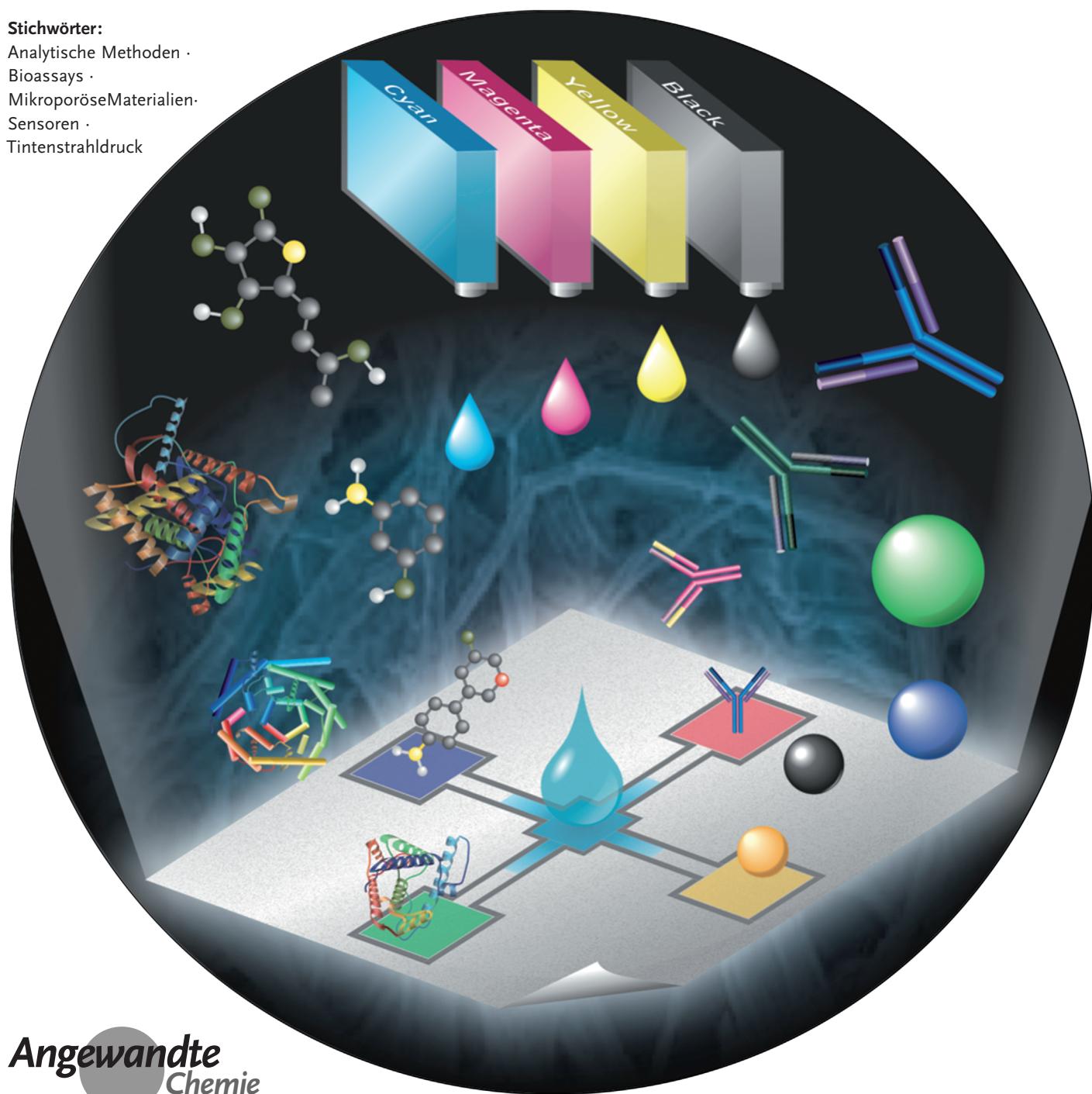


Papierbasierte tintenstrahlgedruckte Mikrofluidiksysteme für die Analytik

Kentaro Yamada, Terence G. Henares, Koji Suzuki und Daniel Citterio*

Stichwörter:

Analytische Methoden ·
Bioassays ·
Mikroporöse Materialien ·
Sensoren ·
Tintenstrahldruck



Die Möglichkeit zur schnellen, präzisen und reproduzierbaren Auftragung einer Vielzahl von funktionellen Materialien, einschließlich analytischer Testreagentien und Biomoleküle, hat den Tintenstrahldruck zu einem effektiven Verfahren für die Fabrikation von mikroanalytischen Systemen gemacht. Ein allgegenwärtiges Bürogerät, so einfach wie ein Desktop-Tintenstrahldrucker mit mehreren Tintenpatronen, kann zu diesem Zweck verwendet werden. Dieser Aufsatz diskutiert die Kombination von Tintenstrahldruck und Papier als Drucksubstrat zur Herstellung von papierbasierten Mikrofluidiksystemen für die Analytik (μ PADs), die zu einem rasch wachsenden neuen Gebiet der analytischen Chemie geworden sind. Nach einer Einführung in die Grundlagen von μ PADs und des Tintenstrahldruckes werden Themen wie die Erzeugung von Mikrofluidikstrukturen in Papier, die maßgeschneiderte Anordnung von Materialien sowie Funktionen, die ausschließlich durch Tintenstrahlaufladung analytischer Testreagentien erreicht werden können, diskutiert.

1. Einleitung

Papierbasierte Mikrofluidiksysteme für die Analytik, kurz μ PADs genannt und zum ersten Mal 2007 durch Whitesides und Mitarbeiter beschrieben, sind analytische Systeme mit mikrofluidisch strukturierten Papiersubstraten als Hauptkomponenten.^[1] Stark vereinfacht können diese als Papiervariante konventioneller Mikrofluidiksysteme oder aber als fortgeschrittene Version der klassischen Teststreifen betrachtet werden. Der Grundgedanke hinter μ PADs ist es, extrem kostengünstige, wegwerfbare, einfach zu handhabende analytische Systeme für die Anwendung unter limitierten Ressourcen zur Verfügung zu stellen, wie man sie in Entwicklungsländern, im Bereich der Feldanalytik oder in privaten Haushalten antrifft, wo die technische Infrastruktur limitiert ist und geschulte Experten nicht verfügbar sind. μ PADs sind im Idealfall unabhängige Systeme, in die sämtliche für einen analytischen Test notwendigen Komponenten (z.B. Probentransport, Probenvorbehandlung, Testreagenzien, Signalsystem) integriert sind (Abbildung 1). Obwohl die meisten Forschungsaktivitäten in Bezug auf μ PADs die medizinische Diagnostik zum Ziel haben, wo die Auswirkungen von Kostensenkungen und Vereinfachungen als besonders relevant gelten, kommen weitere Anwendungsgebiete, zum Beispiel die Umweltüberwachung, das Aufspüren von Explosivstoffen, oder das Screening von Lebensmitteln, kontinuierlich zu dieser Liste hinzu.^[2]

Die Hauptmotivation für das Ersetzen von Glas- oder Polymersubstraten herkömmlicher Mikrofluidiksysteme durch Papier ist das Bedürfnis nach einem kostengünstigen, im Überfluss vorhandenen Einwegmaterial.^[3] Darüber hinaus machen die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Zellulosepapier es zu einem äußerst vielseitigen Werkstoff für Mikrofluidiksysteme. Flüssigkeitstransport in μ PADs beruht vollständig auf Kapillarfluss, sodass keine externen Pumpen benötigt werden. Zusätzlich ermöglichen die chemische Zu-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	5385
2. Grundlagen	5386
3. Mikrofluidische Strukturierung von Papiersubstraten	5389
4. Strukturierung von Papier durch Tintenstrahldruck	5391
5. Auftragung von Testreagentien durch Tintenstrahldruck	5393
6. Zusammenfassung und Ausblick	5399

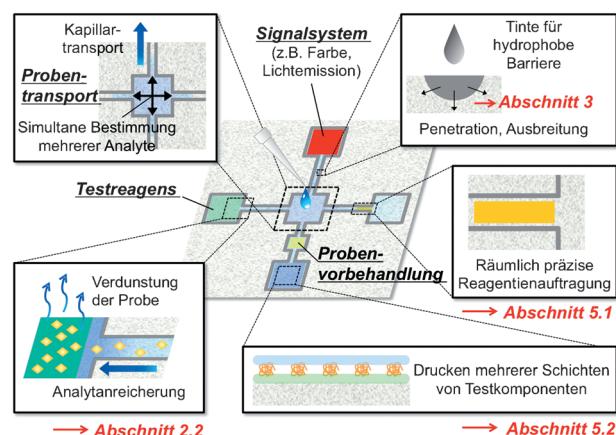


Abbildung 1. Veranschaulichung des multifunktionalen Charakters eines papierbasierten Mikrofluidiksystems für die Analytik (μ PAD).

sammensetzung und das große Oberfläche-Volumen-Verhältnis von Papier die einfache physikalische Immobilisierung von Reagentien, die für einen analytischen Test erforderlich sind. Diese Funktionen sind auch mit vermeintlichen „High-Tech“-Materialien nicht einfach erreichbar. Andererseits ist die Motivation für das Hinzufügen mikrofluidischer Funktionen zu klassischen Teststreifen die Erhöhung ihrer Leistung und Funktionalität. Die räumliche Trennung von Probeneinlass und Signalerkennung ermöglicht die Verteilung einer Probe auf verschiedene Tests, systemintegrierte Probenvorbehandlung und Zeitverzögerungen zur Inkubation –

[*] M. Eng. K. Yamada, Prof. Dr. T. G. Henares, Prof. Dr. K. Suzuki, Prof. Dr. D. Citterio
Department of Applied Chemistry, Keio University
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama 223-8522 (Japan)
E-Mail: citterio@applc.keio.ac.jp

um nur einige Möglichkeiten zu nennen, die mit Teststreifen nicht zur Verfügung stehen.

Die grundsätzliche Funktion eines Tintenstrahldruckers ist die Auftragung von mikrometergroßen Flüssigkeitströpfchen (Tinte) auf eine benutzerdefinierte Position eines Substrates. Da Drucktinten eine Vielzahl von Materialien über klassische Farbstoffe und Pigmente hinaus beinhalten können, hat sich der Tintenstrahldruck zu einem wichtigen Verfahren für die industrielle Massenproduktion^[4] und für gedruckte Elektronik entwickelt.^[5] Im Bereich der Chemie, Biologie und der Biowissenschaften kam das Tintenstrahldruckverfahren zuerst für die Auftragung von Nukleinsäuren bei der Herstellung von DNA-Chips routinemäßig zur Anwendung.^[6]

Das Wissen um die Druckbarkeit von Biomolekülen sowie das Interesse am Arbeiten mit Papiersubstraten sollten die Anwendung von Tintenstrahldruck für die Entwicklung von μPADs geradezu offensichtlich erscheinen lassen. Dennoch wurden die ersten μPADs durch photolithographische Strukturierung von Filterpapier, gefolgt von manueller Auftragung von Testreagentien erhalten.^[1] Im Jahr 2008 zeigte unsere Arbeitsgruppe zum ersten Mal, dass die Tintenstrahldrucktechnologie eine praktikable Vorgehensweise sowohl zur mikrofluidischen Strukturierung von Papiersubstraten als auch zum Auftragen von Testreagentien darstellt.^[7]

Obwohl noch relativ jung, wurde das Thema der papierbasierten Mikrofluidiksysteme für die Analytik bereits mehrfach in Aufsätzen behandelt, und die Liste der hier angegebenen Literaturzitate ist vermutlich nicht vollständig.^[2,3,8–23] Ebenso wurde eine Vielzahl von Aufsätzen über die Anwendung des Tintenstrahldruckes zur Materialauftragung verfasst.^[5,24–30]

Während sich frühere Arbeiten meist auf die analytischen Anwendungen von μPADs konzentrierten, ist es das Ziel

dieses Aufsatzes, die Grundlagen, Stärken und Schwächen der Anwendung des Tintenstrahldruckes zur Herstellung von μPADs zu diskutieren. Da die Forschung über tintenstrahldruckte μPADs ein sehr facettenreiches Arbeitsgebiet ist, finden sich hier Literaturzitate unter anderem aus Bereichen wie analytische Chemie, Tintenstrahldrucktechnologie, physikalische Chemie, Papierchemie, Materialchemie und Polymerchemie.

2. Grundlagen

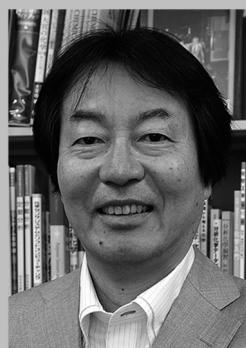
2.1. Von Mikrofluidiksystemen für die Analytik zu μPADs

Gefördert durch den technischen Fortschritt in der Mikrofertigung führte der Trend zur Miniaturisierung in den 1980er Jahren zur Entwicklung von analytischen Systemen, die als „μTAS“ (Mikrototalanalysesysteme)^[31–33] oder „Lab-on-chip“ (LOC)-Systeme bezeichnet werden. Die Integration von Verfahrensschritten wie Probentransport, Probenvorbehandlung, Trennung und Nachweis in eine einzige Plattform ist in Einklang mit dem Wunsch nach einfacheren und präziseren analytischen Tests. Als positiven „Nebeneffekt“ brachte die Miniaturisierung analytischer Systeme eine drastische Reduktion der Probevolumina mit sich und senkte den Verbrauch von Reagentien.

Aufgrund ihrer Effizienz, Geschwindigkeit und einfachen Bedienung wurden Mikrofluidiksysteme als ideal für die klinische Diagnostik außerhalb von Krankenhauslaborene vorgeschlagen.^[34] Doch trotz dieser Perspektive sind wir noch weit von der Situation entfernt, da jede Person den Gesundheitszustand zu Hause mithilfe eines LOC-Systems überwacht.^[35] Der Grund dafür ist, dass die zuvor aufgeführten



Kentaro Yamada erhielt seinen B. Eng. und seinen M. Eng. an der Keio Universität (2013 bzw. 2014). Gegenwärtig arbeitet er dort als Doktorand an der Entwicklung von papierbasierten tintenstrahldruckten Mikrofluidiksystemen für die Analytik.



Koji Suzuki promovierte 1982 an der Keio Universität. Dort erhielt er 1982 eine Fakultätsstelle als Forschungsassistent, wurde 1988 zum Assistenprofessor, 1993 zum Associate Professor und 1998 zum ordentlichen Professor befördert. Die Zeit von 1990–1992 verbrachte er als Gastprofessor an der ETH Zürich. Seit 2015 hält er die Position des Präsidenten der JSAC inne. In seiner Forschung befasst er sich mit chemischen und biochemischen Sensoren basierend auf funktionellen Molekülen.



Terence G. Henares promovierte 2008 an der Universität von Hyogo. Nach Postdoktoraten am Population Council Center für biomedizinische Forschung in New York und an der Osaka Prefectural Universität trat er seine Stelle als Projekt-Associate-Professor an der Keio Universität an. Seine Forschungsinteressen liegen im Bereich der Entwicklung von Mikrofluidiksystemen für die Analytik.



