstand z. B. durch Kanalerweiterungen (zu breit oder zu tief) oder Kanalverengungen (zu schmal oder zu niedrig),



**Abbildung 6.7:** Beispiele von aufgetretenen Defekten an Chips, die den fluidischen Widerstand beeinflussen und deshalb zum Ausschluss führen, z. B. durch Kanalerweiterungen (a, b), Kanalverengungen (c, d) oder starkes Misalignment (weiße Pfeile: Si-Kanten, schwarze Pfeile: Sollposition) (e). Der Maßstab ist jeweils gleich groß und entspricht  $100\ \mu\text{m}$ .

wie sie in Abb. 6.7a-d zu sehen sind, beeinflussen und deshalb zum Ausschluss des Chips führen, müssen aussortiert werden.

Bei einem zu großen Justagefehler, insbesondere bei einer Verschiebung der Lithographiemasken der Vorder- oder Rückseitenstrukturierung während des Herstellungsprozesses, wie in Abb. 6.7e dargestellt, wird der Chip nicht verwendet, da der Einfluss auf die Strömung nicht einzuschätzen ist.

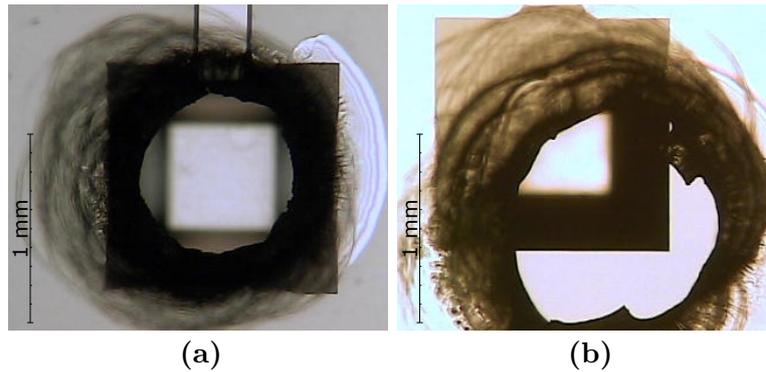
Wird die Ätztiefe der Kanäle nicht exakt erreicht, verändert sich der fluidische Widerstand. Deshalb wurden für beide Designs die Kanaltiefen sämtlicher Chips auf Vorder- und Rückseite mittels Oberflächenprofilometer (Kapitel 5.3) bestimmt und nur diejenigen mit der geringsten Abweichung verwendet. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chips sind die Werte der Designs 1 und 2 in Tabelle 6.3 aufgeführt. Dabei ergibt sich auf der Chiprückseite eine maximale Differenz zur Solltiefe von ca.  $0,34\ \mu\text{m}$  bei Design 1 und  $0,54\ \mu\text{m}$  bei Design 2. Auf der Vorderseite sollte ein gleichmäßiger Wert ( $SD < 0,4$ ) über den gesamten Chip erreicht werden, damit die Widerstände der Ein- und Ausgänge einheitlich sind; die nominale Tiefe ist nebensächlich. Die Chips mit einer unregelmäßigeren Verteilung der Tiefe wurden für die Zellkultur verwendet, da dabei der Flusswiderstand und das Strömungsverhalten nicht relevant waren.

Da die Positionierung der Löcher, die in Borsilikatglas-Wafern mit elektrochemischem Funkenerodieren erzeugt wurden, über den Ein- und Ausgängen der Si-Wafer optisch ohne Vergrößerung vor dem anodischen Bondprozess erfolgte, wurde deren Anordnung vor dem Aufkleben der Anschlüsse überprüft. Um leichte Schwankungen auszugleichen, sind die Durchmesser der Löcher kleiner (ca.  $0,85\ \text{mm}$ ) als die Kantenlänge der Kavitäten ( $1,2\ \text{mm}$ ). Eine perfekte Position ist in Abb. 6.8a zu sehen, bei welcher der viereckige Boden der Si-Kavität symmetrisch durch das Loch erkennbar ist. Im Fall von Abb. 6.8b wurde der Chip aussortiert, da die Überlappung zwischen Kavität und Loch zu gering war.

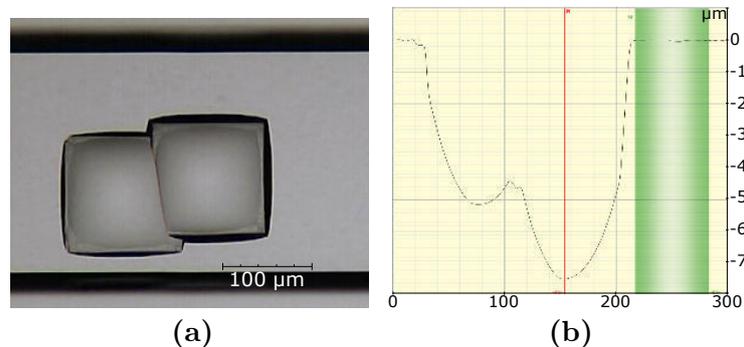
Einige Fehler ändern den Fluss nicht, da sie wie ein Totvolumen wirken oder zu klein sind. In Abb. 6.9 ist ein solcher Fehler zu sehen, dessen Tiefe durch eine Oberflächenprofilometer-Messung auf ca.  $7,5\ \mu\text{m}$  bestimmt wurde und der keinen wesentlichen Einfluss auf den Kanalwiderstand des  $300\ \mu\text{m}$  breiten und  $35,7\ \mu\text{m}$  tiefen Ausgangskanals hat. Ein Chip mit solch einem Fehler kann für

**Tabelle 6.3:** Arithmetische Mittelwerte  $M$  der mittels Oberflächenprofilometer gemessenen Kanaltiefen der verwendeten Chips mit Standardabweichungen  $SD$  für die Designs 1 und 2. Die angestrebte Ätztiefe der Rückseite beträgt  $32,8\ \mu\text{m}$  bzw.  $50,46\ \mu\text{m}$ . Auf der Vorderseite sollten die Werte einheitlich sein. Auf der Rückseite der Wafer wurden pro Chip sechs Stellen gemessen, auf der Vorderseite drei und darüber die Mittelwerte gebildet. Pro Wafer wurden für den Gesamtmittelwert 48 bzw. 24 Stellen vermessen. Zusätzlich wird angegeben, ob thermisch hergestelltes  $\text{SiO}_2$  aufgebracht wurde und welche Analysemethoden zum Einsatz kamen.

Wafer	therm. $\text{SiO}_2$	Chip-Nr.	Kanaltiefen in $\mu\text{m}$				Testmethode
			Rückseite		Vorderseite		
			M	SD	M	SD	
<b>Design 1</b>							
<b>25</b>	ja	<b>1</b>	32,62	0,04	32,05	1,28	Zellkultur
		<b>2</b>	32,63	0,05	31,39	1,27	Zellkultur
		<b>4</b>	32,58	0,07	32,47	0,35	BPA
		<b>5</b>	32,62	0,02	32,82	0,07	FACS
		<b>7</b>	32,61	0,04	32,68	0,13	HPLC-MS
		<b>8</b>	32,65	0,02	32,82	0,04	HPLC-MS
		<b>Gesamt</b>	32,62	0,04	32,36	0,83	
<b>29</b>	nein	<b>1</b>	32,48	0,03	32,38	0,15	HPLC-MS
		<b>2</b>	32,48	0,04	32,22	0,15	BPA
		<b>Gesamt</b>	32,46	0,05	32,40	0,13	
<b>41</b>	ja	<b>1</b>	32,89	0,06	33,08	0,14	FACS
		<b>2</b>	32,94	0,04	33,11	0,02	Zellkultur
		<b>5</b>	32,97	0,04	33,18	0,07	HPLC-MS
		<b>8</b>	32,94	0,04	33,28	0,05	BPA
		<b>Gesamt</b>	32,92	0,05	33,18	0,09	
<b>46</b>	nein	<b>2</b>	32,88	0,07	33,20	0,08	BPA
		<b>4</b>	32,88	0,09	33,15	0,09	HPLC-MS
		<b>8</b>	32,88	0,08	33,17	0,07	HPLC-MS
		<b>Gesamt</b>	32,93	0,41	33,17	0,06	
<b>Design 2</b>							
<b>26</b>	ja	<b>1</b>	49,92	0,25	38,77	0,08	BPA
		<b>4</b>	50,13	0,28	38,80	0,08	HPLC-MS
		<b>6</b>	50,56	0,04	38,82	0,08	BPA
		<b>7</b>	50,67	0,04	38,85	0,06	FACS
		<b>Gesamt</b>	50,34	0,30	38,82	0,07	
<b>39</b>	ja	<b>2</b>	50,74	0,13	35,70	0,04	HPLC-MS
		<b>4</b>	49,99	0,28	35,59	0,03	FITC
		<b>5</b>	50,40	0,14	35,52	0,06	HPLC-MS
		<b>6</b>	50,82	0,08	35,63	0,06	FITC
		<b>Gesamt</b>	50,46	0,33	35,62	0,09	



**Abbildung 6.8:** Mit elektrochemischem Funkenerodieren hergestellte Löcher durch Bor-silikatglas als Anschlusslöcher für Flüssigkeiten am Chip; a) Perfekte Positionierung des ca. 0,85 mm großen Lochs über einer Ein- oder Ausgangskavität des Chips; b) Die Verschiebung des Lochs führt zum Ausschluss des Chips.

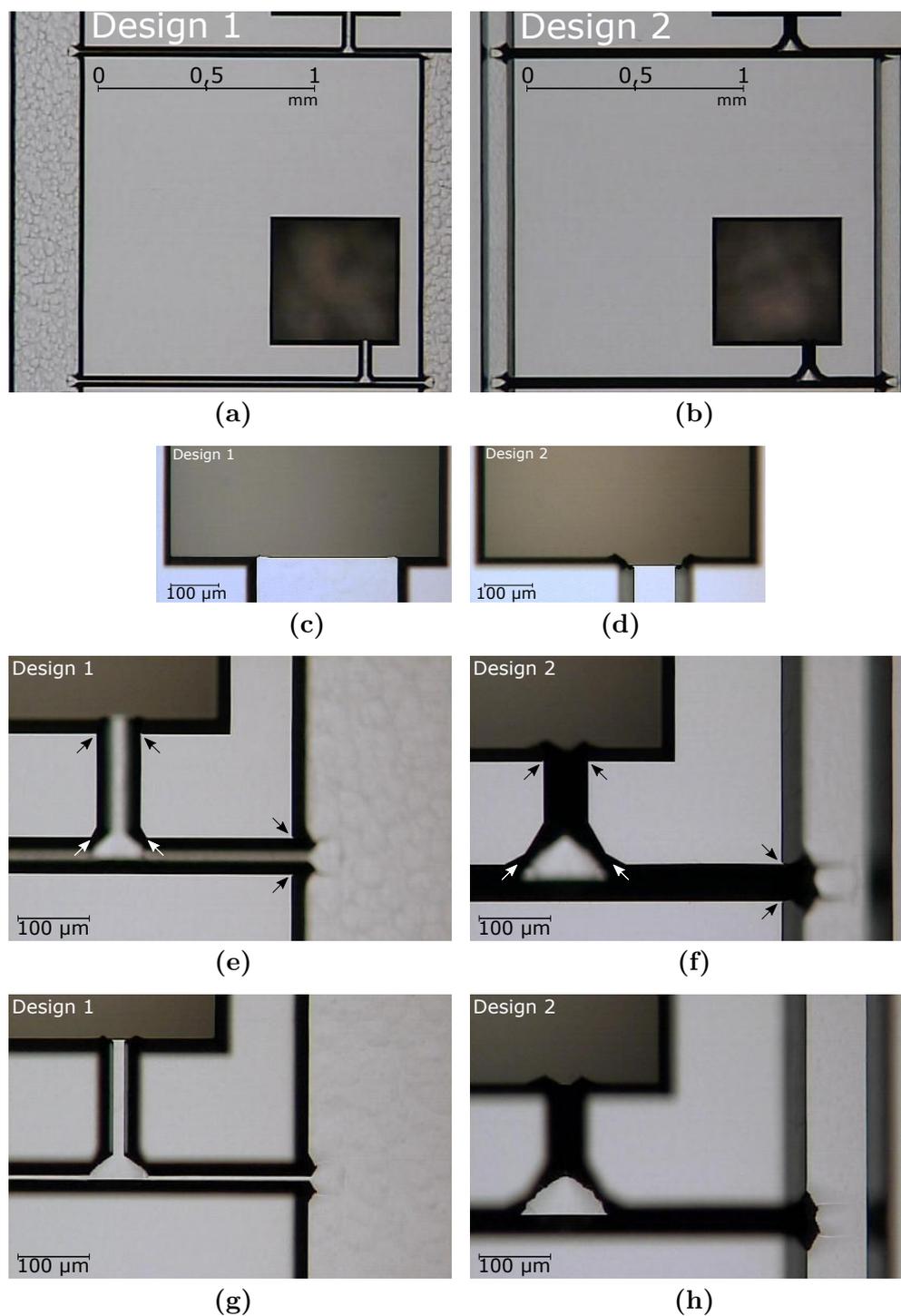


**Abbildung 6.9:** Vertiefungen in den Kanälen, die den fluidischen Widerstand nicht beeinflussen und deshalb nicht zum Ausschluss führen; a) Optische Analyse; b) Messung mittels Oberflächenprofilometer, um die Tiefe von 7,5 µm zu bestimmen.

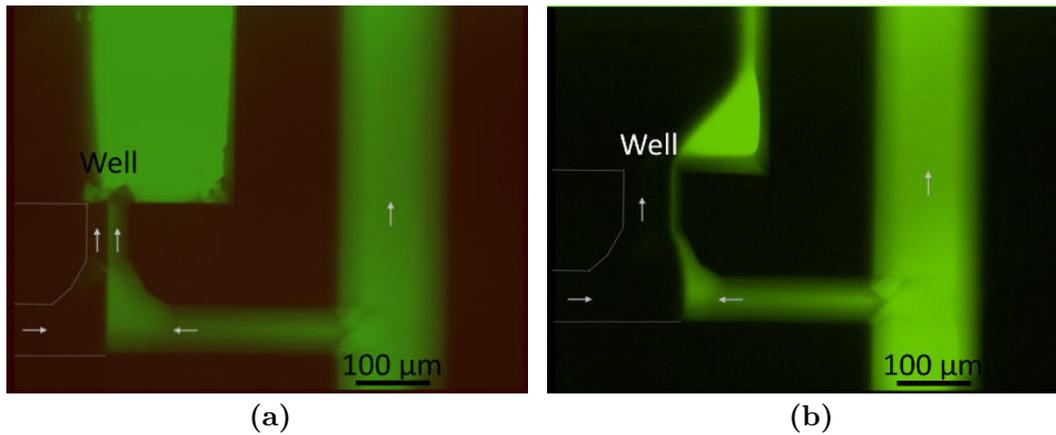
Analysen verwendet werden, im Nachhinein sollte das Ergebnis allerdings auf Unregelmäßigkeiten im Zusammenhang damit abgeglichen werden.

Abb. 6.10 zeigt Mikroskopaufnahmen von Wafern der Designs 1 und 2 nach der Si-Strukturierung. Beide zeigen keine Defekte, haben ein gutes Alignment am Chipeingang sowie exakte konvexe Ecken zum Zuflusskanal und dem Well (schwarze Pfeile). Einige Unterschiede der Chips, die sich aufgrund der unterschiedlichen Designs und damit der variierenden Tiefe ergeben, sind in den Bildern zu erkennen:

- die Breite der Zuflusskanäle aufgrund der unterschiedlichen Tiefe,
- die Form der Querschnittsfläche der Sprossenkanäle (Trapez, Dreieck),
- die Kompensation der konvexen Ecken am Übergang von Sprosse zu Ausgang (weiße Pfeile),
- die Länge der Sprossen aufgrund der unterschiedlichen Unterätzung.



**Abbildung 6.10:** Gegenüberstellung von Design 1 (links (a,c,e,g): Wafer 41, Chip 5) und Design 2 (rechts (b,d,f,h): Wafer 39, Chip 2) nach der Si-Strukturierung. Beide haben keine Defekte. a) / b) Teil der Leiterstruktur auf der Chipunterseite: der breite bzw. schmale Zuflusskanal, die Sprossen 9 und 10 sowie die Unterseite des Zellwells; c) / d) Gutes Alignment am Übergang von Eingang zu Zuflusskanal bei beiden Designs; e) / f) Sprosse 9 mit trapezförmigem bzw. dreieckigem Querschnitt; die konvexen Ecken sind jeweils am Zuflusskanal und dem Well exakt ausgebildet (schwarze Pfeile) und am Ausgang aufgrund der Kompensationsstruktur leicht bzw. stark unterätzt (weiße Pfeile); g) / h) Die Ecken aus e) / f) mit Fokus auf den Kanalboden.



**Abbildung 6.11:** Laminarer Fluss im Chip mit in PBS gelöstem FITC (grün) als Substanzlösung und purem PBS (nicht sichtbar) als Puffer unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Flüsse in die Wells sollen die gleiche Flussrate haben. Die Pfeile zeigen in Flussrichtung, die Kanalkanten sind auf der PBS-Seite zur besseren Verständlichkeit nachgezeichnet; a) Well 1 mit einer Sollkonzentration von 50 % der Testsubstanz; b) Well 4 mit einer Sollkonzentration von 6,25 %.

## 6.4 Volumenfluss

### 6.4.1 Ergebnisse

Durch jedes Well soll die gleiche Menge Flüssigkeit fließen, obwohl diese sich aus zwei Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen zusammensetzt, wie es in Abb. 6.11 für zwei unterschiedliche Wells zu sehen ist, so dass vergleichbare Umgebungsbedingungen für die Zellen herrschen. Deshalb ist der Volumendurchfluss an den Ausgängen ein wichtiger Wert zur Charakterisierung der Chips.

Für die Messungen der Flussrate wurde an jedem Chipausgang für 20 min Flüssigkeit mit den in Kapitel 5 beschriebenen Methoden gesammelt, gemessen und mittels t-Test-Analyse (Kapitel 5.9) untereinander verglichen. Pro Chip wurden zwei Probensätze unmittelbar hintereinander erzeugt: Den Proben von Test 1 wurde jeweils ein definiertes Volumen für die HPLC-MS-Analyse entnommen und danach das Volumen bestimmt, die Proben von Test 2 wurden ausschließlich für Volumenmessungen verwendet. Die Werte der aus den Volumenmessungen berechneten Flussraten sind in Anhang E in den Tabellen E.1 und E.2 zu finden. Die Simulationsergebnisse für die Flussraten auf Systemebene und auf physikalischer Ebene sind in den Tabellen 3.5 und 3.6 aufgeführt.

Bei Eingangsflüssen mit Flussraten von  $54,01 \mu\text{l}/\text{min}$  und  $5,99 \mu\text{l}/\text{min}$  ergibt sich ein Gesamtfluss von  $60 \mu\text{l}/\text{min}$ , was bei zehn Ausgängen einem optimalen Fluss von  $6 \mu\text{l}/\text{min}$  pro Ausgang und Well entspricht. Die Mittelwerte der Flussraten (Abb. 6.12), unabhängig vom Design und der Oberflächenbeschichtung, liegen für Test 1 im Bereich von  $4,97 \mu\text{l}/\text{min} \pm 0,72 \mu\text{l}/\text{min}$  bis  $6,18 \mu\text{l}/\text{min} \pm 0,29 \mu\text{l}/\text{min}$  und für Test 2 im Bereich von  $4,94 \mu\text{l}/\text{min} \pm 0,65 \mu\text{l}/\text{min}$  bis  $6,23 \mu\text{l}/\text{min} \pm 0,04 \mu\text{l}/\text{min}$ . Hierbei ergeben sich für die Mittelwerte über alle Ausgänge von

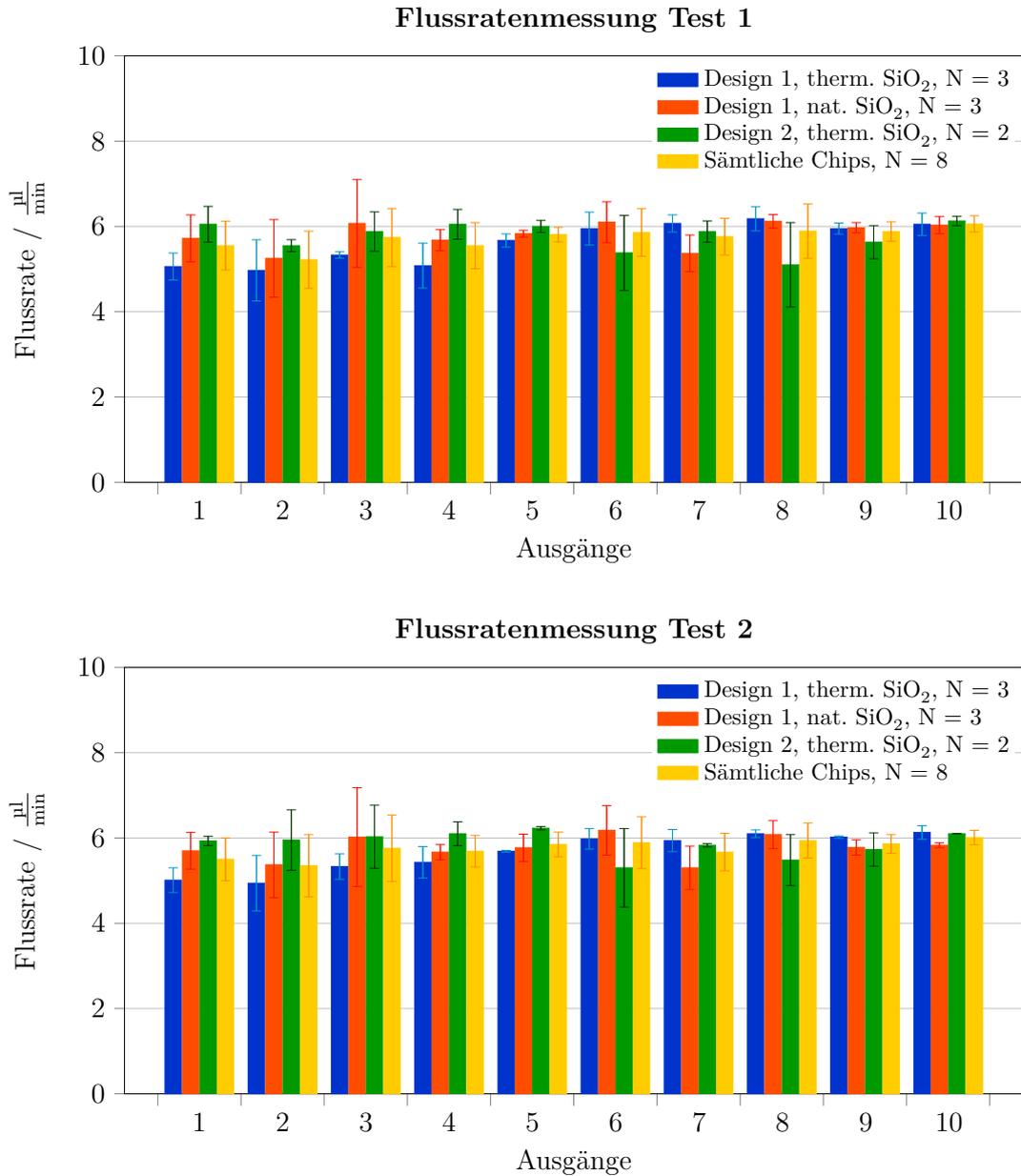
Design 1 mit natürlichem SiO<sub>2</sub> 5,77 µl/min ± 0,53 µl/min, von Design 1 mit thermisch hergestelltem SiO<sub>2</sub> 5,66 µl/min ± 0,50 µl/min und von Design 2 mit natürlichem SiO<sub>2</sub> 5,87 µl/min ± 0,46 µl/min.

