(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/77507 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: G01N 27/447, B01L 3/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05204

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Juni 2000 (06.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 27 534.3 16. Juni 1999 (16.06.1999) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). **GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER SPEKTROCHEMIE UND ANGEWANDTEN SPEKTROSKOPIE E.V.** [DE/DE]; Bunsen-Kirchhoff-Strasse 11, D-44139 Dortmund (DE).

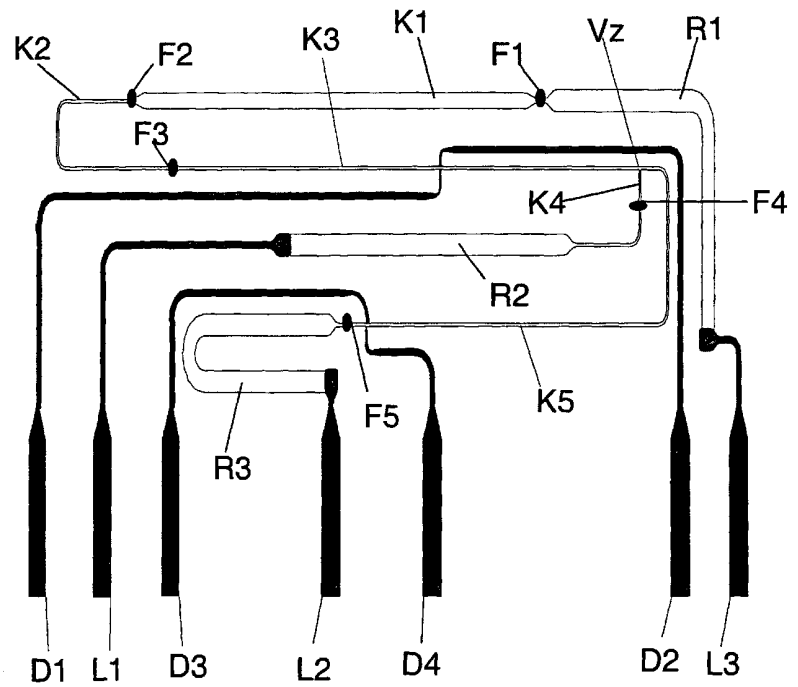
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **EISENBEISS, Friedhelm** [DE/DE]; Luisenstrasse 28, D-64331 Weiterstadt (DE). **STANISLAWSKI, Bernd** [DE/DE]; Ilkenhansstr. 13, D-60433 Frankfurt (DE). **GREVE, Thomas** [DE/DE]; Dieburger Str. 238, D-64287 Darmstadt (DE). **BENDER, Renate** [DE/DE]; Altheimweg 14, D-64291 Darmstadt (DE). **HERGENRÖDER, Roland** [DE/DE]; Immermannstr. 35, D-44147 Dortmund (DE). **WEBER, Günther** [DE/DE]; Justusweg 2, D-44149 Dortmund (DE). **GRASS, Benedikt** [DE/DE]; Schlesien Str. 30, D-59457

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE FOR INTRODUCING SAMPLES

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUR PROBENAUFGABE



(57) **Abstract:** The invention relates to a device for introducing samples which is used for miniaturized analytical systems. Defined volumina of 0.01 µl up to 100 µl can be introduced due to a specific design of the channel system and the displacement of the liquid volume of a defined channel section. The inventive device is especially useful for a subsequent analysis of the samples by means of isotachophoresis.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/77507 A1

Werl (DE). **NEYER, Andreas** [DE/DE]; Langerfelderstr. 69a, D-56838 Iserlohn (DE). **JÖHNCK, Matthias** [DE/DE]; Dülmener Str. 27a, D-48163 Münster (DE).

(74) **Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH**; D-64271 Darmstadt (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten** *(national)*: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *Mit internationalem Recherchenbericht.*

— *Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Probenaufgabe für miniaturisierte Analysensysteme. Durch gezieltes Design des Kanalsystems und Verdrängen des Flüssigkeitsvolumens eines bestimmen Kanalabschnitts können definierte Volumina von 0,01 µl bis zu 100 µl aufgegeben werden. Die erfindungsgemässe Vorrichtung eignet sich insbesondere für eine anschliessende Analyse der Proben mittels Isotachophorese.

Vorrichtung zur Probenaufgabe

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Probenaufgabe für planare, miniaturisierte Analysensysteme.

In Bereichen wie der Lebensmittelanalytik, Umweltanalytik oder auch der industriellen Qualitätskontrolle besteht zunehmend Bedarf an Analysensystemen, die schnell und ohne großen apparativen Aufwand die genaue und quantitative Analyse komplexer Gemische ermöglichen. Neben Sensoren oder Schnelltests, die auf spezifischen chemischen Reaktionen basieren und daher keine universellen Verfahren darstellen, werden hauptsächlich chromatographische und elektrophoretische Trennverfahren eingesetzt. Im Gegensatz zu den meisten chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren bietet die Isotachophorese (ITP) die Möglichkeit, große Probenmengen bei hoher Trennselektivität ohne vorherige Aufarbeitung zu analysieren. Elektrophoretische Trennverfahren wie die ITP eignen sich zudem auch zum Einsatz in miniaturisierten Analysensystemen (MAS), so daß der apparative Aufwand für die Analysen stark reduziert werden kann. Ein wesentlicher Vorteil des Einsatzes von MAS besteht darin, daß diese nach einer Kontaminierung verworfen werden können. Um diesen Vorteil zu realisieren, muß die Reproduzierbarkeit von Analysen in der Serie und zwischen verschiedenen MAS gleichen Types sichergestellt sein.

Neben der Analysenvorrichtung selbst ist einer der wichtigsten Bestandteile eines miniaturisierten Systems die Vorrichtung zur Probenaufgabe. Da Verfahren wie beispielsweise die ITP bezüglich der Beschaffenheit und der Menge der Probe sehr variabel sind, wird durch die Art der Probenaufgabe bestimmt, welches Probenvolumen und welche Art von Probe analysiert werden kann.

In makroskopischen Analysensystemen können ähnlich wie bei Geräten für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie oder Geräten für die Isotachophorese mechanische Aufgabevorrichtungen zur Aufgabe eines definierten Probenvolumens verwendet werden. In Abbildung 4 wird beispielhaft eine derartige Aufgabevorrichtung aus dem Stand der Technik näher beschrieben. Die Vorrichtungen bestehen zumeist aus komplex aufgebauten Hahnsystemen, teilweise mit integrierten Aufgabeschleifen. Auf miniaturisierte Analysensysteme lassen sich diese Vorrichtungen nicht übertragen, da drehbare Hähne oder sonstige mechanische Vorrichtungen, wie beispielsweise verschließbare Ventile, nicht entsprechend miniaturisiert werden können.