Daniel Citterio promovierte 1998 in Chemie an der ETH Zürich. Nach einem Postdoktorat an der Keio Universität arbeitete er ab 2002 als Oberassistent an der ETH. Im Anschluss an ein Nachdiplomstudium und eine Anstellung bei der Ciba Spezialitätenchemie kehrte er 2006 an die Keio Universität zurück. 2009 erhielt er dort eine Position als Associate Professor, und 2014 wurde er zum ordentlichen Professor für analytische Chemie befördert. Seine Forschungsinteressen sind die Entwicklung von kostengünstigen analytischen Systemen und von funktionellen Molekülen für chemische Sensoren.

Vorteile vieler Mikrofluidiksysteme für die Analytik nur teilweise in die Praxis umgesetzt wurden. Der Schritt weg vom Labortisch bleibt in vielen Fällen eine Herausforderung.^[36] Eine wesentliche Hürde für LOC-Systeme sind die Größe, Komplexität und die Kosten der Flüssigkeitshandhabung.^[37] Eine weitere ist die Erfordernis für den Benutzer, eine Vielzahl von Testreagentien hinzuzufügen.^[38]

Eine altbekannte Analysetechnik, die das Problem des Flüssigkeitstransportes auf eine sehr einfache Weise gelöst hat, ist die Papierchromatographie.^[39] Papier, ein mikroporöses hydrophiles Material, ist in der Lage, wässrige Flüssigkeiten wie ein Docht zu transportieren. Das erste Mal, dass diese Eigenschaft zur Kontrolle eines Flüssigkeitstransportes genutzt wurde, war im Fall eines durch eine Barriere aus festem Wachs mit Kanälen strukturierten Filterpapiers zur Vereinfachung der Papierchromatographie (Abbildung 2).^[40]

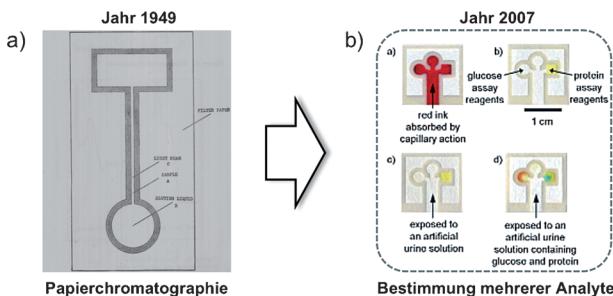


Abbildung 2. Bahnbrechende Arbeiten auf dem Gebiet papierbasierter Mikrofluidiksysteme für die Analytik: a) erstes mikrofluidisch strukturierte Filterpapier zur Papierchromatographie (modifiziert mit Genehmigung aus Lit. [40] Copyright 1949 American Chemical Society) und b) erstes μPAD für die simultane Bestimmung mehrerer Analyte (modifiziert mit Genehmigung aus Lit. [1]. Copyright 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim).

Obwohl Müller und Clegg mit dieser Publikation im Jahr 1949 den Grundstein zur Realisierung von Fluidiksystemen aus Papier gelegt hatten, dauerte es noch sechs Jahrzehnte bis das Konzept der papierbasierten Mikrofluidiksysteme für die Analytik, das mittlerweile zu einem florierenden Forschungsgebiet herangewachsen ist (Abbildung 3), eingeführt^[1] und mit der Bezeichnung „μPADs“ versehen wurde.^[41]

2.2. Konventionelle Mikrofluidik und μPADs: Ähnlichkeiten und Unterschiede

Die wichtigsten Gemeinsamkeiten sowohl herkömmlicher Mikrofluidiksysteme aus Glas- oder Polymersubstraten als auch solcher basierend auf Papier, sind der minimale Verbrauch an Reagentien und Probe und die Möglichkeit der gleichzeitigen Analyse mehrerer Substanzen. Die Unterschiede zwischen den beiden Systemen ergeben sich aus der Art der Mikrofluidikanäle. Während herkömmliche Mikrofluidiksysteme aus hohlen geschlossenen Kanälen bestehen, machen die papierenen Gegenstücke von porösen offenen Varianten Gebrauch. Beide Systeme beruhen auf laminarer Strömung von Flüssigkeiten.^[2] Vereinfacht kann ein

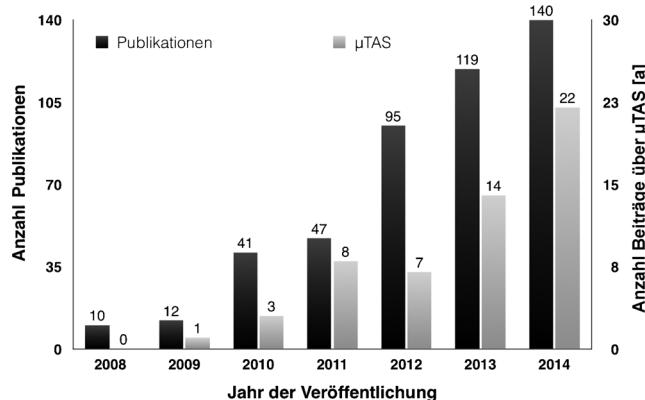


Abbildung 3. Anzahl Publikationen/Konferenzbeiträge zum Thema μPADs.^[a] Jährliche internationale Konferenz für miniaturisierte Systeme für Chemie und Biowissenschaften.

herkömmliches Mikrofluidiksystem als eine „einzige Kapillare“ betrachtet werden, in der das Probenvolumen durch die Abmessungen des Kanals bestimmt ist und in der Sub-Mikroliter-Größenordnung liegt. Die Analyse solch kleiner Volumina erfordert den Einsatz hochentwickelter Detektoren, zum Beispiel eines Fluoreszenzmikroskopes. Ferner wird ein Pumpensystem benötigt, falls Sub-Milliliter-Probenvolumina in einem kontinuierlichen Durchflussmodus analysiert werden. Dies erfordert in den meisten Fällen umfangreiche Instrumente und eine ausgebildete Fachperson für deren Betrieb. Dagegen können μPADs wegen ihrer porösen und offenen Kanäle vereinfacht als Systeme bestehend aus verschiedenen Kapillaren mit diversen Durchmessern betrachtet werden. Infolgedessen erfolgt eine kontinuierliche Flüssigkeitsströmung aufgrund der dochähnlichen Eigenschaften von Papier, während die stetige Verdampfung der Flüssigkeit zusätzlich als Unterdruckpumpe wirkt. Auf diese Weise lässt sich die Handhabung von Flüssigkeiten ohne Pumpen realisieren. Diese Art von dynamischem Flussverhalten kann zudem zur Probenanreicherung und Signalverstärkung eingesetzt werden.^[42] Ein Nachteil der Verwendung von Papiersubstraten ist die unspezifische Adsorption von Molekülen an Zellulose, welche zu einer Verminderung der Menge an Analyt in der Testzone führt und durch Kalibrierung kompensiert werden muss. Ferner kann noch festgehalten werden, dass die meisten μPADs mit sehr einfachen Detektionsmethoden auskommen (z.B. Farbreaktionen), für die sich alltägliche Geräte wie eine Kamera (z.B. Mobiltelefon, Smartphone) oder ein Scanner eignen.

2.3. Papiersubstrate

Filterpapier und Chromatographiepapier sind die am häufigsten verwendeten Substrate für μPADs. Sie bestehen aus reiner Zellulose, während viele andere Papierarten strukturverstärkende Zusätze enthalten,^[23] die möglicherweise einen negativen Einfluss auf analytische Tests haben. Oberflächenbeschichtungen können zum Beispiel die Diffusion von aufgetragenen Komponenten in die Papiermatrix verhindern. Aufheller zur Erhöhung der Weißheit verursachen

eine starke Hintergrundemission im Fall einer Fluoreszenzdetektion.^[43]

Dagegen werden Filterpapier und Chromatographiepapier nicht mit derartigen Zusätzen behandelt, und fast sämtliche Verunreinigungen des Rohmaterials (Lignin usw.) werden durch das vollständige Bleichen entfernt. Zellulose macht den Hauptbestandteil aus, mit einer Vielzahl von Hydroxygruppen (-OH) und einigen Carboxylgruppen (-COOH) an der Faseroberfläche.^[44] Diese können als Gerüste für die Immobilisierung von in μPADs benötigten Substanzen dienen. Es wurde berichtet, dass positiv geladene Verbindungen elektrostatisch an die leicht negativ geladene Oberfläche der Zellulose adsorbiert werden, während dies für nichtionische und anionische Substanzen nicht zutrifft.^[45] Darüber hinaus zeigen auch Proteine mit ihren kationischen Domänen leichte elektrostatische Wechselwirkungen mit Zellulose. Für eine robustere Fixierung von Biomolekülen wird oft auf die kovalente Bindung zurückgegriffen. Weil die Hydroxygruppen der Zellulose dazu unter milden Bedingungen nicht genügend reaktiv sind, wurden deren Aktivierung durch Derivatisierung zu Aldehyden^[46] oder Epoxygruppen,^[47] die Einführung von Poly(carboxybetain)^[48] gefolgt von EDC/NHS-Chemie^[49] und die Modifikation durch Divinylsulfon^[49] zur kovalenten Immobilisierung verschiedener Biomoleküle auf Papier demonstriert (Abbildung 4). In einigen Fällen verbinden diese „Gerüste“ nicht nur das Pa-

nachgezeichnet.^[50] Die folgenden Abschnitte fokussieren auf die Grundlagen des Tintenstrahldruckes, wie die Typen von Druckern und die Druckbarkeit von Tinten.

In Bezug auf die praktische Anwendung wird die Tintenstrahldrucktechnologie in zwei Hauptkategorien aufgeteilt, den „Drop-on-Demand“(DOD)- und den kontinuierlichen Tintenstrahldruck (CIJ). Sämtliche gewöhnlichen Desktop-Drucker und alle im Laborbereich eingesetzten Tintenstrahldrucksysteme beruhen auf der DOD-Technologie. Im Unterschied zum CIJ-Mechanismus mit einem kontinuierlichen Flüssigkeitsausstoß, erfolgt der Tintenausstoß nur „auf Wunsch“. Beim DOD-Tintenstrahldruck ist wiederum zwischen vier Operationsmodi zu unterscheiden: piezoelektrisch, thermisch, elektrostatisch und akustisch. Gegenwärtig kommen nur die piezoelektrischen und thermischen Verfahren routinemäßig zum Einsatz. Der Prozess des Tintenausstoßes für diese beiden DOD-Druckverfahren wird in Abbildung 5 gezeigt. Zunächst ist die Tinte in der Tintenkammer einer Druckzunahme ausgesetzt, welche durch die Deformation eines piezokeramischen Elementes (piezoelektrischer Druck; Abbildung 5a) oder die Expansion einer Dampfblase (thermischer Druck; Abbildung 5b) verursacht wird. Die rasche Expansion der Dampfblase wird durch das Überhitzen der Tinte durch einen etwa 2 µs langen Hitzeimpuls erreicht.^[51] Im Fall von wasserbasierten Tinten beträgt die Temperatur etwa 200–300°C.^[50] Sobald die Tinte ausgestoßen

ist, kollabiert die Dampfblase schlagartig, und das dadurch entstehende Vakuum führt zur automatischen Wiederauffüllung der Tinte in der Kammer aus dem Vorratsbehälter (ca. 80–300 µs Wiederauffüllzeit, abhängig vom Druckkopfdesign und den Tinteneigenschaften). Solch ein einzelner Tintenausstoßvorgang dauert schätzungsweise etwa 10 µs, was die Expansion und den Kollaps der Dampfblase einschließt.^[50]

Die Tinte ist eine essenzielle Komponente des gesamten Druckprozesses, und ihre Eigenschaften entscheiden über Erfolg oder Misserfolg. Ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften bestimmen die Auflösung, die Tröpfchengeschwindigkeit und die Zuverlässigkeit des Druckes. Um die praktische Druckbarkeit von Flüssigkeiten unter DOD-Bedingungen zu evaluieren, werden verschiedene mathematische Formulierungen wie die Reynolds-(Re), Weber(We)- und Ohnesorge(Oh)-Zahlen verwendet [Gleichung (1)].^[52–54]

$$Z = Oh^{-1} = Re/We^{1/2} = (\gamma \rho a)^{1/2}/\eta \quad (1)$$

Hier sind $Re = \nu \rho a / \eta$ und $We = \nu^2 \rho a / \gamma$, und ρ , γ und η stehen für die Dichte, Oberflächenspannung bzw. Viskosität der Flüssigkeit, ν ist die Tröpfchengeschwindigkeit und a der Düsenradius. Es wurde berichtet, dass für eine stabile Tröpfchenerzeugung ein Z -Wert von $0.67 < Z < 50$ nötig ist.^[54] Ein Z -Wert über 50 kann zur Bildung von Satellitentröpfchen

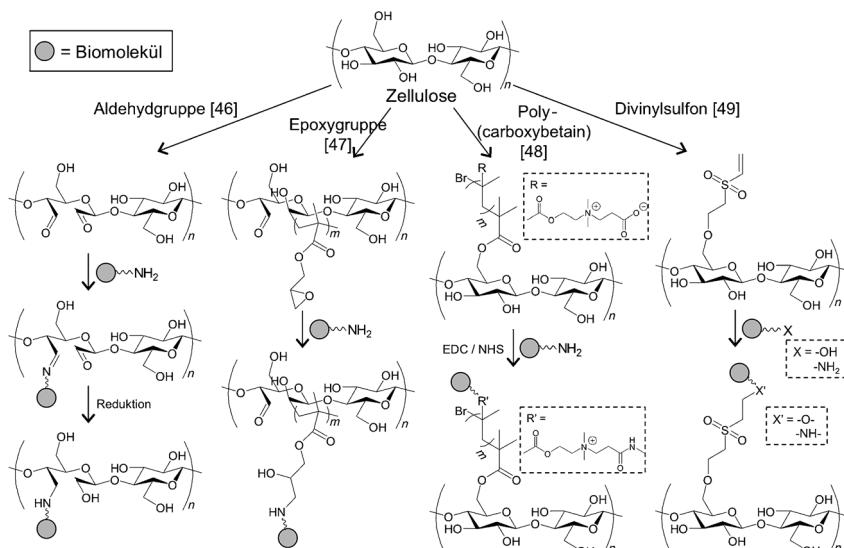


Abbildung 4. Strategien zur Aktivierung zellulärer Hydroxygruppen für die kovalente Bindung von Biomolekülen.

piersubstrat mit den zu immobilisierenden Reagentien, sondern sie reduzieren auch die unspezifische Adsorption von Biomolekülen an das Papier.

