



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

**„Herstellung und Charakterisierung von Nitrocellulose-Papier
Hybridmaterialien und Cellulosenitrat-Papieren als alternative
Membranmaterialien für diagnostische Assays“**

**Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

**Dissertation
von Marcel Krauß**

Erstgutachter: Prof. Dr. Markus Biesalski

Zweitgutachter: Prof. Dr. Nico Bruns

Darmstadt 2023

Krauße, Marcel: Herstellung und Charakterisierung von Nitrocellulose-Papier Hybridmaterialien und Cellulosenitrat-Papieren als alternative Membranmaterialien für diagnostische Assays
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2024

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-263817

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2023

Veröffentlicht unter CC BY 4.0 DEED International – Creative Commons Namensnennung
<https://creativecommons.org/licenses/>

Tag der Einreichung: 27. Juli 2023

Tag der mündlichen Prüfung: 06. November 2023

*„It depends on the conditions
whether it works or not!“*

Klaus Villforth

*„Studierte sind für's
richtige Leben
nicht zu gebrauchen!“*

Gunter Krauße

Die vorliegende Arbeit wurde am Ernst-Berl-Institut für Technische Chemie und Makromolekulare Chemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Markus Biesalski in der Zeit vom 01.08.2016 bis 31.12.2020 durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im nachfolgenden Patent veröffentlicht:

T. Bock, M. Biesalski, M. Krauße, T. Meckel, D. Spiehl, WO22069470 A1 (2021)

“NITROCELLULOSE PAPERS AND METHODS OF PRODUCTION AND USE”

Danksagung

Es ist Zeit all jenen zu danken, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben. Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Biesalski für das entgegengebrachte Vertrauen, der Unterstützung bei der Ausarbeitung meines Forschungsthemas, den spannenden Diskussionen und vor allem der Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Nico Bruns für die Übernahme des Koreferats bedanken. Vielen Dank an die Fachprüfer Prof. Dr. Harald Kolmar und Dr. Tobias Meckel.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen Kolleginnen und Kollegen des Merck Lab @ TU Darmstadt unter der Leitung von Dr. Gerhard Schwall. Danke für den regen Austausch, die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und in Meetings. Ohne euch wäre der Mittwoch ein ganz anderer gewesen. Großen Dank auch an Kami Beyzavi und Mike Mansfield, es war mir eine Ehre mit euch über Membranmaterialien zu diskutieren und gemeinsam an diesem Projekt zu arbeiten.

Nichts prägt die Zeit im Labor mehr als gute Kollegen! Deshalb möchte ich mich herzlichst bei euch dem AK Biesalski und AK Andrieu-Brunsen bedanken. Danke für die gemeinsame Laborarbeit, Kaffeepausen, Team Events, Abende auf dem Balkon, Hirscheegg, Diskussionen, Konferenzen, ... und alles was ich noch vergessen habe.

Besonderen Dank möchte ich an Vanessa, Bärbel, Martina, Heike und Marion richten. Danke für eure administrative, organisatorische und technische Unterstützung! Auch wenn es häufig nicht gesehen wird, es ist unglaublich was ihr leistet! Ihr haltet uns Promovierenden den Rücken frei, damit unser Fokus auf die Forschung gerichtet sein kann. Danke!

Vielen Dank an Alexander, Marius, David und Angela, die ich während verschiedener Praktika und Abschlussarbeiten betreuen durfte. Es hat Spaß gemacht mit euch zu arbeiten und euch zu unterstützen!

Da heutzutage alle unglaublich viel um die Ohren haben ist es umso schöner, wenn es Leute gibt die einem bei den Korrekturen der Arbeit zur Seite stehen. Danke Nicole und Mathias für das Korrekturlesen und den daraus resultierenden Anmerkungen zu meiner Arbeit. Ich weiß eure investierte Zeit sehr zu schätzen!

Wenn aus Kommilitonen Freunde werden, ist dies eine besonders schöne Sache, die noch Jahre nach dem Studium verbindet. Böse Zungen könnten es auch Leidensgenossenschaft nennen. Herzlichen Dank Nicole, Mareike, Christian und Svenja für die gemeinsame Zeit und Erlebnisse!

Besonderem Dank gilt meinem ehemaligen Chemielehrer und Freund Ingo Kronenberger. Du hast es geschafft mich für Chemie zu begeistern, mich gefördert und auf diesen Weg gebracht.

Unendlicher Dank geht an meine Eltern Waltraud und Gunter sowie meinem Bruder Pascal. Ohne eure Unterstützung und den nötigen Rückhalt wäre dieser Lebensabschnitt so nicht möglich gewesen! Danke!

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Lebensgefährtin Tanja bedanken. Du hast mehr als alle anderen über die letzten Jahre und vor allem in der finalen Phase meine Launen, Tiefpunkte und den Stress abfangen müssen. Danke für die Unterstützung, dein offenes Ohr und die ermahnenden Blicke und Worte, wenn ich den Fokus verloren habe.