Deswegen finden sich bei miniaturiserten Analysenvorrichtungen auf Basis von Kapillarelektrophorese (CE) oder ITP Vorrichtungen, bei denen die Probenaufgabe elektrokinetisch unter Ausnutzung des elektroosmotischen Flusses erfolgt. Dies wird im folgenden elektroosmotische Probenaufgabe genannt. Ein schematischer Aufbau einer solchen Vorrichtung aus dem Stand der Technik ist in Abbildung 3 gezeigt. Durch gekreuzte oder versetzt gekreuzte Kapillarstrukturen wird ein Probenvolumen dadurch definiert, daß zunächst ein Kanal mit Probe befüllt wird. Dies kann beispielsweise elektroosmotisch durch Anlegen einer Spannung erfolgen. Anschließend werden die Elektroden an dem befüllten Kanal auf gleiches Potential geschaltet und eine Spannung an dem senkrecht dazu liegenden Trennkanalsystem angelegt. Auf diese Weise wird das Probenvolumen, das sich an der Schnittstelle der beiden Kanalsysteme befindet, in das Trennkanalsystem transportiert. Das so erzeugte Probenvolumen liegt im Bereich einiger Nanoliter oder weniger.

Auf diese Weise ist es zwar möglich, ein durch die Schnittstelle der Kanäle definiertes Probenvolumen aufzugeben, aber die Volumenelemente, in denen durch Diffusion Stoffaustausch mit den Seitenkanälen stattfindet, sind bezogen auf das durch das Schnittvolumen vorgegebene Proben-

volumen sehr groß. Somit ist das tatsächlich eingebrachte Probenvolumen starken Schwankungen unterworfen. Da nur sehr kleine Probenmengen untersucht werden können, sinkt zudem die Konzentration bestimmter Analyte im Detektionsbereich schnell unter die Nachweisgrenze oder das entnommene Probenvolumen kann nicht als repräsentativ für die Probengesamtheit angesehen werden.

Weiterhin kann die Probenaufgabe bei ausreichend großem Kanalquerschnitt durch hydrodynamische Injektion aus einem Probengefäß erfolgen. Dabei wird ein Teil der Probe durch zeitlich gesteuertes Anlegen eines Druckunterschiedes aus dem externen Probengefäß an den Anfang der Trennkapillare transportiert. Nachteil dieser Technik ist eine starke Abhängigkeit des Probenvolumens von der Beschaffenheit der Probe (z.B. Viskosität), aber auch von der erreichbaren Genauigkeit der Drucksteuerung. Schon dadurch ist die Aufgabe eines exakt definiertes Probenvolumen nicht möglich. Zusätzlich bestehen auch hier Probleme durch diffusiven bzw. konvektiven Stoffaustausch an den Grenzflächen zwischen Probevolumen und angrenzenden Volumeneinheiten. Bei kommerziellen, nicht miniaturisierten Systemen ist die hydrodynamische Injektion Stand der Technik, für miniaturisierte Systeme bietet sie keine Vorteile gegenüber der oben beschriebenen elektrokinetischen Injektion unter Ausnutzung des elektroosmotischen Flusses.

Eine direkte, elektrophoretische Injektion aus einem externen Probengefäß (ohne Ausnutzung des elektroosmotischen Flusses), wie sie ebenfalls in kommerziellen Geräten eingesetzt wird, ist schon vom Prinzip her nicht geeignet, definierte Volumina aufzugeben, da hierbei in der Probelösung kein Volumenfluß erzeugt wird, sondern nur Ionen elektrophoretisch in das Trennsystem überführt werden.

Ein weiterer grundsätzlicher Nachteil aller elektroosmotischen Verfahren ergibt sich aus der eingeschränkten Materialauswahl. Da der Proben-

transport an das Auftreten eines elektroosmotischen Flusses gebunden ist, muß eine hohe Ladungsdichte an der Materialoberfläche vorhanden sein. Zudem erfolgt schon während der Aufgabe eine elektrophoretische Auftrennung der Probe, so daß ein inhomogenes Injektionsprofil entsteht.

Da mittels ITP problemlos größere Probenvolumina analysiert werden können, wird die Analyseleistung der derzeitigen miniaturisierten Analysensysteme größtenteils durch die ungenügende Möglichkeit zur Aufgabe großer, definierter Probenvolumina eingeschränkt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung zur Probenaufgabe zu entwickeln, die es ermöglicht, definierte variable Probenvolumina zwischen 0,01 bis 100 µl in ein miniaturisiertes Analysensystem einzubringen.

Es wurde gefunden, daß eine Aufgabevorrichtung bestehend aus einem Kanalsystem sowie Fluidikanschlüssen zum Flüssigkeitstransport die Aufgabe großer Probenvolumina in planaren Systemen ermöglicht. Durch Öffnen des Systems am Ende eines Kanalabschnitts und gleichzeitiges Befüllen des Kanalabschnitts mit der Probenlösung am anderen Ende wird ein bestimmter Kanalabschnitt mit der Probenlösung gefüllt. Das Volumen des Kanalabschnitts und somit das aufgegebene Probenvolumen ist durch die Geometrie des Kanalabschnitts bestimmt, ansonsten aber frei wählbar.

Gegenstand der Erfindung ist daher eine Vorrichtung zur Aufgabe definierter Probenvolumina über 0,01 µl für miniaturisierte Analysensysteme, umfassend in der Hauptsache mindestens einen Kanalabschnitt, an dessen Enden jeweils Fluidikanschlüsse vorhanden sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung können Probenvolumina zwischen 0,05 und 30 µl aufgegeben werden.

Bevorzugte Ausführungsform ist weiterhin eine Aufgabevorrichtung, die mindestens zwei hintereinanderliegende Kanalabschnitte enthält, die jeweils von Fluidikanschlüssen begrenzt werden. Wenn beide Kanalabschnitte direkt aneinander grenzen, so sind insgesamt drei Fluidikanschlüsse vorgesehen.

Bevorzugte Ausführungsform ist auch eine Aufgabevorrichtung, die ein Kanalsystem mit mindestens zwei parallelen Kanalabschnitten enthält, die unabhängig voneinander von Fluidikanschlüssen begrenzt werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform ist eine Vorrichtung, die als Fluidikanschlüsse Mikromischer,Ventile und Mikropumpen oder dichtschließende Mikropumpen besitzt.

