

# Kontaktfreie und medienunabhängige Volumenbestimmung in Nanoliter Dispensern

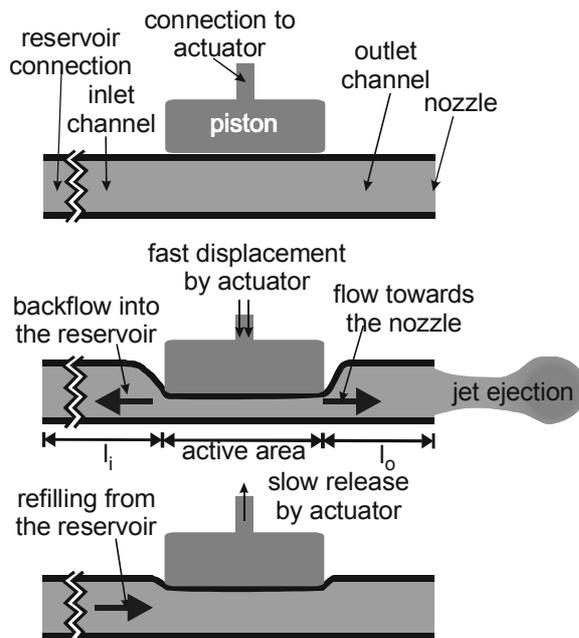
Wolfgang Streule<sup>1</sup>, Matthias Storz<sup>2</sup>, Sebastian Gracki<sup>1</sup>, Matthias Ashauer<sup>2</sup>, Roland Zengerle<sup>1,2</sup>, Peter Koltay<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> IMTEK - Anwendungsentwicklung, Universität Freiburg, Georges-Koehler-Allee 106, D-79110 Freiburg  
<sup>2</sup> HSG-IMIT, Wilhelm-Schickard-Straße 10, D-78052 Villingen-Schwenningen

## Kurzfassung

Wir berichten erstmals über eine kontaminations-freie und medien-unabhängige Methode, um das dosierte Volumen eines kontaktfreien Nanoliter-Dosierers simultan zum Dosiervorgang zu bestimmen. Der Sensor kann für beliebige Drop-on-Demand-Dosierer oder den in Abbildung 1 gezeigten PipeJet<sup>TM</sup>-Dispensierer [1] verwendet werden. Die Bestimmung der dosierten Medienmenge geschieht über einen thermischen Flusssensor [2], der die in das Reservoir nachströmende Luft misst. Da der Sensor nicht in Kontakt mit dem Medium steht, wird weder der Dosierprozess durch die Messung beeinflusst, noch wird der Sensor kontaminiert, und dies ist bei Verwendung von aggressiven Medien besonders vorteilhaft. Zudem muss der Sensor nicht auf das jeweils verwendete Medium kalibriert werden, da lediglich die nachströmende Luft gemessen wird. Wir stellen einen Aufbau vor, mit dem es möglich ist, Volumina größer als 100 nl innerhalb weniger als eine Sekunde zu bestimmen. Die Messgenauigkeit beträgt hierbei ca. 20 % für 100 nl, im Mikroliterbereich verbessert sie sich auf unter 4 %.

## 1 Einleitung

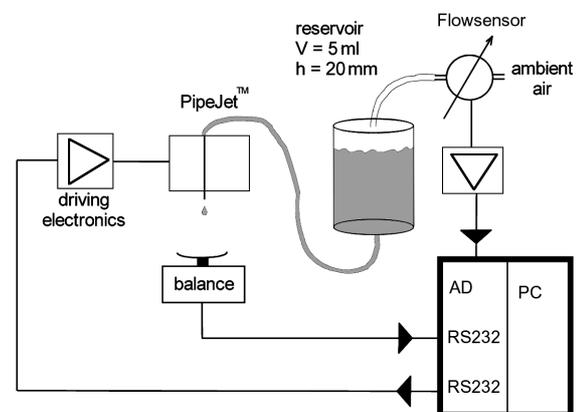
Die Bestimmung des dosierten Flüssigkeitsvolumens als Qualitätskontrolle ist in Nanoliter- und Mikroliter-Dosieranwendungen der Biochemie oder in der industriellen Produktion von großer Bedeutung. Für die Prozesskontrolle können gravimetrische Methoden – wie sie bei der Charakterisierung verwendet werden – meist nicht eingesetzt werden, da das Tropfengewicht (typischerweise einige 100 µg) im Vergleich zum Substrat (z.B. einer Mikrotiterplatte) zu klein ist.