2.4. Grundkonzept und Methoden des Tintenstrahldruckes

Der historische Hintergrund des Tintenstrahldruckes in Bezug auf den technologischen Fortschritt wurde von Le

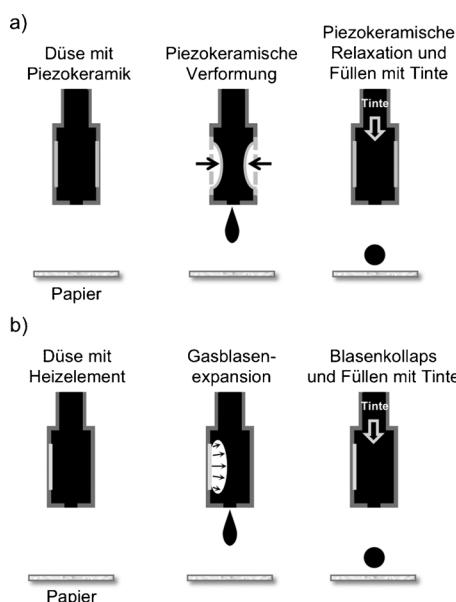


Abbildung 5. Funktionsprinzip des DOD-Tintenstrahldruckes: a) piezoelektrischer Druck und b) thermischer Druck.

führen, die auf die Primärtröpfchen folgen, was einen störenden Einfluss auf die Druckauflösung hat. Z-Werte unter 0.67 wiederum können eine starke viskose Dissipation zur Folge haben, was letztlich den Tröpfchenausstoß verhindert.^[55] Diese Vereinfachung wurde mehrfach modifiziert und könnte weiter angepasst werden, um die Druckbarkeit von Tinten mit schwierigeren rheologischen Eigenschaften zu evaluieren.^[53,54,56] Alle numerischen und experimentellen Verfahren sind darauf ausgerichtet, druckbare Tinten frei von Satellitentröpfchen zur Erzeugung klar definierter Druckmuster ohne Verstopfung der Druckdüse zu erhalten. Um die erforderlichen Tinteneigenschaften zu gewährleisten, ist es oft notwendig, die Viskosität und die Oberflächenspannung durch Zugabe von Modifiziermitteln anzupassen. Typischerweise beträgt die Größenordnung der Oberflächenspannung sowohl für thermische als piezoelektrische Drucktinten $28\text{--}40 \text{ mN m}^{-1}$.^[57] Das thermische Druckverfahren ermöglicht es mit geringeren Tintenviskositäten (minimal 1–1.5 cP, typischerweise < 3 cP) zu drucken, sodass oft einfache wässrige Lösungen ohne Modifiziermittel verwendet werden können. Dagegen erfordert die piezoelektrische Methode (minimal 5–10 cP, typischerweise < 20 cP) bei der Verwendung von wasserbasierten Drucktinten im Allgemeinen den Zusatz von viskositätsmodifizierenden Substanzen.^[27,58,59] Die hier angegebenen Größenordnungen sollten als Richtlinien und nicht als starre Bedingungen betrachtet werden. Es ist in jedem Fall zu empfehlen, Tinten an die erforderlichen Gegebenheiten anzupassen.

3. Mikrofluidische Strukturierung von Papiersubstraten

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Methoden zur Strukturierung von Kanälen in μ PADs kurz diskutiert, mit der Ausnahme des Tintenstrahldruckes, der im folgenden Abschnitt 4 behandelt wird. Abbildung 6 gibt einen Überblick über verschiedene Kanalfabrikationsprinzipien. Im einfachsten Fall, der hier nicht weiter diskutiert wird, erfolgt die Strukturierung durch Schneiden des Papiers^[60–62] (Abbildung 6a). Eine häufiger angewendete Methode ist die Behandlung mit einer hydrophoben Verbindung (Abbildung 6b). Die Ansätze zur hydrophoben Modifizierung lassen sich in indirekte und direkte Strukturierungsmethoden unterteilen. Indirekte Methoden beruhen auf der Verwendung einer Maske, um die Form der mikrofluidischen Kanalstruktur auf das Papier zu projizieren. In den direkten Methoden werden hydrophobe Verbindungen auf spezifische Stellen des Papiersubstrates aufgetragen, um die Flusskanäle zu definieren.

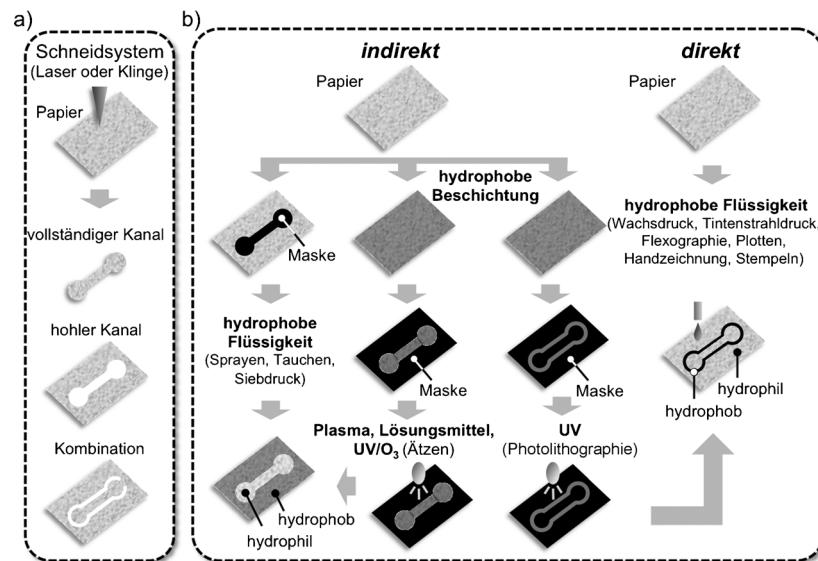


Abbildung 6. Methoden zur Strukturierung von Mikrofluidikkanälen in Papiersubstraten: a) mechanisches Schneiden von Papier und b) Behandlung mit hydrophoben Materialien.

Das Hauptziel bei der Fabrikation von Mikrofluidikkanälen in Papiersubstraten durch hydrophobe Behandlung ist die Erhaltung eines Kontrastes zwischen einer hydrophoben Barriere und einem hydrophilen Flusskanal. Die hydrophob imprägnierten Zonen bestimmen die Dimensionen des Kanals (Abbildung 6b). Die Porosität und die Oberflächeneigenschaften der Zellulosefasern sind zwei wichtige Merkmale für eine kovalente oder nichtkovalente hydrophobe Behandlung des Substrats. Die Porosität ermöglicht das Eindringen und Füllen der Hohlräume mit Flüssigkeit. In Zellulosenetzwerken existieren drei Arten von Poren: die Hohlräume zwischen den Fasern, das Lumen und die inhärenten Poren der Faserwände.^[23]

Eine Strategie zur Fabrikation einer hydrophilen Mikrostruktur in Papier ist das Füllen der Hohlräume mit einem hydrophoben Material, wodurch eine Barriere für wässrige Flüssigkeiten erhalten wird. Beispiele für dazu geeignete hydrophobe Materialien sind Feststoffe mit einer spezifischen Schmelztemperatur oder Lösungen hydrophober Polymere in organischen Lösungsmitteln. Im flüssigen Zustand können beide Materialien in das poröse Netzwerk eindringen. Eine hydrophobe Barriere entsteht, sobald das Material sich bei Raumtemperatur verfestigt oder das Lösungsmittel verdampft. Dieses Verfahren ist eine nichtkovalente Behandlung der Zellulose.

Eine weitere Möglichkeit zur Abgrenzung hydrophiler Kanäle in Papiersubstraten ist die kovalente Modifizierung der Zellulosefasern. Die Gegenwart von Hydroxy- (-OH) oder Carboxy-Gruppen (-COOH) ermöglicht eine chemische Modifikation^[63] – eine Eigenschaft, die häufig in der Papierherstellung genutzt wird. Eine Klasse häufig angewendeter Verbindungen sind die so genannten Leimungsmittel wie Alkylketendimere (AKD), Alkenylbersteinsäureanhydrid (ASA) oder Kolophonium-Harze.^[23] Dabei handelt es sich um hydrophobe Reagentien, welche die Oberflächenenergie der Zellulose verringern, was deren Wasserresistenz durch erhöhte Oberflächenhydrophobie verbessert.^[64] Insbesondere AKD wurde für die mikrofluidische Papierstrukturierung mittels Tintenstrahldruck verwendet (siehe Abschnitt 4).

In der Praxis kommen zur mikrofluidischen Strukturierung von μPADs verschiedene Techniken zum Einsatz, wie Photolithographie,^[1, 41, 65–68] Ätzen,^[7, 67, 69, 70] Handzeichnung,^[71–74] Eintauchen,^[75] Drucken,^[7, 70, 72, 74, 76–85] Stempeln^[86, 87] und Sprayen,^[88] wobei jedes Verfahren besondere hydrophobe Reagentien zur Erstellung hydrophober Barrieren verwendet (Tabelle 1).

Nachteile der Photolithographie sind der Kontakt des gesamten Papiersubstrates (einschließlich der Bereiche, die in hydrophile Kanäle strukturiert werden) mit Lösungsmitteln und hydrophoben Reagentien, sowie deren relativ hoher Verbrauch für die Behandlung der gesamten Papierfläche. Es war daher eine praktische Notwendigkeit, nach direkten Strukturierungsmethoden zu suchen, die ohne Masken auskommen. Dabei wird eine kleine Menge an hydrophobem Material nur auf spezifische Stellen aufgebracht, um eine

hydrophile Kanalstruktur abzugrenzen, während der Rest der Papierfläche unbehandelt bleibt.

Eine der meistverwendeten Methoden zur Erreichung eines minimalen Verbrauchs hydrophober Materialien ist das Drucken. In Bezug auf μPADs gibt es zahlreiche Eigenschaften, die das Drucken zu einer vielversprechenden Lösung machen: 1) anpassbar an Massenproduktion, 2) kosteneffizient, 3) reproduzierbar, 4) einfach. In letzter Zeit wurden mehrere Druckverfahren zu diesem Zweck angepasst, wie der Siebdruck,^[76, 85] die Flexographie^[79, 83] und der digitale Druck.^[7, 70, 72, 74, 77, 78, 80, 81, 84] Der digitale Druck erfreut sich großer Beliebtheit und verbreiteter Anwendung, da er den direkten Transfer von Bildinformation von einem Computer auf das Drucksubstrat ohne die kostspielige und zeitaufwendige Umwandlung von elektronischen Daten in Druckplatten, Masken oder Siebe ermöglicht. Der Bildtransfer vom Drucker auf die Papieroberfläche wird durch die digital gesteuerte, direkte Auftragung von Tinte erreicht. Unter den digitalen Druckverfahren werden der Wachs- und der Tintenstrahldruck aufgrund ihrer einfachen Nutzung und ihrer weit verbreiteten kommerziellen Verfügbarkeit zur Strukturierung von Papier bevorzugt. Verschiedene Arbeitsgruppen haben den Einsatz von Wachsdruck auf Filterpapier zur Herstellung von zwei- (2D) und dreidimensionalen (3D) Mikrofluidikstrukturen, einschließlich halb oder vollständig eingeschlossener Kanäle, aufgezeigt.^[74, 77, 81] Ein Wachsdrucker transferiert geschmolzenes Wachs auf das Papiersubstrat, wo sich dieses bei Kontakt sofort verfestigt. Dies verhindert offensichtlich das Eindringen des hydrophoben Wachses in das Zellulosenetzwerk. Doch durch die Hitzebehandlung (>120°C) des bedruckten Papiers in einem Ofen oder auf einer Heizplatte verflüssigt sich der aufgetragene Wachs und dringt in die Hohlräume des Zellulosenetzwerkes ein, wo es bei Raumtemperatur schließlich eine feste Wachsbarriere bildet.

Der einfache und schnelle Wachsdruck ist eine hervorragende Technik, um hydrophobe Barrieren zur Abgrenzung von Mikrofluidikstrukturen in Papiersubstraten zu erhalten. Die Fabrikation eines μPADs ist jedoch mit der Erzeugung von Mikrofluidikstrukturen noch nicht vollständig. Um ein funktionsfähiges analytisches System zu erhalten, sind weitere funktionelle Materialien notwendig, die erst analytische

Tabelle 1: Hydrophobe Materialien zur mikrofluidischen Strukturierung von Papiersubstraten.

Technik	Hydrophobes Material
<i>Indirekte Strukturierung</i>	
Fotolithographie	SU-8-Fotolack, ^[1, 41, 65, 66] Octadecyltrichlorsilan, ^[67] Acryloxy-terminierte/Acrylat-basierte Polymermischung ^[68]
Ätztechnik	Polystyrol, ^[7] Octadecyltrichlorsilan, ^[67] Alkylketendimer, ^[69] hydrophobes Sol-Gel ^[70]
Sprayen	Acryllack ^[88]
Siebdruck	Polystyrol, ^[76] Wachs ^[85]
Eintauchen	Wachs ^[75]
<i>Direkte Strukturierung</i>	
Wachsdruck	Wachs ^[74, 77, 81]
Plotten	Poly(dimethylsiloxan) ^[82]
Flexographie	Polystyrol, ^[79] Poly(dimethylsiloxan) ^[83]
Handzeichnung	Wachsmalstift, ^[71, 74] wässriger Marker, ^[72] Permanent-Marker ^[73]
Stempeln	Paraffin, ^[86] Wachs ^[87]
Tintenstrahldruck	Polystyrol, ^[7] hydrophobes Sol-Gel, ^[70] Silikon, ^[78] Alkylketendimer, ^[80] Polyacrylat ^[84]

Funktionen wie Probenvorbehandlung, Trennung und Signalerzeugung ermöglichen. Daher ist der Einsatz eines einzigen Druckverfahrens, das die Auftragung von Materialien sowohl zur Strukturierung hydrophiler Kanäle als auch zur Realisierung analytischer Tests ermöglicht, ein wesentlicher Vorteil bei der effizienten Fabrikation vollständiger μ PADs.