Werden die Mittelwerte der einzelnen Ausgänge aus Test 1 und Test 2 mittels abhängigem t-Test einander gegenübergestellt, werden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Ebenso verhält es sich bei den Vergleichen mittels unabhängigem t-Test von Design 1 zu Design 2 und von natürlich zu thermisch oxidierten Proben:

- **Test 1 zu Test 2:** Vergleich pro Ausgang mit abhängigem t-Test, z. B.:
  - Design 1, therm. SiO<sub>2</sub>, Ausgänge 1:  
Test 1 (N=3; M=5,06; SD= 0,32), Test 2 (N=3; M=5,01; SD= 0,30):  
 $t(4) = -0,192, p_S = 0,857,$
  - Design 1, nat. SiO<sub>2</sub>, Ausgänge 1:  
Test 1 (N=3; M=5,72; SD= 0,55), Test 2 (N=3; M=5,70; SD= 0,43):  
 $t(4) = -0,041, p_S = 0,969,$
  - Design 2, therm. SiO<sub>2</sub>, Ausgänge 1:  
Test 1 (N=2; M=6,05; SD= 0,42), Test 2 (N=2; M=5,93; SD= 0,11):  
 $t(2) = -0,404, p_S = 0,725,$
- **Test 1:** therm. SiO<sub>2</sub>, Mittel der Ausgänge:  
**Design 1** (N=30; M=5,63; SD= 0,55), **Design 2** (N=20; M=5,76; SD= 0,49):  
 $t(48) = -0,862, p_S = 0,393,$
- **Test 2:** therm. SiO<sub>2</sub>, Mittel der Ausgänge:  
**Design 1** (N=30; M=5,66; SD= 0,50), **Design 2** (N=20; M=5,87; SD= 0,46):  
 $t(48) = -1,487, p_S = 0,143,$
- **Test 1:** Design 1, Mittel der Ausgänge:  
**therm. SiO<sub>2</sub>** (N=30; M=5,63; SD= 0,55), **nat. SiO<sub>2</sub>** (N=30; M= 5,81; SD=0,53):  
 $t(58) = -1,311, p_S = 0,195,$
- **Test 2:** Design 1, Mittel der Ausgänge:  
**therm. SiO<sub>2</sub>** (N=30; M=5,66; SD= 0,50), **nat. SiO<sub>2</sub>** (N=30; M= 5,77; SD=0,53):  
 $t(58) = -0,852, p_S = 0,398.$

## 6.4.2 Diskussion

Während der Zellkultur bzw. den Toxizitätstests im Chip sollen die Umgebungsbedingungen innerhalb der Wells immer einheitlich und vergleichbar sein, so dass sich darin jeweils nur die Konzentration der Substanzlösung verändert (Abb. 6.11). Auf diese Weise kann auf die Wechselwirkung zwischen den Zellen und der unterschiedlich konzentrierten Testsubstanz im Bereich von 50 % (Ausgang 1) bis 0,098 % (Ausgang 10) pro Well, z. B. durch optische Analysen oder Untersuchungen des Überstands, geschlossen werden. Damit zählen einheitliche Flussraten an den Ausgängen zu den Kernfunktionen des mikrofluidischen Chips, wodurch deren Analyse erforderlich ist.



**Abbildung 6.12:** Mittelwerte mit Standardabweichungen der Flussraten von Test 1 und 2 für beide Designs mit natürlichem oder thermisch hergestelltem  $\text{SiO}_2$  an den Ausgängen 1 bis 10 im Konzentrationsbereich von 50 % bis 0,098 %. Zusätzlich sind die Mittelwerte über alle acht Chips aufgetragen. Der berechnete Sollwert bei festgelegten Eingangsflüssen mit  $54,01 \mu\text{l}/\text{min}$  und  $5,99 \mu\text{l}/\text{min}$  liegt bei  $6 \mu\text{l}/\text{min}$ . Die Werte sind in den Tabellen E.1 und E.2 zu finden.

Durch eine direkt aufeinanderfolgende doppelte Probenentnahme pro Chip konnte gezeigt werden, dass der Fluss über eine Zeitspanne von mindestens 60 min stabil bleibt und nicht durch Verunreinigungen verändert wird. Für aussagekräftigere Ergebnisse zur Zuverlässigkeit und Wiederholbarkeit müssten weitere Tests über eine längere Dauer erfolgen, da der Chip idealerweise für mindestens drei Tage verwendbar sein soll.

Für die Mittelwerte der Flussraten pro Ausgang über insgesamt acht Chips konnte unabhängig von Design und Oberflächenbeschichtung gezeigt werden, dass diese im Bereich der idealen  $6 \mu\text{l}/\text{min}$  liegen (Abb. 6.12, Tabellen E.1 und E.2). Der Mittelwert der Flussraten von Design 2 liegt näher am Sollwert als von Design 1 und scheint gleichmäßiger zu sein, jedoch ist kein statistischer Unterschied zwischen beiden festzustellen. Dabei ist zu beachten, dass pro Design maximal drei Chips analysiert wurden. Bei den unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen mit natürlichem oder  $90 \text{ nm}$  dickem  $\text{SiO}_2$  erscheinen die Flussraten bei ersterem gleichmäßiger und der Mittelwert über alle Ausgänge liegt näher am Sollwert. Es ist allerdings kein statistischer Unterschied festzustellen, wobei auch hier jeweils drei Chips analysiert wurden. Das deutet darauf hin, dass der Einfluss der unterschiedlichen Kontaktwinkel bei der  $90 \text{ nm}$  dicken  $\text{SiO}_2$ -Schicht (ca.  $41^\circ$ ) bzw. beim natürlichen Oxid (ca.  $17^\circ$ ) nicht gravierend ist. Bei Messungen der Langzeitstabilität der Flussrate ist eine bessere Reproduzierbarkeit für die thermische  $90 \text{ nm}$  dicke  $\text{SiO}_2$ -Schicht zu erwarten, da die Struktur einer thermischen Oxidschicht gleichmäßig und wiederholbar hergestellt werden kann.

## 6.5 Konzentrationsverteilung

### 6.5.1 Ergebnisse

Im Chip sollen passiv zehn verschiedene Verdünnungen einer Substanz erzeugt werden, die jeweils zu einem Zellwell fließen (Abb. 6.11). Die Probenflüssigkeiten werden mit dem Versuchsaufbau des in Kapitel 5.2 beschriebenen Flusstests für jeden Ausgang gesammelt und die Substanzmengen mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Die Konzentrationen sollen im Bereich von  $50\%$  an Ausgang 1 bis  $0,098\%$  an Ausgang 10 liegen. Die Tabellen mit den Messwerten sind in Anhang E zu finden. Die jeweilige Probenmenge pro Testmethode und Design variiert und wird zusätzlich in den Graphen ausgewiesen.

### HPLC-MS

Mit Hilfe der HPLC-MS (Kapitel 5.6.1) wurden die Ausgangssubstanzen Diclofenac ( $500 \mu\text{mol}/\text{l}$ ) und Metoprolol ( $100 \mu\text{mol}/\text{l}$ ) in PBS gleichzeitig pro Ausgang gemessen. Da diese Substanzen simultan getestet werden, ergibt sich daraus eine Verdopplung der jeweiligen Probenanzahl pro Chip zur Ermittlung des Mittelwerts. Die Probenergebnisse beziehen sich auf eine Kalibrierkurve und werden prozentual zu diesen Werten angegeben.

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen über die jeweiligen Ausgänge sind in Abb. 6.13 linear und logarithmisch dargestellt sowie zusätzlich in Anhang E in Tabelle E.3 angegeben. In der Tabelle E.4 sind die Differenzen  $D$  und die prozentualen Differenzen  $D\%$  angegeben, welche in Kapitel 5.9 erläutert sind.

Für drei Chips ( $N = 6$ ) mit natürlichem  $\text{SiO}_2$  des Designs 1 liegen die Mittelwerte im Bereich von  $41,4\% \pm 3,29\%$  bis  $0,57\% \pm 0,66\%$  mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 4 mit  $2\%$  und einer maximalen an Ausgang 9 mit  $1055\%$ . Die Differenz an Ausgang 4 entspricht also dem 0,02-fachen des Sollwerts  $6,25\%$  und an Ausgang 9 dem 10,6-fachen des Sollwerts  $0,2\%$ .

Für drei Chips ( $N = 6$ ) mit thermisch abgeschiedenem,  $90\text{ nm}$  dickem  $\text{SiO}_2$  des Designs 1 liegen die Mittelwerte im Bereich von  $43,75\% \pm 4,98\%$  bis  $0,51\% \pm 0,73\%$  mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 2 mit  $0,4\%$  und einer maximalen an Ausgang 10 mit  $425\%$ . Die Differenz zum Sollwert  $25\%$  ist am Ausgang 2 minimal und am Ausgang 10 entspricht sie dem 4,3-fachen des Sollwerts  $0,1\%$ .

Für Design 2 liegen die Mittelwerte der Ausgänge von zwei gemessenen Chips ( $N = 4$ ) mit  $90\text{ nm}$  dickem  $\text{SiO}_2$  im Bereich von  $38,63\% \pm 2,12\%$  bis  $0,09\% \pm 0,09\%$  mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 3 mit  $4\%$  und einer maximalen an Ausgang 7 mit  $357\%$ . Die Differenz an Ausgang 3 entspricht dem 0,04-fachen des Sollwerts  $12,5\%$  und an Ausgang 7 dem 3,6-fachen des Sollwerts  $0,78\%$ .

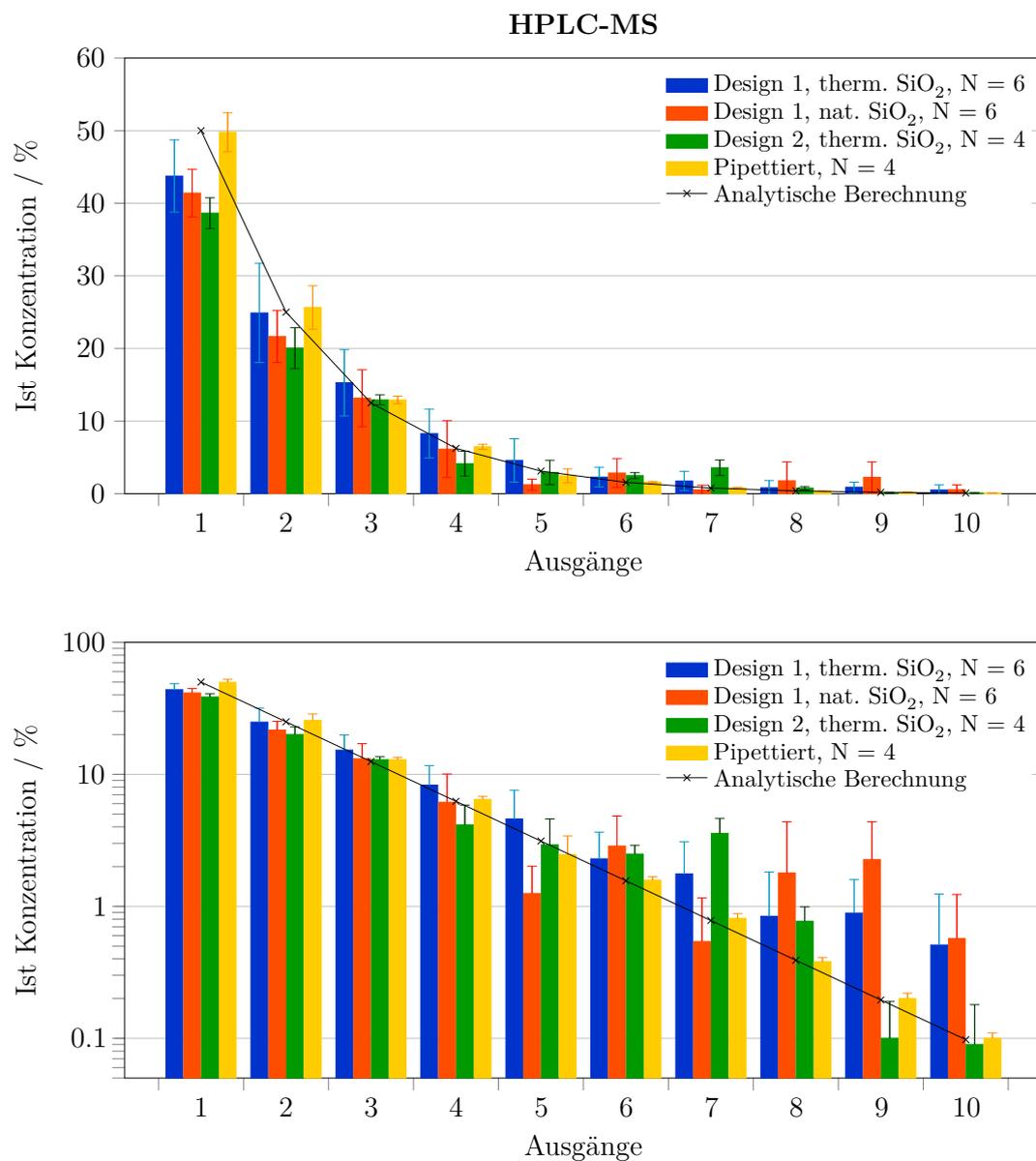
Zusätzlich wurden zwei pipettierte Reihen gemessen, um die Testmethode zu überprüfen. Diese Werte liegen im Bereich von  $49,78\% \pm 2,68\%$  bis  $0,10\% \pm 0,01\%$  mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 1 mit  $0,4\%$  und einer maximalen an Ausgang 5 mit  $21\%$ . Die Differenz zum Sollwert  $50\%$  ist am Ausgang 1 minimal und am Ausgang 5 entspricht sie dem 0,2-fachen des Sollwerts  $3,13\%$ .

### BPA-Test

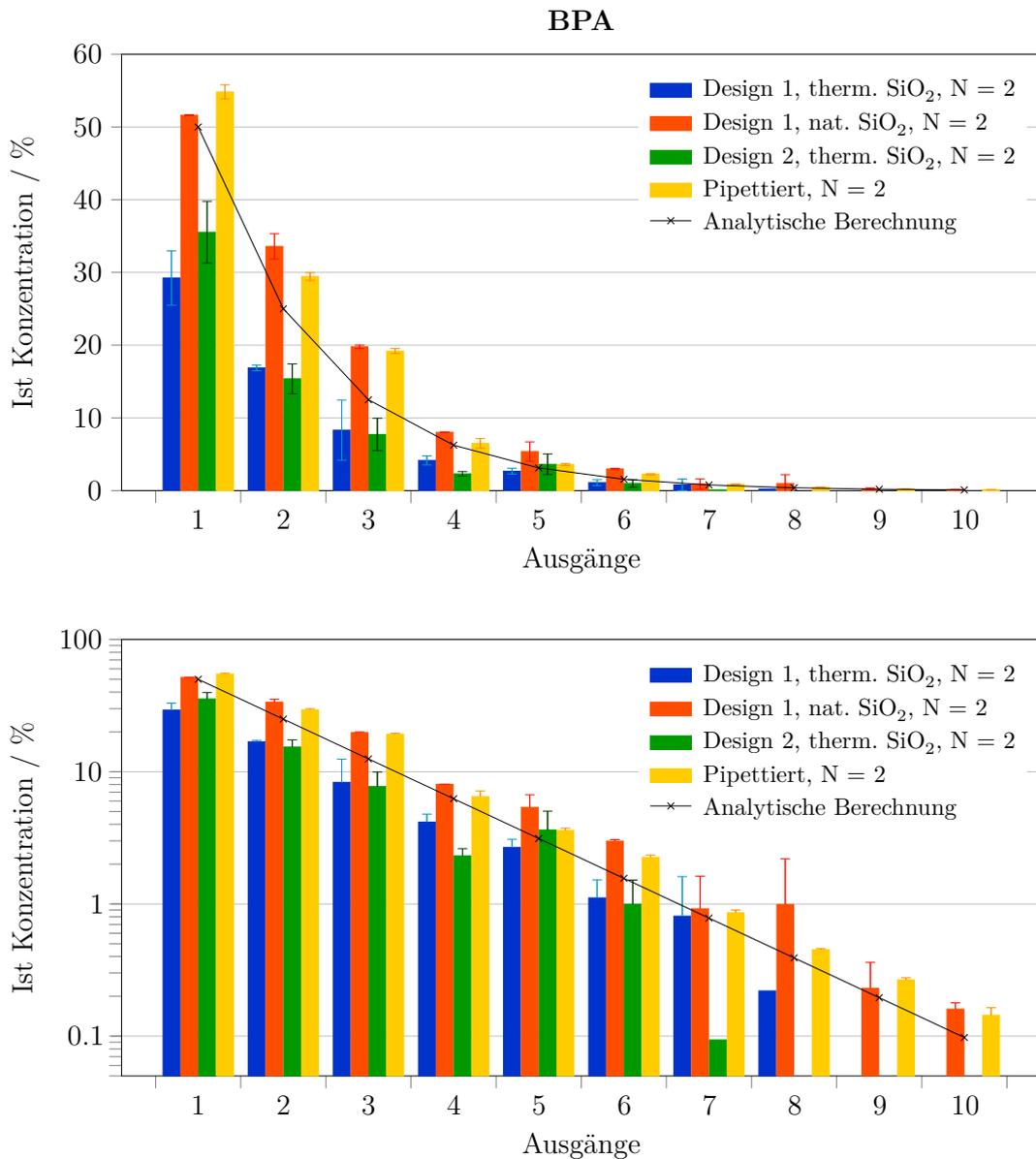
Mit Hilfe des BPA-Tests (Kapitel 5.6.2) wurden die Proteinkonzentrationen der Ausgangssubstanz ( $100\text{ mg/ml}$  BSA in PBS) pro Chipausgang bestimmt. Die Ergebnisse werden in Prozent der Ausgangskonzentration angegeben.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen über die jeweiligen Ausgänge sind in Abb. 6.14 linear und logarithmisch dargestellt sowie zusätzlich in Anhang E in Tabelle E.5 angegeben. In der Tabelle E.6 sind die Differenzen  $D$  und die prozentualen Differenzen  $D\%$  angegeben, welche in Kapitel 5.9 erläutert sind. Für alle Angaben ergibt sich eine Probenmenge von  $N = 2$ .

Je zwei Chips von Design 1 wurden mit natürlichem  $\text{SiO}_2$  und mit  $90\text{ nm}$  dickem thermischen  $\text{SiO}_2$  gemessen. Die Werte für ersteres liegen im Bereich von  $51,62\% \pm 0,06\%$  bis  $0,16\% \pm 0,02\%$  mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 1 mit  $3\%$  und einer maximalen an Ausgang 8 mit  $153\%$ . Die Differenz an Ausgang 1 entspricht also dem 0,03-fachen des Sollwerts  $50\%$  und an Ausgang 8 dem 1,5-fachen des Sollwerts  $0,39\%$ . Für den zweiten Fall liegen die



**Abbildung 6.13:** Arithmetische Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen der HPLC-MS-Messungen pro Ausgang über jeweils sechs bzw. vier Proben beider Designs mit thermisch hergestelltem oder natürlichem SiO<sub>2</sub> sowie der pipettierten Messreihen und der analytischen Berechnung in linearer und logarithmischer Darstellung. Die Werte sind prozentual zur Kalibrierkurve angegeben und in Tabelle E.3 zu finden.



**Abbildung 6.14:** Arithmetische Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen der BPA-Messungen pro Ausgang über jeweils zwei Chips beider Designs mit thermisch hergestelltem oder natürlichem SiO<sub>2</sub> sowie mit der pipettierten Messreihe und der analytischen Berechnung in linearer und logarithmischer Darstellung. Die Werte sind prozentual zur Ausgangskonzentration angegeben und in Tabelle E.5 zu finden.

Werte im Bereich von  $29,23\% \pm 3,75\%$  bis  $0,22\%$  am achten Ausgang mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 7 mit  $3\%$  und einer maximalen an Ausgang 8 mit  $44\%$ . Die Differenz an Ausgang 7 entspricht dem 0,03-fachen des Sollwerts  $0,78\%$  und an Ausgang 8 dem 0,4-fachen des Sollwerts  $0,39\%$ . Die geringer konzentrierten Proben konnten nicht ausgelesen werden. Dies war ebenfalls der Fall für die zwei Chips von Design 2 mit  $90\text{ nm}$  dickem  $\text{SiO}_2$  mit Werten im Bereich von  $35,53\% \pm 4,25\%$  bis  $0,09\%$  am siebten Ausgang mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 5 mit  $16\%$  und einer maximalen an Ausgang 7 mit  $88\%$ . Die Differenz an Ausgang 5 entspricht dem 0,2-fachen des Sollwerts  $3,13\%$  und an Ausgang 7 dem 0,9-fachen des Sollwerts  $0,78\%$ .

Zusätzlich wurden zwei pipettierte Reihen gemessen, um die Testmethode zu überprüfen. Diese Werte liegen im Bereich von  $54,82\% \pm 0,96\%$  bis  $0,14\% \pm 0,02\%$  mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 4 mit  $4\%$  und einer maximalen an Ausgang 3 mit  $54\%$ . Die Differenz an Ausgang 4 entspricht dem 0,04-fachen des Sollwerts  $6,25\%$  und an Ausgang 3 dem 0,5-fachen des Sollwerts  $12,5\%$ .

### Simulationen

Die Werte der Simulationen auf physikalischer Ebene mittels COMSOL Multiphysics (Tabelle 3.6) für Design 1 und 2 sind in Abb. 6.15 dargestellt. Für Design 1 liegen diese im Bereich von  $50,05\%$  bis  $0,2\%$ , für Design 2 im Bereich von  $48,71\%$  bis  $0,63\%$ . Die Werte der Simulationen auf Systemebene mittels CoventorWare Architect3D (Tabelle 3.5) entsprechen nahezu den analytisch berechneten Werten: für Design 1 im Bereich von  $49,99\%$  bis  $0,082\%$  und für Design 2 im Bereich von  $50,0\%$  bis  $0,10\%$ . Aus diesem Grund werden nur die analytischen Berechnungen im Bereich von  $50\%$  bis  $0,098\%$  zum Vergleich mit den Comsol-Simulationen abgebildet. Die Oberflächenbeschichtung wurde in der theoretischen Betrachtung und bei den Simulationen vernachlässigt.

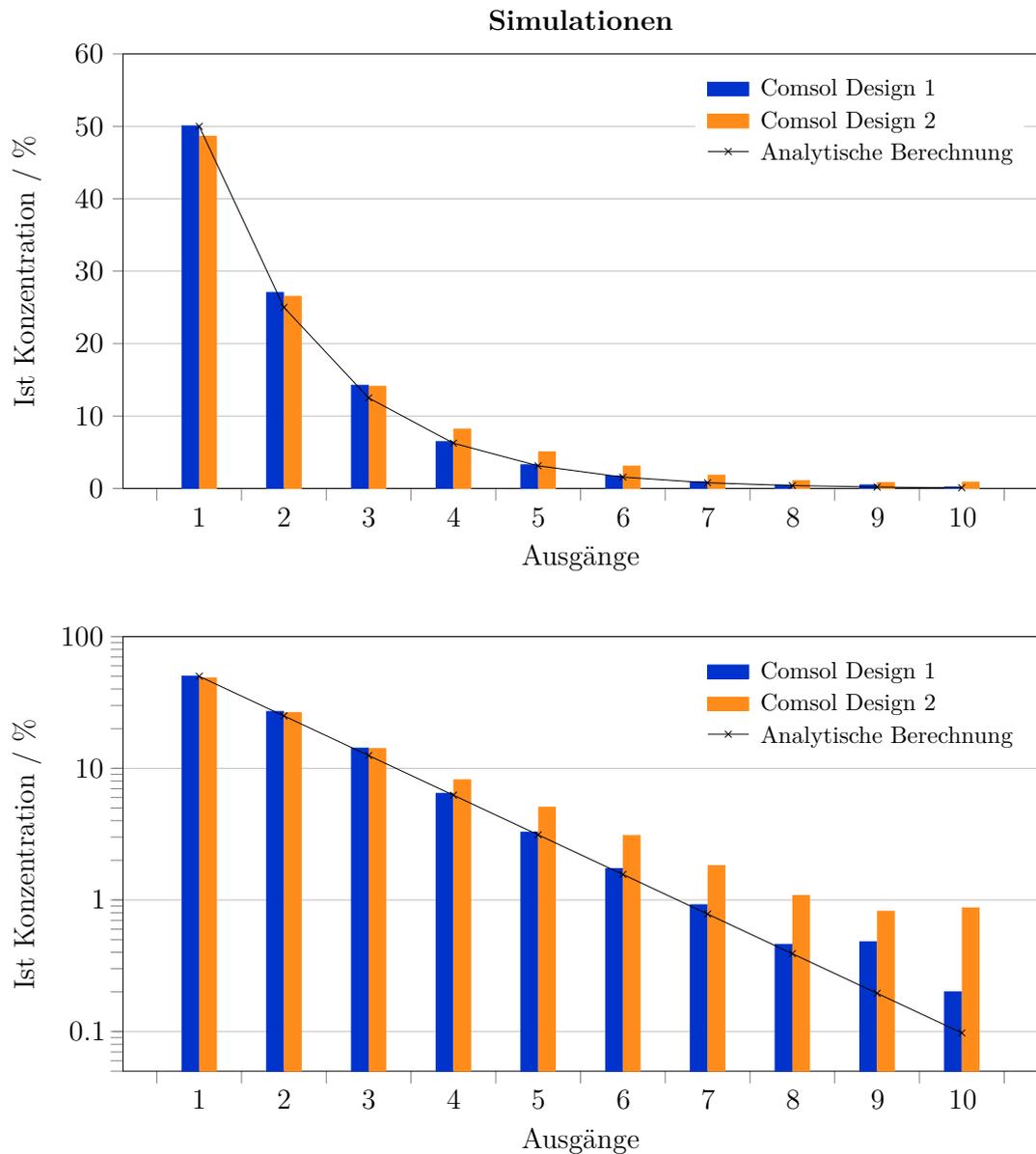
### Unterschiedliche Chipdesigns

Die Ergebnisse der vorhergehenden Analysemethoden werden im Folgenden nach Design und Oberfläche miteinander verglichen.