Abbildung 1 zeigt eine erfindungsgemäße Aufgabevorrichtung.

In Abbildung 2 ist eine mögliche Vorgehensweise zum Befüllen eines miniaturisierten Analysensystems mit einer erfindungsgemäßen Aufgabevorrichtung gezeigt.

Abbildung 3 zeigt eine Aufgabevorrichtung für miniaturisisierte Analysensysteme aus dem Stand der Technik.

Abbildung 4 zeigt eine Aufgabevorrichtung für makroskopische Analysensysteme aus dem Stand der Technik.

Im Gegensatz zu anderen Aufgabemethoden wird bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung das Kanalsystem während der Probenaufgabe an zwei Stellen geöffnet. Eine Öffnung dient zur Einleitung der Flüssigkeit, d.h. beispielsweise der Probenlösung, die andere Öffnung ermöglicht den Austritt der vorher im System befindlichen Flüssigkeit oder Luft. Prinzip der

erfindungsgemäßen Aufgabevorrichtung ist demnach das Verdrängen eines in einem bestimmten Kanalabschnitt befindlichen Flüssigkeits- oder Gas-Volumens durch die Probenlösung.

Durch geeignete Wahl der Eintritts- und Austrittsöffnung wird lediglich die Flüssigkeit in dem dazwischenliegenden Kanalabschnitt verdrängt bzw. der dazwischenliegende Kanalabschnitt gefüllt. Die Flüssigkeit in eventuell vorhandenen angrenzenden Seitenkanälen wird nicht ausgetauscht, da sich in den Seitenkanälen keine geöffneten Eintritts- oder Austrittsöffnungen befinden und so die Flüssigkeit in diesen Bereichen weder durch Druck noch durch Sog bewegt wird. Verluste bzw. Verdünnungen durch Flüssigkeitsströme an den Kontaktflächen zu Seitenkanälen sind im Verhältnis zum gesamten Probenvolumen, das typischerweise im µl-Bereich liegt, gering. Bei geeigneter konstanter Dosiergeschwindigkeit kann die Probenaufgabe sehr gut reproduzierbar erfolgen. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber Methoden, bei denen sehr kleine Probenvolumina von wenigen Nanolitern aufgegeben werden. Eine erfindungsgemäße Aufgabevorrichtung ist prinzipiell auch für Aufgabenvolumina von weniger als 50 nl geeignet. Jedoch sind dann bezüglich Präzision und Genauigkeit Kompromisse notwendig.

Der Transport der Probenflüssigkeit kann über dicht angeschlossene Pumpen, Spritzen, Mikromischer, Elektroosmose oder hydrostatischen Druck erfolgen, bevorzugt über Mikropumpen- und Ventile.

Diese Vorrichtungen können bevorzugt außerhalb, möglichst dicht am Chip, angebracht werden.

Die austretende Flüssigkeit muß nicht zusätzlich abgepumpt werden. Sie wird durch den Druck der injizierten Ersatzflüssigkeit hinreichend effektiv verdrängt.

Durch diese Art des Befüllens werden die Nachteile der elektroosmotischen Injektion vermieden, d.h. die Befüllung ist weitgehend unabhängig von Probenzusammensetzung, pH-Wert und dem Material des Analysensystems. Durch die vorhandenen Ventile oder dichtschließenden Pumpen wird jede störende Flüssigkeitsbewegung, wie beispielsweise durch hydrostatische Druckdifferenzen oder Elektroosmose, unterbunden.

Erfindungsgemäß werden alle Ventile, Pumpen bzw. Mikropumpen, dichtschließende Mikropumpen, Mikromischer oder sonstigen Anschlüsse der erfindungsgemäßen Vorrichtung, die zum Befüllen des Kanalsystems dienen, als Fluidikanschlüsse bezeichnet.

Die erfindungsgemäße Aufgabevorrichtung kann für jede Art von planarem miniaturisiertem Analysensystem eingesetzt werden. Es kann sich dabei um Systeme für die Analytik handeln oder auch um Systeme, die zusätzlich Trenn- oder Derivatisierungseinheiten enthalten. Dem Fachmann sind entsprechende miniaturisierte Systeme bekannt.

Viskosität und Ionenstärke der Probenlösung oder der zu verdrängenden Lösung, d.h. z.B. eines Transportpuffers, haben nur geringen Einfluß auf die Dosierung oder die Einfüllgeschwindigkeit. Es ist möglich, Suspensionen, Emulsionen, partikel- und zellhaltige Flüssigkeiten einzufüllen. Genauso unterliegt die Wahl des Materials zum Aufbau der Analysenvorrichtung, d.h. besonders die Beschaffenheit der Wände des Kanalsystems der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Probenaufgabe keiner Einschränkung. Auch Druckschwankungen, Pulsationen, Anlauf- oder Stopeffekte während des Einbringens der Probe haben auf die Dosiergenauigkeit keinen Einfluß.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung besitzt bezüglich des Aufgabevolumens systembedingt weite Grenzen. Das Volumen der Probeflüssigkeit, die injiziert werden kann, wird allein durch das Volumen des Kanalabschnitts

bestimmt, der sich zwischen den Öffnungen befindet. Durch Variation der geometrischen Abmessungen dieses Abschnitts bei dem Design des Kanalsystems der Analysevorrichtung lassen sich vorab an das analytische Problem angepasste Probenvolumina festlegen. Genauso ist es möglich, verschieden große Abschnitte parallel und/oder in Reihe zu implementieren, so daß das Volumen des durch die Probenlösung zu verdrängenden Abschnitts variiert werden kann. Bevorzugterweise wird deshalb ein Analysesystem zur Nutzung der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit mehreren Kanalabschnitten unterschiedlicher Dimension versehen, die über jeweils unabhängige Fluidikanschlüsse für die Probenaufgabe verwendet werden können. Dadurch können Probenvolumina zwischen 0,01 µl und 100 µl , bevorzugt zwischen 0,05 und 30 µl in unterschiedlicher Abstufung je nach Bedarf injiziert werden. Dabei werden üblicherweise Variationskoeffizienten bei der Aufgabe von Probenvolumina ab 1 µl von etwa 5%, typischerweise unter 2% erreicht.

Auf diese Weise können quantitativ reproduzierbare und leicht handhabbare repräsentative Probenmengen eines flüssigen Analyten in jedes mikrostrukturierte System eingebracht werden. Besonders bevorzugt ist der Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung für die ITP, da damit die Möglichkeit gegeben ist, kleinste Mengen von Analyten aus großen Probenvomunina anzureichern und zu separieren.