4. Strukturierung von Papier durch Tintenstrahl-druck

4.1. Tintenstrahl-Ätzung

Unsere Arbeitsgruppe hat zum ersten Mal die sequenzielle Verwendung von Tintenstrahldruck sowohl für die Strukturierung von Mikrofluidikkanälen als auch für die Auftragung von Testreagentien bei der Herstellung eines papierbasierten Systems zur simultanen Bestimmung mehrerer Analyte aufgezeigt (Abbildung 7).^[7] Das Herzstück

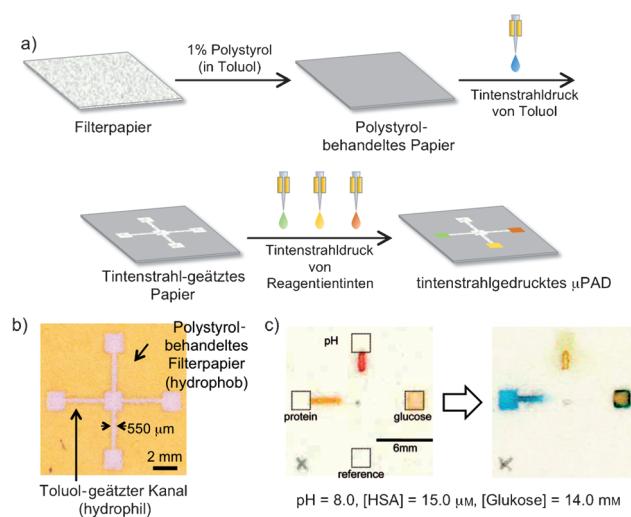


Abbildung 7. Kanalstrukturierung durch Tintenstrahl-Ätzung: a) Fabrikationsprinzip, b) Foto eines in Filterpapier strukturierten Kanals und c) Farbreaktion nach Probenauftrag (modifiziert mit Genehmigung aus Lit. [7]. Copyright 2008 American Chemical Society.)

dieser μ PAD-Strukturierungstechnik ist die „Tintenstrahl-Ätzung“ – ein Konzept, das zuerst für das Ätzen von Löchern und Rinnen in Polymerfilmen aufgezeigt wurde.^[89,90] Angewendet auf ein Filterpapiersubstrat beruht die Tintenstrahl-Ätzung auf der Auflösung eines festen Polymermaterials durch lokalen Kontakt mit der aufgedruckten Lösungsmitteltinte, die das ursprünglich hydrophile Zellulosenetzwerk wieder freilegt (Abbildung 7a). Bei diesem Verfahren wird das Papiersubstrat zunächst in ein vollständig hydrophobes Material umgewandelt, indem es in eine Polystyrollösung (1.0 Gew.-% in Toluol) eingelegt und dann während 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet wird. Anschließend werden auf dem hydrophoben Papier durch Tintenstrahldruck mit pikolitergroßen Toluoltröpfchen etwa 550 µm breite Kanäle erzeugt (Abbildung 7b). Es wurde beobachtet, dass 10 Druck-

vorgänge zu einer ausgezeichneten Strukturierungsreproduzierbarkeit in Bezug auf die Kontrolle der Größe der Strukturen und der homogenen Kanalbenetzbareit führen. Während diese durch Tintenstrahl-Ätzung strukturierten μ PADs die simultane Analyse von Protein, Glukose und pH ermöglichten (Abbildung 7c)^[7] und später auch noch auf einen Immunassay angewendet wurden (beide Beispiele werden im Abschnitt 5 detailliert behandelt),^[91] wurde das als Tinte verwendete Toluol aufgrund seiner Brennbarkeit und Klassifizierung als flüchtige organische Verbindung (VOC) als nachteilig in Bezug auf die Nutzerfreundlichkeit und Umweltverträglichkeit beurteilt. Daher wurde der Fokus auf einen umweltfreundlicheren Ansatz zur Tintenstrahl-basierten μ PAD Fertigung verlagert. Als erstes wurde versucht, Toluol durch ein weniger schädliches Lösungsmittel wie Limonen zu ersetzen (Bestandteil von Entfetttern und gewisser Kosmetika), aber die dadurch erhaltenen Mikrofluidikkanäle zeigten keine klare Struktur. Mit seinem im Vergleich zu Toluol wesentlich geringeren Dampfdruck blieb das gedruckte Limonen zu lange in Kontakt mit dem Polystyrol, was zu einem unkontrollierten und ausgedehnten Ätzen des hydrophoben Polymers führte. Außerdem benötigten sowohl Toluol als auch Limonen einen speziellen Drucker, da deren hohe Lösungskraft schädlich für die Plastikteile in Desktop-Tintenstrahldruckern ist. Ferner ist die Tintenstrahl-Ätzung mit den gleichen Nachteilen wie die zuvor diskutierte Photolithographie oder andere auf Masken beruhende Ansätze behaftet, weil eine vergleichsweise große Menge an hydrophobem Material zur vollständigen Hydrophobisierung des gesamten Papiersubstrates benötigt wird. Schlussendlich, in Analogie zur Photolithographie, kommt das gesamte Papiersubstrat einschließlich der zum Schluss hydrophilen Mikrofluidikstrukturen während des Strukturierungsverfahrens in Kontakt mit Lösungsmitteln und anderen Chemikalien, was möglicherweise einen unbekannten Einfluss auf die analytischen Tests mit sich bringt, für welche die Systeme bestimmt sind.

4.2. Direkter Tintenstrahldruck hydrophober Barrieren

Um die genannten Nachteile zu überwinden, wurde eine UV-härtende Tinte für die Kanalstrukturierung mit einem Desktop-Tintenstrahldrucker entwickelt (Abbildung 8).^[84] Bei dieser Tinte handelt es sich um eine Polymervorläuferlösung bestehend aus Octadecylacrylat (Monomer), 1,10-Decandioldiacrylat (Vernetzer und Lösungsmittel) und 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon (Photoinitiator). Neben ihrem stark hydrophoben Charakter zeigen die mit langen Alkylketten substituierten Acrylate sehr geringe Flüchtigkeit. Dies verhindert eine rasche Verdampfung, was genügend Zeit für das Eindringen in das Papiersubstrat und für die Polymerisation ohne Verlust der UV-härtenden Tinte gibt. Die Polymerisation wird durch Bestrahlung mit UV-Licht (60 s) ausgelöst, was zur Bildung eines hydrophoben interpenetrierenden Polymers innerhalb des Zellulosenetzwerkes führt. Ähnlich wie bei dem zuvor erörterten Wachsdruckansatz ist ein einziger Druckzyklus zur Tintenauftragung erforderlich, bei welchem das Tintenvolumen durch Variationen der

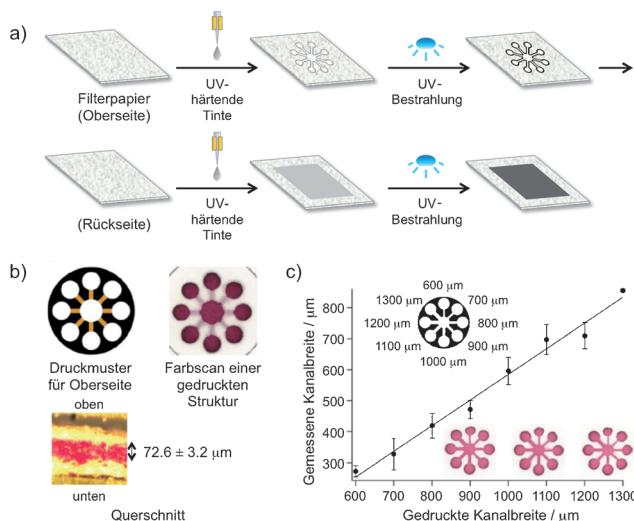


Abbildung 8. Strukturierung von Mikrofluidikkanälen mittels UV-härtender Tintenstrahlalte: a) Fabrikationsprinzip, b) 3D-gedruckter Kanal in einem einzigen Blatt Filterpapier, und c) Korrelation zwischen gedruckter und experimentell gemessener Kanalbreite. Modifiziert aus Lit. [84] mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Transparenz graphischer Elemente zur Abgrenzung der Mikrofluidikkanäle mit der Computersoftware festgelegt wird.

Die Fabrikationsmethode ist in Abbildung 8a dargestellt. Beide Seiten des Papiers werden mit der UV-härtenden Tinte bedruckt, was die Erstellung verschiedener Kanalstrukturen wie Halbkanäle oder 3D-Kanäle in einem einzigen Blatt Papier ermöglicht (Abbildung 8b). Mit diesem Strukturierungsverfahren wurden schmale hydrophile Kanäle mit nur 272 μm Breite erreicht (Abbildung 8c). Derartige Mikrofluidikstrukturen behalten ihre Probentransportfunktion über mindestens 6 Monate bei Lagerung bei Raumtemperatur und über mindestens 72 h bei 50°C. Diese Strukturierungsme-
thode wurde erfolgreich für einen Enzymassay (H_2O_2) und einen Antikörper-freien Bioassay von Tränenflüssigkeit (Lactoferrin) angewendet.^[84,92]

Neben UV-härtenden Tinten wurden andere Tinten zur direkten Strukturierung von Kanälen mittels Tintenstrahl-druck eingesetzt. Dazu gehören Alkyketendimer (AKD),^[80,93,94] Silikon,^[78] hydrophobes Sol-Gel^[70] und wässrige Fluoracryl-Copolymer-Dispersionen.^[95] Darunter ist AKD die am einfachsten verwendbare Tinte, da diese Substanz, wie bereits in Abschnitt 3 erwähnt, eine lange Ge-
schichte als Papierleimungsmittel hat und daher kommerziell erhältlich ist. Wie in Abbildung 9a gezeigt, reagiert die Lacton-Gruppe von AKD durch Veresterung mit den Hydroxygruppen der Zellulose, was in einer Trennung zwischen hydrophoben (AKD-bedruckten) und hydrophilen Zonen (unbehandeltes Filterpapier) auf dem μPAD resultiert. Zum Auftragen durch Tintenstrahldruck wird AKD in Heptan gelöst, das wegen seines hohen Dampfdrucks nach dem Druckvorgang rasch verdampft. Den Abschluss bildet eine 8-minütige Hitzebehandlung bei 100°C. Nach diesem Verfah-
ren wurden Mikrofluidikkanäle mit etwa 300 μm Breite strukturiert (Abbildung 9b).

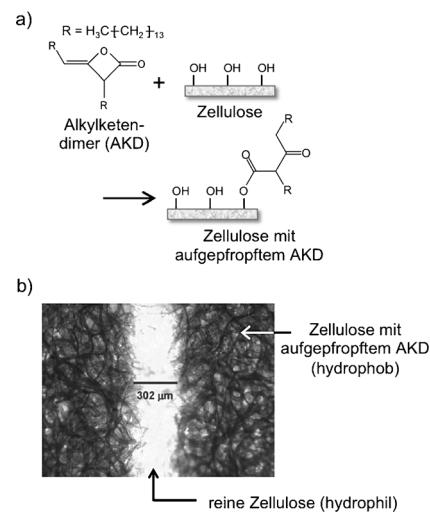


Abbildung 9. Tintenstrahlgdrucktes AKD zur Kanalstrukturierung: a) Aufpropfen von AKD auf Zellulose und b) elektronenmikroskopische Aufnahme eines gedruckten Kanals (modifiziert mit Genehmigung aus Lit. [80]. Copyright 2010 Elsevier B.V.).

Sämtliche diskutierten tintenstrahlbasierten Strukturierungsansätze führen zu hydrophoben Barrieren, die vollständig kompatibel mit wässrigen Probeflüssigkeiten sind. Einzelne echte Proben können jedoch Reagentien enthalten, welche die Funktion der Barrieren beeinträchtigen könnten. Zum Beispiel wurde im Zusammenhang mit der Analyse von Zell-Lysaten mit relativ hoher Konzentration an Tensiden berichtet, dass AKD-gedruckte Barrieren durchbrochen werden.^[70,78] Undichte tritt auch bei wachsgedruckten Strukturen auf.^[96] Im Fall von tintenstrahlgdruckten Barrieren auf der Basis der zuvor beschriebenen UV-härtenden Tinte wurde Undichte gegenüber Lösungen mit Oberflächenspannungen unterhalb 30 mN m^{-1} beobachtet.^[84] Dagegen be-wahren Barrieren aus tintenstrahlgdrucktem Silikon oder hydrophobem Sol-Gel-Methylsilsesquioxan (MSQ) ihre Integrität auch in der Gegenwart von Tensiden und verschie-denen organischen Lösungsmitteln.^[70,78]

Dieser Abschnitt hat gezeigt, dass sich das Tintenstrahl-druckverfahren als eine Methode zur Erstellung von Mikrofluidikstrukturen in μPADs etabliert hat. Sämtliche vorge-stellten Ansätze haben ihre Stärken und Schwächen in Bezug auf Geschwindigkeit, Einfachheit, erreichte Auflösung, Ver-fügbarkeit von Reagentien, verwendbare Druckertypen und die chemische Beständigkeit von Barrieren. Daher sollte man diejenige Methode auswählen, die am geeignetsten für eine spezielle Anwendung und den verfügbaren Druckertyp ist. Es muss an dieser Stelle auch gesagt werden, dass zurzeit keiner der tintenstrahlbasierten Ansätze in Bezug auf Geschwin-digkeit im Rahmen von Laborversuchen mit dem Wachs-druck konkurrieren kann. Die Möglichkeit, zusätzliche Funktionen per Tintenstrahldruck auf einen μPAD aufzu-bringen, ist jedoch ein sehr starkes Argument für diese Drucktechnik. Dies kommt insbesondere auch daher, dass sich der Tintenstrahldruck von verschiedenen funktionellen Materialien bereits lange vor der Entwicklung modernerer μPADs etabliert hat.^[28] Somit ist es naheliegend, die Erstel-lung von Fluidikstrukturen auf Papier mit der Auftragung

Tabelle 2: Allgemeine analytische Tests für tintenstrahlgedruckte μPADs.

Testtyp	Gedrucktes funktionelles Material	Zielanalyt	Tintenzusammensetzung	
			thermisch	piezoelektrisch
Klassischer Farbindikator	Chromogener Farbstoff	Ionen, Proteine	Wasser (Puffer)	Wasser (Puffer), viskositätsmodifizierende Substanz, ^[a] Tenside ^[b]
Immunassay	Antikörper	Antigen	Puffer	Puffer, viskositätsmodifizierende Substanz, Tenside
Enzymassay	Enzyme	Metabolit	Puffer	Puffer, viskositätsmodifizierende Substanz, Tenside

[a] Glycerol und Glykole sind typische Beispiele viskositätsmodifizierender Substanzen. [b] Triton X-100 ist ein Beispiel eines Tensids (nichtionisch) zur Anpassung der Oberflächenspannung der Tinte.

anderer funktioneller Materialien unter Verwendung einer einzelnen Drucktechnik zu vereinen.

5. Auftragung von Testreagentien durch Tintenstrahldruck

In diesem Abschnitt wird die Anwendung des Tintenstrahldruckes im Zusammenhang mit der Auftragung von Testreagentien diskutiert. Ein Überblick über allgemeine

Testmethoden, gedruckte funktionelle Materialien und deren allgemeine Tintenzusammensetzung ist in Tabelle 2 zusammengestellt. Die aufgeführten drei grundsätzlichen Testmethoden repräsentieren nahezu alle chemischen oder biochemischen Tests, die gegenwärtig für tintenstrahlgedruckte μPADs bekannt sind. Dies zeigt, dass die Mehrheit der μPADs auf etablierten Testprinzipien beruht.

Tabelle 3 gibt eine detaillierte Übersicht über analytische Systeme basierend auf Papier, bei denen Tintenstrahldruck mindestens in einem Fabrikationsschritt involviert ist: ent-

Tabelle 3: In der Fachliteratur vorgestellte Anwendungen von tintenstrahlgedruckten (μ)PADs.