**Für Design 1 mit natürlichem  $\text{SiO}_2$**  sind die Ergebnisse der verschiedenen Methoden in Abb. 6.16 zusammengefasst.

Die Werte der HPLC-MS liegen im Bereich von  $41,4\% \pm 3,29\%$  bis  $0,57\% \pm 0,66\%$  bei einer Probenanzahl von  $N = 6$  mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 4 mit  $2\%$  und einer maximalen an Ausgang 9 mit  $1055\%$ . Die Differenz an Ausgang 4 entspricht also dem 0,02-fachen des Sollwerts  $6,25\%$  und an Ausgang 9 dem 10,5-fachen des Sollwerts  $0,2\%$ .

Für die BPA-Messungen ergeben sich bei einer Probenanzahl von  $N = 2$  Werte im Bereich von  $51,62\% \pm 0,06\%$  bis  $0,16\% \pm 0,02\%$  mit einer minimalen



**Abbildung 6.15:** Werte der Simulationen auf physikalischer Ebene für beide Designs (Tabelle 3.6) in linearer und logarithmischer Darstellung. Die Simulationenwerte auf Systemebene (Tabelle 3.5) entsprechen nahezu den hier gezeigten analytisch berechneten Werten. Alle Werte sind prozentual zur Ausgangskonzentration der theoretischen Testsubstanz angegeben.

prozentualen Differenz an Ausgang 1 mit 3 % und einer maximalen an Ausgang 8 mit 153 %. Die Differenz an Ausgang 1 entspricht dem 0,03-fachen des Sollwerts 50 % und an Ausgang 8 dem 1,5-fachen des Sollwerts 0,39 %.

Die Ergebnisse der Simulation liegen im Bereich von 50,05 % bis 0,2 %. Dabei wird die Oberflächenbeschichtung nicht berücksichtigt.

**Für Design 1 mit thermisch hergestelltem, 90 nm dickem SiO<sub>2</sub>** sind die Ergebnisse der verschiedenen Methoden in Abb. 6.17 zusammengefasst.

Die Werte der HPLC-MS liegen im Bereich von 43,75 % ± 4,98 % bis 0,51 % ± 0,73 % bei einer Probenanzahl von  $N = 6$  mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 2 mit 0,4 % und einer maximalen an Ausgang 10 mit 425 %. Die Differenz zum Sollwert 25 % ist an Ausgang 2 minimal und an Ausgang 10 entspricht sie dem 4,3-fachen des Sollwerts 0,1 %.

Für die BPA-Messungen ergeben sich bei einer Probenanzahl von  $N = 2$  Werte im Bereich von 29,23 % ± 3,75 % bis 0,22 % am achten Ausgang mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 7 mit 3 % und einer maximalen an Ausgang 8 mit 44 %. Die Differenz an Ausgang 7 entspricht dem 0,03-fachen des Sollwerts 0,78 % und an Ausgang 8 dem 0,4-fachen des Sollwerts 0,39 %.

Die Ergebnisse der Simulation liegen im Bereich von 50,05 % bis 0,2 %. Dabei wird die Oberflächenbeschichtung nicht berücksichtigt.

**Für Design 2 mit thermisch hergestelltem, 90 nm dickem SiO<sub>2</sub>** sind die Ergebnisse der verschiedenen Methoden in Abb. 6.18 zusammengefasst.

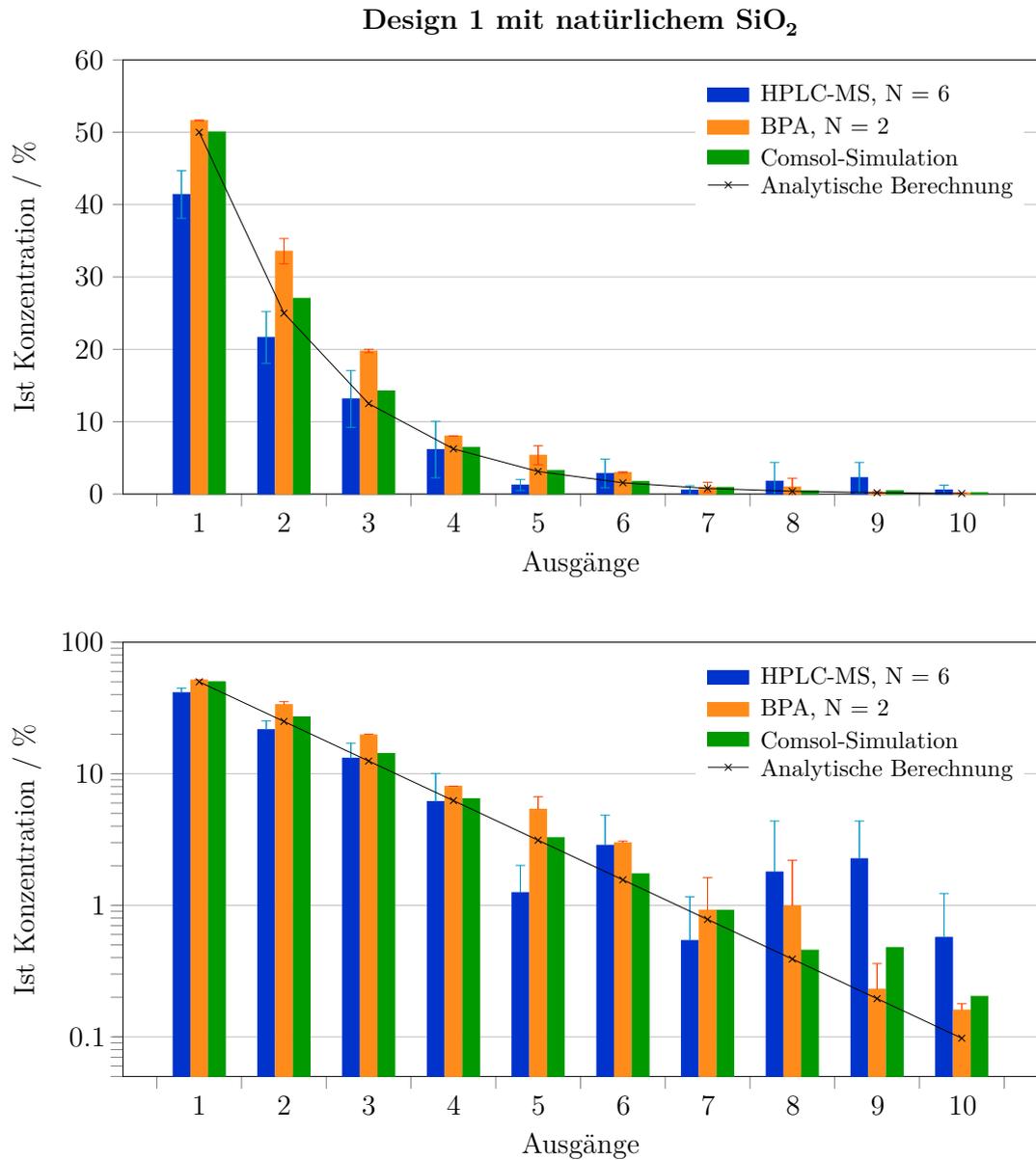
Die Werte der HPLC-MS liegen im Bereich von 38,63 % ± 2,12 % bis 0,09 % ± 0,09 % bei einer Probenanzahl von  $N = 6$  mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 3 mit 4 % und einer maximalen an Ausgang 7 mit 357 %. Die Differenz an Ausgang 3 entspricht dem 0,04-fachen des Sollwerts 12,5 % und an Ausgang 7 dem 3,6-fachen des Sollwerts 0,78 %.

Für die BPA-Messungen ergeben sich bei einer Probenanzahl von  $N = 2$  Werte im Bereich von 35,53 % ± 4,25 % bis 0,09 % am siebten Ausgang mit einer minimalen prozentualen Differenz an Ausgang 5 mit 16 % und einer maximalen an Ausgang 7 mit 88 %. Die Differenz an Ausgang 5 entspricht dem 0,2-fachen des Sollwerts 3,13 % und an Ausgang 7 dem 0,9-fachen des Sollwerts 0,78 %.

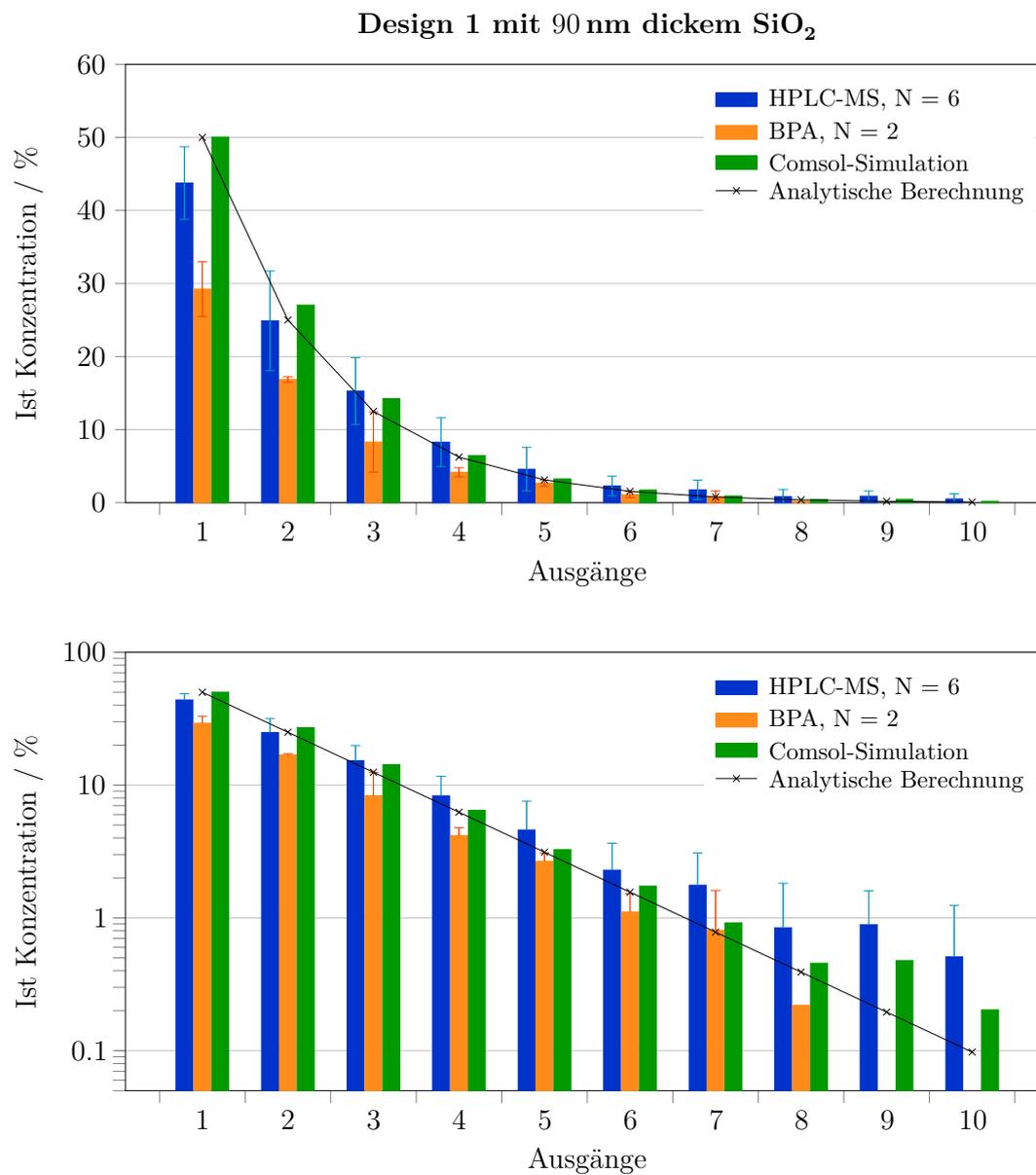
Die Ergebnisse der Simulation liegen im Bereich von 48,71 % bis 0,63 %. Dabei wird die Oberflächenbeschichtung nicht berücksichtigt.

### Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

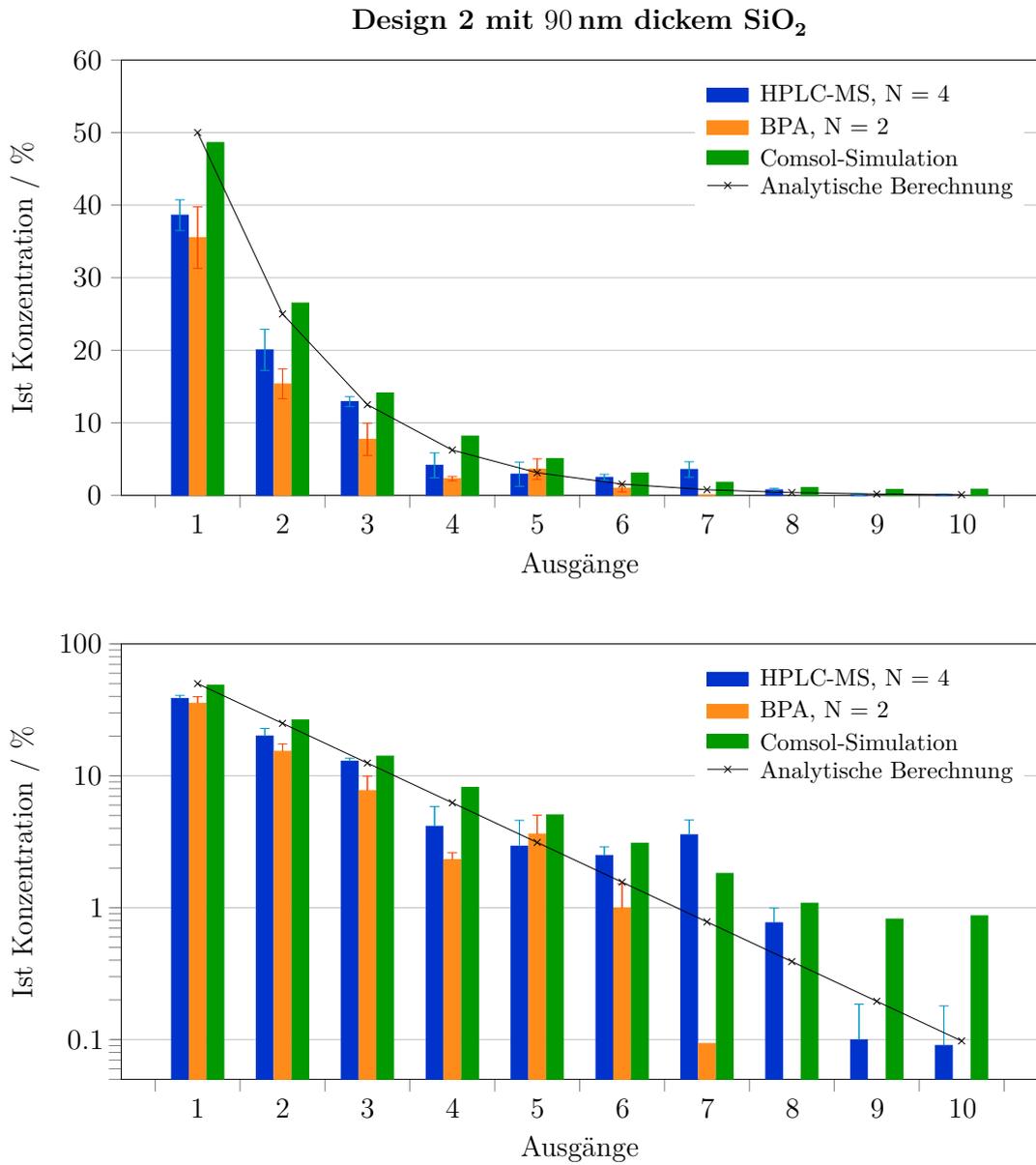
Mit Hilfe der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Kapitel 5.6.3) wurden unterschiedlich fluoreszierende 1 µm-Partikel in einem festgelegten Volumen gezählt, um so auf die Partikelmengen pro Ausgang zu schließen. Für die Ausgangssubstanzen wurden die Partikel mit unterschiedlichen Dichten in PBS suspendiert: rote an Eingang 1 mit ca.  $15,2 \cdot 10^6$  Partikel/ml, grüne an Eingang 2 mit ca.  $1,7 \cdot 10^6$  Partikel/ml. Pro Chip wurden nacheinander zwei Probensätze (Test 1



**Abbildung 6.16:** Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Analysemethoden von Design 1 mit natürlichem SiO<sub>2</sub> in linearer und logarithmischer Darstellung.



**Abbildung 6.17:** Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Analysemethoden von Design 1 mit thermisch abgeschiedenem SiO<sub>2</sub> in linearer und logarithmischer Darstellung.



**Abbildung 6.18:** Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Analysemethoden von Design 2 mit thermisch abgeschiedenem SiO<sub>2</sub> in linearer und logarithmischer Darstellung.

und 2) genommen, um die Stabilität des Flusses zu überprüfen. Die Werte werden prozentual bezüglich der Gesamtanzahl der Partikel pro Ausgang angegeben. Für die roten Partikel sollten diese zwischen 50 % (Ausgang 1) und 0,098 % (Ausgang 10) liegen, da die Ausgangslösung jeweils halbiert werden soll. Die zweite Flüssigkeit mit den grünen Partikeln soll den Fluss zu den Wells auffüllen, um überall die gleiche Flussrate zu erhalten, weshalb Werte zwischen 50 % (Ausgang 1) und 99,90 % (Ausgang 10) erwartet werden.

In Tabelle E.7 in Anhang E und Abb. 6.19 sind die Ergebnisse einer pipettierten Messreihe und eines Chips des Designs 1 mit 90 nm dickem SiO<sub>2</sub> angegeben. Die Anzahl der Partikel, die insgesamt an den einzelnen Ausgängen ankommen, liegt bei Test 1 zwischen 1157 an Ausgang 7 und 3612 an Ausgang 1, bei Test 2 zwischen 1198 an Ausgang 9 und 2051 an Ausgang 1. Die prozentualen Anteile der roten Partikel des Tests 1 liegen im Bereich von 7,77 % an Ausgang 1 bis 1,89 % an Ausgang 10, die der grünen Partikel im Bereich von 91,16 % an Ausgang 2 bis 98,90 % an Ausgang 5. Die Werte von Test 2 liegen bei den roten Partikeln im Bereich von 3,28 % an Ausgang 3 bis 1,89 % an Ausgang 10 und bei den grünen Partikeln im Bereich von 96,47 % an Ausgang 3 bis 99,84 % an Ausgang 5.

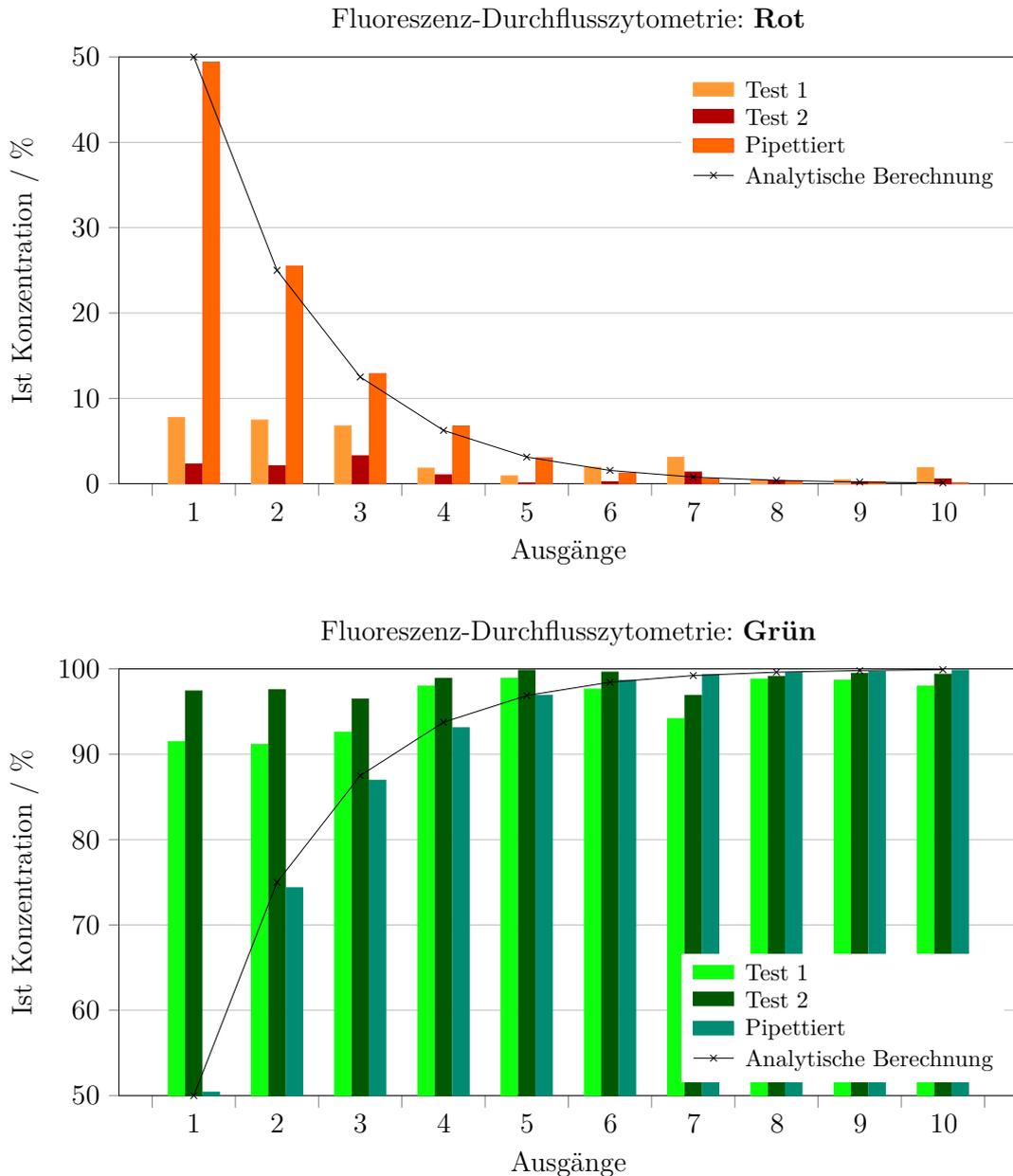
Zusätzlich wurde eine pipettierte Reihe gemessen, um die Testmethode zu überprüfen. Diese Werte liegen bei den roten Partikeln im Bereich von 49,39 % bis 0,10 % und bei den grünen Partikeln im Bereich von 50,42 % bis 99,84 %.

### 6.5.2 Diskussion

Ziel des Chips ist eine Vereinfachung komplexer Testprozesse, bei denen viele unterschiedliche Parameter chemischer Komponenten auf Zellen analysiert werden können. Ein wesentlicher Bestandteil des Chips ist die Rückseite mit einer Kanalanordnung zur Erzeugung einer Verdünnungsreihe mit zehn Konzentrationen in einem Bereich von 50 % (Ausgang 1) binär-logarithmisch abgestuft bis 0,098 % (Ausgang 10). Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte passive Struktur ähnelt einer Leiter (Abb. 3.2), deren Funktionsprinzip in Abb. 3.3 dargestellt ist. Während eines Tests fließt die Testsubstanz von Einlass 1 über den Zuflusskanal in verschiedenen Mengen in die unterschiedlich breiten Sprossenkanäle. Gleichzeitig fließt die Pufferlösung von Eingang 2 in die Sprossenkanäle und gleicht die Volumendifferenz aus, um am Ausgang eine einheitliche Flussrate zu erhalten. Die Flussverhältnisse werden passiv, also über die fluidischen Widerstände der Kanäle, geregelt und können nach Chipherstellung nicht mehr verändert werden.

### Unterschiedliche Methoden und Chipdesigns

Um zu überprüfen, ob bei den Flusstests eine binär-logarithmische Verdünnungsreihe mit zehn Konzentrationen an den Ausgängen der Chips resultiert, wurden unterschiedliche Analysemethoden mit unterschiedlichen Testsubstanzen angewendet: die HPLC-MS (Kapitel 5.6.1), der BPA-Test (Kapitel 5.6.2), die



**Abbildung 6.19:** Ergebnisse der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie für einen Chip des Designs 1 mit 90 nm dickem  $\text{SiO}_2$ . Direkt hintereinander wurden zwei Probensätze (Tests 1 und 2) sowie eine pipettierte Messreihe mit rot (oben) und grün (unten) fluoreszierenden  $1\ \mu\text{m}$ -Partikeln in PBS genommen. Die analytischen Werte zeigen die Sollkonzentrationen an. Die Werte werden in % bezüglich der Gesamtanzahl der Partikel pro Ausgang angegeben und in Tabelle E.7 angegeben.

Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Kapitel 5.6.3) sowie die pH-Messung (Kapitel 5.6.4).

Der logarithmische Konzentrationsabfall, eine der Kernfunktionen des mikrofluidischen Chips, entspricht tendenziell den Erwartungen, wobei weitere Optimierungen der Analysemethoden nötig sind. Die Messungen der HPLC-MS mit Diclofenac und Metoprolol in PBS (Abb. 6.13) sowie die BPA-Tests mit BSA in PBS (Abb. 6.14) erwiesen sich als die erfolgreichsten Methoden. In den kleinen Konzentrationsbereichen an den Ausgängen 7 (0,78 %) bis 10 (0,098 %), bei denen die prozentualen Differenzen zu den Sollkonzentrationen am höchsten sind, ist ein Optimierungsbedarf zu erkennen, obwohl die Flussraten an diesen Ausgängen nur gering schwanken. Das könnte daran liegen, dass die Abweichungen in den niedrigen Bereichen auffallender sind, die Spritzenpumpen nicht pulsfrei laufen oder an Messunsicherheiten. Bei den BPA-Tests konnte z. B. ein mit der Zeit fortschreitender Erkenntnisgewinn zur Methodik festgestellt werden: Bei den ersten Messungen (Design 1 und 2 mit therm.  $\text{SiO}_2$ ) konnten die Ergebnisse nur bis Ausgang 7 bzw. 8 erfasst werden, während bei den folgenden Messungen (Design 1 mit nat.  $\text{SiO}_2$ ) eine Auswertung bis Ausgang 10 möglich war. Bei anderen Methoden waren Wechselwirkungen zwischen einigen Testsubstanzen und den Materialien des Chips oder des Testaufbaus zu erkennen, wie z. B. Verapamil bei der HPLC-MS sowie fluoreszierende Partikel bei der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Abb. 6.19). Die pH-Messung war nicht zur Untersuchung des Konzentrationsbereichs geeignet, da keine Rückschlüsse von den Abweichungen auf den Fluss im Chip möglich waren.

Die grundlegende Einsatzfähigkeit der HPLC-MS-Messungen (Abb. 6.13) und der BPA-Tests (Abb. 6.14) zur Konzentrationsbestimmung konnte anhand pipettierter Messreihen nachgewiesen werden, die bei der HPLC-MS bis auf Ausgang 5 mit den Sollwerten übereinstimmen und bei den BPA-Tests leicht darüber liegen.

In der vorliegenden Arbeit kann zwischen Design 1 mit natürlichem und Design 1 mit 90 nm dickem  $\text{SiO}_2$  kein grundlegender Unterschied festgestellt werden: Beim Vergleich zwischen den unterschiedlichen Designs und Oberflächenbeschichtungen ergibt sich für Design 1 mit 90 nm dickem  $\text{SiO}_2$  das beste HPLC-MS-Ergebnis (Abb. 6.13) mit einer stetigen Konzentrationsabnahme bis Ausgang 8 (0,39 %) und dem kleinsten Mittelwert über die Differenzen  $D$  (Tabelle E.4), d. h. die Werte liegen am dichtesten an den Sollwerten, wobei die Konzentrationen ab Ausgang 2 leicht erhöht sind. Beim Vergleich der BPA-Ergebnisse (Abb. 6.14) ergibt sich zwar auch für Design 1 das beste Resultat, allerdings mit natürlichem  $\text{SiO}_2$ . Die Konzentrationsabnahme ist stetig mit einer Ausnahme an Ausgang 8 (0,39 %) und die Konzentrationswerte liegen am dichtesten an den Sollwerten (Tabelle E.6). Allerdings hat dieses Design bei beiden Messmethoden den höchsten Mittelwert der prozentualen Differenzen  $D\%$ , wobei zu beachten ist, dass die BPA-Ergebnisse der beiden anderen Chipdesigns maximal bis Ausgang 8 ausgewertet werden konnten und  $D\%$  gerade bei den niedrigen Konzentrationen hoch ausfällt.

Des Weiteren kann auch für Design 2 mit 90 nm dickem  $\text{SiO}_2$  ein stetiger Abfall

der Konzentrationswerte für beide Messmethoden festgestellt werden (Abb. 6.18). Dabei gibt es bei der HPLC-MS eine Ausnahme an Ausgang 7 (0,78 %) und bei den BPA-Tests an Ausgang 5 (3,13 %). Bei einem direkten Vergleich der unterschiedlichen Modifikationen hat Design 2 bei beiden Messmethoden den höchsten Mittelwert der Differenzen  $D$  und liegt somit insgesamt am weitesten von den Sollwerten weg. Dabei ist zu beachten, dass für dieses Design am wenigsten Proben gemessen wurden.

Um eine höhere statistische Sicherheit zu bekommen, sind weitere Messungen zusätzlicher Proben wünschenswert.

### Simulationen

Die Werte der Simulationen beider Designs auf Systemebene sowie der Simulation des Designs 1 auf physikalischer Ebene zeigen gute Übereinstimmungen mit den Sollkonzentrationen (Abb. 6.15). Design 2 ist bei der Simulation auf physikalischer Ebene ab Ausgang 3 etwas zu hoch. Dies liegt wahrscheinlich an den dreieckigen Kanälen, für die ein aufwendigeres *Mesh* erforderlich ist als für die trapezförmigen Kanäle von Design 1, sowie an der begrenzten Rechenkapazität, wegen der die Komplexität reduziert werden musste. Dadurch konnte das Simulationspotential nicht optimal ausgeschöpft werden. Durch die Verwendung eines komplexeren *Meshs* könnte dieses Ergebnis genauer werden.

### Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Für die Konzentrationsmessungen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie wurden an Einlass 1 rot und an Einlass 2 grün fluoreszierende Partikel in PBS eingelassen. Dadurch sollten sich die roten Partikel in einem Konzentrationsbereich von 50 % bis 0,1 % jeweils halbieren, während die grünen einen Bereich von 50 % bis 99,9 % abdecken sollten. Da die pipettierte Messreihe mit den Sollwerten für die Partikel übereinstimmt (Abb. 6.19), konnte die grundlegende Einsatzfähigkeit der Methode zur Konzentrationsbestimmung nachgewiesen werden.

Allerdings fallen die Konzentrationen der roten Partikel zu gering aus und die der grünen zu hoch, zusätzlich ist keine stetige Konzentrationsabnahme erkennbar. Nur die gesamte Partikelanzahl pro Ausgang reduziert sich von Ausgang 1 bis 10 (Tabelle E.7 in Anhang E). Dies widerspricht den Ergebnissen der gleichmäßigen Flussraten an den Ausgängen, wobei die Partikelanzahl zusätzlich mit der Zeit von Test 1 zu Test 2 abnimmt. Der Grund für diese Effekte ist wahrscheinlich eine adhäsive Wechselwirkung der Partikel mit dem Material des Chips oder des Messaufbaus, da z. B. bei der pipettierten Reihe dieser Effekt nicht zu beobachten ist und dabei die Partikel mit wesentlich weniger Materialien und Oberflächen in Kontakt kommen. In diesem Zusammenhang sind weitere Partikelversuche nötig, um die Konzentrationen mit dieser Methode zuverlässig messen zu können.

## 6.6 Zellkultur

### 6.6.1 Ergebnisse

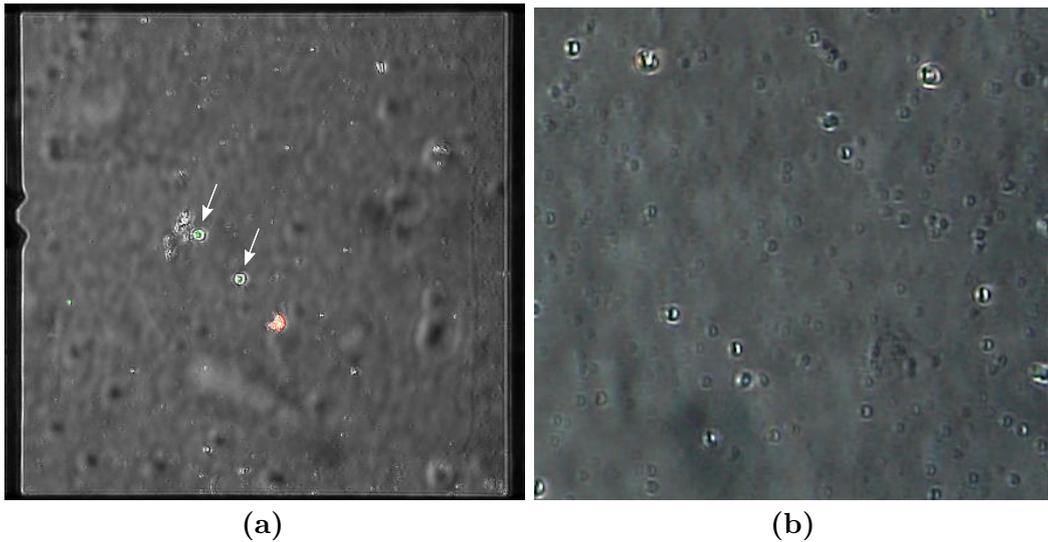
Eine wesentliche Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Kultivierung von lebenden Zellen im mikrofluidischen Chip bei kontinuierlicher Nährmedienzufuhr. Hierzu wurden *in vitro*-Tests für 24 h mit adhärenenten HeLa-Zellen in einem Chip des Designs 1 mit einer 90 nm dicken SiO<sub>2</sub>-Beschichtung durchgeführt. Die Methode wurde, wie in Kapitel 5.8 beschrieben, in drei Versuchen optimiert, um zeigen zu können, dass HeLa-Zellen mindestens 24 h im Chip überleben.

Die grün fluoreszierenden Zellen werden je nach Versuch mit dem pH-abhängigen BCECF oder dem pH-unabhängigen PKH67 gefärbt und an Einlass 1 mit der Flussrate 1,198 µl/min eingelassen. Die rot fluoreszierenden Zellen werden bei allen Versuchen mit PKH26 gefärbt und an Einlass 2 mit 10,802 µl/min eingelassen. Während der Zellkultur wird der Chip für 4 h bei 37 °C ohne zusätzliche Mediumzufuhr gelagert, damit sich die Zellen im Chip absetzen können. Danach wird in einem 37 °C-Raum für weitere 20 h kontinuierlich Medium zugeführt.

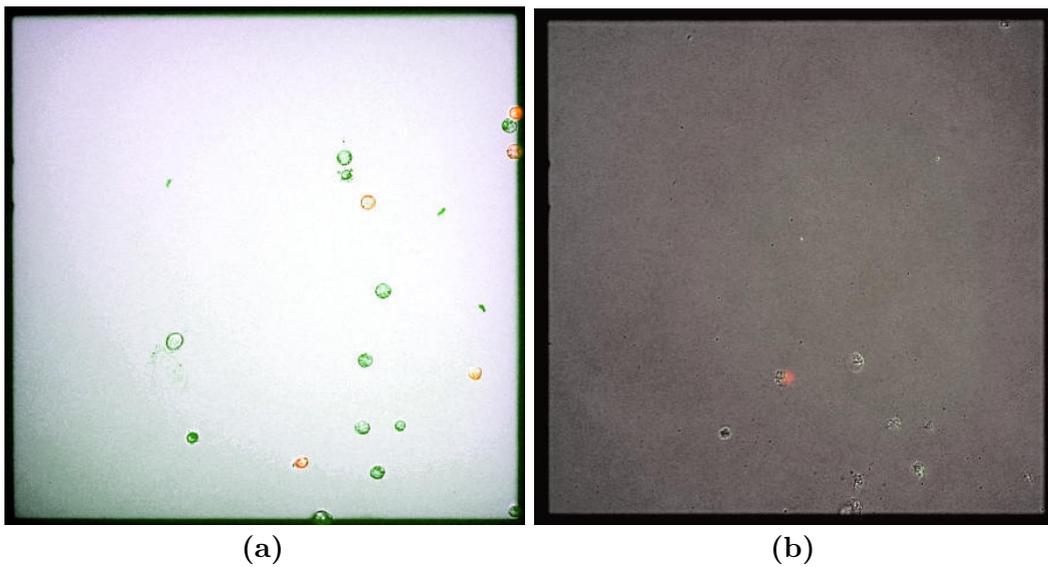
Bei Versuch 1 (6.20) mit einer moderaten Zell-Anfangsdichte waren die Proben nach 4,5 h kontaminiert und nur wenige grün fluoreszierende Zellen (BCECF) in den Wells zu sehen. Die rot fluoreszierende Komponente in dem hier abgebildeten Well konnte nicht eindeutig als Zelle identifiziert werden und fluoreszierte zusätzlich im grünen Bereich.

Bei Versuch 2 (6.21) wurde eine größere Zelldichte verwendet und der Chip während der ersten 4 h steril verschlossen. Für die grün fluoreszierenden Zellen wurde BCECF verwendet. Nach 4 h haben sich einige Zellen auf dem Wellboden abgesetzt, nach 24 h sind nur noch wenige Zellen zu sehen und es wurde keine Kontamination festgestellt. Einige der grün fluoreszierenden Zellen fluoreszieren auch im roten Bereich.

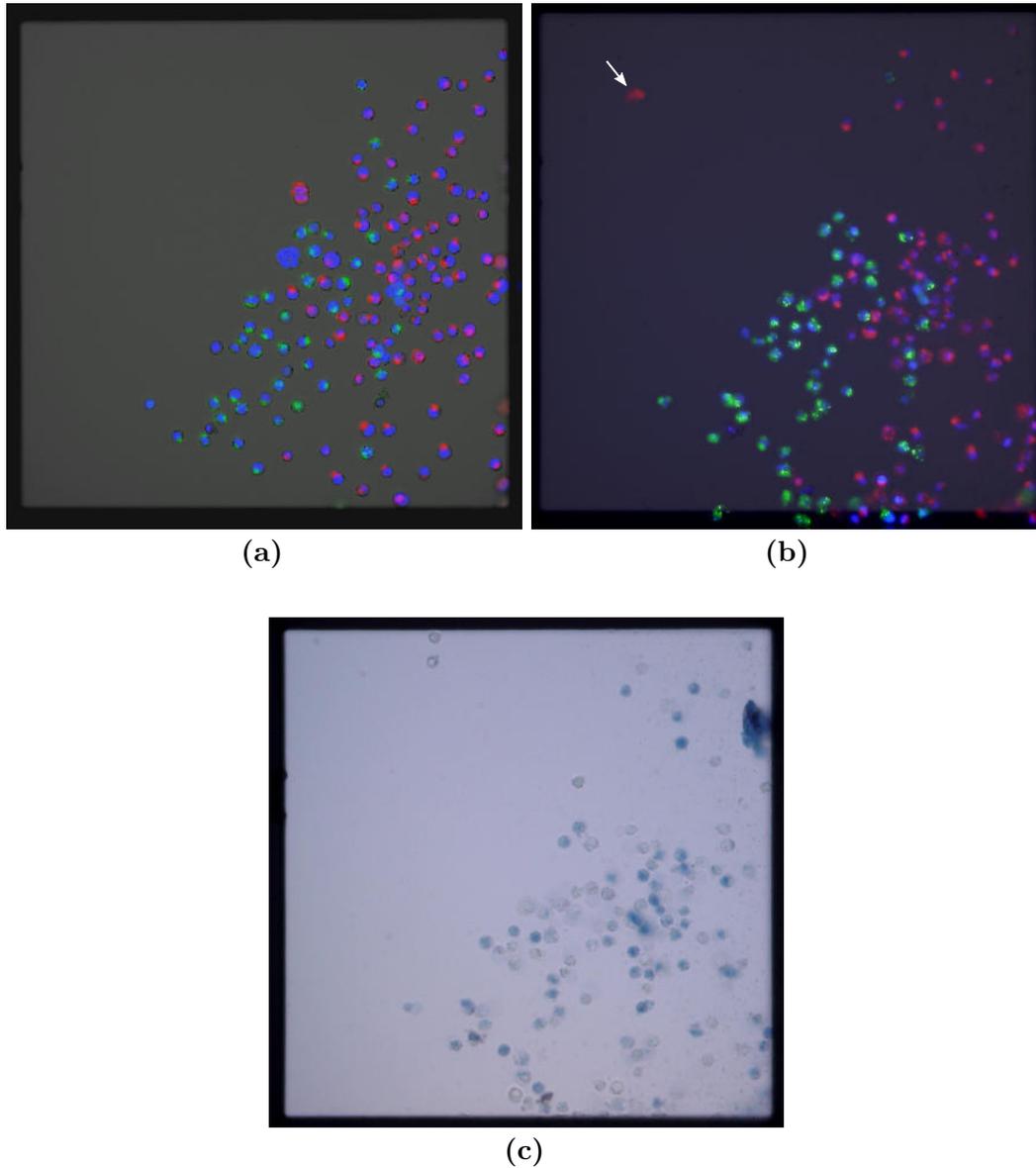
Bei Versuch 3 (6.22) wurde die Zelldichte erneut erhöht sowie ein pH-unabhängiger grüner Farbstoff (PKH67) und ein zusätzlicher blauer Farbstoff (Bisbenzimid) zur Markierung der Zellkerne verwendet. Nach 4 h haben sich Zellen auf dem Wellboden abgesetzt, nach 24 h mit einer Nährmediumzufuhr mit 10-fach erhöhter Flussrate sind diese größtenteils noch da. Es wurde keine Kontamination festgestellt und die grün fluoreszierenden Zellen sind unter Verwendung des roten Emissionsfilters nicht mehr zu sehen. Durch die blaue Fluoreszenzfärbung der Zellkerne können Verunreinigungen (weißer Pfeil) von Zellen unterschieden werden. Die Zellviabilität wurde durch eine Trypanblau-Färbung überprüft, bei der einige Zellen nicht eingefärbt wurden, wodurch bei diesen auf eine intakte Membran zu schließen ist (Abb. 6.22c und 6.23). Aufgrund der bis zur Aufnahme der Bilder verstrichenen Zeit können wegen der toxischen Wirkung des Farbstoffs womöglich zusätzliche Zellen beschädigt und blau gefärbt sein.



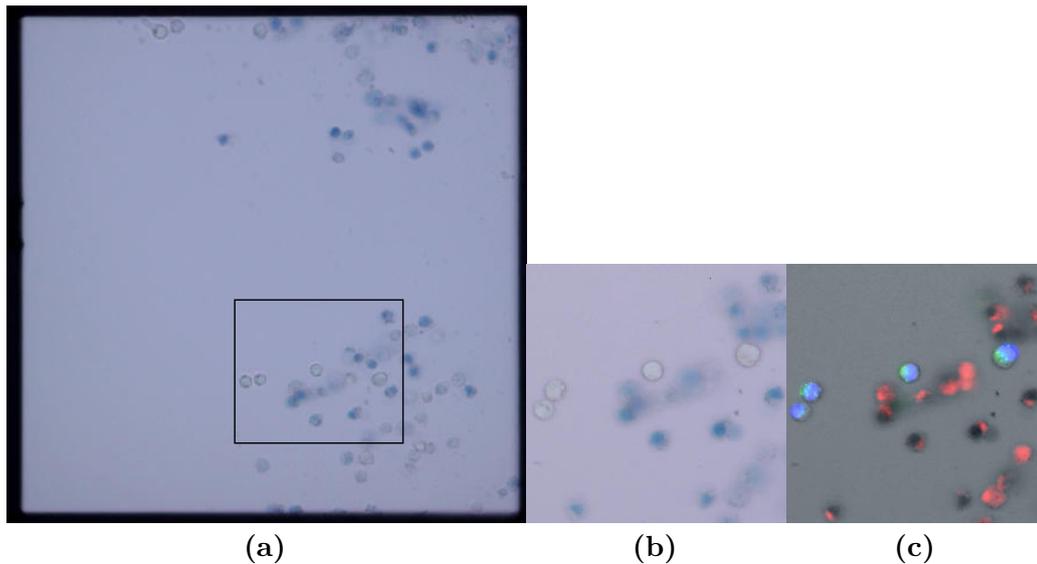
**Abbildung 6.20:** Versuch 1: Zellwells nach 4,5 h Zellkultur ohne kontinuierliche Nährmediumzufuhr, damit sich die Zellen im Chip absetzen können; a) Well 2: die grün fluoreszierenden Zellen (Pfeile) wurden mit BCECF gefärbt, die rot fluoreszierenden mit PKH26, wobei es sich hier wahrscheinlich um keine Zelle sondern um eine Verunreinigung handelt; b) Die Punkte in der Vergrößerung des Wells 10 deuten auf die Kontamination der Probe hin.



**Abbildung 6.21:** Versuch 2: die Zelldichte an den Eingängen wurde erhöht. Im Chip (hier: Well 2) ist keine Kontamination erkennbar. Die grün fluoreszierenden Zellen wurden mit BCECF gefärbt, die rot fluoreszierenden mit PKH26; a) Nach 4 h Zellkultur ohne kontinuierliche Nährmediumzufuhr haben sich einige grün und rot fluoreszierende Zellen im Well abgesetzt; b) Nach 24 h Zellkultur mit langsamer kontinuierlicher Nährmediumzufuhr sind nur noch wenige Zellen zu sehen.



**Abbildung 6.22:** Versuch 3: die Zelldichte an den Eingängen wurde erneut erhöht. Im Chip (hier: Well 4) ist keine Kontamination erkennbar. Die grün fluoreszierenden Zellen wurden mit PKH67 gefärbt, die rot fluoreszierenden mit PKH26. Alle Zellen wurden zusätzlich mit Bisbenzimid (blau) gefärbt; a) Nach 4 h Zellkultur ohne kontinuierliche Nährmediumzufuhr haben sich Zellen im Well abgesetzt [83]; b) Nach 24 h Zellkultur mit 10-facher, kontinuierlicher Nährmediumzufuhr. Verunreinigungen (weißer Pfeil) sind an der fehlenden blauen Fluoreszenz erkennbar [83]; c) Trypanblau-Färbung der Zellen: unbeschädigte Zellen bleiben ungefärbt, beschädigte färben sich blau. Das Ergebnis kann aufgrund der Dauer bis zur Bildaufnahme negativ verfälscht sein.



**Abbildung 6.23:** Trypanblau-Färbung nach Versuch 3 an Well 3. Unbeschädigte Zellen bleiben ungefärbt, beschädigte färben sich blau. Das Ergebnis kann aufgrund der Dauer bis zur Bildaufnahme negativ verfälscht sein; a) Ganzes Well; b) Vergrößerung des eingerahmten Bereichs aus a) mit vier ungefärbten Zellen mit intakter Membran; c) Überlagerung der verschiedenen Fluoreszenzfarben und der Trypanblau-Färbung des Ausschnitts aus b), die vier unbeschädigten Zellen fluoreszieren grün und blau.

### 6.6.2 Diskussion

Ziel des Chips ist eine Vereinfachung komplexer Testprozesse, bei denen unterschiedliche Parameter von chemischen Komponenten auf Zellen analysiert werden. Da die Integration mehrerer Zellkulturwells auf einem Chip zu einer geringeren Kontamination, zu reproduzierbareren Daten und zu einer Zeitersparnis bei den damit durchgeführten Versuchen führt, ist eine wesentliche Kernfunktion des mikrofluidischen Chips die Kultivierung von lebenden Zellen bei kontinuierlicher Nährmediumzufuhr. Der Chip ist sowohl für adhärenente als auch nicht-adhärenente Zellen geeignet.

Dafür wurden verschiedene Parameter der Zellkultur adhärenente HeLa-Zellen in drei Versuchen, deren Resultate in den Abb. 6.20 bis 6.22 zu sehen sind, optimiert (ausführlich in Kapitel 5.8 und in Tabelle 5.3 aufgeführt):

- Die Zell-Anfangsdichte wurde erhöht, da HeLa-Zellen nur in ausreichender Dichte und Kontakt zu einer Nachbarzelle länger überleben. Eine nahezu konfluente Schicht sollte angestrebt werden.
- Die Kontaminationen konnten minimiert werden, indem die Schlauchanschlüsse für die ersten 4 h steril verschlossen und danach ausgetauscht wurden.
- Ein pH-unabhängiger grüner Fluoreszenzfarbstoff (hier: PKH67) wurde zur Zellfärbung verwendet, um Überlagerungen der Farbspektren auszuschließen. Der pH-abhängige Farbstoff BCECF war bei pH-Änderungen

der Zelle auch im roten Spektrum zu sehen, wodurch keine Unterscheidung mehr möglich war.

- Ein blauer Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von Zellkernen wurde hinzugefügt, um Zellen eindeutig von Verunreinigungen unterscheiden zu können.
- Die Flussgeschwindigkeit für die kontinuierliche Mediumzufuhr wurde angepasst, damit die Zellen durch Nährstoffaustausch gut versorgt waren, aber gleichzeitig kaum durch Scherstress beeinflusst wurden.