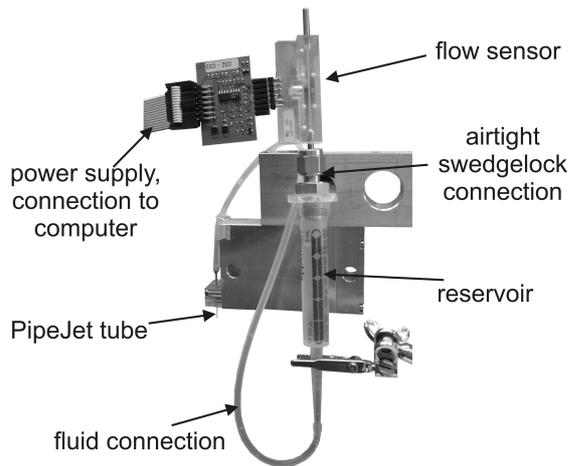
**Bild 1** Prinzip des PipeJet<sup>TM</sup> Dispensers

## 2 Funktionsprinzip und Aufbau

Das vorgestellte Messsystem misst die nach dem Dosiervorgang in das Flüssigkeitsreservoir zum Druckausgleich nachströmende Luft. Hierzu wird das Reservoir luftdicht verschlossen und als einzige mögliche Entlüftung wird der Messkanal eines thermischen Flusssensors des HSG-IMIT angeflanscht. Das andere Ende des Sensors hat Kontakt zur Umgebungsluft. Aus der so ermittelten Strömungsgeschwindigkeit kann durch Integration das gesamte in das Reservoir nachgeströmte Volumen bestimmt werden. Es entspricht dem dosierten Volumen. Bild 2 zeigt den schematischen Aufbau, Bild 3 den im Labor verwendeten Messaufbau zusammen mit dem PipeJet<sup>TM</sup>-Dispenser und einer als Messreferenz dienenden Waage vom Typ Sartorius SC2 [3] (Auflösung 0,1 µg ≙ 100 pl).



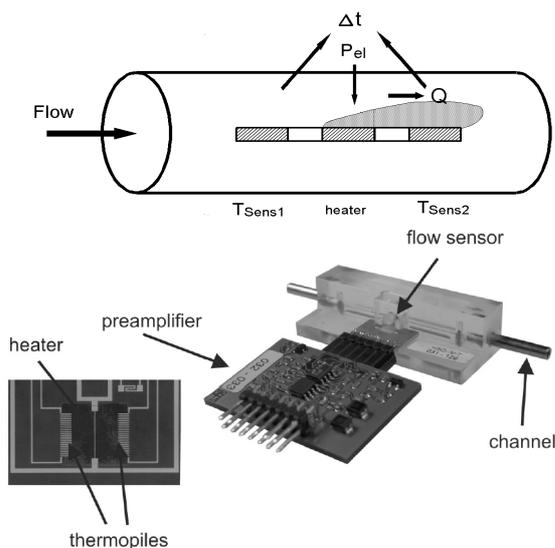
**Bild 2** Funktionsprinzip des Messaufbaus.



**Bild 3** Im Labor verwendeter Messaufbau. Die Waage ist hier nicht gezeigt.

Die gesamte Messsteuerung übernimmt ein PC mit der Messdatensoftware Testpoint [4], in den zudem noch eine A/D-Karte zur Digitalisierung des Flusssensorsignals eingebaut ist.

Der PipeJet™-Dispenser erlaubt die variable Dosierung von Flüssigkeiten im Bereich von wenigen Nanolitern bis zu einigen Mikrolitern. Kernstück des Verfahrens ist ein elastischer Mikroschlauch, der durch einen Piezo-Stack-Aktor mit hoher Geschwindigkeit (ca. 200  $\mu\text{m}/\text{ms}$ ) um bis zu 40  $\mu\text{m}$  verdrängt wird. Die Flüssigkeit wird aufgrund der schnellen Volumenkompression durch das Schlauchende ausgestoßen. Das Dosiervolumen ist dabei in einem gewissen Bereich unabhängig von der Viskosität und der Oberflächenspannung der zu dosierenden Flüssigkeit [1]. Die CV's liegen hierbei im Bereich von 0,5 bis 3,0 %.