Analyt	Gedruckte Struktur	Detektionsmodus	Detektor	Drucker	Analytische Leistungsmerkmale ^[d,e]	Lit.
pH, Glukose, Protein	hydrophobe Barriere Testzone (Chromogene, Enzyme)	Colorimetrie	Scanner	PicoJet-2000 ^[a]	pH: 5–9, Glukose: 2.8–28 mM, humanes Serumalbumin: 0.46–46 µM	[7]
pH humanes IgG	hydrophobe Barriere Test-/Kontrolllinie (Antikörper, Antigen)	Colorimetrie	Scanner	PicoJet-2000 ^[a]	humanes IgG: $\leq 10 \text{ ng mL}^{-1}$	[91]
Maus IgG	Testzone (Kieselerde-Sol-Gel-Schicht mit verkapseltem Enzym)	Colorimetrie	Digitalkamera, Smartphone-Kamera	Dimatix DMP-2800 ^[a]	Paraoxon: 100 nM , Aflatoxin B1: 30 nM	[114, 115]
Paraoxon, Ben-diocarb, Carbaryl, Malathion	Testzone (Kieselerde-Sol-Gel-Schicht mit verkap-seltem Enzym oder Chromogen)	Colorimetrie	Digitalkamera	Dimatix DMP-2800 ^[a]	Paraoxon: 1 nM , Ben-diocarb: 1 nM , Carbaryl: 10 nM , Malathion: 10 nM	[116]
E. coli BL21	hydrophobe Barriere	Colorimetrie	Digitalkamera, Scanner	Dimatix DMP-2800 ^[a]	E. coli BL21: 20 cfu mL⁻¹ ^[f]	[118]
E. coli O157:H7	Testzone (Kieselerde-Sol-Gel Schicht, Chromogene, Oxidationsmittel)	Colorimetrie	Digitalkamera, Scanner	Dimatix DMP-2800 ^[a]	E. coli O157:H7: 5 cfu mL⁻¹ ^[f]	
Hg ²⁺ , Ag ⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , Cr ⁴⁺ , Ni ²⁺	hydrophobe Barriere, Testzone (Kieselerde-Sol-Gel-Schicht mit verkap-seltem Enzym, Chromogene)	Colorimetrie	Digitalkamera, Scanner	Dimatix DMP-2800 ^[a]	Hg ²⁺ : 0.001 , Ag ⁺ : 0.002 , Cu ²⁺ : 0.020 , Cd ²⁺ : 0.020 , Pb ²⁺ : 0.140 , Cr ⁴⁺ : 0.150 , Ni ²⁺ : 0.230 ppm	[117]
ATP*	Testzone (Kieselerde-Sol-Gel-Schicht mit verkapseltem Enzym)	Geruch	menschliche Nase	Dimatix DMP-2800 ^[a]	1.16 µM ^[g] (in Puffer), 1.36 µM ^[g] (in Orangenpunsch)	[126]
pH, H ₂ O ₂	hydrophobe Barriere Test Zone (Enzyme, Chromogene)	Colorimetrie	Scanner	Epson PX-101 ^[b]	pH: 4–9, H ₂ O ₂ : 14.4 µM	[84, 127]
Lactoferrin	hydrophobe Barriere Vorbehandlung/Assay-Bereich (Carbonat, Metall)	Fluoreszenz	UV-Handlampe, Digitalkamera	Epson PX-105 ^[b] , Dimatix DMP-2831 ^[a]	umfasst 0.63–2.9 mg mL ⁻¹ (0.30 mg mL⁻¹)	[92]

Tabelle 3: (Fortsetzung)

Analyt	Gedruckte Struktur	Detektionsmodus	Detektor	Drucker	Analytische Leistungsmerkmale ^[d,e]	Lit.
flüchtige primäre Amine	Sensorpunkte (farbstoffbeladene Nanopartikel)	Colorimetrie	Scanner	Dimatix DMP-2831 ^[a]	Unterscheidung von <i>n</i> -C _n H _{2n+1} NH ₂ (<i>n</i> =1–7)	[128]
Nitrit, ALP*	hydrophobe Barriere Testzone (Enzym, Chromogen)	Colorimetrie	Scanner	Canon Pixma ip4500 ^[e]	Nitrit (NO ₂ ⁻): 0–5 mM	[80]
DBAE*, NADH*	hydrophobe Barriere	Elektrochemilumineszenz	Smartphone-Kamera	Canon Pixma ip4500 ^[c]	DBAE: <u>3 μM</u> –5 mM (0.9 μM), NADH: <u>0.2–10 mM</u> (200 μM)	[129]
Nitrit, Nitrat	hydrophobe Barriere	Colorimetrie	Scanner	Canon P4700 ^[c]	Nitrit (NO ₂ ⁻): 10–150 μM (1.0 μM , LOQ 7.8 μM), Nitrat (NO ₃ ⁻): 50–1000 μM (19 μM , LOQ 48 μM)	[94]
Nitrit, Harnsäure	hydrophobe Barriere	Colorimetrie	Scanner	Canon Pixma ip4500 ^[c]	Nitrit: <u>0–1250 μM</u>	[130]
Reaktives Phosphat	hydrophobe Barriere	Colorimetrie	Scanner	Canon P4700 ^[c]	0.2–10 mg L ⁻¹ P (0.05 mg L⁻¹ P , LOQ 0.16 mg L ⁻¹ P)	[131]
metabolische flüchtige Komponenten aus Lebensmitteln	Testzone (fluoreszierende Oligomere)	Fluoreszenz	Hg-Lampe, Epifluoreszenzmikroskop	HP Deskjet F4280 ^[c]	Überwachung von Fleisch, Milchprodukten, Früchten, Getreide, verderbendem Gemüse, reifenden Früchten	[43]
phenolische Komponenten	Testzone (Polymerschicht mit verkapseltem Enzym)	Colorimetrie	Scanner	Dimatix DMP-2800 ^[a]	BPA, <i>p</i> -Cresol: <u>1–200</u> , Dopamine, Catechol: <u>1–300</u> , Phenol: <u>1–400</u> , <i>m</i> -Cresol: <u>1–500 μg L⁻¹</u> (0.86 μg L⁻¹)	[120]
hCG*	physikalische Barriere	Colorimetrie	Digitalkamera	SLT0505-HKF ^[a]	1 ng mL⁻¹ in Pufferlösung, 4 ng mL⁻¹ in Urinprobe	[132]
Rhodamin 6G, Kokain, Heroin, Malathion, BPE*	hydrophobe Barriere Raman-Verstärkerpunkt (Silber/Gold-Nanopartikel)	Raman-Spektroskopie	tragbares Spektrometer	Epson Workforce 30 ^[b]	Rhodamin 6G: 10 fmol , Kokain: 15 ng , Heroin: 9 ng , Malathion: 413 pg , BPE: 1.8 ppb	[133]–[135]
2, 4, 6-Trinitrotoluol	Raman-Verstärkerpunkt (Silber-Nanopartikel)	Raman-Spektroskopie	Raman-Spektrometer	keine Details verfügbar	1.6 × 10⁻¹⁷ g cm⁻²	[136]
Rhodamin 6G, Malachitgrün, Iprodione	Raman-Verstärkerpunkt (Reduziermittel für Gold-Nanopartikel-Vorläufer)	Raman-Spektroskopie	tragbares Spektrometer	keine Details verfügbar	Malachitgrün: 1 nM , Iprodione: 10 μM	[137]
2, 4, 6-Trinitrophenol	Testzone (fluoreszierende Nanostäbchen)	Fluoreszenz	UV-Lampe, Digitalkamera	HP Deskjet 1000 ^[c]	5–40 μM (0.74 μM) 0.45 ng mm⁻² (visuelle Inspektion)	[138]
flüchtige organische Verbindungen	Testzone (Chromogen)	Colorimetrie, Fluoreszenz	UV-Lampe, Digitalkamera, Mikroskop	HP Deskjet D2360 ^[c]	Unterscheidung von 10 organischen Lösungsmitteldämpfen	[139]
Morphin	Test-/Kontrolllinie (Antikörper)	Colorimetrie	Scanner	Dimatix DMP-2831 ^[a]	1 ng mL⁻¹ (qualitative LOD durch visuelle Inspektion)	[106]
anionisches Polymer, kationische Tenside	Testzone (Chromogen und Kofaktor)	Colorimetrie	Digitalkamera	keine Details verfügbar	anionisches Polymer, kationische Tenside: ≤ 1 mM	[140]
Glukose	Testzone (Enzyme)	Colorimetrie	Spektrophotometer	Epson ME1+ ^[b]	0–100 mM in Urin	[121]
<i>E. coli</i> XL1, <i>B. subtilius</i>	Testzone (Enzyme und Substrate)	Colorimetrie	Scanner	Epson Artisan 50 ^[b]	<i>E. coli</i> XL1, <i>B. subtilius</i> : 10³ cfu (qualitative LOD durch visuelle Inspektion)	[101]

[a] Piezoelektrischer Labordrucker. [b] Piezoelektrischer Desktop-Tintenstrahldrucker. [c] Thermischer Desktop-Tintenstrahldrucker. [d] Unterstrichene Werte zeigen den linearen Bereich. [e] Fettgedruckte Werte beziehen sich auf die Nachweisgrenze (LOD). [f] Im Fall der Kombination mit immunmagnetischer Trennung zur Vorkonzentration. [g] BET-Wert („best estimated threshold“). *ATP: Adenosintriphosphat, ALP: Alkalische Phosphatase, DBAE: 2-(Dibutylamino)ethanol, NADH: Nikotinamidadenindinukleotid, hCG: menschliches chorionisches Gonadotropin, BPE: 1,2-Bis(4-pyridyl)-ethylen.

weder zur mikrofluidischen Strukturierung, zur Auftragung analytischer Testkomponenten oder zu beiden. In einigen nicht weiter diskutierten Tabelleneinträgen spielt der Tintenstrahldruck nur eine Nebenrolle in der Fabrikation von μ PADs. Einige nichtmikrofluidische PADs wurden in Tabelle 3 aufgenommen, wenn es als nützlich erachtet wurde, um die besonderen Möglichkeiten und Vorteile des Tintenstrahldruckes zu veranschaulichen. Andererseits wurden μ PADs mit gedruckten Elektroden für rein elektrochemische Sensoren ausgeschlossen, da diese besser im Zusammenhang mit gedruckten elektronischen Strukturen diskutiert werden.

Eine wichtige Schlussfolgerung aus Tabelle 3 ist die Tatsache, dass tintenstrahlgedruckte (μ)PADs eine breite Palette von analytischen Anwendungen abdecken. Da der Tintenstrahldruck kompatibel mit einer Reihe von Materialien ist, lässt sich dessen Anwendung auf (μ)PADs gut mit den Anwendungsbereichen von μ PADs im Allgemeinen vergleichen (z.B. biomedizinische, umweltrelevante oder Lebensmittelqualitätsassays). Die Tatsache, dass die Tinte einem Hitzeimpuls ausgesetzt ist, hat einige Bedenken beim Arbeiten mit empfindlichen Biomolekülen im thermischen Druckverfahren erregt, aber es wurde experimentell nachgewiesen, dass dies nicht notwendigerweise ein Problem ist.^[59,97-99] Andererseits wurde darüber berichtet, dass die beim piezoelektrischen Tintenausstoßverfahren auftretenden großen Scherkräfte eine Ursache von Proteinschädigungen sein können.^[100] Daher ist eine experimentelle Abklärung von Fall zu Fall erforderlich.

Die wichtigste Stärke des Tintenstrahldruckes als Verfahren zur Auftragung von Komponenten analytischer Tests liegt in seiner Flexibilität und Präzision. Drei besondere Vorzüge des Tintenstrahldruckes mit Bezug auf μ PADs, die nicht so leicht durch andere Ansätze erzielt werden können, werden hier kurz eingeführt, bevor sie detaillierter im Zusammenhang mit Beispielen in den folgenden Abschnitten separat behandelt werden:

- 1) Präzise Auftragung und Anordnung von Reagentien in pikolitergroßen Tröpfchen von Reagentientinte zur Realisierung klar definierter Strukturen mit hoher räumlicher Präzision über einen weiten Bereich (μm bis cm).
- 2) Wiederholtes Drucken auf ein und dieselbe identische Zone (Mehrschichtdruck). Ein Austausch der Tinte zwischen Druckzyklen ermöglicht das Auftragen von verschiedenen Materialien in einer Anordnung ähnlich der Schicht-um-Schicht(LbL)-Methode.
- 3) Jeder einfache Desktop-Tintenstrahldrucker eignet sich zum simultanen Drucken mehrerer Reagentien in individuell kontrollierbaren Mengen aus mindestens 4 Tintenpatronen.

5.1. Präzise Auftragung und Anordnung von Reagentien

5.1.1. Positionskontrolle und räumliche Eingrenzung

In unserer ersten Arbeit auf dem Gebiet der tintenstrahlgedruckten μ PADs wurde der Einfluss der geometrischen Form der Testzonen und die Anordnung der Reagen-

tien auf colorimetrische Tests untersucht.^[7] Colorimetrische Tests mit μ PADs leiden häufig unter inhomogener Farbentwicklung in den Testzonen, verursacht durch die Auflösung von Reagentien und deren Abtransport im kontinuierlichen Probefluss, was eine genaue quantitative Analyse durch digitale Farbmessung verunmöglicht. Die Geschwindigkeit und die Flexibilität des Tintenstrahldruckes ermöglichen eine vergleichsweise einfache geometrische Optimierung der Mikrofluidikstrukturen und der Anordnung von Testreagentien, wie es in Abbildung 10 am Beispiel eines Proteinassays ge-

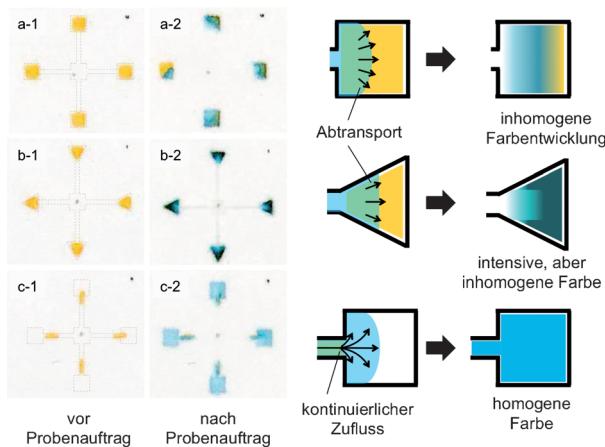
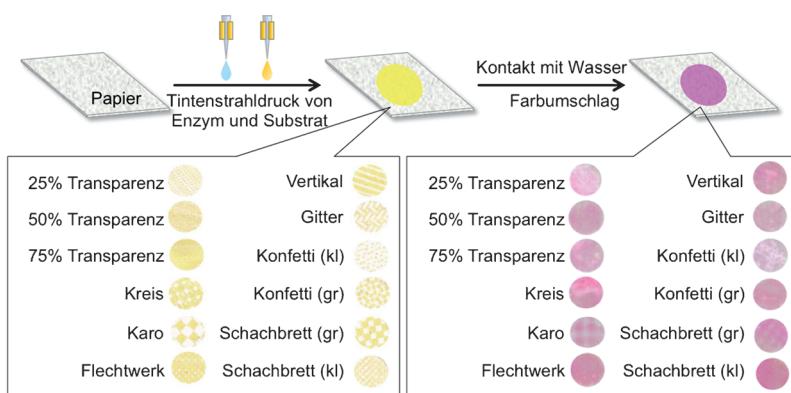


Abbildung 10. Die Geometrie der Testzone und die Positionierung der Testreagenzien beeinflussen die Farbveränderung nach Probenauftrag. Jedes Feld zeigt die vierfache Proteinanalyse (1) vor und (2) nach Probenauftrag: a) Reagentien in quadratischen Testzonen, b) Reagentien in dreieckigen Testzonen, und c) Reagentien aufgetragen im Inneren von Mikrofluidikkanälen vor quadratischen Testzonen (modifiziert mit Genehmigung aus Lit. [7]. Copyright 2008 American Chemical Society). Die Zeichnungen auf der rechten Seite erläutern die schematischen Vorgänge für jede Anordnung.

zeigt wird. Im Vergleich zu quadratischen Testzonen (Felder a-1 und a-2) zeigen dreieckige Testzonen intensivere Farbänderungen (Felder b-1 und b-2), aber beide Formen sind inhomogen gefärbt. Dagegen führt die Auftragung der Reagentien in der Form einer dünnen Linie innerhalb der 550 μm breiten Mikrofluidikkanäle zu homogenen Farbumschlägen in den Testzonen (Felder c-1 und c-2). Während alle digitalen Drucktechniken die Möglichkeit der raschen und flexiblen Variation von Mikrofluidikstrukturen in Papier bieten, gelingt einzig mit dem Tintenstrahldruck die Optimierung der Reagentienanordnung mit der notwendigen räumlichen Präzision (550 μm Kanal). Da es kein universelles μ PAD-Design gibt und eine Optimierung von Fall zu Fall erforderlich ist, leisten die Flexibilität und hohe Präzision des Tintenstrahldruckes einen wichtigen Beitrag zur reproduzierbaren Fabrikation von μ PADs mit optimierter Leistungsfähigkeit.