Abbildung 1 zeigt beispielhaft eine mögliche Anordnung des Kanalsystems der erfindungsgemäßen Aufgabevorrichtung. Das Kanalsystem ist in zwei Kanalabschnitte 1A und 1B mit unterschiedlichem Volumen unterteilt. Daran angrenzend befindet sich der Trennkanal 1C. Über die Fluidikanschlüsse 11, 12 und 13 kann entweder der Kanalabschnitt 1A (Bei Öffnen der Anschlüsse 11 und 12) oder der Kanalabschnitt 1B (Bei Befüllen über die Anschlüsse 12 und 13) oder die beiden Kanalabschnitte zusammen (bei Befüllen über die Anschlüsse 11 und 13) mit der Proben-

lösung gefüllt werden. Nach Befüllen der Aufgabeabschnitte wird durch Anlegen einer Spannung die Probe in Abschnitt 1C aufgetrennt. Falls nur Abschnitt 1A mit der Probe befüllt wurde, kann auch Abschnitt 1B als Trennstrecke genutzt werden, so daß die Trennstrecke bei Bedarf verlängert werden kann.

Abbildung 2 zeigt eine mögliche Vorgehensweise bei der Befüllung eines miniaturisierten Analysensystems. Dargestellt ist ein Kanalsystem bestehend aus drei Reservoiren R1 bis R3, den Kanalabschnitten K1 bis K4, den Fluidikanschlüssen F1 bis F6 und einer Verzweigungsstelle Vz. Das in der Abbildung gezeigte System besitzt einen Kanalabschnitt K1 zur Probenaufgabe. Die Trennung kann entlang des Kanalabschnitts K2 und K3 oder K2 und K4 erfolgen. Zur Durchführung einer isotachophoretischen Trennung muß das System mit einer Probe und entsprechenden Puffern befüllt werden. Dabei muß das Probevolumen an einer Seite in Richtung der Trennstrecke mit einem Puffer (Leading-Puffer) und an der anderen Seite mit einem anderen Puffer (Terminating-Puffer) in Kontakt sein. Durch die Verzweigung Vz des Kanalsystems besteht die Möglichkeit, über die Reservoire R2 und R3 unterschiedliche Leading-Puffer einzufüllen. Das Ausschleusen von aufgetrennten Komponenten aus der Probe kann über den Fluidikanschluß F3 erfolgen.

Um die gewünschte Anordnung von Probe und Puffern im Kanalsystem zu erreichen, werden zunächst, wie unter A in der Abbildung schematisch dargestellt, die Fluidikanschlüsse F2 (Auslaß), F4, F5 und F6 (Einlässe) geöffnet und das Kanalsystem über die drei Reservoirs mit den beiden Leading-Puffern (über R2 und R3, schräg schraffiert bzw. gepunktet dargestellt) und dem Terminating-Puffer (über R1, senkrecht gestreift dargestellt) gefüllt. Überschüssiger Puffer kann durch den Fluidikanschluß F2 austreten. Auf diese Weise füllt sich Kanalabschnitt K1 mit Terminating-Puffer, der Abschnitt K3 mit Leading-Puffer (LE2) über R2, Abschnitt K4 mit Leading-Puffer (LE1) über R3 und Kanalabschnitt K2 enthält eine Mischung

der beiden Leading-Puffer. Die Fluidikanschlüsse F1 und F3 bleiben bei diesem Schritt geschlossen.

Der Kanalabschnitt K2 kann wahlweise mit Leading-Puffern über R2 oder R3 gefüllt werden. K2 stellt den ersten Abschnitt der Trennstrecke dar

In Teil B der Abbildung wird gezeigt, wie die Probe in den Kanalabschnitt K1 eingebracht wird und der Kanalabschnitt K2 mit einem Leading-Puffer über R3 gefüllt wird. Die Fluidikanschlüsse F5 und F6 sind geschlossen und es wird kein weiterer Terminating-Puffer über R1 sowie kein weiterer Leading-Puffer (LE2) über R2 gepumpt. Fluidikanschluß F4 ist geöffnet und Kanalabschnitt K2 wird mit Leading-Puffer (LE1) über R3 gefüllt. Gleichzeitig ist der Fluidikanschluß F1 geöffnet und die Probe wird über F1 zugeführt (dargestellt als Wellenlinien). Über den geöffneten Fluidik-anschluß F2 kann überschüssige Probe und überschüssiger Leading-Puffer (LE1) austreten. Dadurch, daß der Leading-Puffer (LE1) und das Probevolumen simultan gegeneinander gepumpt werden, wird eine besonders präzise Füllung der Kanalabschnitte K1 und K2 erreicht. Auf diese Weise ist es möglich auch mit Pumpen, die eine geringe Pulsation besitzen, eine exakte Befüllung vorzunehmen.

Nach Beendigung des Füllvorganges werden die Fluidikanschlüsse geschlossen. Man erhält so ein abgeschlossenes System ohne hydrodynamischen Fluß, in dem die Trennung reproduzierbar durchgeführt werden kann. Die Probe kann ganz oder in Fraktionen über die Kanalabschnitte K2 und K3 oder über die Kanalabschnitte K2 und K4 getrennt werden. Sobald die Probe oder eine gewählte Fraktion durch den Kanalabschnitt K2 gewandert ist und an der Verzweigung Vz angekommen ist, kann entschieden werden, ob die Trennung weiter in Richtung K4 oder K3 geführt werden soll. Dies geschieht durch dauerndes oder zeitweises Umschalten der Anodenpotentials von F4 auf F6.

Die folgende Tabelle zeigt nochmals im Überblick die Schaltung der Fluidikanschlüsse während der einzelnen Schritte der Probenaufgabe:

Füllprozeß	**Fluidikanschlüsse**					
	F1	**F2**	**F3**	**F4**	**F5**	**F6**
Füllprozeß A	zu	offen, „Überlauf"	zu	offen (LE1 rein)	offen (TE rein)	offen (LE2 rein)
Füllprozeß B	offen (Probe rein)	offen, „Überlauf"	zu	offen (LE1 rein)	zu	zu

Nach Beendigung des Füllvorganges werden die Fluidikanschlüsse (F1-F6) geschlossen.