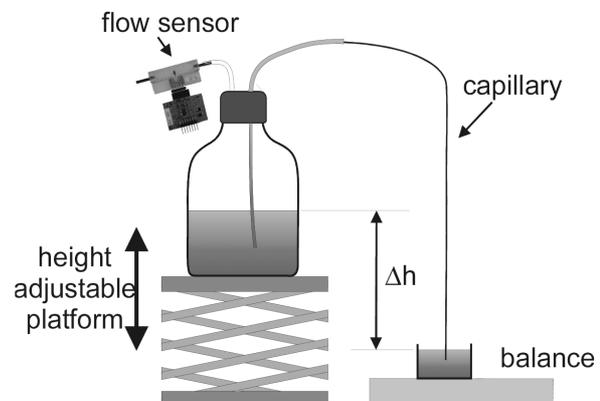
**Bild 4** Funktionsprinzip, Außenansicht und Detail des verwendeten Flusssensors.

Bei den vorliegenden Experimenten wurden typischerweise einzelne Wassertropfen in der Größenordnung von 100 nl dosiert. Durch schnelle Mehrfachdosierung mit bis zu 350 Hz können auch größere Volumina generiert und untersucht werden.

Der verwendete Flusssensor (Typ 600/120, siehe Bild 4) basiert auf dem Mikro-Thermotransfer-Verfahren. Über einen Widerstand wird das vorbeiströmende Medium – im vorliegenden Fall Luft – aufgeheizt. Temperatursensoren vor und nach dem Heizer detektieren den Wärmestrom im Medium. Mit den Daten Wärmestrom und verwendete Heizleistung kann der Massenstrom berechnet werden, siehe Bild 4.

### 3 Kalibration

Da Strömungen im Bereich von  $-1,2$  bis  $1,2$  ml/min bei den Referenzsensoren einen zu großen Fehler aufweisen, wird zur Kalibration des Flusssensors bewusst eine indirekte Methode gewählt. Der Sensor wird an das offene Ende einer teilweise mit Wasser gefüllten Wulffschen Flasche montiert. Der andere Anschluss der Flüssigkeit ist über einen hohen fluidischen Widerstand mit einer Hochpräzisionswaage verbunden, siehe auch Bild 5. Wird nun der Flüssigkeitspegel in der Wulffschen Flasche über den Pegel in der Wägeschale gebracht, so entsteht ein hydrostatisch getriebener Fluss, der über die Waage vermessen werden kann. Diese Strömung wird aufgrund des benötigten Druckausgleichs in der Wulffschen Flasche auch vom Flusssensor detektiert. Durch lineare Änderung des Höhenunterschiedes kann so der komplette benötigte Strömungsbereich untersucht werden. Die so gewonnenen Daten wurden mit einem kubischen Fit ( $R=99,8\%$ ) angenähert und für die folgenden Messungen zur Umrechnung der Sensorspannung in einen Massenstrom verwendet.



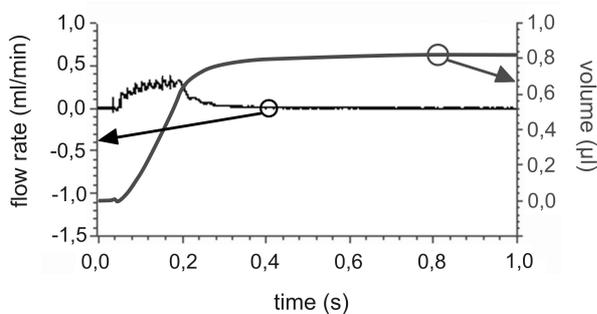
**Bild 5** Aufbau zur Kalibration des Flusssensors.

## 4 Experimentelle Ergebnisse

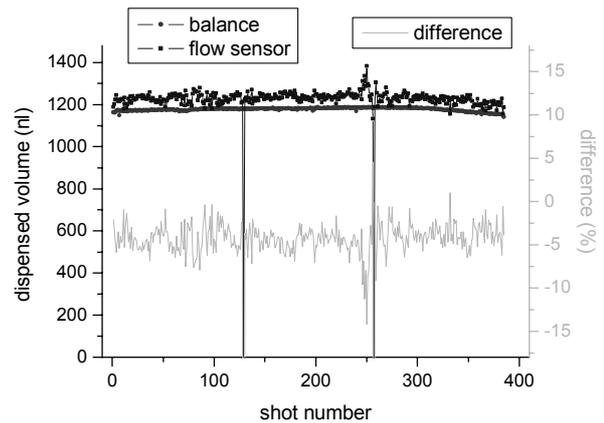
Bild 6 zeigt einen typischen Signalverlauf am Flusssensor mit dem entsprechenden integralen Wert bei der Dosierung von 10 Tropfen mit jeweils 82 nl Volumen bei einer Frequenz von 60 Hz. Jeder der Einzeltropfen ist im Signal deutlich als kleine Zacke wiederzuerkennen. Im Gegensatz zur Waage, die aufgrund ihres Einschwingverhalten und der Verdunstungskompensation mehrere Sekunden benötigt, um einen Messwert zu ermitteln, kann die Volumeninformation vom Flusssensor unter einer Sekunde gewonnen werden. Direkt nach der Dosierung kann schon eine Volumenaussage mit 95%iger Sicherheit getroffen werden. Die Reaktionszeit des Sensors von ca. 2 ms hat hierbei keinen Einfluss auf die Messung: Zum einen nimmt das kapillare Nachfüllen des Pipe-Jet™-Dispensers einen Großteil der Dosierzeit von 16 ms ein, zum anderen dämpft das Luftpolster im Reservoir das fluidische System.