Ein sehr aktuelles Beispiel, das die Vorteile des Tintenstrahldruckes hinsichtlich der präzisen räumlichen Kontrolle demonstriert, ist die Auftragung eines Enzyms und des zugehörigen Substrates in unmittelbarer Nähe (ca. 2 mm) auf Papier.^[101] Die optimale Geometrie, Dimensionen und die Menge an aufgetragenen Reagentien wurden evaluiert, um deren unkontrollierte Vermischung auf dem Papier zu ver-

hindern. Zu diesem Zweck wurden β -Galactosidase und Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid (chromogenes Substrat) mittels Tintenstrahldruck in unterschiedlichen Konzentrationen und verschiedenen geometrischen Anordnungen (Karo-, Gitter-, Schachbrettmuster usw.) aufgetragen. In Kontakt mit Wasser gebracht, was die Diffusion des Enzyms und Substrates ermöglicht, zeigte jedes Muster eine unterschiedliche Farbänderung, was auf unterschiedliche Aktivität in Abhängigkeit des Layouts deutet (Abbildung 11).



gedruckte geometrische Anordnung

Farberscheinung

Abbildung 11. Gedruckte geometrische Anordnungen von Enzym und Substrat (Bilder links), und deren Farberscheinung nach erfolgter Farbreaktion durch Eintauchen in Wasser (Bilder rechts). Modifiziert mit Genehmigung aus Lit. [101]. Copyright 2014 American Chemical Society.

Wenn mehrere Reagenzien in diskreten Zonen eines einzelnen μ PADs immobilisiert werden müssen, ist die Wechselwirkung zwischen benachbarten Komponenten unerwünscht. Ein Problem bei der Auftragung von Reagenzien mit nicht-tintenstrahlbasierten Methoden ist die Tatsache, dass die kleinstmöglichen Tropfenvolumina oft deutlich größer sind. Dies wird bei Substraten basierend auf Papier rasch zu einer Herausforderung, da „überschüssige“ Tintenflüssigkeit angetrieben durch Kapillarkräfte zu deren sofortiger Verbreitung führt. Dies trifft selbstverständlich für manuelles Pipettieren zu, aber auch für Kontaktdruck durch einen Nadel-Spotter. Während letzterer theoretisch eine ähnliche Auflösung wie ein Tintenstrahldrucker erzielen kann,^[102] kommt es beim Druckprozess zu einem direkten Kontakt zwischen dem Papiersubstrat und dem mit Tinte beladenen Dispenser. Dabei besteht die Gefahr, dass die Kapillarwirkung des Papiers zu einer Saugwirkung für überschüssige Tinte aus der Öffnung der Nadel führt. Beispielsweise wurde eine wesentliche Reagentienausbreitung mit schlechter Reproduzierbarkeit aufgrund der großen Dosievolumina (ca. 100 nL) und der Kapillarwirkung durch die poröse Substratstruktur für den Kontaktdruck auf Papiersubstrate (Kopierpapier und reines Zellulose-Chromatographiepapier) beobachtet.^[103]

Die einzige einfache Alternative zur Verhinderung dieser Reagentienausbreitung und Vermischung ist der Wechsel zu größeren μ PADs. Doch eine solche Maßstabsvergrößerung ist unweigerlich mit höheren Kosten und dem Bedarf nach einem größeren Probevolumen verbunden. Da die Er-

schwinglichkeit für das Konzept der μ PADs entscheidend ist, ist eine Kostenminimierung durch Materialeinsparung und optimierte Fabrikation zwingend.^[22,80] Überraschenderweise ist bei der Verwendung von Filterpapier das Papiersubstrat der dominierende Kostenfaktor eines μ PADs,^[92,104] was die effiziente räumliche Anordnung von Mikrofluidikstrukturen zu einer wichtigen Überlegung macht. Die Forderung nach geringen Probenvolumina in der medizinischen Diagnostik wurde vor kurzem mit einem antikörperfreien Test für ein biologisches Protein in Tränenflüssigkeit auf einem μ PAD demonstriert.^[92] Weil das für eine Analyse zur Verfügung stehende Volumen menschlicher Tränenflüssigkeit vergleichsweise gering ist (typischerweise 10 μ L bei gesunden Probanden, <3 μ L bei Augenpatienten), wurde ein entsprechend kompaktes μ PAD entwickelt, um eine Analyse mit 2.5 μ L Tränenprobe zu gewährleisten (Abbildung 12). Im Fall der manuellen Auftragung der Reagenzien in eine 3 \times 3 mm² große Testzone durch Mikropipetten war die erreichte Signalhomogenität nicht vergleichbar mit derjenigen bei der Auftragung durch Tintenstrahldruck.

5.1.2. Drucken von Test-/Kontrolllinien für Lateralfluss-Immunoassays

Lateralfluss-Immunoassays (LFAs) sind gängige biochemische Testverfahren, wie sie für Schwangerschaftstests oder zur Diagnose von Infektionskrankheiten zum Einsatz kommen.^[105] Diese geben entweder qualitative (positiv/negativ) oder quantitative (Ana-

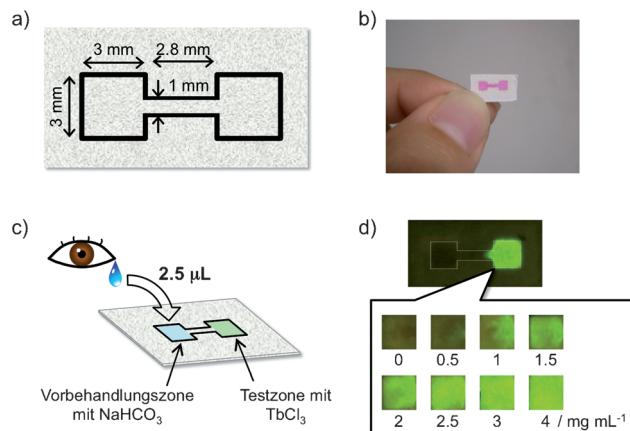


Abbildung 12. μ PAD zur Quantifizierung von Lactoferrin in menschlicher Tränenflüssigkeit basierend auf der Sensibilisierung von Tb^{3+} . Fluoreszenzemission: a) Skizze; die schwarzen Linien markieren die durch Tintenstrahldruck von UV-härtender Tinte gefolgt von Photopolymerisation erhaltenen hydrophoben Barrieren, b) Foto einer Mikrofluidikstruktur, die durch Lebensmittelarbstofflösung sichtbar gemacht wurde, c) schematische Darstellung der Analyse menschlicher Tränenflüssigkeit und d) Fluoreszenzemission von der Testzone unter UV-Beleuchtung nach Auftragung von Standardlösungen verschiedener Konzentrationen. Modifiziert aus Lit. [92] mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

lytmenge) Resultate in Form einer Farbe auf einer Testlinie und zeigen das Ende des Tests durch Erscheinen einer Farbe auf einer Kontrolllinie an. Zur Erstellung dieser Linien werden üblicherweise Antikörper oder Antigene (Immunreagentien) in der Form eines Linienmusters angeordnet. Das Zeichnen einer klaren Testlinie ist essenziell für die Realisierung präziser und genauer quantitativer Tests.

Unsere Arbeitsgruppe hat versucht, einen LFIA-Test auf einem einzigen Blatt Zellulosefilterpapier zu entwickeln.^[91] Mikrofluidikstrukturen sowie die Test- und Kontrolllinien wurden mittels Tintenstrahldruck angefertigt (Abbildung 13a). Um die Ausbreitung der Immunreagentien wäh-

noch in klaren Linien, da die kleinen Tröpfchenvolumina lediglich zu geringer Ausbreitung der ausgestoßenen Tinte auf dem Papier führen. Dies wurde anhand eines LFIA für Morphin durch gedrucktes rekombinantes Anti-Morphin-Fragment auf Papiersubstraten gezeigt.^[106] Neben den soeben genannten Beispielen wurde eine Reihe weiterer klinisch relevanter Antikörper (z.B. Anti-C-reaktives Protein,^[107,108] Anti-Cholera-Toxin,^[109] Antikörper für Zytokine, Brustkrebsbiomarker, krebsbedingtes Protein,^[110] Anti-Tumor-Nekrosefaktor α)^[111] erfolgreich durch Tintenstrahldruck auf verschiedene Substrate aufgetragen.

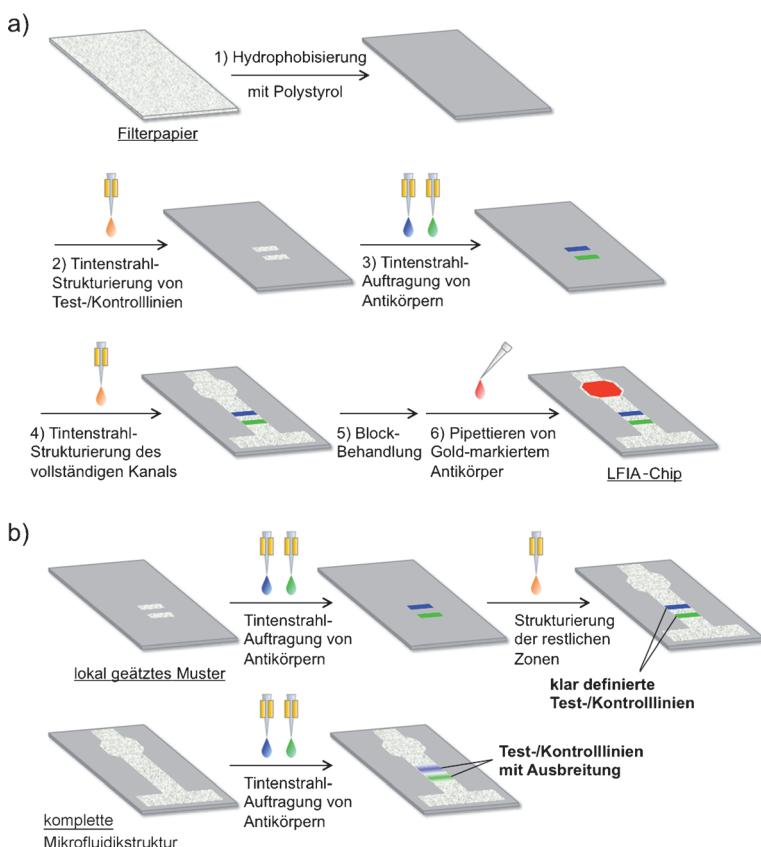


Abbildung 13. a) Herstellung von tintenstrahlgedruckten LFIA-Systemen auf Filterpapier (modifiziert aus Lit. [91] mit freundlicher Genehmigung durch Springer Science and Business Media.). b) Drucken der Immunreagentien in lokal geätzte hydrophile Zonen vor der mikrofluidischen Strukturierung führt zu besser definierten Test-/Kontrolllinien (obere Reihe) als das Drucken in vorstrukturierte Mikrofluidikstrukturen (untere Reihe).

rend wiederholter Druckzyklen zu verhindern, wurden diese anstelle von vollständigen Mikrofluidikstrukturen in schmale tintenstrahlgeätzte, von hydrophoben Barrieren umgebene Zonen aufgetragen. Obwohl dieses Vorgehen einen zusätzlichen Strukturierungsschritt erfordert, ist es hilfreich, um die Reagenzien in einem klar definierten Bereich zu begrenzen (Abbildung 13b).

Dieser Ansatz zur Begrenzung der Linien kann nur durch die Strukturierungsmethode basierend auf Ätzen realisiert werden. Doch selbst das direkte Tintenstrahldrucken von Immunreagentien in Mikrofluidikstrukturen resultiert immer

5.2. Drucken von Schichtstrukturen

Häufig werden fragile analytische Testkomponenten wie Enzyme und Antikörper in μ PADs integriert. Deren Lagerstabilität auf Papiersubstraten ist entscheidend was die praktische Anwendung betrifft.

Kieselerde aus Sol-Gel-Vorstufen ist ein leistungsfähiges Material um die Robustheit von Biomolekülen zu verstärken.^[112] Es ist seit Jahrzehnten bekannt, dass in hydrolysierte (und kondensierte) Kieselerde-Matrizes verkapselfte Biomoleküle eine erhöhte Lebensdauer aufweisen.^[113] Im Jahr 2009 wurde diese Strategie durch die Arbeitsgruppe von Brennan erstmals auf proteinbasierte μ PADs angewendet.^[114] Die Autoren verließen sich auf Tintenstrahldruck, um eine Kieselerde-Sol-Gel-Testzone mit verkapselftem Enzym für einen Paperteststreifen zu konstruieren. Herkömmlich verwendete man dazu Tauch-/Schleuderbeschichtung oder Sprayen, aber diese Techniken können die Anforderungen in Bezug auf Produktivität, sparsame Reagentiennutzung oder Miniaturisierung nicht erfüllen. Das direkte Drucken von enzymbeladener Kieselerde ist nicht möglich, da die Gelbildung der Tinte ein Verstopfen der Druckdüsen verursacht. Der schrittweise Druck einer kationisch geladenen Unterlage (Polyvinylamin, PVAm), gefolgt von einer ersten Kieselerde-Sol-Gel-Vorläuferschicht, einer Enzymschicht (Acetylcholinesterase, AChE) und einer zweiten Kieselerde-Sol-Gel-Vorläuferschicht resultierte in einer Schichtstruktur (Abbildung 14a). Eine detaillierte morphologische Untersuchung zeigte, dass die derart konstruierten Schichten einige zehn Nanometer dünne Beschichtungen von Kieselerde-Verbundmaterialien auf den Zellulosefasern bildeten.^[115] Diese schichtweise Biotenstruktur wurde zur Anwendung auf μ PADs für die Detektion von Pestiziden^[114,116] und giftigen Schwermetallen^[117] angepasst, dessen Signalisierung auf der Desaktivierung des verkapselften Enzyms (AChE oder β -Galactosidase) beruht. Ferner wurde dieser Ansatz auch auf die Verkapselung von Enzymsubstraten angewendet, wodurch das Anwendungsbereich auf den Nachweis von Lebensmittel-Pathogenen (*E. coli* BL21 und *E. coli* O157:H7) durch Messung derer intrazellu-

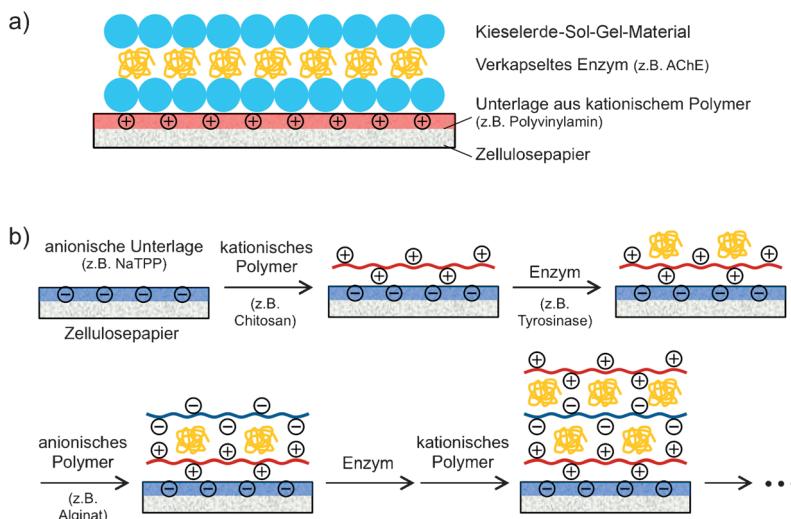


Abbildung 14. Strategien zur Enzymverkapselung und Stabilisierung durch tintenstrahl-aufgetragene Schichtstrukturen: a) aus Kieselerde-Sol-Gel-Materialien (modifiziert mit Genehmigung aus Lit. [114]. Copyright 2009 American Chemical Society.) und b) aus einem Paar von positiv/negativ geladenen Polymermaterialien (modifiziert mit Genehmigung aus Lit. [120]. Copyright 2012 American Chemical Society.).

lären Enzyme ausgeweitet wurde.^[118] Es kann erwartet werden, dass basierend auf diesem Konzept weitere klassische enzymatische Tests sowie andere Kombinationen von Enzymen und Substraten für den Nachweis von Bakterien^[119] flexibel auf PADs integriert werden können.