Nach diesen Optimierungen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Zellkultur von adhärennten HeLa-Zellen im Chip für mindestens 24 h möglich ist. Dies konnte durch eine Trypanblau-Färbung (Abb. 6.22c und 6.23) nachgewiesen werden, die nur Zellen mit geschädigter Zellmembran anfärbt. Bleibt eine Zelle ungefärbt, bedeutet das, dass die Zelle eine intakte Zellmembran hat und überlebensfähig ist. Da trotz der toxischen Wirkung des Farbstoffs bis zur Bildaufnahme der Wells einige Zellen ungefärbt blieben, ist daraus zu schließen, dass die Zellen zumindest teilweise nach 24 h überlebensfähig sind. Durch die erhöhte Zelldichte und die verbesserten Fluoreszenzfärbungen der Zellen konnten diese in den Zellwells gut optisch nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die CO<sub>2</sub>-Zufuhr während der Zellkultur trotz Luftundurchlässigkeit der Chipmaterialien durch eine frühzeitige Mediumsättigung erreicht werden kann.

Weiterhin müssen die optimale Einfließgeschwindigkeit und -dichte der Zellen und des Mediums untersucht werden, um optimale Ergebnisse in Form von Zellteilungen und einer nahezu geschlossenen Zellschicht am Wellboden zu erhalten.

Als nächster Schritt sollte die Zellkultur mit nicht-adhärennten Hefezellen des Typs *S. pombe* durchgeführt werden.

# 7 Zusammenfassung und Ausblick

## 7.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sind die Ergebnisse und Schlussfolgerungen zur Entwicklung des Designs, zur Optimierung der Herstellung, zum Befüllvorgang des Chips, zum Messaufbau des Flusses sowie zur Charakterisierung des mikrofluidischen Chips zusammengetragen. Die Funktionstauglichkeit der Chips konnte durch die Erfüllung der drei Kernfunktionen – der Erzeugung einer binär-logarithmischen Konzentrationsreihe, der Kultivierung von lebenden Zellen im mikrofluidischen Chip bei kontinuierlicher Nährmediumzufuhr sowie einer einheitlichen Flussrate an den Ausgängen – aufgrund der Resultate der unterschiedlichen Versuche und Untersuchungen gezeigt werden. Diesen Untersuchungen ging ein Auswahlverfahren der Herstellungsmethoden voraus. Außerdem wurde ein geeigneter Versuchsaufbau zur Probengewinnung pro Well entwickelt sowie geeignete Analysemethoden für die Konzentrationen gesucht, da bei Chips anderer Gruppen keine Probenentnahme vorgesehen war und hauptsächlich optische Untersuchungen durchgeführt wurden. Der Fluss im Chip wurde zusätzlich mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie visualisiert.

Aus den vorgegebenen Anforderungen wurde ein Design konzipiert, bei welchem eine binär-logarithmisch abnehmende Konzentrationsreihe im Bereich von 50 % bis 0,098 % auf passive Weise entsteht. Die einzelnen Konzentrationslösungen fließen mit der jeweils gleichen Flussrate zu je einem Zellkulturwell, das mittels optischem Mikroskop untersucht werden kann.

Aufgrund der passiven Flussregelung wird die Konzentrationsverteilung durch die definierten Flusswiderstände der Kanäle und damit durch deren Abmessungen bestimmt. Diese Parameter werden für die Leiterstruktur der Kanäle auf der Chiprückseite analytisch mittels Netzwerkanalyse berechnet und mit Hilfe von computergestützten Simulationen auf Systemebene sowie auf physikalischer Ebene überprüft. Damit kann das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Kanaldesign leicht an andere Verdünnungsreihen, wie z. B. eine lineare Konzentrationsabnahme, angepasst und mit dem verwendeten Herstellungsprozess produziert werden, ohne das übrige Chipdesign ändern zu müssen. Neben dem Flussfeld sowie der Druck- und der Konzentrationsverteilung in den Kanälen werden auch die Diffusion der Nährstoffe und die Zellverteilung in Form von Partikeln in den Wells betrachtet. Die Simulationsergebnisse zeigen, dass das

berechnete Kanaldesign für die binär-logarithmische Konzentrationsreihe und die anschließende Zellkultur in den Wells geeignet ist.

Die Materialauswahl, KOH-geätztes Silizium und Borsilikatglas, erfüllt die Anforderungen u. a. an Formstabilität und Chemikalienbeständigkeit. Das anisotrope Ätzen ermöglicht kurze Kanäle und somit einen minimalen Flächenbedarf des Chips. Alle verwendeten Materialien, auch die aufgewachsene SiO<sub>2</sub>-Schicht, sind biokompatibel und nicht toxisch. Der Gesamtprozess zur Herstellung der Prototypen besteht aus der beidseitigen Strukturierung des Siliziumwafers, der Borsilikatglas-Bearbeitung mittels elektrochemischer Funkenerosion, dem anodischen Bonden und dem Anbringen der reversiblen fluidischen Anschlüsse aus Aderendhülsen. Für den kommerziellen Einsatz und die zukünftige Massenproduktion der Chips empfiehlt sich das Spritzgussverfahren mit den Thermoplasten Topas und Zeonor. Während des Herstellungsprozesses hat sich gezeigt, dass die Maskenöffnungen für bekannte Kompensationsstrukturen der konvexen Ecken während der Siliziumstrukturierung mit KOH zu klein sind. Aus diesem Grund wurde das Silizium alternativ mit TMAH strukturiert, welches mit dem Tensid Triton-X-100 angereichert war. Weiterhin wurde eine Kompensationsstruktur aus <110>-Stegen für sich gegenüberliegende konvexe Ecken entwickelt, die beim KOH-Ätzen eine kleinere Fläche benötigt. Trotz Prozessoptimierungen bei beiden Methoden waren die Resultate für den störungsempfindlichen Fluss nicht ausreichend. Als Konsequenz wurden zwei alternative Chipdesigns mit einem Kompromiss aus Wahl der Ätztiefe, daraus resultierender Unterätzung der konvexen Ecken sowie der erzielbaren Prozesssicherheit in Bezug auf die Kanaltiefen hergestellt, untersucht und miteinander verglichen.

Für die auf die Prototypenherstellung folgenden Flusstests wurden nur mikrofluidische Chips ohne optisch erkennbare Defekte verwendet, auf deren Auswahl in Kapitel 6 eingegangen wurde. Die Ergebnisse wurden dort im Hinblick auf die unterschiedlichen Designs und SiO<sub>2</sub>-Oberflächenbeschichtungen diskutiert.

Um die Luftblasenbildung während des Befüllvorgangs zu verstehen und zu unterdrücken, wurde das Benetzungsverhalten der Kanaloberflächen (KOH-geätzte {100}- und {111}-Ebenen) mit unterschiedlichen SiO<sub>2</sub>-Beschichtungen durch statische Kontaktwinkelanalyse untersucht. Das thermisch hergestellte 90 nm dicke SiO<sub>2</sub> hat für beide Ebenen einen höheren Kontaktwinkel als das natürliche, wodurch sich der Concus-Finn-Effekt in den Kanalecken reduziert und teilweise nicht mehr auftritt. Da dies jedoch nicht ausreicht, um die Luftblasen während des Befüllens mit einer Spritzenpumpe komplett zu unterdrücken, wurde als Folge eine neue Methode in einer Unterdruckatmosphäre eines Exsikkators entwickelt, die unabhängig von beiden Beschichtungen funktioniert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Flussraten an den Ausgängen, eine der Kernfunktionen des Chips, identisch sind und dass diese im Bereich des idealen Werts liegen. Es ist kein statistischer Unterschied zwischen beiden Designs und den unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen festzustellen, Design 2 mit 90 nm dicker SiO<sub>2</sub>-Schicht erreicht jedoch die gleichmäßigsten Flussraten. Daraus kann auch geschlossen werden, dass der neu aufgebaute Messstand

des Flusstests zur Probensammlung zuverlässig funktioniert. Der Fluss bleibt über eine Zeitspanne von mindestens einer Stunde stabil und wird nicht durch Verunreinigungen verändert.

Eine weitere Kernfunktion des Chips, die Erzeugung einer binär-logarithmischen Konzentrationsreihe mit zehn Konzentrationen an den Ausgängen, wurde mittels verschiedener Analysemethoden – der HPLC-MS, dem BPA-Test, der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie sowie pH-Messungen – mit unterschiedlichen Testsubstanzen überprüft und mit verschiedenen Simulationsergebnissen verglichen. Die Messungen der HPLC-MS mit Diclofenac und Metoprolol in PBS sowie die BPA-Tests mit BSA in PBS zeigten zuverlässige Ergebnisse: Zwischen Design 1 mit natürlichem und mit 90 nm dickem SiO<sub>2</sub> kann kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Beide zeigen eine fast durchgängige stetige Konzentrationsabnahme und die Werte liegen bei jeweils einer der Messmethoden dicht an den Sollkonzentrationen. Des Weiteren kann auch für Design 2 mit 90 nm dickem SiO<sub>2</sub> ein stetiger Abfall der Konzentrationswerte für beide Messmethoden festgestellt werden.

Bei der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, die prinzipiell zur Messung des benötigten Konzentrationsbereichs geeignet ist, sind Wechselwirkungen zwischen den fluoreszierenden Partikeln und den Materialien des Chips bzw. des Testaufbaus zu erkennen, da die Partikelanzahl insgesamt sehr gering ist und mit der Zeit abnimmt. Wechselwirkungen wurden auch zwischen den Materialien des Versuchsaufbaus und Verapamil bei der HPLC-MS festgestellt, weshalb sich diese Substanz nicht zur Konzentrationsanalyse eignet. Die pH-Wert-Messungen ließen aufgrund der Auswertungsmethoden mit Indikatorstreifen bzw. Potentiometer keine Rückschlüsse auf den Fluss im Chip zu, da die Angaben zu ungenau waren.

In den Versuchen zur Kultivierung von adhärennten HeLa-Zellen mit kontinuierlicher Nährmediumzufuhr konnte durch optische Analysen mittels Fluoreszenz und Trypanblau gezeigt werden, dass sich die Zellen teilweise am Boden absetzen und mindestens 24 h im Chip überleben.

## 7.2 Ausblick

Bisher wurden mehrere Prototypen unterschiedlicher Designs und mit verschiedenen SiO<sub>2</sub>-Oberflächenbeschichtungen hergestellt und analysiert. Für einen kommerziellen Einsatz des Chips sind jedoch weitere Schritte nötig.

Bei den Konzentrationsanalysen liegen die Probenmengen zur Berechnung der Mittelwerte bei den HPLC-MS-Messungen und den BPA-Tests zwischen zwei und sechs. Zur Bestätigung der in der vorliegenden Arbeit getroffenen Aussagen sollten weitere Proben vermessen werden. Bei der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie sind Partikelversuche nötig, um Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Materialien und den Partikeln auszuschließen und die Konzentrationen mit dieser Methode zuverlässig messen zu können. Da der Chip für die Langzeitanwendung geeignet sein soll, werden Aussagen zur Langzeitstabilität und zur Zuverlässigkeit

des Chips benötigt, die bisher nicht untersucht wurden. Dazu müssten Tests zum Volumenfluss, der Konzentrationsverteilung und der Zellkultur über mehrere Tage durchgeführt werden. Zusätzlich ist ein Vergleich der bisherigen Ergebnisse mit den Ergebnissen bei um zwei Größenordnungen kleineren Flussraten wünschenswert, da die Zelltests wegen Minimierung des Scherstressess langsamer durchgeführt werden.

Die Zellkultur wurde bereits in einigen Versuchen optimiert, ist aber noch nicht zufriedenstellend. Um eine nahezu konfluente Zellschicht zu erhalten, könnten noch einige Punkte verbessert werden, wie zum Beispiel die Zell-Anfangsdichte, die Einfließgeschwindigkeit der Zellen sowie die des Nährmediums. Auch der Einfluss des CO<sub>2</sub>-Gehalts des Mediums auf die Zellen sollte ermittelt werden. Um zu zeigen, dass der Chip sowohl mit adhärenenten als auch mit nicht-adhärenenten Zellen verwendet werden kann, sollte die Zellkultur mit nicht-adhärenenten Hefezellen des Typs *S. pombe* durchgeführt werden. Für die unterschiedlichen Zellen sollten Zellkulturprotokolle für standardisierte Testabläufe angefertigt werden. Nächste Schritte wären Toxizitätstests im Chip, welche die Durchführbarkeit auf dem Chip ermitteln und eventuelle Optimierungsmöglichkeiten am Design aufzeigen sollen.

Nach Abschluss dieser Arbeiten kann das Design mittels Spritzgussverfahren für die Massenproduktion hergestellt werden. Die Flussverhältnisse im Chip sollten sich aufgrund der gleichbleibenden fluidischen Widerstände bei dem dann verwendeten Material nicht ändern. Dies sollte dennoch überprüft werden. Danach müssen die Zellkulturprotokolle entsprechend dem für den kommerziellen Einsatz verwendeten Chipmaterial (Thermoplast) angepasst werden. Für eine einfachere Bedienbarkeit während der Testdurchführung wäre die Entwicklung einer Anschlussplattform für fachfremde Anwender hilfreich, in die der Chip eingelegt werden kann und dadurch fluidisch mit Pumpen sowie mit integrierten Probenbehältern in einer gekühlten Feuchtkammer verbunden wird. Damit würde sich die Probenahme und auch der Vorgang des Sterilisierens vor der Zellkultur zum Vermeiden von Kontaminationen einfacher gestalten. Zusätzlich könnte eine Temperaturkontrolle sowie ein Vorwärmen des Zellmediums integriert werden, wodurch der Chip ohne Brutschrank verwendet werden könnte. Eventuell könnte der Chip auch an eine bereits bestehende Plattform angepasst werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] H. SEIDEL, L. CSEPREGI, A. HEUBERGER und H. BAUMGAERTEL: Anisotropic etching of crystalline silicon in alkaline solutions. I. Orientation dependence and behavior of passivation layers. In: *Journal of the Electrochemical Society* 137 (1990), Nr. 11, S. 3612–3626.
- [2] M. L. KOVARIK, P. C. GACH, D. M. ORNOFF, Y. WANG, J. BALOWSKI, L. FARRAG und N. L. ALLBRITTON: Micro total analysis systems for cell biology and biochemical assays. In: *Analytical Chemistry* 84 (2012), Nr. 2, S. 516–540; DOI 10.1021/ac202611x.
- [3] E. K. SACKMANN, A. L. FULTON und D. J. BEEBE: The present and future role of microfluidics in biomedical research. In: *Nature* 507 (2014), Nr. 7491, S. 181–189; DOI 10.1038/nature13118.
- [4] A. MANZ, N. GRABER und H. M. WIDMER: Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. In: *Sensors and Actuators: B. Chemical* 1 (1990), Nr. 1-6, S. 244–248.
- [5] D. R. REYES, D. IOSSIFIDIS, P. A. AUROUX und A. MANZ: Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Nr. 12, S. 2623–2636.
- [6] A. CARREL: Pure Cultures of Cells. In: *The Journal of Experimental Medicine* 16 (1912), Nr. 2, S. 165–168; DOI 10.1084/jem.16.2.165.
- [7] M. MEHLING und S. TAY: Microfluidic cell culture. In: *Current Opinion in Biotechnology* 25 (2014), S. 95–102.
- [8] M.-H. WU, S.-B. HUANG und G.-B. LEE: Microfluidic cell culture systems for drug research. In: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 10 (2010), Nr. 8, S. 939–956.
- [9] S. HALLDORSSON, E. LUCUMI, R. GÓMEZ-SJÖBERG und R. M. T. FLEMING: Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. In: *Biosensors and Bioelectronics* 63 (2015), S. 218–231.
- [10] M. TEHRANIROKH, A. Z. KOUZANI, P. S. FRANCIS und J. R. KANWAR: Microfluidic devices for cell cultivation and proliferation. In: *Biomicrofluidics* 7 (2013), Nr. 5; DOI 10.1063/1.4826935.

- [11] E. BERTHIER und D. J. BEEBE: Gradient generation platforms: New directions for an established microfluidic technology. In: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 14 (2014), Nr. 17, S. 3241–3247; DOI 10.1039/c4lc00448e.
- [12] F. PAMMOLLI, L. MAGAZZINI und M. RICCABONI: The productivity crisis in pharmaceutical R&D. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 10 (2011), Nr. 6, S. 428–438; DOI 10.1038/nrd3405.
- [13] P. A. AUROUX, D. IOSSIFIDIS, D. R. REYES und A. MANZ: Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Nr. 12, S. 2637–2652.
- [14] P. NEUŽIL, S. GISELBRECHT, K. LÄNGE, T. J. HUANG und A. MANZ: Revisiting lab-on-a-chip technology for drug discovery. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 11 (2012), Nr. 8, S. 620–632.
- [15] I. MEYVANTSSON, E. VU, C. LAMERS, D. ECHEVERRIA, T. WORZELLA, V. ECHEVERRIA, A. SKOIEN und S. HAYES: Image-based analysis of primary human neutrophil chemotaxis in an automated direct-viewing assay. In: *Journal of Immunological Methods* 374 (2011), Nr. 1-2, S. 70–77; DOI 10.1016/j.jim.2010.12.017.
- [16] R. ZANTL und E. HORN: Chemotaxis of Slow Migrating Mammalian Cells Analysed by Video Microscopy. In: C. M. WELLS (Hrsg.), M. PARSONS (Hrsg.): *Cell Migration / Cell migration* Bd. 769. New York: Humana Press, 2011. – ISBN 9781617792069, S. 191–203.
- [17] G. M. WHITESIDES: Cool, or simple and cheap? Why not both? In: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 13 (2013), Nr. 1, S. 11–13; DOI 10.1039/c2lc90109a.
- [18] G. M. WHITESIDES: The lab finally comes to the chip! In: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 14 (2014), Nr. 17, S. 3125–3126; DOI 10.1039/c4lc90072c.
- [19] F. GREVE, L. SEEMANN und A. HIERLEMANN, J. LICHTENBERG: A hybrid microsystem for parallel perfusion experiments on living cells. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17 (2007), Nr. 8, S. 1721–1730.
- [20] C. KIM, K. LEE, J. H. KIM, K. S. SHIN, K.-J. LEE, T. S. KIM und J. Y. KANG: A serial dilution microfluidic device using a ladder network generating logarithmic or linear concentrations. In: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 8 (2008), Nr. 3, S. 473–479.
- [21] K. HATTORI, S. SUGIURA und T. KANAMORI: Generation of arbitrary monotonic concentration profiles by a serial dilution microfluidic network

- composed of microchannels with a high fluidic-resistance ratio. In: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 9 (2009), Nr. 12, S. 1763–1772.
- [22] S. K. W. DERTINGER, D. T. CHIU, N. L. JEON und G. M. WHITESIDES: Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks. In: *Analytical Chemistry* 73 (2001), Nr. 6, S. 1240–1246.
- [23] H. ZOU, W. YUE, W.-K. YU, D. LIU, C.-C. FONG, J. ZHAO und M. YANG: Microfluidic Platform for Studying Chemotaxis of Adhesive Cells Revealed a Gradient-Dependent Migration and Acceleration of Cancer Stem Cells. In: *Analytical Chemistry* 87 (2015), Nr. 14, S. 7098–7108; DOI 10.1021/acs.analchem.5b00873.
- [24] C.-W. CHANG, Y.-J. CHENG, M. TU, Y.-H. CHEN, C.-C. PENG, W.-H. LIAO und Y.-C. TUNG: A polydimethylsiloxane-polycarbonate hybrid microfluidic device capable of generating perpendicular chemical and oxygen gradients for cell culture studies. In: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 14 (2014), Nr. 19, S. 3762–3772; DOI 10.1039/c4lc00732h.
- [25] W. DAI, Y. ZHENG, K. Q. LUO und H. WU: A prototypic microfluidic platform generating stepwise concentration gradients for real-time study of cell apoptosis. In: *Biomicrofluidics* 4 (2010), Nr. 2.
- [26] J. RUAN, L. WANG, M. XU, D. CUI, X. ZHOU und D. LIU: Fabrication of a microfluidic chip containing dam, weirs and gradient generator for studying cellular response to chemical modulation. In: *Materials Science and Engineering C* 29 (2009), Nr. 3, S. 674–679.
- [27] H. SOMAWEERA, S. O. HAPUTHANTHRI, A. IBRAGUIMOV und D. PAPPAS: On-chip gradient generation in 256 microfluidic cell cultures: simulation and experimental validation. In: *Analyst* 140 (2015), Nr. 15, S. 5029–5038; DOI 10.1039/C5AN00481K.
- [28] Y.-C. TOH, T. C. LIM, D. TAI, G. XIAO, D. VAN NOORT und H. YU: A microfluidic 3D hepatocyte chip for drug toxicity testing. In: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 9 (2009), Nr. 14, S. 2026–2035; DOI 10.1039/b900912d.
- [29] G. M. WALKER, N. MONTEIRO-RIVIERE, J. ROUSE und A. T. O'NEILL: A linear dilution microfluidic device for cytotoxicity assays. In: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 7 (2007), Nr. 2, S. 226–232.
- [30] B.-Y. XU, S.-W. HU, G.-S. QIAN, J.-J. XU und H.-Y. CHEN: A novel microfluidic platform with stable concentration gradient for on chip cell culture

- and screening assays. In: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 13 (2013), Nr. 18, S. 3714–3720; DOI 10.1039/c3lc50676b.
- [31] G. ZHENG, Y. WANG, Z. WANG, W. ZHONG, H. WANG und Y. LI: An integrated microfluidic device in marine microalgae culture for toxicity screening application. In: *Marine Pollution Bulletin* 72 (2013), Nr. 1, S. 231–243; DOI 10.1016/j.marpolbul.2013.03.035.
- [32] T. BAIER, K. S. DRESE, F. SCHÖNDFELD und U. SCHWAB: A  $\mu$ -fluidic mixing network. In: *Chemical Engineering and Technology* 28 (2005), Nr. 3, S. 362–366.
- [33] J. G. KORVINK und O. PAUL: *MEMS: A Practical Guide to Design, Analysis, and Applications*. Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. – ISBN 3540211179.
- [34] J. BERTHIER und P. SILBERZAN: *Microfluidics for biotechnology*. Auflage 2. Boston: Artech House, 2010. – ISBN 1596934433.
- [35] M. J. MADOU: *Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology*. Bd. 1: *Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Volume I*. Auflage 3. Boca Raton (Fla.) and London and New York: CRC Press, 2012. – ISBN 9781420055115.
- [36] J. P. BRODY, P. YAGER, R. E. GOLDSTEIN und R. H. AUSTIN: Biotechnology at low Reynolds numbers. In: *Biophysical Journal* 71 (1996), Nr. 6, S. 3430–3441.
- [37] P. S. DITTRICH und A. MANZ: Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (2006), Nr. 3, S. 210–218.
- [38] N.-T. NGUYEN: *Mikrofluidik: Entwurf, Herstellung und Charakterisierung*. Auflage 1. Stuttgart: Teubner, 2004. – ISBN 3519004666.
- [39] H. BRUUS: *Theoretical microfluidics*. Oxford: Oxford Univ. Press, 2008. – ISBN 9780199235087.
- [40] Y. NAKAYAMA und R. F. BOUCHER: *Introduction to fluid mechanics*. London: Butterworth-Heinemann, 2000. – ISBN 0340676493.
- [41] C. POZRIKIDIS: *Fluid dynamics: Theory, computation, and numerical simulation*. Boston and Mass: Kluwer Academic Publ, 2001. – ISBN 0792373510.
- [42] B. S. MASSEY und A. J. WARD-SMITH: *Mechanics of fluids*. Auflage 8. London: Taylor & Francis, 2006. – ISBN 0415362067.