Da der Flusssensor eine Volumen-, die Waage jedoch eine Masseninformation bereitstellt, muss für den Vergleich beider Messwerte die Dichte des Mediums bekannt sein. Der in Bild 7 dargestellte Vergleich zwischen Flusssensor und Waage bei einer Langzeitmessung zeigt, dass der Flusssensor das dosierte Volumen um 4,2 % überschätzt, was durch eine angepasste Kalibration behoben werden kann. Für eine einzelne Dosierung (82 nl) beträgt diese Abweichung 20 %, da hier durch die geringere durchschnittliche Flussrate der Einfluss der Kalibration größer wird und zudem sehr nahe am Limit des Sensors gemessen wird.

Die bei diesen Versuchen gewählte Abtastfrequenz für den Flusssensor beträgt 10 kHz, kleinere Frequenzen führen zu größeren Abweichungen von bis zu 20 % bei 1  $\mu$ l, größere Frequenzen zeigen keine weitere Verbesserung. Der Gesamt-CV der gravimetrischen Messung beträgt im Bereich von 1  $\mu$ l 0,4 %, der Fehler der Flusssensormessung beläuft sich auf 4,7 %. Für größere Volumina um 10  $\mu$ l fällt dieser Fehler auf weniger als 2 % ab.



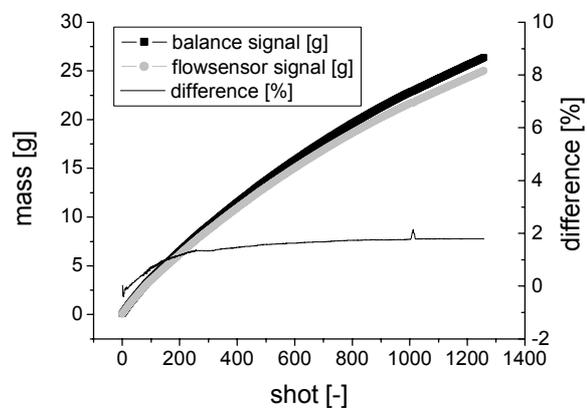
**Bild 6** Flussrate und dosiertes Volumen für eine Serie von 10 Dosierungen à 82 nl.



**Bild 7** Zeigt einen Vergleich zwischen Waage- und Flusssensor-Werten bei einer Serie von 400 Dosierungen von je 1,2  $\mu$ l. Die großen Abweichungen bei Dosierung 125 und 257 sind auf das Öffnen/Schließen der Labortür und dem damit verbundenen Druckpuls zurückzuführen.

Bild 8 zeigt die Ergebnisse einer Messserie von 1250 Dosierungen à 20  $\mu$ l. Hierbei wurde zudem mit der Sartorius SC1 eine Waage mit größerem Wägebereich (max. 200 g) und geringerer Auflösung (10  $\mu$ g) gewählt, da der maximal 2,1 g fassende Wägeteller der SC2 zu klein für das gesamte dosierte Volumen von 25 ml ist. Die Abweichung zwischen Gravimetrie und Flusssensor ist über den gesamten Bereich kleiner als 2 %.

Anhand dieser Messung wird auch das Verhalten des Aufbaus bei größer werdendem Totvolumen im Reservoir untersucht. Über den gesamten Bereich nimmt dieses von knapp 5 ml auf 30 ml zu, was natürlich zu einer größeren Dämpfung und Trägheit des Messsystems führt. Hierdurch werden die Amplituden des Flusssensorsignals zwar geringer, das Integral jedoch bleibt konstant.