Ein ähnlicher tintenstrahldruckbasierter Ansatz für eine Schicht-um-Schicht-Struktur wurde zur Enzymstabilisierung und Immobilisierung zwischen alternierenden Schichten eines kationischen und eines anionischen Polymers realisiert.^[120] Tyrosinase wurde zwischen kationischem Chitosan und anionischem Natriumalginat aufgetragen, nachdem Pentanatriumtriphasphat (NaTPP) als Stabilisator und Vernetzer gedruckt wurde (Abbildung 14b). Durch elektrostatische Adsorption verkapselte Tyrosinase wies dank der biokompatiblen Mikroumgebung aus Chitosan und Alginat eine außerordentliche Stabilität auf (92 % verbleibende Aktivität nach 260 Tagen bei Raumtemperatur, 99 % nach 54 Tagen und 97 % nach 260 Tagen im Kühlschrank oder Tiefkühler). Dieser Ansatz ist ein weiteres Beispiel einer einfachen Herstellungsmethode für PADs mit immobilisiertem Enzym verlängerter Haltbarkeit.

5.3. Simultanes Drucken mehrerer Reagentien

Eine der nützlichsten Eigenschaften normaler Desktop-Tintenstrahldrucker ist die Verfügbarkeit von mindestens vier Tintenpatronen (Cyan, Magenta, Gelb und Schwarz), was theoretisch das simultane Auftragen von vier Materialien ermöglicht. Ein Tintenstrahldrucker ermöglicht dadurch nicht nur die Erstellung von seriell verdünnten Punkten durch

Kontrolle der abgegebenen Menge eines einzelnen Reagens (Abbildung 15a), sondern bietet auch die Möglichkeit, Reagentien auf dem Substrat zu mischen (Abbildung 15b) oder als Konzentrationsgradienten aufzutragen (Abbildung 15c), wobei all dies alleine durch die Anpassung der Farbmuster in einer Graphik-Software geschieht. Es gibt neben dem Tintenstrahldruck wohl keine andere Methode, mit der Gradienten von analytischen Reagentien derart einfach aufgetragen werden können. Erstaunlicherweise wird diese Eigenschaft von Tintenstrahldruckern bisher nur sehr selten für die Entwicklung von μPADs eingesetzt.

Ein Beispiel, in dem die Strategie zur Mischung mehrerer Reagentien auf Papier klug eingesetzt wurde, ist das Hochdurchsatz-Screening des optimalen Molverhältnisses von Reagentien in einer Mehrkomponentenreaktion, wie es kürzlich zur Konstruktion eines Multi-Enzym-Systems auf einem Papiersubstrat mit-

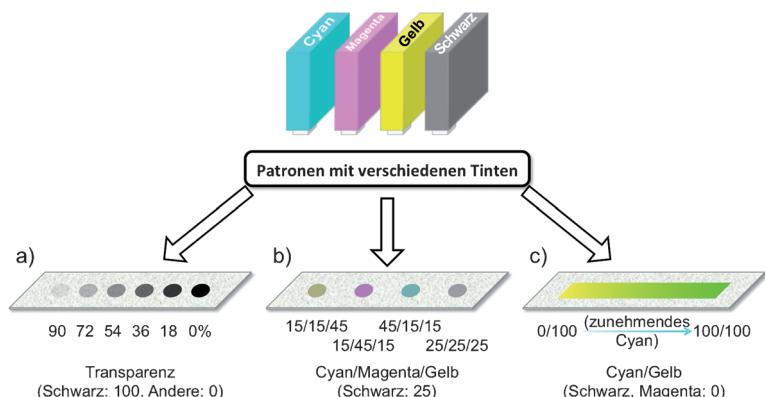


Abbildung 15. Konfiguration der Druckfarbe ermöglicht die Auftragung mehrerer Tinten mit verschiedenen Merkmalen: a) Transparenzwerte verändern die Menge eines einzelnen Reagens, b) CMYK-Werte führen zur unabhängigen Kontrolle der ausgestoßenen Mengenverhältnisse aus individuell adressierbaren Patronen, die mit verschiedenen Reagentien gefüllt sind, und c) Farbgradienten innerhalb einer einzelnen Grafik definieren einen kontinuierlich zunehmenden (abnehmenden) Konzentrationsgradienten von Reagentien.

tels Tintenstrahldruck demonstriert wurde.^[121] In dieser Studie wurden zwei Sätze von Enzymkombinationen (GOx/HRP, Diaphrose (DP)/Alkoholdehydrogenase (ADH)) in verschiedenen Verhältnissen aufgedruckt, mit dem Ziel, die höchste Effizienz der bienzymatischen Reaktionen zu erhalten. Nachdem eine gute Übereinstimmung zwischen dem voreingestellten (CMYK-Farbwerde der Graphik-Software) und dem ausgedruckten Mengenverhältnis (beurteilt anhand fluoreszenzmarkierter Enzyme) aufgezeigt werden konnte, wurden die Enzymverhältnisse zur maximalen Reaktionsausbeute (GOx/HRP 2:8, DP/ADH 5:95) bestimmt (der Fall von GOx/HRP ist in Abbildung 16 gezeigt). Dank der Vorteile des Tintenstrahldruckes konnten die zur Enzymverhältnisoptimierung erforderliche Zeit und der Arbeitsauf-

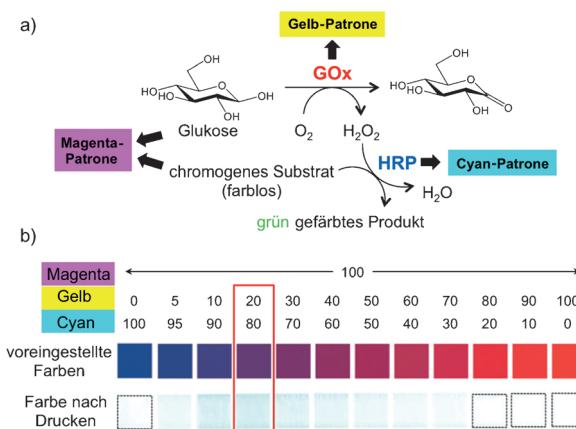


Abbildung 16. Optimierung der Reagentienverhältnisse basierend auf simultanem Tintenstrahldruck von Materialien: a) Farben erzeugendes bienzymatisches System, b) voreingestellte Farbe und Farbe nach enzymatischer Reaktion. Die intensivste Farbe (Gelb/Cyan 20:80) kennzeichnet das optimale Molverhältnis von GOx/HRP. Modifiziert von Lit. [121] mit Genehmigung der The Royal Society of Chemistry.

wand im Vergleich zu herkömmlichen enzymatischen Tests drastisch reduziert werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Der Tintenstrahldruck stellt eine vielversprechende Technologie zur Entwicklung hochfunktionalisierter μPADs dar, doch es muss auf einige inhärente Schwächen hingewiesen werden. Während der digital kontrollierte Druckprozess eine rasche und flexible Änderung der Druckmuster ermöglicht, wird das eigentliche gedruckte Bild durch die Punkt-für-Punkt Auftragung von Tintentröpfchen erstellt. Als Folge davon ist dieser Vorgang langsamer als Platten- oder Siebdruck, wo das gesamte Muster in einem einzigen Schritt auf das Substrat übertragen wird. Daher kann der Tintenstrahldruck in Fällen, wo eine große Zahl identischer Strukturen ohne Notwendigkeit hoher Auflösung reproduziert wird, in Bezug auf die Geschwindigkeit nicht mit anderen Drucktechniken mithalten.

Das begrenzte Fenster der Tintenviskosität und Oberflächenspannung kann gelegentlich die Vielseitigkeit des Tintenstrahldruckes mindern. Insbesondere kann ein erforderlicher Zusatz von Tensiden in denjenigen Fällen problematisch sein, wo zur Herstellung von μPADs Tinten basierend auf für Denaturierung anfälligen Proteinen verwendet werden. Im Fall des Druckens von Nanopartikeln führen deren Dispersionsstabilität in der Tintenflüssigkeit und deren Durchmesser zu weiteren Einschränkungen der Tintenzusammensetzung.

Die Möglichkeit der Auftragung von Materialtinten in Pikolitervolumina in fein abstimmbaren Strukturen mit hoher räumlicher Auflösung ist eine einzigartige Stärke des Tintenstrahldruckes. Es wurde in diesem Aufsatz mehrfach demonstriert, dass sogar gewöhnliche Desktop-Tintenstrahldrucker zur Herstellung von μPADs mit mikrometergroßen Strukturmerkmalen geeignet sind. Die Kombination von

Mikrofluidik basierend auf Papier mit dem bewährten Tintenstrahldruck von funktionellen Materialien oder Biomaterialien^[28] bildet einen interessanten Ansatz zur Entwicklung von Systemen, die nicht nur kostengünstiger, sondern – was noch wichtiger ist – innerhalb kurzer Zeit realisiert werden können. Dadurch wird eine schnelle Reaktion auf höchst aktuelle gesellschaftliche Herausforderungen ermöglicht, zum Beispiel bei der Seuchenbekämpfung. Ein kürzlich vorgestelltes, wenn auch nicht direkt tintenstrahlbezogenes Beispiel, ist ein Gen-Netzwerk mit mRNA-Sensoren basierend auf Papier, das entwickelt wurde, um zwei Stämme von Ebola-Viren aus dem Sudan und Zaire zu unterscheiden.^[122]

Durch Tintenstrahldruck erhaltene μPADs stehen noch am Anfang ihrer Entwicklung, was zu vielfältigen Herausforderungen und Möglichkeiten führt. Die Formulierung von Tintenzusammensetzungen ist eine zentrale Aufgabe beim Tintenstrahldruck. Jedes funktionelle Material erfordert eine spezifische Tintenzusammensetzung, um konsistente Strukturen auf Papiersubstraten ohne Verstopfung der Druckdüsen zu erhalten. Es mag der Traum eines Wissenschaftlers sein, einen Rheologie-unabhängigen Tintenstrahldrucker zu haben, der mit einer Art universeller Tinte mit verschiedenen chemischen Komponenten wie Proteinen, organischen Farbstoffen, Zellen, anorganischen und organischen Nanopartikeln und anderen funktionellen Materialien auskommt. In Wirklichkeit aber dürfte eine solche Technologie in naher Zukunft nicht erhältlich sein, womöglich wird sie niemals realisiert. Daher stellen der Fokus auf neue chemische Tinten und das Drucken von physikalischen oder biologischen Mikrostrukturen (2D oder 3D)^[123–125] auf Zellulosesubstrate einen realistischeren unmittelbaren Forschungsansatz in Richtung einer erhöhten Vielfältigkeit nützlicher funktionaler tintenstrahlgedruckter μPADs dar.

Wir danken für die finanzielle Unterstützung durch das Japanische Umweltministerium, durch Nestec Ltd. (Vevey, Schweiz) und durch die Japan Science and Technology Agency (JST-SENTAN).

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5294–5310
Angew. Chem. **2015**, *127*, 5384–5401

- [1] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1318–1320; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1340–1342.
- [2] D. M. Cate, J. A. Adkins, J. Mettakoonpitak, C. S. Henry, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 19–41.
- [3] E. W. Nery, L. T. Kubota, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 7573–7595.
- [4] H. Sirringhaus, T. Kawase, R. H. Friend, T. Shimoda, M. Inbasekaran, W. Wu, E. P. Woo, *Science* **2000**, *290*, 2123–2126.
- [5] A. Teichler, J. Perelaer, U. S. Schubert, *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 1910–1925.
- [6] T. Okamoto, T. Suzuki, N. Yamamoto, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 438–441.
- [7] K. Abe, K. Suzuki, D. Citterio, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6928–6934.
- [8] W. K. Tomazelli Coltro, C. M. Cheng, E. Carrilho, D. P. de Jesus, *Electrophoresis* **2014**, *35*, 2309–2324.
- [9] M. Santhiago, E. W. Nery, G. P. Santos, L. T. Kubota, *Bioanalysis* **2014**, *6*, 89–106.