- [43] J. SPURK und N. AKSEL: *Strömungslehre: Einführung in die Theorie der Strömungen*. Auflage 7. Dordrecht: Springer, 2007 (Springer-Lehrbuch). – ISBN 3540384391.
- [44] D. VAN NOORT und J. S. MCCASKILL: Flows in micro fluidic networks: From theory to experiment. In: *Natural Computing* 3 (2004), Nr. 4, S. 395–410.
- [45] E. LAURIEN und H. OERTEL: *Numerische Strömungsmechanik*. Auflage 4. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag / Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH Wiesbaden, 2011. – ISBN 9783834815033.
- [46] S. SALITERMAN: *Press monograph series*. Bd. 153: *Fundamentals of bioMEMS and medical microdevices*. Bellingham and Washington: Wiley-Interscience and SPIE Press, 2006. – ISBN 0819459771.
- [47] D. J. BEEBE, G. A. MENSING und G. M. WALKER: Physics and applications of microfluidics in biology. In: *Annual Review of Biomedical Engineering* 4 (2002), S. 261–286.
- [48] P. TABELING und S. CHEN: *Introduction to microfluidics*. Oxford: Oxford Univ. Press, 2005. – ISBN 0198568649.
- [49] J. BERTHIER und K. A. BRAKKE: *The physics of microdroplets*. Beverly and Mass and Hoboken and NJ: Scrivener and Wiley, 2012. – ISBN 9780470938805.
- [50] G. KARNIADAKIS, N. ALURU, S. S. ANTMAN, A. BESKOK, J. E. MARSDEN und L. SIROVICH: *Springer-11649 /Dig. Serial*. Bd. 29: *Microflows and Nanoflows: Fundamentals and Simulation*. New York and NY: Springer Science+Business Media Inc, 2005. – ISBN 9780387221977.
- [51] R. WILLIAMS und A. M. GOODMAN: Wetting of thin layers of SiO<sub>2</sub> by water. In: *Applied Physics Letters* 25 (1974), Nr. 10, S. 531–532; DOI 10.1063/1.1655297.
- [52] R. R. THOMAS, F. B. KAUFMAN, J. T. KIRLEIS und R. A. BELSKY: Wettability of polished silicon oxide surfaces. In: *Journal of the Electrochemical Society* 143 (1996), Nr. 2, S. 643–648.
- [53] H. YANAZAWA, T. MATSUZAWA und N. HASHIMOTO: Evaluation of hydrophobic SiO<sub>2</sub> surfaces prepared by fluorinated organosilane treatments. In: *Journal of Adhesion Science and Technology* 4 (1990), Nr. 1, S. 145–153; DOI 10.1163/156856190X00162.
- [54] J. BERTHIER: *Microdrops and digital microfluidics*. Norwich and NY: William Andrew Pub, 2008 (Micro & nano technologies). – ISBN 9780815515449.

- [55] H. M. SCHAEDEL: *Fluidische Bauelemente und Netzwerke*. Braunschweig and Wiesbaden: Vieweg, 1979. – ISBN 3528084235.
- [56] H. J. TAFEL und H. SCHAEDEL: Analogien zwischen elektrischen und fluidischen Bauelementen und Netzwerken. In: *Frequenz* 23 (1969), Nr. 3; DOI 10.1515/FREQ.1969.23.3.68. – ISSN 21916349.
- [57] M. RICHTER, P. WOIAS und D. WEISS: Microchannels for applications in liquid dosing and flow-rate measurement. In: *Sensors and Actuators, A: Physical* 62 (1997), Nr. 1-3, S. 480–483.
- [58] W. URBANEK, J. N. ZEMEL und H. H. BAU: An investigation of the temperature dependence of Poiseuille numbers in microchannel flow. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 3 (1993), Nr. 4, S. 206.
- [59] W. MENZ und J. MOHR: *Mikrosystemtechnik für Ingenieure*. Auflage 2. Weinheim: VCH, 1997. – ISBN 3527294058.
- [60] V. LINDROOS, M. TILLI, A. LETHO und T. MOTOOKA: *Handbook of silicon based MEMS materials and technologies*. Auflage 1. Oxford: Elsevier, 2010. – ISBN 9780815515944.
- [61] U. HILLERINGMANN: *Mikrosystemtechnik*. Wiesbaden: B.G. Teubner Verlag / GWV Fachverlage GmbH Wiesbaden, 2006; DOI 10.1007/978-3-8351-9022-1. – ISBN 3835100033.
- [62] S. GLOBISCH (Hrsg.): *Lehrbuch Mikrotechnologie für Ausbildung, Studium und Weiterbildung*. München: Fachbuchverlag Leipzig im Carl-Hanser-Verlag, 2011. – ISBN 9783446425606.
- [63] M. J. MADOU: *Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology*. Bd. 2: *Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Volume II*. Auflage 3. Boca Raton and FL: CRC Press, 2012. – ISBN 9781420055191.
- [64] MICROCHEMICALS: *Ätzen von Silizium*. <http://t1p.de/pry4>; Version: 2013, überprüft am 13.01.2016.
- [65] M. SHIKIDA, K. SATO, K. TOKORO und D. UCHIKAWA: Differences in anisotropic etching properties of KOH and TMAH solutions. In: *Sensors and Actuators, A: Physical* 80 (2000), Nr. 2, S. 179–188; DOI 10.1016/S0924-4247(99)00264-2.
- [66] P. PAL, K. SATO, M. A. GOSALVEZ, Y. KIMURA, K.-I. ISHIBASHI, M. NIWANO, H. HIDA, B. TANG und S. ITOH: Surfactant adsorption on single-crystal silicon surfaces in TMAH solution: Orientation-dependent adsorption detected by in situ infrared spectroscopy. In: *Journal of Microelectromechanical Systems* 18 (2009), Nr. 6, S. 1345–1356.

- [67] P. PAL, S. HALDAR, S. S. SINGH, A. ASHOK, X. YAN und K. SATO: A detailed investigation and explanation of the appearance of different undercut profiles in KOH and TMAH. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 24 (2014), Nr. 9, S. 095026; DOI 10.1088/0960-1317/24/9/095026
- [68] G. K. MAYER, H. L. OFFEREINS, H. SANDMAIER und K. KEHL: Fabrication of non-underetched convex corners in anisotropic etching of (100)-silicon in aqueous KOH with respect to novel micromechanic elements. In: *Journal of the Electrochemical Society* 137 (1990), Nr. 12, S. 3947–3951.
- [69] W. T. C. CHIEN, C. O. CHANG, Y. C. LO, Z. W. LI und C. S. CHOU: On the miller-indices determination of Si{100} convex corner undercut planes. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 15 (2005), Nr. 4, S. 833–842.
- [70] P. PAL, K. SATO und S. CHANDRA: Fabrication techniques of convex corners in a (100)-silicon wafer using bulk micromachining: A review. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17 (2007), Nr. 10.
- [71] C. JIA, W. DONG, C. LIU, X. ZHANG, J. ZHOU, Z. ZHONG, H. XUE, H. ZANG, B. XU und W. CHEN: Convex corners undercutting and rhombus compensation in KOH with and without IPA solution on (1 1 0) silicon. In: *Microelectronics Journal* 37 (2006), Nr. 11, S. 1297–1301.
- [72] W. FAN und D. ZHANG: A simple approach to convex corner compensation in anisotropic KOH etching on a (100) silicon wafer. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16 (2006), Nr. 10, S. 1951–1957.
- [73] M. M. SMILJANIĆ, V. JOVIĆ und Ž. LAZIĆ: Maskless convex corner compensation technique on a (100) silicon substrate in a 25wt% TMAH water solution. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 22 (2012), Nr. 11.
- [74] P. PAL und K. SATO: Complex three-dimensional structures in Si{1 0 0} using wet bulk micromachining. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 19 (2009), Nr. 10.
- [75] O. TABATA, R. ASAHI, H. FUNABASHI, K. SHIMAOKA und S. SUGIYAMA: Anisotropic etching of silicon in TMAH solutions. In: *Sensors and Actuators: A. Physical* 34 (1992), Nr. 1, S. 51–57.
- [76] P. PAL und K. SATO: Fabrication methods based on wet etching process for the realization of silicon MEMS structures with new shapes. In: *Microsystem Technologies* 16 (2010), Nr. 7, S. 1165–1174.

- [77] M. A. GOSÁLVEZ, P. PAL, B. TANG und K. SATO: Atomistic mechanism for the macroscopic effects induced by small additions of surfactants to alkaline etching solutions. In: *Sensors and Actuators, A: Physical* 157 (2010), Nr. 1, S. 91–95.
- [78] P. PAL, K. SATO, M. SHIKIDA und M. A. GOSÁLVEZ: Study of corner compensating structures and fabrication of various shapes of MEMS structures in pure and surfactant added TMAH. In: *Sensors and Actuators, A: Physical* 154 (2009), Nr. 2, S. 192–203.
- [79] M. A. GOSÁLVEZ, B. TANG, P. PAL, K. SATO, Y. KIMURA und K. ISHIBASHI: Orientation- and concentration-dependent surfactant adsorption on silicon in aqueous alkaline solutions: Explaining the changes in the etch rate, roughness and undercutting for MEMS applications. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 19 (2009), Nr. 12.
- [80] M. WICK: *Untersuchung des KOH-Ätzprozesses von konvexen Ecken in (100) Silizium*. Universität des Saarlandes, Fakultät VII – Lehrstuhl für Mikromechanik, Seminararbeit – Saarbrücken, 2011.
- [81] M. BAO, C. BURRER, J. ESTEVE, J. BAUSELLS und S. MARCO: Etching front control of <110 > strips for corner compensation. In: *Sensors and Actuators: A. Physical* 37-38 (1993), Nr. C, S. 727–732.
- [82] M. J. MADOU: *Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology*. Bd. 3: *Fundamentals of microfabrication and nanotechnology: Volume III*. Auflage 3. Boca Raton and FL: CRC Press, 2012. – ISBN 9781420055160.
- [83] H. KREHER, I. N. DAHMKE, H. SEIDEL und D. FEILI: A continuous flow microfluidic chip with integrated concentration gradient generator for cell culturing. In: *Transducers – 18th International Conference, Anchorage*, (2015), S. 1810–1813; DOI 10.1109/TRANSDUCERS.2015.7181299
- [84] G. M. WHITESIDES: The origins and the future of microfluidics. In: *Nature* 442 (2006), Nr. 7101, S. 368–373.
- [85] J.-B. NOBS und S. J. MAERKL: Long-term single cell analysis of *S. pombe* on a microfluidic microchemostat array. In: *PLOS ONE* 9 (2014), Nr. 4; DOI 10.1371/journal.pone.0093466.
- [86] Y. XIA und G. M. WHITESIDES: Soft lithography. In: *Annual Review of Materials Science* 28 (1998), Nr. 1, S. 153–184.
- [87] J. N. LEE, C. PARK und G. M. WHITESIDES: Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. In: *Analytical Chemistry* 75 (2003), Nr. 23, S. 6544–6554; DOI 10.1021/ac0346712.

- [88] A. R. ABATE, D. LEE, T. DO, C. HOLTZE und D. A. WEITZ: Glass coating for PDMS microfluidic channels by sol-gel methods. In: *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology* 8 (2008), Nr. 4, S. 516–518.
- [89] G. KOTZAR, M. FREAS, P. ABEL, A. FLEISCHMAN, S. ROY, C. ZORMAN, J. M. MORAN und J. MELZAK: Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices. In: *Biomaterials* 23 (2002), Nr. 13, S. 2737–2750.
- [90] D. FEILI, C. KIRSCH, H. KREHER, M. HEIN und H. SEIDEL: Silicon based CMOS compatible lab on chip system - cytotoxicity and design considerations. In: *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* 55 (2010), Nr. s1; DOI 10.1515/bmt.2010.711.
- [91] G. VOSKERICIAN, M. S. SHIVE, R. S. SHAWGO, H. VON RECUM, J. M. ANDERSON, M. J. CIMA und R. LANGER: Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices. In: *Biomaterials* 24 (2003), Nr. 11, S. 1959–1967.
- [92] H. KREHER, L. KIREENKO, D. FEILI und H. SEIDEL: Theoretische Analyse und Simulation eines Zellkultur-Arrays mit integrierter Konzentrationsreihe für Drug Discovery-Anwendungen. In: *Mikrosystemtechnik-Kongress, Darmstadt*, (2011), S. 910–913, P 10.11. – ISBN 9783800733675.
- [93] H. KREHER, D. FEILI und H. SEIDEL: Theoretical analysis of a binary logarithmic concentration gradient generator. In: *Bubble Tech to Bio App, 2nd Korea – EU Workshop on Microfluidic Technology for Chemical, Biological and Medical Applications, Saarbrücken*, (2011).
- [94] COVENTOR, INC: *CoventorWare 2012 Manual: MEMS Design and Analysis in ARCHITECT: Tutorials*. 2012.
- [95] O. FREDERICH: *Numerische Simulation und Analyse turbulenter Strömungen am Beispiel der Umströmung eines Zylinderstumpfes mit Endscheibe*. TU Berlin, Fakultät V – Verkehrs- und Maschinensysteme, Dissertation – Berlin, 2010. – ISBN 9783798322424.
- [96] O. GESCHKE; H. KLANK und P. TELLEMAN: *Microsystem engineering of lab-on-a-chip devices*. Auflage 2. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. – ISBN 9783527319428.
- [97] E. UNGER: Die Erzeugung dünner Schichten. Das PECVD-Verfahren: Gasphasenabscheidung in einem Plasma. In: *Chemie in unserer Zeit* 25 (1991), Nr. 3, S. 148–158; DOI 10.1002/ciuz.19910250306. – ISSN 15213781.
- [98] G. WALLIS und D. I. POMERANTZ: Field assisted glass-metal sealing. In: *Journal of Applied Physics* 40 (1969), Nr. 10, S. 3946–3949.

- [99] A. ARORA, LAB ON A CHIP - CHIPS AND TIPS (Hrsg.): *Rapid, inexpensive and stress free drilling in glass substrates or thermally bonded glass chips using electrochemical spark erosion method*. <http://t1p.de/he6r>; 2011, überprüft am 13.01.2016.
- [100] C. T. YANG, S. S. HO und B. H. YAN: Micro hole machining of borosilicate glass through electrochemical discharge machining (ECDM). In: *Key Engineering Materials* 196 (2001), S. 149–166.
- [101] D.-J. KIM, Y. AHN, S.-H. LEE und Y. K. KIM: Voltage pulse frequency and duty ratio effects in an electrochemical discharge microdrilling process of Pyrex glass. In: *International Journal of Machine Tools and Manufacture* 46 (2006), Nr. 10, 1064–1067; DOI 10.1016/j.ijmactools.2005.08.011. – ISSN 08906955.
- [102] H. H. KELLOGG: Anode Effect in Aqueous Electrolysis. In: *Journal of the Electrochemical Society* 97 (1950), Nr. 4, S. 133–142; DOI 10.1149/1.2777980.
- [103] E. S. LEE, D. HOWARD, E. LIANG, S. D. COLLINS und R. L. SMITH: Removable tubing interconnects for glass-based micro-fluidic systems made using ECDM. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 14 (2004), Nr. 4, S. 535–541.
- [104] B. JIANG, S. LAN, J. NI und Z. ZHANG: Experimental investigation of spark generation in electrochemical discharge machining of non-conducting materials. In: *Journal of Materials Processing Technology* 214 (2014), Nr. 4, S. 892–898.
- [105] SCHOTT TECHNICAL GLASS SOLUTIONS GMBH (Hrsg.): *BORO-FLOAT 33: Broschüre*. <http://t1p.de/pmdb>; 2014, überprüft am 13.01.2016.
- [106] MICROFLUIDIC CHIPSHOP (Hrsg.): *Lab-on-a-Chip Catalogue*. Bd. 3. 2014
- [107] TOPAS ADVANCED POLYMERS GMBH: *Topas Cyclic Olefin Copolymer-Datenblatt: Materialeigenschaften*. <http://t1p.de/vf6k>; 2011, überprüft am 13.01.2016.
- [108] ZEON EUROPE GMBH: *ZEONOR® Cyclo Olefin Polymer-Datenblatt: Materialeigenschaften*. <http://t1p.de/1b99>; 2014, überprüft am 13.01.2016.
- [109] J. MONAHAN, A. A. GEWIRTH und R. G. NUZZO: A method for filling complex polymeric microfluidic devices and arrays. In: *Analytical Chemistry* 73 (2001), Nr. 13, S. 3193–3197; DOI 10.1021/ac001426z.
- [110] KRÜSS GMBH: *Tropfenkonturanalyse*. <http://t1p.de/v6br>; Version: 2015, überprüft am 13.01.2016.

- [111] KRÜSS GMBH: *Pendant drop*. <http://t1p.de/lfqq>; Version: 2015, überprüft am 13.01.2016.
- [112] J. O. BECKER und A. N. HOOFNAGLE: Replacing immunoassays with tryptic digestion-peptide immunoaffinity enrichment and LC-MS/MS. In: *Bioanalysis* 4 (2012), Nr. 3, S. 281–290; DOI 10.4155/bio.11.319.
- [113] M. SCIGELOVA und A. MAKAROV: Orbitrap mass analyzer - Overview and applications in proteomics. In: *Proteomics* 1 (2006), Nr. 1-2 SUPPL, S. 16–21; DOI 10.1002/pmic.200600528.
- [114] THERMO SCIENTIFIC: *Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer*. <http://t1p.de/lr4r>; Version: 06.2015, überprüft am 13.01.2016.
- [115] J. H. GROSS: *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*. Berlin and Heidelberg: Springer, 2013. – ISBN 9783827429810.
- [116] M. M. BRADFORD: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), Nr. 1–2, S. 248–254; DOI 10.1016/0003–2697(76)90527–3. – ISSN 00032697.
- [117] POLYSCIENCES: *Fluoresbrite Microparticles: Mikropartikel rot PC red und grün YG*. <http://t1p.de/qgur>; Version: 2013, überprüft am 13.01.2016.
- [118] TU GRAZ: *FITC: fluorescein-5-isothiocyanate-protein conjugate*. <http://t1p.de/625u>; Version: 2015, überprüft am 13.01.2016.
- [119] K. ZWERENZ: *Statistik verstehen mit Excel: Interaktiv lernen und anwenden*. Auflage 2. München: Oldenbourg, 2008. – ISBN 9783486585919.
- [120] J. WESTERMANN, H. NIENHAUS und W. MÖNCH: Oxidation stages of clean and H-terminated Si(001) surfaces at room temperature. In: *Surface Science* 311 (1994), Nr. 1-2, S. 101–106; DOI 10.1016/0039–6028(94)90482–0.
- [121] T. M. BALGAR: *Laserstrukturierung von Alkylsiloxanmonoschichten auf Siliziumsubstraten im Submikrometerbereich*. Univ. Duisburg-Essen, Fachbereich Chemie, Dissertation – Essen, 2005.
- [122] E. A. WOVCHKO, J. C. CAMP, J. A. GLASS und J. T. YATES: Active sites on SiO<sub>2</sub>. Role in CH<sub>3</sub>OH decomposition. In: *Langmuir* 11 (1995), Nr. 7, S. 2592–2599.
- [123] E. D. PALIK, O. J. GLEMOCKI, I. J. HEARD, P. S. BURNO und L. TENERZ: Etching roughness for (100) silicon surfaces in aqueous KOH. In: *Journal of Applied Physics* 70 (1991), Nr. 6, S. 3291–3300; DOI 10.1063/1.349263.

- [124] K. J. KUBIAK, M. C. T. WILSON, T. G. MATHIA und P. CARVAL: Wettability versus roughness of engineering surfaces. In: *Wear* 271 (2011), Nr. 3-4, S. 523–528; DOI 10.1016/j.wear.2010.03.029.
- [125] R. K. SHAH und A. L. LONDON: *Laminar flow forced convection in ducts: A Source Book for Compact Heat Exchanger Analytical Data*. New York: Academic Press, 1978. – ISBN 0120200511.

# Eigene Publikationen

- [EP 1]/[83] H. KREHER, I. N. DAHMKE, H. SEIDEL und D. FEILI: A continuous flow microfluidic chip with integrated concentration gradient generator for cell culturing. Konferenzbeitrag in: *Transducers – 18th International Conference, Anchorage*, (2015), S. 1810–1813; DOI 10.1109/TRANSDUCERS.2015.7181299.
- [EP 2]/[92] H. KREHER, L. KIREENKO, D. FEILI und H. SEIDEL: Theoretische Analyse und Simulation eines Zellkultur-Arrays mit integrierter Konzentrationsreihe für Drug Discovery-Anwendungen. Konferenzbeitrag in: *Mikrosystemtechnik-Kongress, Darmstadt*, (2011), S. 910–913, P 10.11. – ISBN 9783800733675.
- [EP 3]/[93] H. KREHER, D. FEILI und H. SEIDEL: Theoretical analysis of a binary logarithmic concentration gradient generator. Poster bei: *Bubble Tech to Bio App, 2nd Korea – EU Workshop on Microfluidic Technology for Chemical, Biological and Medical Applications, Saarbrücken*, (2011).
- [EP 4]/[90] D. FEILI, C. KIRSCH, H. KREHER, M. HEIN und H. SEIDEL: Silicon based CMOS compatible lab on chip system cytotoxicity and design considerations. Konferenzbeitrag in: *BMT, Rostock*, (2010); DOI 10.1515/BMT.2010.638.
- [EP 5] H. KREHER: Microfluidic Systems for Cells. Vortrag bei: *Deutsch-Chinesische Sommerschule, Peking*, (2010).
- [EP 6] A. ABABNEH, H. KREHER und U. SCHMID: Etching behaviour of sputter-deposited aluminium nitride thin films in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and KOH solutions. In: *Microsystem Technologies*, 14 (2008), Nr. 4–5, S. 567–573; DOI 10.1007/s00542-007-0450-x.
- [EP 7] A. ABABNEH, H. KREHER, H. SEIDEL und U. SCHMID: The influence of varying sputter deposition conditions on the wet chemical etch rate of AlN thin films. In: *Proc. SPIE-Konferenz „Microtechnologies for the New Millenium“*, Gran Canaria, 6589 (2007), S. 65890U.
- [EP 8] H. KREHER: Toxizität von CNTs auf Caco-2-Zellen. Vortrag bei: *Mitgliederversammlung NanoBioNet, Saarbrücken*, (2007).

- [EP 9] H. KREHER, C. LEHR und M. SCHNEIDER: In vitro toxicology with carbon nanotubes on intestinal columnar epithelium. Poster bei: *Kongress Nano2Life, Annual Meeting, Saarbrücken, (2007)*.
- [EP 10] H. KREHER, C. LEHR und M. SCHNEIDER: Toxicologic impact of carbon nanotubes on Caco-2 cells. Poster bei: *Jahrestreffen DPG, Regensburg; Verhandl. DPG (VI) 42, (2007), BP 16.25. – ISSN 0420-0195.*

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Anzahl der Publikationen pro Jahr bei Scopus am 10.12.2015. . . . .	3
2.1	Laminare Couette-Strömung einer inkompressiblen viskosen Flüssigkeit zwischen zwei Platten. . . . .	7
2.2	Vermischung zweier Flüssigkeiten bei laminarem Fluss durch Diffusion.	10
2.3	Schematische Darstellung von Molekülen an der Grenzfläche Wasser / Luft (in Anlehnung an [39, 49]). . . . .	12
2.4	Wasser benetzt Silizium unter Bildung des Kontaktwinkels $\theta$ . . . . .	12
2.5	Wasseroberfläche in einem Mikro-Becherglas (bearbeitet aus [49]). . . . .	13
2.6	Die von Brakke erweiterte Concus-Finn-Bedingung [54]. . . . .	14
2.7	Fluidisches Netzwerk analog zum elektrischen. . . . .	14
2.8	Diamantgitterstruktur des Si-Kristalls mit den drei wichtigsten Si-Kristall-Ebenen: $\{100\}$ , $\{110\}$ , $\{111\}$ . Bindungen der Si-Atome an der Oberfläche einer $\{100\}$ -Ebene. Alle Abbildungen entnommen aus [59].	16
2.9	Ätzzraten der unterschiedlichen Ebenen eines $\{100\}$ -Wafers in 50%iger KOH bei 78°C [1]. . . . .	17
2.10	Strukturen nach anisotropem Ätzen eines (100)-Wafers. . . . .	18
2.11	Schematische Darstellung der beteiligten Ebenen und Winkel bei der Unterätzung konvexer Ecken mit TMAH und KOH [67]. . . . .	20
2.12	KOH-geätzte Struktur. Vergleich einer kompensierten mit einer nicht kompensierten Ecke (in Anlehnung an [80]). . . . .	21
2.13	Schematische Darstellung der Ätzfronten bei häufig verwendeten Kompensationsstrukturen [78]. . . . .	22
2.14	Zusammenstellung verschiedener Kompensationsstrukturen [70]. . . . .	22
2.15	$\langle 100 \rangle$ -Steg als Kompensationsstrukturen: einfacher symmetrischer Steg [70], asymmetrischer Steg [81]. . . . .	23
3.1	Ablauf der Designentwicklung (in Anlehnung an [82]). . . . .	25
3.2	Kanalordnung auf der Chiprückseite: Die Leiterstruktur zur passiven Erzeugung der Verdünnungsreihe mit zwei Zuflusskanälen und zehn unterschiedlich breiten Sprossenkanälen (in Anlehnung an [83]). . . . .	26
3.3	Schematische Darstellung des Prinzips zur Erzeugung einer binär-logarithmischen Konzentrationsreihe von 1/2 bis 1/1024 mit zehn Konzentrationen (in Anlehnung an [83]). . . . .	27
3.4	Nährmedium-Fluss im Querschnitt eines Wells. . . . .	27
3.5	Allgemeines Ersatzschaltbild des fluidischen Netzwerks für den Chip (in Anlehnung an [92, 93]). . . . .	29
3.6	Netzwerk der Coventor Architect Simulation auf Systemebene. . . . .	32
3.7	Mesh eines Teilabschnitts der Leiterstruktur. . . . .	34