Im folgenden werden beispielhaft einige Schaltvorgänge für verschiedene analytische Prozesse auf einer Analyseeinheit entsprechend Abbildung 2 aufgeführt:
(Die Spannung wird jeweils hinter den Fluidikanschlüssen angelegt)

1.) Einfache Trennung (Trennkanäle K2 und K4)

Anode : F4 Kathode : F5

2.) 2-stufige Trennung (Ausschleusung in internen Kanal K3)

a.) Trennung in K2 Anode : F4 Kathode : F5
(Umschalten, wenn Probenkomponente kurz vor Vz)
b.) Trennung in K3 Anode : F6 Kathode : F5

3.) 2-stufige Trennung (Ausschleusung und Überführung in externen Kanal)

a.) Trennung in K2 Anode : F4 Kathode : F5
(Umschalten, wenn Probenkomponente kurz vor Vz)
b.) Überführung nach außen über F3 Anode : F3 Kathode : F5

Abbildung 3 zeigt eine Möglichkeit zur elektrokinetischen Probenaufgabe in miniaturisierten Analysensystemen nach dem Stand der Technik. Die Bilder A, B, C und D zeigen die einzelnen Schritte der Probenaufgabe. Bild A zeigt schematisch eine gekreuzte Kanalstruktur. An den Enden der Kanäle befinden sich die Elektroden E1 bis E4. Zunächst wird, wie in Bild B verdeutlicht, durch Anlegen einer Spannung zwischen Elektrode E1 (0 V) und E2 (+ 500 V) ein Kanal mit Probe befüllt. Anschließend werden, wie in Bild C gezeigt, die Elektroden an dem befüllten Kanal auf gleiches Potential geschaltet (z.B. E1 und E2 beide auf + 400 V) und eine Spannung an dem senkrecht dazu liegenden Trennkanalsystem angelegt (E3 = 0 V und E4 = + 2,5 kV). Auf diese Weise wird das Probenvolumen, das sich an der Schnittstelle der beiden Kanalsysteme befindet, in das Trennkanalsystem transportiert (Bild D). Das so erzeugte Probenvolumen liegt im Bereich einiger Nanoliter oder weniger.

Abbildung 4 zeigt eine Möglichkeit zur Probenaufgabe in makroskopischen Analysensystemen, wie beispielsweise dem Isotachophoresegerät ItaChrom® EA 101 der Firma I + M, Analytische Meß- und Regeltechnik, Deutschland. Die Bilder A1/A2, B1/B2 und C1/C2 zeigen die unterschiedlichen Stufen der Probenaufgabe, wobei die Bilder A1, B1 und C1 eine Seitenansicht der Aufgabevorrichtung zeigen, die Bilder A2, B2 und C2 eine Ansicht von oben. Diese mechanische Vorrichtung zur Probenaufgabe besteht aus einem Hahn K, der von einer Ummantelung U umgeben ist. Sowohl die Ummantelung U, wie auch der Hahn K sind mehrfach von Kanälen durchbrochen. Der Hahn K kann in der Ummantelung U derart gedreht werden, daß jeweils bestimmte Kanäle in Hahn und Ummantelung verbunden werden und so Flüssigkeiten aus Vorratsgefäßen durch die gezeigte Vorrichtung definiert in das angeschlossene Isotachophoresegerät gelangen. Vorratsbehälter und das ITP-Gerät sind in der Abbildung nicht gezeigt, sondern lediglich durch Pfeile angedeutet. In den Abbildungen A1/A2 ist der Hahn derart gedreht, daß eine Verbindung der Kanalstücke 3,

4 und 5, sowie 2 und 6 besteht. Dadurch wird Kanalstück 5 im inneren des Hahns mit Probelösung aus einem Vorratsgefäß gefüllt, das mit Kanal 3 verbunden ist. Außerdem wird über ein Vorratsgefäß an Kanal 2 das Kanalsystem des Isotachophoresegeräts mit einem der beiden für eine ITP notwendigen Trennpuffer (Puffer 1) gefüllt.

In einem zweiten Schritt (Bild B1/B2) wird der Hahn K so gedreht, daß die in Bild A1/A2 bestandenen Kanalverbindungen unterbrochen werden. Statt dessen wird eine Verbindung der Kanalstücke 1 und 7 hergestellt. Auf diese Weise wird das hinter der Aufgabevorrichtung liegende Kanalsystem mit einem zweiten Puffer (Puffer 2) gefüllt. In Bild C1/C2 wird schließlich der Hahn K erneut gedreht, so daß eine Verbindung der Kanalstücke 1, 5 und 2 entsteht. Kanal 2 ist mit Puffer 1 gefüllt, Kanal 5 mit der Probenlösung und Kanal 1 mit Puffer 2. Auf diese Weise ist ein durch die Abmessungen von Kanal 5 definiertes Volumen der Probenlösung zwischen den für die ITP notwendigen zwei Puffern eingebettet. Durch Anlegen einer Spannung kann nun die Trennung begonnen werden.

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen, sowie der korrespondierenden Anmeldung DE 199 27 534, eingereicht am 16.06.1999, ist durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

Ansprüche

1. Vorrichtung zur Aufgabe definierter Probenvolumina über 0,01 µl für miniaturisierte Analysensysteme umfassend mindestens einen Kanalabschnitt, an dessen Enden jeweils mindestens ein Fluidikanschluß vorhanden ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Probenvolumen zwischen 0,05 und 30 µl beträgt.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Kanalsystem mindestens zwei hintereinanderliegende Kanalabschnitte enthält, die jeweils von Fluidikanschlüssen begrenzt werden.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Kanalsystem mindestens zwei parallele Kanalabschnitte enthält, die unabhängig voneinander von Fluidikanschlüssen begrenzt werden.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Fluidikanschlüsse dichtschließende Mikropumpen dienen.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Fluidikanschlüsse Mikromischer, Ventile und Mikropumpen dienen.