- [10] C. Rozand, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *33*, 147–156.
- [11] J. Hu, S. Wang, L. Wang, F. Li, B. Pingguan-Murphy, T. J. Lu, F. Xu, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 585–597.
- [12] L. Ge, J. H. Yu, S. G. Ge, M. Yan, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 5613–5630.
- [13] A. K. Yetisen, M. S. Akram, C. R. Lowe, *Lab Chip* **2013**, *13*, 2210–2251.
- [14] W. L. Then, G. Garnier, *Rev. Anal. Chem.* **2013**, *32*, 269–294.
- [15] E. J. Maxwell, A. D. Mazzeo, G. M. Whitesides, *MRS Bull.* **2013**, *38*, 309–314.
- [16] P. Lisowski, P. K. Zarzycki, *Chromatographia* **2013**, *76*, 1201–1214.
- [17] S. Byrnes, G. Thiessen, E. Fu, *Bioanalysis* **2013**, *5*, 2821–2836.
- [18] D. D. Liana, B. Raguse, J. J. Gooding, E. Chow, *Sensors* **2012**, *12*, 11505–11526.
- [19] X. Li, D. R. Ballerini, W. Shen, *Biomicrofluidics* **2012**, *6*, 011301.
- [20] D. R. Ballerini, X. Li, W. Shen, *Microfluid. Nanofluid.* **2012**, *13*, 769–787.
- [21] W. K. Tomazelli Coltro, D. P. de Jesus, J. A. Fracassi da Silva, C. L. do Lago, E. Carrilho, *Electrophoresis* **2010**, *31*, 2487–2498.
- [22] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, E. Carrilho, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3–10.
- [23] R. Pelton, *Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 925–942.
- [24] L. Gonzalez-Macia, A. Morrin, M. R. Smyth, A. J. Killard, *Analyst* **2010**, *135*, 845–867.
- [25] J. T. Delaney, P. J. Smith, U. S. Schubert, *Soft Matter* **2009**, *5*, 4866–4877.
- [26] E. Tekin, P. J. Smith, U. S. Schubert, *Soft Matter* **2008**, *4*, 703–713.
- [27] B. J. de Gans, P. C. Duineveld, U. S. Schubert, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 203–213.
- [28] P. Calvert, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3299–3305.
- [29] N. Komuro, S. Takaki, K. Suzuki, D. Citterio, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 5785–5805.
- [30] M. Singh, H. M. Haverinen, P. Dhagat, G. E. Jabbour, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 673–685.
- [31] A. Manz, N. Gruber, H. M. Widmer, *Sens. Actuators B* **1990**, *1*, 244–248.
- [32] D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2623–2636.
- [33] P.-A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyes, A. Manz, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2637–2652.
- [34] P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam, B. H. Weigl, *Nature* **2006**, *442*, 412–418.
- [35] G. M. Whitesides, *Nature* **2006**, *442*, 368–373.
- [36] N. Blow, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 683–686.
- [37] J. L. Osborn, B. Lutz, E. Fu, P. Kauffman, D. Y. Stevens, P. Yager, *Lab Chip* **2010**, *10*, 2659–2665.
- [38] L. Gervais, E. Delamarche, *Lab Chip* **2009**, *9*, 3330–3337.
- [39] D. L. Clegg, *Anal. Chem.* **1950**, *22*, 48–59.
- [40] R. H. Müller, D. L. Clegg, *Anal. Chem.* **1949**, *21*, 1123–1125.
- [41] A. W. Martinez, S. T. Phillips, B. J. Wiley, M. Gupta, G. M. Whitesides, *Lab Chip* **2008**, *8*, 2146–2150.
- [42] S. Y. Wong, M. Cabodi, J. P. Rolland, C. M. Klapperich, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 11981–11985.
- [43] H. Kwon, F. Samain, E. T. Kool, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2542–2549.
- [44] S. Alila, S. Boufi, M. N. Belgacem, D. Beneventi, *Langmuir* **2005**, *21*, 8106–8113.
- [45] F. Kong, Y. Hu, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 7–13.
- [46] S. Su, R. Nutiu, C. D. M. Filipe, Y. Li, R. Pelton, *Langmuir* **2007**, *23*, 1300–1302.
- [47] C. Tyagi, L. K. Tomar, H. Singh, *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *111*, 1381–1390.
- [48] Y. Zhu, X. Xu, N. D. Brault, A. J. Keefe, X. Han, Y. Deng, J. Xu, Q. Yu, S. Jiang, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2871–2875.
- [49] A. Yu, J. Shang, F. Cheng, B. A. Paik, J. M. Kaplan, R. B. Andrade, D. M. Ratner, *Langmuir* **2012**, *28*, 11265–11273.
- [50] H. P. Le, *J. Imaging Sci. Technol.* **1998**, *42*, 49–62.
- [51] L. Setti, C. Piana, S. Bonazzi, B. Ballarin, D. Frascaro, A. Fraleoni-Morgera, S. Giuliani, *Anal. Lett.* **2004**, *37*, 1559–1570.
- [52] J. E. Fromm, *IBM J. Res. Dev.* **1984**, *28*, 322–333.
- [53] H. C. Nallan, J. A. Sadie, R. Kitsomboonloha, S. K. Volkman, V. Subramanian, *Langmuir* **2014**, *30*, 13470–13477.
- [54] J. Tai, H. Y. Gan, Y. N. Liang, B. K. Lok in *Proceedings of the 10th Electronics Packaging Technology Conference*, **2008**, S. 761–766.
- [55] B. Derby, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2010**, *40*, 395–414.
- [56] D. Jang, D. Kim, J. Moon, *Langmuir* **2009**, *25*, 2629–2635.
- [57] M. R. N. Monton, E. M. Forsberg, J. D. Brennan, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 796–811.
- [58] S. Magdassi in *The Chemistry of Inkjet Inks* (Hrsg.: S. Magdassi), World Scientific, Singapore, **2010**, S. 19–41.
- [59] S. Di Risio, N. Yan, *J. Adhes. Sci. Technol.* **2010**, *24*, 661–684.
- [60] C. Renault, X. Li, S. E. Fosdick, R. M. Crooks, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7976–7979.
- [61] J. Nie, Y. Liang, Y. Zhang, S. Le, D. Li, S. Zhang, *Analyst* **2013**, *138*, 671–676.
- [62] E. M. Fenton, M. R. Mascarenas, G. P. Lopez, S. S. Sibbett, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1*, 124–129.
- [63] D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink, A. Bohn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3358–3393; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3422–3458.
- [64] M. A. Hubbe, *BioResources* **2006**, *2*, 106–145.
- [65] Y. Wu, P. Xue, Y. Kang, K. M. Hui, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8661–8668.
- [66] L. OuYang, C. Wang, F. Du, T. Zheng, H. Liang, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 1093–1101.
- [67] Q. He, C. Ma, X. Hu, H. Chen, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1327–1331.
- [68] S. A. Klasner, A. K. Price, K. W. Hoeman, R. S. Wilson, K. J. Bell, C. T. Culbertson, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1821–1829.
- [69] X. Li, J. Tian, T. Nguyen, W. Shen, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9131–9134.
- [70] J. Wang, M. R. N. Monton, X. Zhang, C. D. M. Filipe, R. Pelton, J. D. Brennan, *Lab Chip* **2014**, *14*, 691–695.
- [71] H. Yang, Q. Kong, S. Wang, J. Xu, Z. Bian, X. Zheng, C. Ma, S. Ge, J. Yu, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 21–27.
- [72] M. P. Sousa, J. F. Mano, *Cellulose* **2013**, *20*, 2185–2190.
- [73] J. Nie, Y. Zhang, L. Lin, C. Zhou, S. Li, L. Zhang, J. Li, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6331–6335.
- [74] Y. Lu, W. Shi, L. Jiang, J. Qin, B. Lin, *Electrophoresis* **2009**, *30*, 1497–1500.
- [75] T. Songjaroen, W. Dungchai, O. Chailapakul, W. Laiwattanapaipal, *Talanta* **2011**, *85*, 2587–2593.
- [76] Y. Sameenoi, P. N. Nongkai, S. Nouanthavong, C. S. Henry, D. Nacapricha, *Analyst* **2014**, *139*, 6580–6588.
- [77] C. Renault, J. Koehne, A. J. Ricco, R. M. Crooks, *Langmuir* **2014**, *30*, 7030–7036.
- [78] V. Rajendra, C. Sicard, J. D. Brennan, M. A. Brook, *Analyst* **2014**, *139*, 6361–6365.
- [79] J. Olkkonen, K. Lehtinen, T. Erho, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 10246–10250.
- [80] X. Li, J. Tian, G. Garnier, W. Shen, *Colloids Surf. B* **2010**, *76*, 564–570.
- [81] E. Carrilho, A. W. Martinez, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7091–7095.
- [82] D. A. Bruzewicz, M. Reches, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3387–3392.
- [83] A. Määttänen, D. Fors, S. Wang, D. Valtakari, P. Ihälainen, J. Peltonen, *Sens. Actuators B* **2011**, *160*, 1404–1412.

- [84] K. Maejima, S. Tomikawa, K. Suzuki, D. Citterio, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 9258–9263.
- [85] W. Dungchai, O. Chailapakul, C. S. Henry, *Analyst* **2011**, *136*, 77–82.
- [86] P. de Tarso Garcia, T. M. Garcia Cardoso, C. D. Garcia, E. Carrilho, W. K. Tomazelli Coltro, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 37637–37644.
- [87] Y. Zhang, C. B. Zhou, J. F. Nie, S. W. Le, Q. Qin, F. Liu, Y. P. Li, J. P. Li, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2005–2012.
- [88] T. Nurak, N. Praphairaksit, O. Chailapakul, *Talanta* **2013**, *114*, 291–296.
- [89] B. J. de Gans, S. Hoeppener, U. S. Schubert, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 910–914.
- [90] T. Kawase, H. Sirringhaus, R. H. Friend, T. Shimoda, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1601–1605.
- [91] K. Abe, K. Kotera, K. Suzuki, D. Citterio, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 885–893.
- [92] K. Yamada, S. Takaki, N. Komuro, K. Suzuki, D. Citterio, *Analyst* **2014**, *139*, 1637–1643.
- [93] M. S. Li, J. F. Tian, M. Al-Tamimi, W. Shen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5497–5501; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5593–5597.
- [94] B. M. Jayawardane, S. Wei, I. D. McKelvie, S. D. Kolev, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7274–7279.
- [95] M. Elsharkawy, T. M. Schutzius, C. M. Megaridis, *Lab Chip* **2014**, *14*, 1168–1175.
- [96] A. M. M. Rosa, A. F. Louro, S. A. M. Martins, J. Inácio, A. M. Azevedo, D. M. F. Prazeres, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4340–4347.
- [97] L. Setti, A. Fraleoni-Morgera, I. Mencarelli, A. Filippini, B. Ballarin, M. Di Biase, *Sens. Actuators B* **2007**, *126*, 252–257.
- [98] L. Setti, A. Fraleoni-Morgera, B. Ballarin, A. Filippini, D. Frascaro, C. Piana, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2019–2026.
- [99] M. S. Khan, D. Fon, X. Li, J. Tian, J. Forsythe, G. Garnier, W. Shen, *Colloids Surf. B* **2010**, *75*, 441–447.
- [100] G. M. Nishioka, A. A. Markey, C. K. Holloway, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16320–16321.
- [101] B. Creran, X. Li, B. Duncan, C. S. Kim, D. F. Moyano, V. M. Rotello, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 19525–19530.
- [102] I. Barbulovic-Nad, M. Luente, Y. Sun, M. Zhang, A. R. Wheeler, M. Bussmann, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2006**, *26*, 237–259.
- [103] M. K. LaGasse, J. M. Rankin, J. R. Askim, K. S. Suslick, *Sens. Actuators B* **2014**, *197*, 116–122.
- [104] M. M. Mentele, J. Cunningham, K. Koehler, J. Volckens, C. S. Henry, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4474–4480.
- [105] V. Gubala, L. F. Harris, A. J. Ricco, M. X. Tan, D. E. Williams, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 487–515.
- [106] T. Teerinen, T. Lappalainen, T. Erho, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 5955–5965.
- [107] B. Feyssa, C. Liedert, L. Kivimaki, L.-S. Johansson, H. Jantunen, L. Hakalahti, *PLoS One* **2013**, *8*, e68918.
- [108] S. Nilsson, C. Lager, T. Laurell, S. Birnbaum, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3051–3056.
- [109] J. B. Delehanty, F. S. Ligler, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5681–5687.
- [110] H. Li, R. F. Leulmi, D. Juncker, *Lab Chip* **2011**, *11*, 528–534.
- [111] K. Abe, Y. Hashimoto, S. Yatsushiro, S. Yamamura, M. Bando, Y. Hiroshima, J.-i. Kido, M. Tanaka, Y. Shinohara, T. Ooie, Y. Baba, M. Kataoka, *PLoS One* **2013**, *8*, e53620.
- [112] G. Aragay, F. Pino, A. Merkoçi, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5317–5338.
- [113] D. Avnir, S. Braun, O. Lev, M. Ottolenghi, *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1605–1614.
- [114] S. M. Z. Hossain, R. E. Luckham, A. M. Smith, J. M. Lebert, L. M. Davies, R. H. Pelton, C. D. M. Filipe, J. D. Brennan, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5474–5483.
- [115] J. Wang, D. Bowie, X. Zhang, C. Filipe, R. Pelton, J. D. Brennan, *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 1941–1947.
- [116] S. M. Hossain, R. E. Luckham, M. J. McFadden, J. D. Brennan, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9055–9064.
- [117] S. M. Z. Hossain, J. D. Brennan, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8772–8778.
- [118] S. M. Z. Hossain, C. Ozimok, C. Sicard, S. Aguirre, M. M. Ali, Y. Li, J. Brennan, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1567–1576.
- [119] S. Orenga, A. L. James, M. Manafi, J. D. Perry, D. H. Pincus, *J. Microbiol. Methods* **2009**, *79*, 139–155.
- [120] R. S. J. Alkasir, M. Ornatska, S. Andreeșcu, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9729–9737.
- [121] Y. Zhang, F. Lyu, J. Ge, Z. Liu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12919–12922.
- [122] K. Pardee, A. A. Green, T. Ferrante, D. E. Cameron, A. DaleyKeyser, P. Yin, J. J. Collins, *Cell* **2014**, *159*, 940–954.
- [123] S. Moon, S. K. Hasan, Y. S. Song, F. Xu, H. O. Keles, F. Manzur, S. Mikkilineni, J. W. Hong, J. Nagatomi, E. Haeggstrom, A. Khademhosseini, U. Demirci, *Tissue Eng. Part C* **2010**, *16*, 157–166.
- [124] K. Cai, H. Dong, C. Chen, L. Yang, K. D. Jandt, L. Deng, *Colloids Surf. B* **2009**, *72*, 230–235.
- [125] T. Xu, J. Jin, C. Gregory, J. J. Hickman, T. Boland, *Biomaterials* **2005**, *26*, 93–99.
- [126] Z. Zhang, J. Wang, R. Ng, Y. Li, Z. Wu, V. Leung, S. Imbrogno, R. Pelton, J. D. Brennan, C. D. Filipe, *Analyst* **2014**, *139*, 4775–4778.
- [127] D. Citterio, K. Maejima, K. Suzuki in *15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences—μTAS*, Seattle, **2011**, S. 2099–2101.
- [128] T. Soga, Y. Jimbo, K. Suzuki, D. Citterio, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 8973–8978.
- [129] J. L. Delaney, C. F. Hogan, J. Tian, W. Shen, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1300–1306.
- [130] X. Li, J. Tian, W. Shen, *Cellulose* **2010**, *17*, 649–659.
- [131] B. M. Jayawardane, I. D. McKelvie, S. D. Kolev, *Talanta* **2012**, *100*, 454–460.
- [132] A. Apilux, Y. Ukita, M. Chikae, O. Chailapakul, Y. Takamura, *Lab Chip* **2013**, *13*, 126–135.
- [133] W. W. Yu, I. M. White, *Analyst* **2013**, *138*, 1020–1025.
- [134] E. P. Hoppmann, W. W. Yu, I. M. White, *Methods* **2013**, *63*, 219–224.
- [135] W. W. Yu, I. M. White, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9626–9630.
- [136] J. Wang, L. Yang, B. Liu, H. Jiang, R. Liu, J. Yang, G. Han, Q. Mei, Z. Zhang, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3338–3345.
- [137] W.-J. Liao, P. K. Roy, S. Chattopadhyay, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 40487–40493.
- [138] L. Hong, Q. Mei, L. Yang, C. Zhang, R. Liu, M. Han, R. Zhang, Z. Zhang, *Anal. Chim. Acta* **2013**, *802*, 89–94.
- [139] B. Yoon, I. S. Park, H. Shin, H. J. Park, C. W. Lee, J.-M. Kim, *Macromol. Rapid Commun.* **2013**, *34*, 731–735.
- [140] A. Swerin, I. Mira, *Sens. Actuators B* **2014**, *195*, 389–395.

Eingegangen am 28. November 2014
Online veröffentlicht am 13. April 2015