3.8	Mesh und Ergebnis der Geschwindigkeitssimulation am ersten Ausgang.	34
3.9	Geschwindigkeitsprofil bei unterschiedlichen Kanalquerschnittsformen mit gleichem fluidischen Widerstand. . . . .	36
3.10	Flussdarstellungen an den Ausgängen 1 und 2 eines Chips mit Design 1.	37
3.11	Simulation der Geschwindigkeiten in der Leiterstruktur von Design 2.	37
3.12	Simulation der Druckverteilung in der Leiterstruktur von Design 1. . .	37
3.13	Simulation der Konzentrationen in den Kanälen von Design 2. . . . .	38
3.14	Simulierte Konzentrationsverteilung an den Ausgängen bei Design 1. .	38
3.15	Transiente Simulation der Verteilung der Testsubstanz durch Konvektion und Diffusion in Well 7. . . . .	40
3.16	Numerische Simulation des Einströmverhaltens der Partikel entsprechend des Einströmens von Zellen für die Zellkultur. . . . .	41
3.17	Numerische Simulation der Partikel entsprechend der Nährmediumzufuhr während der Hefe-Zellkultur. . . . .	41
3.18	Neu entworfene Struktur aus <110>-Stegen und theoretisch erarbeitete KOH-Ätzfronten (in Anlehnung an [80]). . . . .	42
3.19	Maske von Design 3 mit der Anordnung der <110>-Stege. . . . .	43
3.20	Kompensierte Ecken mit und ohne unterätzter Ätzmaske und Oberflächenprofil mit Si-Resten am Boden des Sprossenkanals. . . . .	43
3.21	Eckenkompensation in den Leiterstrukturen von Design 1 und Design 2.	44
3.22	CleWin-Zeichnungen der Lithographiemasken. . . . .	45
4.1	Vor- und Rückseite eines Chips. . . . .	50
4.2	Herstellungsprozess des Chips (in Anlehnung an [83]). . . . .	51
4.3	Vergleich mit und ohne Zweistufen-Lithographie nach KOH-Ätzen. . .	52
4.4	Vorderseite eines Si-Wafers nach der Zweistufen-Lithographie. . . . .	52
4.5	Wafer nach Zweistufen-Lithographie mit unterschiedlichen $Si_xN_y$ -Dicken. . . . .	53
4.6	Prinzip des anodischen Bondens (in Anlehnung an [96]). . . . .	54
4.7	Bondkurve bei 450 °C und 1000 V. . . . .	54
4.8	Schematischer Aufbau zum elektrochemischen Funkenerodieren bei Borsilikatglas (in Anlehnung an [99]). . . . .	55
4.9	Experimenteller Aufbau der elektrochemischen Funkenerosion von Borsilikatglas mit NaOH. . . . .	56
5.1	Schematische Darstellung einer parabolischen Strömung in einem kreisrunden Rohr und des Concus-Finn-Effekts in einem eckigen Kanal. . .	59
5.2	Chip in Isopropanol während des Befüllens mittels Unterdruck an den Ausgängen. . . . .	60
5.3	Exsikkator-Aufbau zum Evakuieren und anschließendem Befüllen des Chips. . . . .	61
5.4	Schematische Zeichnung des Exsikkators während des Luftabpumpens.	62
5.5	Chip nach dem Befüllen mit Isopropanol mit Luftblasen unter dem Kapton-Band. . . . .	63
5.6	Optische Kontrolle auf Luftblasen der mit Isopropanol befüllten Kavitäten. . . . .	63
5.7	Messaufbau für die Flusstests (in Anlehnung an [83]). . . . .	64

5.8	Verbindung einer Spritze mit einem Dreiwegehahn und einem Luer-Adapter zum Schlauch in Richtung Eingang. . . . .	64
5.9	Messung der Ätztiefe an der Kante der Zuflusskanäle mittels Oberflächenprofilometer von Design 1 und Design 2. . . . .	65
5.10	Die zwei Methoden der Tropfenkonturanalyse: <i>Pendant-Drop</i> und <i>Sessile-Drop</i> . . . . .	66
5.11	Volumenmessung zur Bestimmung der Flussraten an den einzelnen Chipausgängen. . . . .	67
5.12	Schematischer Aufbau der HPLC mit gekoppelter Massenspektrometrie. Abbildung der MS in Anlehnung an [114]. . . . .	69
5.13	Schematische Darstellung der Ionenfalle <i>Orbitrap</i> [113]. . . . .	69
5.14	Schematische Darstellung der Messmethode einer Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. . . . .	71
5.15	Aufbau des Fluoreszenzmikroskops, um den Fluss im Chip zu visualisieren. . . . .	72
5.16	Versuchsaufbau der HeLa-Zellkultur zur kontinuierlichen Mediumzufuhr für 20 h bei 37 °C. . . . .	74
6.1	Kontaktwinkelmessung bei {100} Silizium mittels <i>Sessile-Drop</i> -Methode für unterschiedliche Oberflächenbehandlungen. . . . .	81
6.2	Kontaktwinkelmessung bei {111} Silizium mittels <i>Sessile-Drop</i> -Methode für unterschiedliche Oberflächenbehandlungen. . . . .	81
6.3	Kontaktwinkelmessung bei Borsilikatglas mittels <i>Sessile-Drop</i> -Methode. . . . .	81
6.4	Vergleich der Ätzergebnisse von KOH und TMAH + Triton-X-100. . . . .	84
6.5	Vergleich der Ätzergebnisse der entwickelten Kompensationsstruktur mit unterschiedlich breiten Balken. . . . .	85
6.6	Der Verlauf der Ätzfronten während des Ätzprozesses der entwickelten Kompensationsstruktur aus <110>-Stegen. . . . .	85
6.7	Beispiele von aufgetretenen Defekten an Chips. . . . .	87
6.8	Mit elektrochemischem Funkenerodieren hergestellte Löcher durch Borsilikatglas als Anschlusslöcher für Flüssigkeiten am Chip. . . . .	89
6.9	Vertiefungen in den Kanälen, die den fluidischen Widerstand nicht beeinflussen und deshalb nicht zum Ausschluss führen. . . . .	89
6.10	Gegenüberstellung von Design 1 und Design 2 nach Si-Strukturierung. . . . .	90
6.11	Laminarer Fluss im Chip mit in PBS gelöstem FITC als Substanzlösung und purem PBS als Puffer unter dem Fluoreszenzmikroskop. . . . .	91
6.12	Mittelwerte mit Standardabweichungen der Flussraten von Test 1 und 2 für beide Designs mit unterschiedlichen SiO <sub>2</sub> -Beschichtungen an den Ausgängen 1 bis 10. . . . .	93
6.13	Arithmetische Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen der HPLC-MS-Messungen pro Ausgang beider Designs. . . . .	96
6.14	Arithmetische Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen der BPA-Messungen pro Ausgang beider Designs. . . . .	97
6.15	Werte der Simulationen auf physikalischer Ebene für beide Designs in linearer und logarithmischer Darstellung. . . . .	99

6.16	Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Analysemethoden von Design 1 mit natürlichem SiO <sub>2</sub> . . . . .	101
6.17	Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Analysemethoden von Design 1 mit thermisch abgeschiedenem SiO <sub>2</sub> . . . . .	102
6.18	Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Analysemethoden von Design 2 mit thermisch abgeschiedenem SiO <sub>2</sub> . . . . .	103
6.19	Ergebnisse der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie für einen Chip des Designs 1. . . . .	105
6.20	Zellkultur: Versuch 1 nach 4,5 h. . . . .	109
6.21	Zellkultur: Versuch 2 nach 4,5 h und nach 24 h. . . . .	109
6.22	Zellkultur: Versuch 3 nach 4,5 h und nach 24 h [83]. . . . .	110
6.23	Trypanblau-Färbung nach Versuch 3 an Well 3. . . . .	111

# Tabellenverzeichnis

1.1	Literaturübersicht zu unterschiedlichen mikrofluidischen Zellkultur-Chips mit integrierter Verdünnungsreihe. . . . .	4
2.1	Änderung der physikalischen Eigenschaften des fluidischen Systems bei Verkleinerung der Länge $L$ [34, 36–39]. . . . .	8
2.2	Einige Werte für Oberflächenspannungen $\gamma_{lg}$ und Kontaktwinkel $\theta$ an Luft und bei 20°C. . . . .	13
2.3	Maßeinheiten der fluidischen Variablen [38]. . . . .	15
2.4	Einige Werte für den Widerstandsfaktor für Kanäle verschiedener Querschnittsgeometrien [55, 57, 58]. . . . .	15
2.5	Vergleich der Ätzzraten und -verhältnisse von KOH und TMAH mit Triton-X-100. . . . .	19
2.6	Vergleich der Literaturwerte für Winkel und Ebenen, die an der Unterätzung konvexer Ecken bei KOH, purem TMAH oder TMAH mit Triton-X-100 beteiligt sind. . . . .	20
3.1	Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile von Silizium und PDMS. . .	28
3.2	Werte der analytisch berechneten Widerstände $R_{m,2}$ und $R_{m,3}$ . . . . .	31
3.3	Variierbare Parameter der Netzwerkkomponenten auf Systemebene. . .	33
3.4	Fluss- und Geometriewerte zu Abb. 3.9 mit unterschiedlichen Kanalquerschnitten. . . . .	36
3.5	Ergebnisse der Simulationen auf Systemebene für die Konzentrationen und Flüsse an den Ausgängen der drei Designs im Vergleich mit den analytischen Werten. . . . .	39
3.6	Ergebnisse der Simulationen auf physikalischer Ebene für die Konzentrationen und Flüsse an den Ausgängen der drei Designs im Vergleich mit den analytischen Werten. . . . .	39
3.7	Werte der analytisch berechneten Kanalabmessungen der Widerstände für unterschiedliche Ätztiefen mit den davon abhängigen Kanalbreiten und -formen (für Design 3 übernommen aus [92]). . . . .	46
4.1	Einige relevante Materialeigenschaften von drei Thermoplasten, die für die Massenproduktion des Chips mittels Spritzgussverfahren geeignet sind. . . . .	57
5.1	Auflistung des verwendeten Zubehörs für den Flusstest. . . . .	64
5.2	Ergebnisse der pH-Wert-Analysen mit Indikatorstreifen und Potentiometer einer pipettierten Konzentrationsreihe mit Essigsäure. . . . .	70
5.3	Optimierung der Zellkultur in drei Versuchen für unterschiedliche Parameter. . . . .	74

6.1	Arithmetische Mittelwerte $M$ der Kontaktwinkelmessungen mittels Tropfenkonturanalyse mit Standardabweichungen $SD$ . . . . .	80
6.2	Die Berechnungen der Concus-Finn-Bedingung für die Ecken von dreieckigen und trapezförmigen Kanälen mit unterschiedlichen $\text{SiO}_2$ -Beschichtungen. . . . .	82
6.3	Arithmetische Mittelwerte $M$ der mittels Oberflächenprofilometer gemessenen Kanaltiefen der verwendeten Chips mit Standardabweichungen $SD$ für die Designs 1 und 2. . . . .	88
B.1	Reynolds-Zahlen verschiedener Kanäle der unterschiedlichen Designs. .	145
B.2	Parameter der COMSOL-Simulationen. . . . .	145
E.1	<b>Flussraten von Test 1.</b> . . . . .	155
E.2	<b>Flussraten von Test 2.</b> . . . . .	156
E.3	Arithmetische Mittelwerte $M$ der <b>HPLC-MS-Messungen</b> pro Ausgang mit den jeweiligen Standardabweichungen $SD$ . . . . .	157
E.4	Differenzen $D$ und prozentuale Differenzen $D\%$ zu den Sollwerten der Werte aus Tabelle E.3 der HPLC-MS-Messungen. . . . .	157
E.5	Arithmetische Mittelwerte $M$ der <b>BPA-Messungen</b> pro Ausgang mit den jeweiligen Standardabweichungen $SD$ . . . . .	158
E.6	Differenzen $D$ und prozentuale Differenzen $D\%$ zu den Sollwerten der Werte aus Tabelle E.5 der BPA-Messungen. . . . .	158
E.7	Ergebnisse der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. . . . .	159

# Verwendete Abkürzungen, Symbole und Formelzeichen

## Abkürzungen

Abk.	Bedeutung
BPA	<u>B</u> radford <u>p</u> rotein <u>a</u> ssay
BSA	Rinderalbumin
$(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$	TMAH
CVD	chemische Gasphasenabscheidung
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
DI	<u>d</u> eionisiertes Wasser
ECDM	Elektrochemisches Funkenerodieren
ECM	Elektrochemisches Abtragen
EDM	Funkenerosion
FSC	<u>f</u> orward- <u>s</u> cattered
HF	Flusssäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-MS	HPLC mit <u>M</u> assenspektrometrie
FEM	<u>F</u> inite- <u>E</u> lement- <u>M</u> ethode
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothiocy <u>a</u> nat
KOH	Kaliumhydroxid
$\mu\text{TAS}$	<i><u>m</u>icro <u>t</u>otal <u>a</u>nalysis <u>s</u>ystem</i>
LW	<u>L</u> eitungswasser
MS	<u>M</u> assenspektrometrie
NaOH	Natronlauge
nat. $\text{SiO}_2$	natürliches $\text{SiO}_2$
$\text{NH}_3$	Ammoniak

Abk.	Bedeutung
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PC	<u>P</u> oly <u>C</u> arbonat
PECVD	plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung
PDMS	<u>P</u> oly <u>d</u> imethylsiloxan
S. pombe	Schizosaccharomyces pombe – nicht-adhärenente Hefezellen
Si	<u>S</u> ilizium
SiH <sub>4</sub>	Monosilan
SiO <sub>2</sub>	Siliziumdioxid
Si <sub>x</sub> N <sub>y</sub>	Siliziumnitrid
SSC	<u>s</u> ide- <u>s</u> cattered
therm. SiO <sub>2</sub>	thermisch hergestelltes 90 nm dickes SiO <sub>2</sub>
TMAH	<u>T</u> etra <u>m</u> ethyl <u>a</u> mmonium <u>h</u> ydroxid
UV	<u>U</u> ltraviolettstrahlung

## Symbole und Formelzeichen

Abk.	Einheit	Beschreibung
$2\alpha$	Grad (°)	Öffnungswinkel einer Ecke
$\alpha_{KOH}$	Grad (°)	Winkel zwischen {100}- und {111}-Si-Ebenen
$\alpha_S$		Signifikanzniveau des t-Tests
$a$	m/s <sup>2</sup>	Beschleunigung
$A$	m <sup>2</sup>	Fläche
$b$	m	Kanalbreite: obere Kanalöffnung
$B$		zur Berechnung von $C_R$ eines Rechtecks
$B_P$		Berechnung von $C_R$ eines Dreiecks im Anhang
$c(\vec{x}, t)$	mol/m <sup>3</sup>	Konzentration
$c_a$		Ausgangskonzentration zur Berechnung des pH-Werts
$C$		zur Berechnung von $C_R$ eines Trapez
$C_R$		Widerstandsfaktor
$d$	m	Plattenabstand

Abk.	Einheit	Beschreibung
$D$	%	Differenz zwischen $M$ und $S$
$D_{\%}$	%	prozentuale Differenz: % von $D$ bezogen auf $S$
$D_h$	m	hydraulischer Durchmesser
$D_{iff}$	m <sup>2</sup> /s	Diffusionskonstante
$df$		Freiheitsgrade des t-Tests
$f$		Umrechnungsfaktor der dreieckigen Kanäle in runde für fluidisches Netzwerk
$F$	N	Kraft
$\gamma$	N/m	Grenzflächenspannung zw. zwei Phasen
$\gamma_{lg}$	N/m	Grenzflächenspannung zw. flüssig und gasförmig
$\gamma_{sg}$	N/m	Grenzflächenspannung zw. fest und gasförmig
$\gamma_{sl}$	N/m	Grenzflächenspannung zw. fest und flüssig
$\vec{g}$	m/s <sup>2</sup>	Erdbeschleunigung
$h$	m	Strukturhöhe der Kanäle
$I_0$	kg/s	Massenfluss am Ausgang
$I_{1,1}$	kg/s	Massenfluss an Einlass 1 für Testsubstanz
$I_{10,4}$	kg/s	Massenfluss an Einlass 2 für Puffer
$I_m$	kg/s	Massenfluss
$I_{m,1}, I_{m,4}$	kg/s	Massenfluss im Zuflusskanal
$I_{m,2}, I_{m,3}$	kg/s	Massenfluss im Sprossenkanal
$\vec{J}$	mol/(m <sup>2</sup> s)	Flussdichte
$l$	m	Kanallänge
$L$	m	charakteristische Länge
$L_0$	m	charakteristische Länge eines Kanals
$L_D$	m	Diffusionslänge
$m$	kg	Masse
$\mu$	kg/(m s)	dynamische Viskosität
$m$		Verdünnungsschritt
$m/q$	kg/C	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
$M$		arithmetisches Mittel
$n$		Anfangsverdünnung
$N$		Anzahl der Verdünnungen

Abk.	Einheit	Beschreibung
$p$	kg m/s	Impuls
$p$	N/m <sup>2</sup>	Druck
$P_o$		Poiseuille-Zahl
$ps$		Signifikanz-Wahrscheinlichkeit des t-Tests
$r(\vec{x}, t)$		Quelle/Senke für Teilchen bei Diffusion
$\rho$	kg/m <sup>3</sup>	Dichte
$R$	1/ms	fluidischer Kanalwiderstand
$R_{lam}$	1/ms	fluidischer Widerstand bei laminarem Fluss
$R_1$	1/ms	fluidischer Widerstand der Zuflusskanäle
$R_{in}, R_0$	1/ms	fluidischer Widerstand an den Ein- bzw. Ausgängen
$R_{m,2}, R_{m,3}$	1/ms	fluidische Widerstände der Sprossen
$Re$		Reynolds-Zahl
$Re_{krit}$		kritische Reynolds-Zahl, Übergang zwischen laminar und turbulent
$S$		Sollwert
$SD$		Standardabweichung
$t$	s	Zeit
$t(df)$		t-Wert
$T$	m	Kanaltiefe
$t_D$	s	Diffusionszeit
$\theta, \theta_1, \theta_2$	Grad (°)	Kontaktwinkel eines Tropfens auf einer Oberfläche
$\tau$	N/m <sup>2</sup>	Schubspannung
$u$	m/s	Geschwindigkeit
$U$	m	Umfang
$U_e$	V	elektrische Spannung
$u_{Wand}$	m/s	Geschwindigkeit an der Kanalwand
$u_y$	m/s	lokale Geschwindigkeit
$\vec{v}$	m/s	Vektor der Geschwindigkeit
$v_0$	m/s	mittlere Geschwindigkeit
$V$	m <sup>3</sup>	Volumen
$z$	m <sup>3</sup>	Kantenlänge eines Würfels mit kubischem Gitter

# Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. Helmut Seidel bedanken. Durch seine wissenschaftlichen Anregungen, die freundliche Unterstützung und die Bereitstellung der finanziellen Mittel hat er maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Andreas Manz möchte ich mich für die Bereitschaft der Übernahme des Zweitgutachtens und für sein förderndes Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. Navina Dahmke, die mir nicht nur mit vielen Ratschlägen helfen konnte, sondern auch die Fluoreszenzmessungen und Zellversuche ermöglichte. Diese durfte ich dank Herrn Univ.-Prof. Dr. Michael Menger am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie durchführen.

Herrn Dr. Erwin Gorjup der Arbeitsgruppe In-Vitro-Kulturtechniken am IBMT in St. Ingbert danke ich für die Kooperation zur Durchführung der BPA-Untersuchungen.

Ebenso geht mein Dank an meine ehemaligen und gegenwärtigen Kolleginnen und Kollegen am Lehrstuhl für Mikromechanik, Mikrofluidik und Mikroaktorik, die mich in den vergangenen Jahren mit bereichernden Tipps, Hilfsbereitschaft und Diskussionsbeiträgen dem Ziel näher brachten. Dabei möchte ich mich bei besonders Dr. Dara Feili bedanken, der mir unter anderem viele Kontakte und Kooperation vermittelte.

Ich möchte mich auch bei den Studierenden, die im Rahmen von studentischen Arbeiten oder HiWi-Tätigkeiten mit mir zusammengearbeitet haben, bedanken. Besonders möchte ich dabei Herrn Michael Wick für seine hilfreiche Studienarbeit nennen, die mich auf dem Gebiet der Kompensationsstrukturen weitergebracht hat.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Familie sowie meinen Freundinnen und Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützt und ermutigt haben.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund, der mir mit sämtlichen Computerproblemen geholfen und vor allem auch stets Mut zugesprochen sowie mich in meiner Arbeit bestärkt hat.



# A Berechnung $C_R$ für gleichschenkliges Dreieck

Für die Berechnung des  $C_R$ -Werts für Kanäle mit einem gleichschenkligen Dreieck mit einem Basiswinkel von  $54,74^\circ$  als Querschnittsfläche  $A$  mit Umfang  $U$  müssen zuerst der hydraulische Durchmesser  $D_h$  und die Poiseuille-Zahl  $P_o$  bestimmt werden [57, 125]:

Basiswinkel:	$\alpha_{KOH} = 54,74^\circ$
	$\phi = 90 - \alpha_{KOH} = 35,26^\circ$
hydraulischer Durchmesser:	$D_h = \frac{4A}{U} = \frac{2h \sin \phi}{1 + \sin \phi} = \frac{2h \cos \alpha_{KOH}}{1 + \cos \alpha_{KOH}}$
	$B_P = 4 + \frac{5}{2} \sqrt{\frac{1}{\tan^2 \phi} - 1} = 6,501$
Poiseuille-Zahl:	$P_o = f Re = \frac{12(B_P + 2)(1 - \tan^2 \phi)}{(B_P - 2) [\tan \phi + \sqrt{1 + \tan^2 \phi}]^2}$
	$P_o = 13,3105$
Widerstandsfaktor:	$C_R = \frac{U^2}{8A} P_o = \underline{\underline{35,12}}$



# B Chipdesign

## B.1 Reynolds-Zahlen

**Tabelle B.1:** Reynolds-Zahlen verschiedener Kanäle der unterschiedlichen Designs mit den maximalen Eingangsflüssen 54,06  $\mu\text{l}/\text{min}$  und 5,94  $\mu\text{l}/\text{min}$  der Flusstests. Die Reynolds-Zahl ist proportional zum Volumenfluss und verringert sich zusammen mit diesem um zwei Größenordnungen für die Zelltests.

	Zuflusskanal für Puffer	Kleinste Sprosse	Breiteste Sprosse
Maximaler Volumenfluss in $\mu\text{l}/\text{min}$	54,01	6	6
Design 1	5,0	3,2	2,1
Design 2	10,0	3,2	2,1
Design 3	10,5	3,2	2,1

## B.2 Parameter der numerischen Simulationen

**Tabelle B.2:** Parameter der besprochenen COMSOL-Simulationen für die Geschwindigkeiten, die Konzentrationsverteilung, die Diffusion im Well und die Partikelverteilung.

	Geschwindigkeiten Konzentrationsverteilung	Diffusion im Well	Partikelverteilung
Physik	Transport, Verdünnte Spezies		
		Partikeltrajektorien für Fluidströmungen	
	Laminare Strömung		
Zeitverhalten	stationär	transient	transient
Solver	PARDISO	MUMPS	SPOOLES
Konvergenz	0,0012	0,001	0,001



# C Prozessparameter

Die im Herstellungsprozess verwendeten Geräte und Parameter werden in diesem Anhang aufgeführt. Dabei entspricht die aufgelistete Reihenfolge der ersten Anwendung des Schrittes während der Chipherstellung. Die genaue Reihenfolge der Prozessschritte ist in Kapitel 4.1 beschrieben.

## C.1 Siliziumwafer

**Si-Wafer** Einkristalline und beidseitig polierte (100)-Siliziumwafer mit einem Durchmesser von 100 mm werden verwendet. Diese werden mittels Czochralski-Verfahren von *Si-Mat Silicon Materials* mit einer Dicke von  $500\ \mu\text{m} \pm 25\ \mu\text{m}$  und einer p-Dotierung (Bor) hergestellt. Der Widerstand beträgt 1 - 30  $\Omega\ \text{cm}$ .

**Die Dickenvariation** über den 100 mm-Wafer wird durch ein berührungsloses, kapazitives Messverfahren mittels *Waferbow MX 203-6-33* der Firma *EH-Metrology GmbH* mit 17 Messpunkten pro Wafer bestimmt.

**Eine Siliziumnitrid-Schicht** wird durch PECVD (*Plasmalab System 133, Oxford Instruments*) aufgebracht. Die angelegte Spannung zur Erzeugung des Plasmas beträgt 40 W. Auf der Vorderseite des Wafers wird bei 380 °C und einem Druck von 650 mTorr eine 800 nm bis 900 nm dicke und auf der Rückseite eine 350 nm bis 400 nm dicke Schicht abgeschieden. Beides dient als Hartmaske für das spätere KOH-Ätzen und muss noch in HF strukturiert werden. Die Gasflüsse während des Prozesses betragen jeweils:  $\text{SiH}_4$  20 sccm,  $\text{NH}_3$  20 sccm und  $\text{N}_2$  800 sccm.