Fig. 1

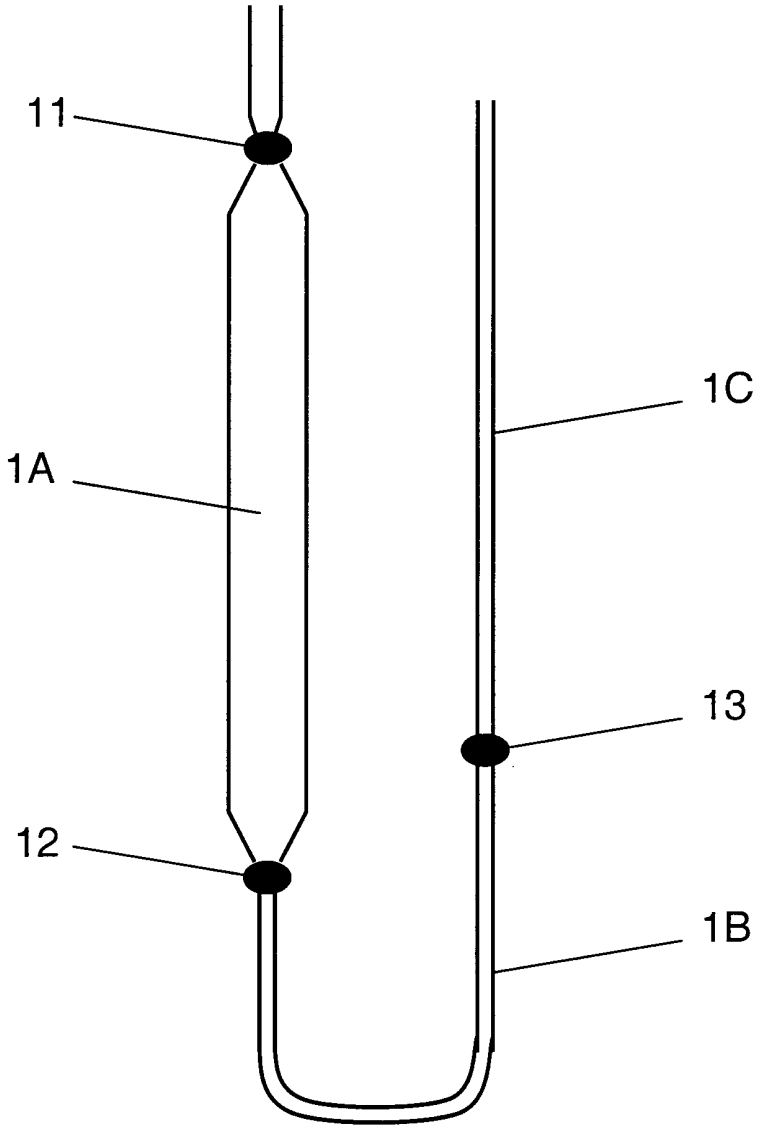
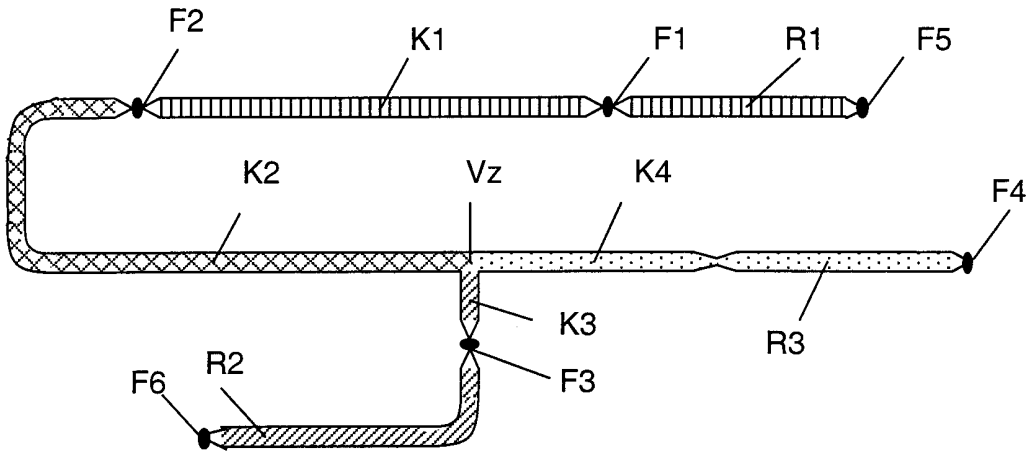