**Bild 8** Verhalten bei 1250 Dosierungen à 20  $\mu$ l:

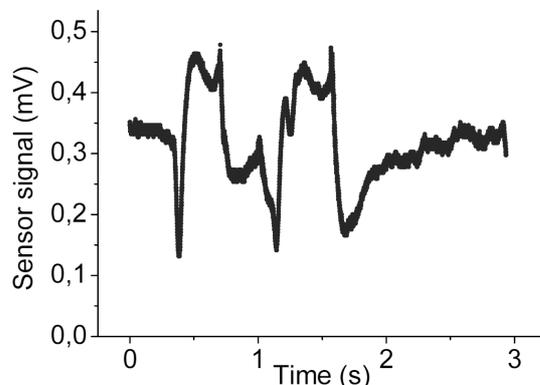
## 4.1 Externe Messeinflüsse

Die hohe Empfindlichkeit des Flusssensors auf kleinste Luftschwankungen führt dazu, dass er auch selbst das Öffnen oder Schließen der Labortür als Dosierereignis erfasst: Der aus der Türbewegung resultierende Wind führt zu einer Strömung im Sensor, siehe auch Bild 8 und die starken Messausreißer in Bild 7. Der Fluss ist hierbei im Bereich 0,3 ml/min, also im Bereich des auch sonst verwendeten Messsignals. Durch Anbringen eines Schalldämpfers an den Außenport des Sensors kann dies jedoch nahezu eliminiert werden.

Der thermische Flusssensor selbst reagiert entsprechend dem idealen Gasgesetz auf Druck- und Temperaturschwankungen. Da dies über einen Druckbereich von 960 bis 1040 mbar einen Fehler von  $\pm 8\%$  und über einen Temperaturbereich von 0 bis 40°C einen Fehler von  $\pm 6\%$  ergibt, wurden die Messungen bei konstanten Labortemperaturen und nur bei geringen Luftdruckschwankungen durchgeführt. Für die industrielle Anwendung müsste an das Messsystem zur Kompensation dieser Einflüsse noch ein Druck- und ein Temperatursensor angeschlossen und deren Werte verrechnet werden.

## 4.2 Verwendung in anderen Dosiersystemen

Aufgrund der verwendeten dünnen Messmembran im Flusssensor kann dieser lediglich bis zu Reservoirdrücken von ca. 2 bar eingesetzt werden. Dies schließt eine direkte Verwendung in druckgetriebenen Systemen [5], die oft mit höheren Drücken arbeiten, aus. Bei druckfreien Systemen, wie zum Beispiel dem TopSpot-Microarrayer [6] oder akustischen InkJet-Systemen wie dem Microdrop Dispenser [7], kann es aber für den Volumenbereich ab 10 nl nahezu ohne Änderung übernommen werden.



**Bild 8** Sensorsignal beim Öffnen der Labortür.

## 5 Zusammenfassung

Die vorgestellte Methode zur Volumenbestimmung dosierter Mengen arbeitet kontaktfrei und benötigt auch keinerlei Zugang zum Flüssigkeitsstrahl. Sie bestimmt mit ihrem einfachen und kostengünstigen Aufbau das dosierte Volumen unabhängig vom Medium in weniger als einer Sekunde und lässt sich sehr gut in existierende kontaktfreie und vermutlich auch kontaktbasierte Dosiersysteme einbauen. Dabei kann das System im Bereich einiger  $\mu\text{l}$  das abgegebene Volumen mit einer Richtigkeit von besser als 5% bestimmen, bei kleineren Volumina kann zumindest noch zuverlässig die Aussage getroffen werden, ob erfolgreich dosiert wurde oder nicht. Damit ist das System auch für die Ausfallüberwachung bei kritischen Dosierprozessen im nl-Bereich verwendbar. Durch das indirekte Messverfahren können auch aggressive Medien überwacht werden, die sonst den Fluss- oder andere Sensoren angreifen würden.

## 6 Literatur

- [1] W. Streule et al., "PipeJet: A Simple disposable dispenser for the nanoliter- and microliter range". JALA Vol. 9 Issue 5, pp. 300-306, Oct. 2004.
- [2] M. Ashauer et al., „New applications for thermal flow sensors“, Proc of Sensor 2001, Nürnberg, Germany.
- [3] Sartorius AG, Weender Landstrasse 94-108, D-37075 Göttingen, Germany, [www.sartorius.de](http://www.sartorius.de)
- [4] Testpoint 4.1, Keithley Instruments GmbH, Germany; [www.keithley.com](http://www.keithley.com)
- [5] Cartesian Dispensing Systems, 4355 Varsity Drive, Ann Arbor, MI 48108 USA; [www.cartesiantech.com](http://www.cartesiantech.com)
- [6] O. Gutmann et al., Biomed. Microdevices 6, 131, 2004.
- [7] Microdrop GmbH; Muehlenweg 143; D-22844 Norderstedt, Germany; [www.microdrop.de](http://www.microdrop.de)