**Die 5“ x 5“ Chrommaske** für die spätere Belichtung wird mit einem Laserlithograf *DWL66* von *Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH* geschrieben und für ca. 30 s entwickelt. Das Chrom wird danach mit *ChromeEtch n° 1* (*MicroChemicals*) für ca. 2 min geätzt und die komplette Maske mit Caroscher Säure gereinigt. Das Maskendesign wird mit *CleWin Version 3.2.2* gezeichnet.

**Carosche Säure** wird zum Entfernen organischer Verschmutzungen, wie z. B. Haftvermittler und Lack, auf Chrommasken, Si-Wafern und Glaswafern verwendet. Es handelt sich um eine wässrige Lösung der Peroxomonoschwefelsäure mit der chemischen Summenformel  $\text{H}_2\text{SO}_5$ . Diese besteht aus Wasserstoffperoxid

und Schwefelsäure im Verhältnis 1 : 2 und wird bei 80 °C für mindestens 10 min verwendet.

**Belackung** Eine 2 µm dicke Lackschicht wird mit einem SpinCoater von *Süss Microtec* hergestellt. Zuerst wird der Si-Wafer zur Desorption von H<sub>2</sub>O im Ofen bei 120 °C für 40 min ausgeheizt und dann beidseitig belackt, zur besseren Haftung des Lacks wird ein Haftvermittler verwendet:

**Haftvermittler** *Ti-Prime (MicroChemicals)*

a = 4000 l/min<sup>2</sup>   v = 3000 l/min   t = 20 s

Ofen                      120 °C                      6 min

**Positivlack** *AZ 1518 (MicroChemicals)*

a = 3000 l/min<sup>2</sup>   v = 4000 l/min   t = 20 s

Ofen                      98 °C                      3 min

Positivlack bedeutet, dass belichtete Bereiche in einem Entwicklungsschritt entfernt werden, während die durch die Maske geschützten Bereiche stehenbleiben. Bei Negativlack bleiben hingegen die belichteten Bereiche stehen.

**Flatalignment** Zur Ausrichtung der Strukturen zur Kristallorientierung des Siliziumwafers ist eine Justage nötig. Hierfür werden Alignment-Kreuze mit dem Laserlithograf *DWL66* von *Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH* geschrieben und entwickelt. Zu diesen Kreuzen wird dann die erste Maske ausgerichtet.

**Vorderseiten-Belichtung** *Mask Aligner MA 1006* von *Karl Süss* für Vorderseiten-Justage:

Soft Contact:        4,7 s

UV-Lichtquelle:    1000 W Hg-Lampe

Intensität:            15 mW/cm<sup>2</sup> bei einer Wellenlänge von 365 nm

**Rückseiten-Belichtung** *Mask Aligner MA6/BA6* von *Süss MicroTec* für Rückseiten-Justage:

Soft Contact:        15 s

**Entwickeln** Der belichtete Wafer wird für ca. 30 s in dem Entwickler *AZ 351B (MicroChemicals)*, der im Verhältnis 1 : 4 mit H<sub>2</sub>O verdünnt wurde, entwickelt. Mit diesem Schritt wird bei Positivlack der belichtete Lack gelöst, während der unbelichtete stehenbleibt.

**Hardbake** Nach dem Belichten und Entwickeln sollte noch 40 min Hardbake im Ofen bei 120 °C erfolgen, dadurch wird der Lack gehärtet und ist für mindestens 10 min in 6 %igem HF stabil.

**HF-Ätzen** wird zur Strukturierung der  $\text{Si}_x\text{N}_y$ -Schicht verwendet. Das bedeutet, dass Strukturen vom Lack in die Schicht übertragen werden, indem vom Lack freigelegte Stellen weggeätzt werden, während vom Lack geschützte Stellen nicht angegriffen werden. Die Ätzraten bei 6 %igem HF liegen zwischen 50 nm/min und 75 nm/min, abhängig von der Qualität der  $\text{Si}_x\text{N}_y$ -Schicht.

**Strippen** Der Lack auf den Si-Wafern wird nach dem HF-Schritt mit Aceton entfernt und mit Isopropanol gespült. Anschließend wird wie oben beschrieben mit Caroscher Säure gereinigt.

**KOH-Ätzen** Das einkristalline {100}-Silizium wird durch 40 %iges Kaliumhydroxid (KOH) bei 85 °C geätzt, wobei das  $\text{Si}_x\text{N}_y$  als Hartmaske dient. Das Ätzmedium wird durch eine Membranpumpe gleichmäßig durchmischt. Durch die vorherige Messung der Waferdicke kann die Ätzzeit abhängig von der Ätzrate in {100}-Richtung bestimmt werden. Für den ersten Ätzschritt wird ein KOH-Halter verwendet, in welchen der Wafer eingespannt und nur von der Vorderseite angegriffen wird. Für den zweiten KOH-Schritt wird ein beidseitiger Halter verwendet. Somit werden Vorder- und Rückseite des Wafers gleichermaßen angegriffen. Die Ätzraten sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

**TMAH-Ätzen mit Triton X-100** Der Siliziumwafer wird in einem horizontalen Halter durch 25 %iges Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) bei 90 °C geätzt, wobei  $\text{Si}_x\text{N}_y$  als Hartmaske dient. Bei 500 ml werden 1 ml Triton-X-100 (*Sigma-Aldrich*) zur Minimierung der Eckenunterätzung zugefügt. Es ergibt sich ein Volumenanteil von 0,002. Ein Magnetrührer sorgt für eine gleichmäßige Durchmischung. Die Ätzraten sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

**Oberflächenprofilometer** Mit Hilfe des *Dektak 150* der Firma *Veeco Instruments* wird die Äztiefe der verschiedenen Schritte bestimmt. Es wird eine Nadel mit einem Spitzenradius von 5 µm und eine Kontaktkraft von 7 mg verwendet.

**Die Siliziumdioxid-Schicht** wird mittels trockener Oxidation aufgebracht. Jeweils drei Dummy-Wafer werden vor und hinter die Proben gestellt, um einen regelmäßigen Gasfluss zu erhalten. Um Schichtspannungen und damit die Gefahr des Ablösens der Schicht während der Flussversuche zu reduzieren, durchlaufen die Wafer im Anschluss an die Oxidation einen Tempersschritt, bevor sie endgültig abkühlen. Während des Prozesses mit den folgenden Parametern bildet sich eine etwa 90 nm dicke Schicht, deren Homogenität um  $\pm 10$  nm über die Fläche des Wafers variiert:

Spülen	Stickstoff		12 h	RT
Erwärmen	Sauerstoff	150 l/h	55 min	1000 °C
Oxidation	Sauerstoff	150 l/h	60 min	1000 °C
Tempern	Sauerstoff	25 l/h	120 min	300 °C
Tempern	Stickstoff	100 l/h	40 min	1000 °C
Abkühlen	Stickstoff	25 l/h	12 h	RT

## C.2 Borsilikatglas

Der Si-Wafer wird beidseitig mit Borsilikatglas abgeschlossen. Das untere Glas ist unbehandelt, das obere Glas benötigt Löcher für die Ein- und Ausgänge der Flüssigkeiten. Hierfür wird die elektrochemische Funkenerosion verwendet. Pro Glaswafer werden 98 Löcher benötigt, wodurch Spannungen im Glas entstehen können. Durch einen Ausheizschritt werden diese reduziert. Nach der Reinigung mit Caroscher Säure werden die Gläser nacheinander anodisch gebondet.

**Glaswafer** Die Borsilikatglas-Wafer, mit einer Dicke von  $500\ \mu\text{m} \pm 25\ \mu\text{m}$ , bestehen aus BOROFLOAT 33 (*Plan Optik AG*), welches sich wie folgt zusammensetzt [105]:

SiO <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> O/K <sub>2</sub> O	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
81 %	13 %	4 %	2 %

**Elektrochemische Funkenerosion** Die Positionsmarkierungen für die Löcher werden auf der Unterseite des Glases durch einen Master mit einem 0,2 mm-dünnen, wasserfesten Stift gesetzt. Um die Markierungen vor dem Ablösen durch NaOH zu schützen, wird die Unterseite mit chemikalienresistenter Klebefolie abgedeckt. Eine Elektrode (Anode) wird bei Raumtemperatur in NaOH (8 mol/l) getaucht. Die zweite Elektrode (Kathode) wird an der Spitze mit einem Isolierband abgeklebt, um eine ca. 0,5 mm lange Spitze mit 0,8 mm Durchmesser zu erhalten. Diese wird über die Markierung auf dem Glas in NaOH gehalten und mit dem Fußschalter eine Spannung von 55 V angelegt. Dadurch kommt es zur Blasen- und Funkenbildung bei einem maximalen Stromfluss von 2 A. Die Anode wird bis zum Durchbruch auf der Unterseite des Glases nachgeführt. Um die Trichterform der Löcher zu minimieren, wird die angelegte Spannung mittels Fußschalter ausgeschaltet, damit der Materialabtrag umgehend stoppt.

**Spannungsarmes Ausheizen** Das Borsilikatglas wird im Muffelofen (*Nabertherm L9/12/P320*) in zwei Stunden auf 520 °C erhitzt, für 40 min die Temperatur gehalten und anschließend in ca. 21 h auf Raumtemperatur abgekühlt.

## C.3 Glas-Silizium-Glas-Stack

**Anodisches Bonden** Der Si-Wafer wird beidseitig mit Borsilikatglas anodisch ohne Vakuum gebondet. Dabei ist auf eine sehr geringe Kraft der Elektroden auf den Wafer-Stack zu achten, da das gelöcherte Glas sonst brechen kann. Die Wafer werden zusammen mit der Heizplatte und der Spannvorrichtung in ca. 25 min auf die Prozesstemperatur von 450 °C aufgeheizt. Der Bonder *Electronic Visions PB6-RV* wird bei einer angelegten Spannung von 1000 V und einem maximalen Strom von 20 mA verwendet. Der Bondprozess ist beendet, wenn der Strom stabil und kleiner als 1 mA ist. Bei zusätzlicher Oxidschicht dauert dies ca. 5 min länger. Die Qualitätskontrolle wird visuell überprüft: Defekte sind hellgrau oder bilden Interferenzringe [60].

**Sägen** Mit Hilfe eines Diamantblattes werden die Chips durch Sägen vereinzelt. Um den Stress auf die Materialien gering zu halten, wird in acht Schritten um jeweils 180 nm tiefer gesägt. Zur Kühlung während des Sägens wird Wasser verwendet. Damit die Chips während des Sägens nicht wegfliegen und die Chips vor Wasser geschützt sind, werden sie vorher mit den Glaslöchern nach unten auf eine UV-Sägefolie geklebt. Die Folie kann nach einer UV-Bestrahlung ohne Rückstände abgezogen werden.

**Fluidische Anschlüsse** Auf die Aderendhülse wird eine dünne Umrandung *Pattex Repair Gel* aufgebracht und unter einer Lupe auf dem Chip positioniert. Nach 24 h Trocknen wird der Zwei-Komponenten-Kleber *Araldite Epoxy Adhesive* im Verhältnis 1 : 1 gemischt und um die Hülse aufgetragen. Der Kleber wird bei 60 °C für eine Stunde ausgeheizt.

Aderendhülsen aus verzinnem Kupfer (*18H686*) von *Bürklin*:

Innendurchmesser	1,7 mm
Außendurchmesser	2,8 mm
Länge	7 mm



# D Protokoll der Zellkultur

Die Schritte und Parameter der in Kapitel 5.8 beschriebenen Zellkultur und des Einfärbens der Zellen werden hier aufgeführt.

## Zellkultur

**HeLa-Zellen** mit RPMI (10 % fetales Kälberserum, Pen/Strep):

- Kultivierung in 10 cm Petrischalen mit 10 ml Medium RPMI + 10 % FKS + 100 units/ml Penicillin/Streptomycin (Antibiotikum) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>
- Zellen ernten mit 1 ml Trypsin, danach mit 10 % FCS in PBS Reaktion stoppen, zentrifugieren (5 min bei 400 x *g*) und Pellet in PBS auflösen, danach nochmals zentrifugieren
- Zellzählung in Neubauerzählkammer

**Fluoreszenzfärbung der Zellen** mit drei Farbstoffen

Bisbenzimid (blau): Zellkernmarkierung aller Zellen

- 2 µl/ml Bisbenzimid in Medium zu Zellen geben und für 15 min bei 37 °C und mit 5 % CO<sub>2</sub> im Dunkeln kultivieren,
- 1 mal mit PBS waschen.

Zellen mit 1 ml Diluent C aufnehmen und in 2 Teile teilen, anfärben entweder mit PKH26 (rot) oder PKH67 (grün):

- davon pro Färbung 500 µl Zellsuspension verwenden,
- jeweils 500 µl Diluent C mit 2 µl Fluoreszenzfarbstoff dazu geben, mischen,
- Zellkultur für 5 min bei 37 °C und mit 5 % CO<sub>2</sub>, zwischendurch 2 x mischen,
- Farbreaktion stoppen mit 9 ml 10 % FCS in PBS, mischen,
- Zentrifugieren für 10 min bei 400 x *g*,
- 2 mal mit PBS waschen,
- mit Medium auf Endkonzentrationen verdünnen: PKH26 5 · 10<sup>4</sup> Zellen/ml und PKH67 5 · 10<sup>5</sup> Zellen/ml.



# E Ergebnisse der Analysen

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse aus Kapitel 6 in Form von Tabellen aufgeführt.

**Tabelle E.1: Flussraten von Test 1** (Abb. 6.12): Diesen Proben wurde jeweils vor der Messung ein definiertes Volumen für die HPLC-MS-Analyse entnommen. Aufgeführt sind die arithmetischen Mittelwerte  $M$  der Volumenflussmessungen pro Ausgang mit den jeweiligen Standardabweichungen  $SD$  von drei Chips des Designs 1 mit natürlichem  $\text{SiO}_2$ , drei des Designs 1 mit thermischem  $\text{SiO}_2$ , zwei des Design 2 mit thermischem  $\text{SiO}_2$ , fünf mit thermischem  $\text{SiO}_2$  beider Designs und das arithmetische Mittel über alle acht Chips. Die optimale Flussrate pro Ausgang liegt bei  $6 \mu\text{l}/\text{min}$ .

Chips	Maske 1				Maske 2		alle Chips mit $\text{SiO}_2$		alle Chips insgesamt	
	ohne $\text{SiO}_2$		mit $\text{SiO}_2$		mit $\text{SiO}_2$		mit $\text{SiO}_2$		insgesamt	
	3		3		2		5		8	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
1	5,72	0,55	5,06	0,32	6,05	0,42	5,46	0,62	5,55	0,57
2	5,25	0,91	4,97	0,72	5,55	0,14	5,20	0,60	5,22	0,67
3	6,07	1,03	5,33	0,08	5,88	0,46	5,55	0,38	5,74	0,68
4	5,68	0,25	5,08	0,53	6,05	0,35	5,47	0,67	5,55	0,54
5	5,83	0,08	5,67	0,15	6,00	0,14	5,80	0,22	5,81	0,17
6	6,10	0,48	5,95	0,39	5,38	0,88	5,72	0,61	5,86	0,56
7	5,37	0,43	6,07	0,20	5,88	0,25	5,99	0,22	5,76	0,43
8	6,12	0,16	6,18	0,29	5,10	0,99	5,75	0,80	5,89	0,64
9	5,97	0,12	5,95	0,13	5,63	0,39	5,82	0,28	5,88	0,23
10	6,03	0,20	6,05	0,26	6,13	0,07	6,08	0,20	6,06	0,19
<b>Mittel</b>	5,81	0,53	5,63	0,55	5,76	0,49	5,68	0,52	5,73	0,53

**Tabelle E.2: Flussraten von Test 2** (Abb. 6.12): Arithmetische Mittelwerte  $M$  der Volumenflussmessungen pro Ausgang mit den jeweiligen Standardabweichungen  $SD$  der selben Chips wie in Tabelle E.1. Die Proben wurden nach denen von Test 1 gesammelt und nur für Volumenmessungen verwendet. Die optimale Flussrate pro Ausgang liegt bei 6  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Chips	Maske 1				Maske 2		alle Chips		alle Chips	
	ohne $\text{SiO}_2$		mit $\text{SiO}_2$		mit $\text{SiO}_2$		mit $\text{SiO}_2$		insgesamt	
	3		3		2		5		8	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
<b>1</b>	5,70	0,43	5,01	0,29	5,93	0,11	5,38	0,54	5,50	0,50
<b>2</b>	5,37	0,77	4,94	0,65	5,95	0,71	5,34	0,80	5,35	0,73
<b>3</b>	6,02	1,16	5,33	0,30	6,03	0,74	5,61	0,57	5,76	0,78
<b>4</b>	5,67	0,18	5,43	0,37	6,10	0,28	5,70	0,47	5,69	0,37
<b>5</b>	5,77	0,32	5,69	0,02	6,23	0,04	5,90	0,29	5,85	0,29
<b>6</b>	6,18	0,58	5,98	0,24	5,30	0,92	5,71	0,62	5,89	0,61
<b>7</b>	5,30	0,51	5,94	0,26	5,83	0,04	5,89	0,19	5,67	0,44
<b>8</b>	6,08	0,33	6,10	0,09	5,48	0,60	5,85	0,46	5,94	0,41
<b>9</b>	5,78	0,18	6,02	0,03	5,73	0,39	5,90	0,25	5,86	0,22
<b>10</b>	5,83	0,06	6,13	0,16	6,10	0,00	6,12	0,12	6,01	0,17
<b>Mittel</b>	5,77	0,53	5,66	0,50	5,87	0,46	5,74	0,49	5,75	0,50

**Tabelle E.3:** Arithmetische Mittelwerte  $M$  der **HPLC-MS-Messungen** pro Ausgang mit den jeweiligen Standardabweichungen  $SD$  und der Anzahl der jeweils gemessenen Proben  $N$ , aus welchen der Mittelwert gebildet wird (Abb. 6.13). Pro Chip wurden zwei Substanzen (Metoprolol und Diclofenac) des gleichen Tests gemessen. Die Werte werden in % und in Bezug auf die Kalibrierkurven angegeben.

$N$ Chipanzahl	Design 1				Design 2		Pipettiert		Sollwert
	therm. SiO <sub>2</sub>		nat. SiO <sub>2</sub>		therm. SiO <sub>2</sub>				
	6		6		4		4		
	3		3		2				
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	
1	43,75	4,98	41,40	3,29	38,63	2,12	49,78	2,68	50
2	24,90	6,82	21,64	3,58	20,05	2,83	25,64	3,00	25
3	15,28	4,57	13,15	3,93	12,93	0,69	12,92	0,51	12,5
4	8,29	3,36	6,15	3,91	4,14	1,71	6,47	0,35	6,25
5	4,59	2,99	1,25	0,76	2,93	1,67	2,47	0,95	3,13
6	2,29	1,36	2,86	1,98	2,49	0,41	1,58	0,10	1,56
7	1,76	1,33	0,54	0,62	3,57	1,07	0,81	0,07	0,78
8	0,84	0,98	1,79	2,58	0,77	0,22	0,38	0,03	0,39
9	0,89	0,71	2,26	2,11	0,10	0,09	0,20	0,02	0,20
10	0,51	0,73	0,57	0,66	0,09	0,09	0,10	0,01	0,10

**Tabelle E.4:** Differenzen  $D$  und prozentuale Differenzen  $D\%$  zu den Sollwerten der Werte aus Tabelle E.3 der HPLC-MS-Messungen. Maximalwerte sind hervorgehoben.

	Design 1				Design 2		Pipettiert	
	therm. SiO <sub>2</sub>		nat. SiO <sub>2</sub>		therm. SiO <sub>2</sub>			
	D	D%	D	D%	D	D%	D	D%
1	<b>6,3</b>	13	<b>8,6</b>	17	<b>11,4</b>	23	0,2	0,4
2	0,1	0,4	3,4	13	4,9	20	0,6	3
3	2,8	22	0,6	5	0,4	4	0,4	3
4	2,0	33	0,1	2	2,1	34	0,2	4
5	1,47	47	1,88	60	0,20	6	<b>0,65</b>	<b>21</b>
6	0,73	47	1,30	83	0,93	59	0,02	1
7	0,98	125	0,24	31	2,79	<b>357</b>	0,03	3
8	0,45	114	1,40	358	0,38	97	0,01	2
9	0,70	358	2,06	<b>1055</b>	0,1	49	0,00	1
10	0,42	<b>425</b>	0,47	483	0,01	8	0,01	7
Mittel	1,59	118	2,00	211	2,33	66	0,22	4

**Tabelle E.5:** Arithmetische Mittelwerte  $M$  der **BPA-Messungen** pro Ausgang über jeweils zwei Chips ( $N$ ) mit den jeweiligen Standardabweichungen  $SD$  (Abb. 6.14). Die Werte werden in % und bezüglich der positiven Kontrollsubstanz angegeben.

$N$	Design 1				Design 2		Pipettiert		Sollwert
	therm. SiO <sub>2</sub>		nat. SiO <sub>2</sub>		therm. SiO <sub>2</sub>				
	2		2		2		2		
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	
1	29,23	3,75	51,62	0,06	35,53	4,25	54,82	0,96	50
2	16,87	0,38	33,57	1,74	15,37	2,05	29,44	0,54	25
3	8,32	4,13	19,77	0,24	7,73	2,22	19,19	0,33	12,5
4	4,16	0,62	8,03	0,02	2,31	0,31	6,49	0,67	6,25
5	2,67	0,41	5,38	1,32	3,62	1,42	3,60	0,14	3,13
6	1,11	0,41	2,99	0,08	1,00	0,52	2,25	0,09	1,56
7	0,81	0,80	0,92	0,70	0,09		0,86	0,04	0,78
8	0,22		0,99	1,21			0,45	0,01	0,39
9			0,23	0,13			0,27	0,01	0,20
10			0,16	0,02			0,14	0,02	0,10

**Tabelle E.6:** Differenzen  $D$  und prozentuale Differenzen  $D_{\%}$  zu den Sollwerten der Werte aus Tabelle E.5 der BPA-Messungen. Maximalwerte sind hervorgehoben.

	Design 1				Design 2		Pipettiert	
	therm. SiO <sub>2</sub>		nat. SiO <sub>2</sub>		therm. SiO <sub>2</sub>			
	D	D%	D	D%	D	D%	D	D%
1	<b>20,8</b>	42	1,6	3	<b>14,5</b>	29	4,8	10
2	8,1	33	<b>8,6</b>	34	9,6	39	4,4	18
3	4,2	34	7,3	58	4,8	38	<b>6,7</b>	<b>54</b>
4	2,1	33	1,8	28	3,9	63	0,2	4
5	0,45	15	2,26	72	0,5	16	0,47	15
6	0,45	29	1,43	91	0,57	36	0,68	44
7	0,03	3	0,14	18	0,69	<b>88</b>	0,08	10
8	0,17	<b>44</b>	0,60	<b>153</b>			0,06	16
9			0,03	18			0,07	36
10			0,06	62			0,05	47
Mittel	4,53	29	2,38	54	4,94	44	1,76	25

**Tabelle E.7:** Ergebnisse der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie für rot und grün fluoreszierende 1  $\mu\text{m}$ -Partikel in PBS (Abb. 6.19). Dargestellt sind die Ergebnisse einer pipettierten Messreihe sowie zweier Tests eines Chips des Designs 1 mit 90 nm dickem  $\text{SiO}_2$ . Die Werte werden in % bezüglich der Gesamtanzahl der Partikel pro Ausgang angegeben.

	Pipettiert		Test 1			Test 2			Sollwert	
	grün	rot	grün	rot	Anzahl	grün	rot	Anzahl	grün	rot
<b>1</b>	50,42	49,39	91,46	7,77	3612	97,41	2,31	2051	50	50
<b>2</b>	74,37	25,51	91,16	7,48	3340	97,55	2,10	2030	75	25
<b>3</b>	86,96	12,90	92,57	6,79	2759	96,47	3,28	1700	87,5	12,5
<b>4</b>	93,10	6,76	97,98	1,84	2364	98,88	1,05	1886	93,75	6,25
<b>5</b>	96,89	3,04	98,90	0,94	2263	99,84	0,09	1799	96,88	3,13
<b>6</b>	98,64	1,25	97,63	1,93	2030	99,62	0,24	1859	98,44	1,56
<b>7</b>	99,31	0,60	94,18	3,10	1157	96,88	1,38	1851	99,22	0,78
<b>8</b>	99,54	0,36	98,82	0,51	1653	99,10	0,39	1388	99,61	0,39
<b>9</b>	99,69	0,22	98,69	0,48	1531	99,48	0,24	1198	99,80	0,20
<b>10</b>	99,84	0,10	97,98	1,89	1796	99,38	0,56	1473	99,90	0,10