Fig. 2

A


F2
K1
F1
R1
F5
K2
Vz
K4
F4
K3
R3
F6
R2
F3

B

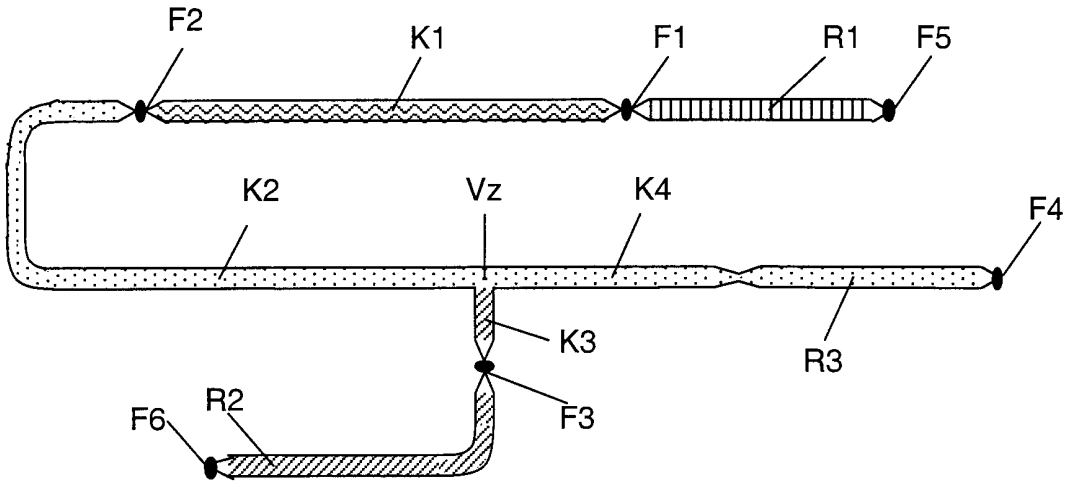

F2
K1
F1
R1
F5
K2
Vz
K4
F4
K3
R3
F6
R2
F3

Fig. 3

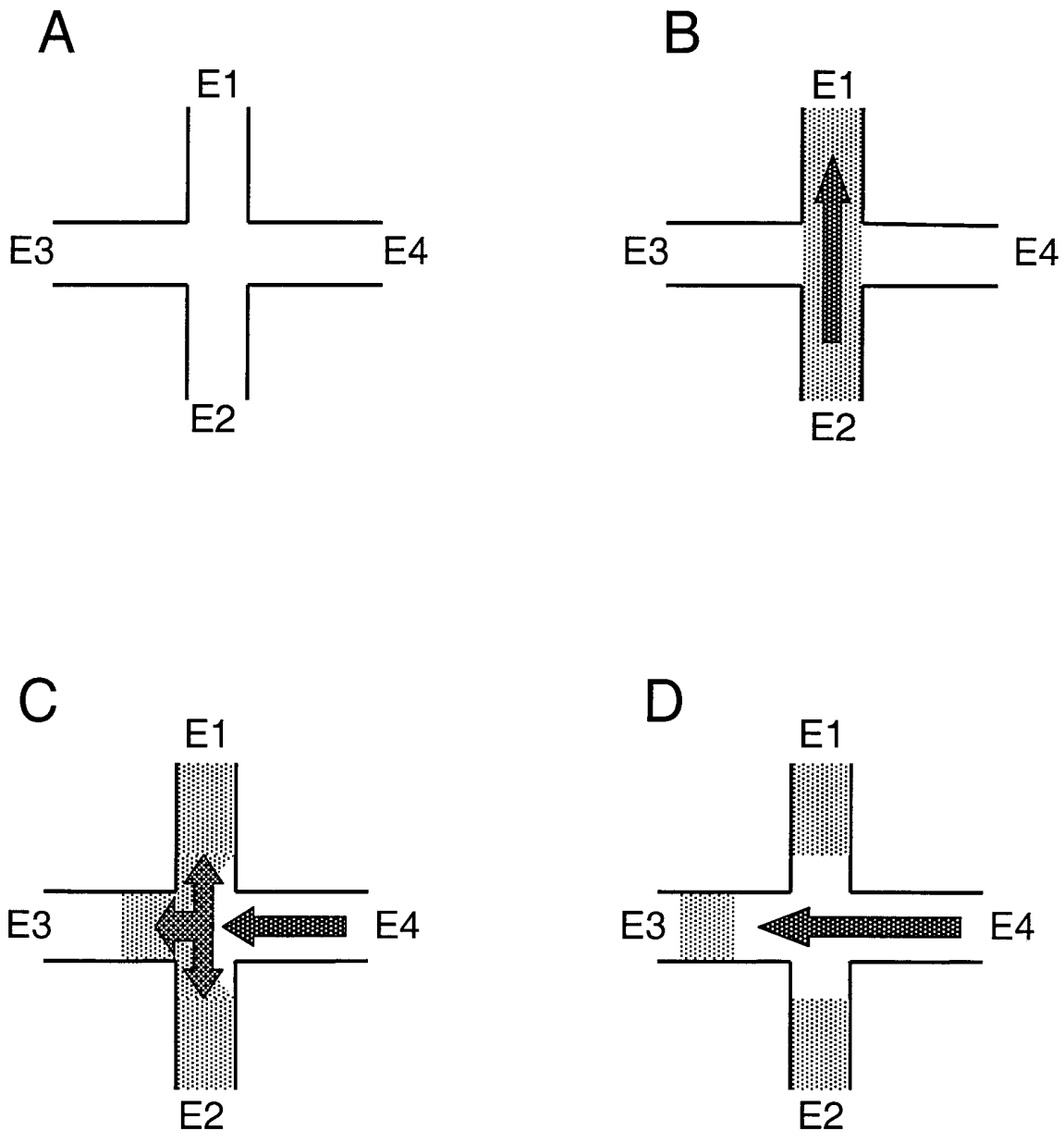
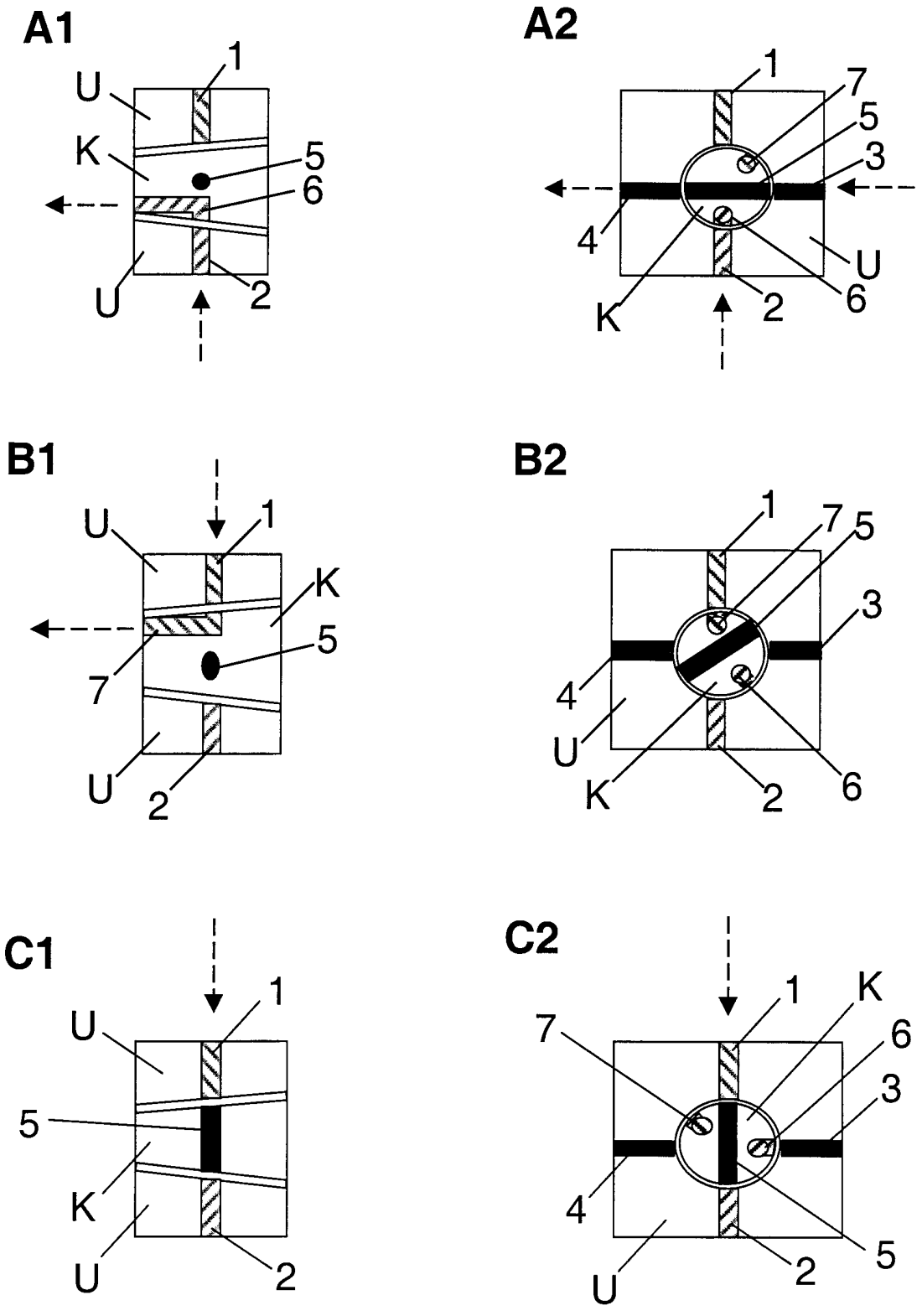


Fig. 4


A1
U
1
K
5
6
U
2
A2
1
7
5
3
4
U
K
2
6
B1
U
1
K
5
7
U
2
B2
1
7
5
3
4
U
K
2
6
C1
U
1
5
K
U
2
C2
7
1
K
6
3
4
5
U
2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr ıal Application No
PCT/EP 00/05204

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N27/447 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N B01L B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 644 395 A (FOLTA JAMES A) 1 July 1997 (1997-07-01) the whole document	1,2
X	ELWENSPOEK M ET AL: "TOWARDS INTEGRATED MICROLIQUID HANDLING SYSTEMS" JOURNAL OF MICROMECHANICS & MICROENGINEERING,US,NEW YORK, NY, vol. 4, no. 4, 1 December 1994 (1994-12-01), pages 227-245, XP000601275 ISSN: 0960-1317 abstract	1,2
A		6

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 September 2000	17/10/2000

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Brison, O

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern ıal Application No
PCT/EP 00/05204

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 00231 A (BOUSSE LUC J ;CALIPER TECHN CORP (US); KOPF SILL ANNE R (US); PARC) 8 January 1998 (1998-01-08) page 28, line 25 -page 29, line 10	1,6
A	WO 99 09042 A (CEPHEID) 25 February 1999 (1999-02-25) page 3, line 36 -page 4, line 3 page 34, line 21-31 page 43, line 5-25	1
A	WO 98 52691 A (ALBERTA RES COUNCIL ;UNIV ALBERTA (CA)) 26 November 1998 (1998-11-26) page 11, line 4-15	1,6
A	GRAVESEN P ET AL: "MICROFLUIDICS - A REVIEW" JOURNAL OF MICROMECHANICS & MICROENGINEERING,US,NEW YORK, NY, vol. 3, 1993, pages 168-182, XP000601274 ISSN: 0960-1317 paragraph '0006!; figure 14	1,6
A	WO 97 22825 A (NEUKERMANS ARMAND P) 26 June 1997 (1997-06-26) page 1-3	1,6
A	WO 98 58247 A (SOANE BIOSCIENCES INC) 23 December 1998 (1998-12-23) abstract	1

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...rmation on patent family members

Interr ...al Application No
PCT/EP 00/05204

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5644395 A	01-07-1997	NONE	
WO 9800231 A	08-01-1998	US 5942443 A	24-08-1999
		US 6046056 A	04-04-2000
		AU 3499097 A	21-01-1998
		BR 9710054 A	11-01-2000
		CA 2258489 A	08-01-1998
		EP 0907412 A	14-04-1999
WO 9909042 A	25-02-1999	AU 8906698 A	08-03-1999
		EP 1003759 A	31-05-2000
		AU 1947299 A	19-07-1999
		WO 9933559 A	08-07-1999
WO 9852691 A	26-11-1998	AU 7421898 A	11-12-1998
		EP 0981408 A	01-03-2000
WO 9722825 A	26-06-1997	EP 0862708 A	09-09-1998
		JP 2000508058 T	27-06-2000
WO 9858247 A	23-12-1998	US 5900130 A	04-05-1999
		AU 8149398 A	04-01-1999
		EP 1021707 A	26-07-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr nales Aktenzeichen
PCT/EP 00/05204

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N27/447 B01L3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N B01L B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 644 395 A (FOLTA JAMES A) 1. Juli 1997 (1997-07-01) das ganze Dokument	1,2

X	ELWENSPOEK M ET AL: "TOWARDS INTEGRATED MICROLIQUID HANDLING SYSTEMS" JOURNAL OF MICROMECHANICS & MICROENGINEERING,US,NEW YORK, NY, Bd. 4, Nr. 4, 1. Dezember 1994 (1994-12-01), Seiten 227-245, XP000601275 ISSN: 0960-1317 Zusammenfassung	1,2
A		6

	-/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
25. September 2000	17/10/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Brison, O

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr ıales Aktenzeichen
PCT/EP 00/05204

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 98 00231 A (BOUSSE LUC J ;CALIPER TECHN CORP (US); KOPF SILL ANNE R (US); PARC) 8. Januar 1998 (1998-01-08) Seite 28, Zeile 25 -Seite 29, Zeile 10 ---	1,6
A	WO 99 09042 A (CEPHEID) 25. Februar 1999 (1999-02-25) Seite 3, Zeile 36 -Seite 4, Zeile 3 Seite 34, Zeile 21-31 Seite 43, Zeile 5-25 ---	1
A	WO 98 52691 A (ALBERTA RES COUNCIL ;UNIV ALBERTA (CA)) 26. November 1998 (1998-11-26) Seite 11, Zeile 4-15 ---	1,6
A	GRAVESEN P ET AL: "MICROFLUIDICS - A REVIEW" JOURNAL OF MICROMECHANICS & MICROENGINEERING,US,NEW YORK, NY, Bd. 3, 1993, Seiten 168-182, XP000601274 ISSN: 0960-1317 Absatz '0006!; Abbildung 14 ---	1,6
A	WO 97 22825 A (NEUKERMANS ARMAND P) 26. Juni 1997 (1997-06-26) Seite 1-3 ---	1,6
A	WO 98 58247 A (SOANE BIOSCIENCES INC) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) Zusammenfassung -----	1

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung die zur selben Patentfamilie gehören

Interne les Aktenzeichen
PCT/EP 00/05204

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5644395	A	01-07-1997	KEINE		
WO 9800231	A	08-01-1998	US	5942443 A	24-08-1999
			US	6046056 A	04-04-2000
			AU	3499097 A	21-01-1998
			BR	9710054 A	11-01-2000
			CA	2258489 A	08-01-1998
			EP	0907412 A	14-04-1999
WO 9909042	A	25-02-1999	AU	8906698 A	08-03-1999
			EP	1003759 A	31-05-2000
			AU	1947299 A	19-07-1999
			WO	9933559 A	08-07-1999
WO 9852691	A	26-11-1998	AU	7421898 A	11-12-1998
			EP	0981408 A	01-03-2000
WO 9722825	A	26-06-1997	EP	0862708 A	09-09-1998
			JP	2000508058 T	27-06-2000
WO 9858247	A	23-12-1998	US	5900130 A	04-05-1999
			AU	8149398 A	04-01-1999
			EP	1021707 A	26-07-2000