Inhaltsverzeichnis

1.....Einleitung und theoretische Grundlagen	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Diagnostische Schnelltests	3
1.3 NC-Membranen für diagnostische Assays	6
1.4 Cellulose und Papier	8
1.5 Motivation	12
2.....Ziele und Strategie	14
2.1 Ziele	14
2.2 Strategie	15
2.2.1 Konzept NC-Papier-Hybridmaterialien	16
2.2.2 Konzept CN-Papiere	17
3.....Methodenteil	18
3.1 Bildgebende Charakterisierungsmethoden für alternative Membranmaterialien	18
3.1.1 Konfokalmikroskopie	18
3.1.2 Rasterelektronenmikroskopie	20
3.1.3 Fluoreszenz-Imager	23
3.2 Benetzungseigenschaften und mikrofluidische Charakterisierung	24
3.3 Diagnostische Assays zur Membrancharakterisierung	25
4.....Herstellung und Charakterisierung von NCPHM und CN-Papieren	27
4.1 Herstellung von vollflächig beschichteten NCPHM	27
4.2 Charakterisierung von konventionellen NC-Membranen und vollflächig beschichteten NCPHM	29
4.2.1 Morphologie konventioneller NC-Membranen und vollflächig beschichteter NCPHM	30
4.2.2 Beschichtungsgewichte vollflächiger NCPHM	41
4.2.3 Fazit zu vollflächig beschichteten NCPHM	43
4.3 Herstellung und Charakterisierung von ortsdefinierten NCPHM	43
4.3.1 Herstellungsmethoden für ortsdefinierte NCPHM	44
4.3.2 Linienqualität und Linienbreiten ortsdefinierter NCPHM	45
4.3.3 Beschichtungsgewichte ortsdefinierter NCPHM	54
4.3.4 Morphologie von ortsdefinierten NCPHM	58
4.3.5 Fazit zu ortsdefinierten NCPHM	69
4.4 Herstellung und Charakterisierung von CN-Papieren durch Veresterung von Baumwoll-Linters-Papieren	70
4.4.1 Herstellung von CN-Papieren durch Veresterung von Baumwoll-Linters-Papieren	70
4.4.2 Bestimmung der Oberflächenstruktur von CN-Papieren	72
4.4.3 Bestimmung der chemischen Oberflächenfunktionalität von CN-Papieren	75
4.4.4 Quantitative Bestimmung des Substitutionsgrades von CN-Papieren	79

4.4.5	Löslichkeit von CN-Papieren in organischem Medium	80
4.4.6	Untersuchung des Festigkeitsverhaltens von CN-Papieren	85
4.4.7	Thermogravimetrische-Beurteilung von CN-Papieren	87
4.5	Zusammenfassung und Bewertung der verschiedenen Herstellungsmethoden für NCPHM und CN-Papieren	89
4.6	Fazit zu verschiedenen Herstellungsmethoden für NCPHM und CN-Papieren	89
5.	Mikrofluidische Charakterisierung von NCPHM und CN-Papieren	92
5.1	Detergensbeschichtung von NCPHM und CN-Papieren	92
5.1.1	Benetzbarkeit von NCPHM und CN-Papieren	92
5.1.2	Einfluss von Detergensbeschichtung auf die Morphologie verschiedener NCPHM und CN-Papieren	93
5.2	Mikrofluidische Charakterisierung von Baumwoll-Linters-Papieren und kommerziell erhältlichen NC-Membranen	95
5.3	Flächig beschichtete NCPHM	96
5.4	Fließeigenschaften von ortsdefinierten NCPHM	103
5.4.1	Bestimmung der Fließeigenschaften von ortsdefinierten NCPHM	103
5.4.2	Einfluss des Dosiervolumens und des NC-Gehalts auf die mikrofluidischen Eigenschaften	104
5.4.3	Vergleich ortsdefinierter NCPHM mit konventionellen NC-Membranen	107
5.5	Charakterisierung der benetzungs- und mikrofluidischen Eigenschaften von CN-Papieren	108
6.	Diagnostische Schnelltests auf Basis von NCPHM und CN-Papieren	112
6.1	Qualitative Betrachtung der Proteinbindung an vollflächigen und ortsdefinierten NCPHM	112
6.2	Vollflächige NCPHM für diagnostische Assays	115
6.3	Ortsdefinierte NCPHM in Lateral Flow Assays	119
6.4	CN-Papiere als Membranmaterial für diagnostische Assays	125
6.5	Zusammenfassung diagnostischer Schnelltests auf alternativen Membranmaterialien im Vergleich zu NC-Membranen	131
7.	Zusammenfassung	134
7.1	Summary	138
8.	Experimenteller Teil	143
8.1	Reagenzien, Lösungsmittel, Gemische und Verbindungen	143
8.2	Herstellung von NC-Lösungen	145
8.2.1	Tauchbeschichtung	147
8.2.2	Liniendruckverfahren	147
8.3	Veresterung von Papiersubstraten mit Nitriersäuren	148
8.4	Bestimmung der Beschichtungsmasse flächig beschichteter NCPHM	148
8.5	Detergensbeschichtung von NCPHM und CN-Papieren	149
8.6	Mikrofluidische Charakterisierung der kapillaren Fließzeit	150

8.7	Qualitative Experimente zur Untersuchung der Interaktion von Proteinen mit NCPHM	150
8.8	Herstellung von diagnostischen Assays auf verschiedenen Membranmaterialien	151
8.9	Probenpräparation für die Elektronenmikroskopie	154
8.10	Fluoreszenzfärbung für Konfokalmikroskopie und Fluoreszenzimager	154
8.11	Probenpräparation für die Untersuchung von Querschnittsproben mittels Konfokalmikroskopie	155
8.12	Geräte und Software	155
8.12.1	Zugfestigkeitsmessungen von verschiedenen Substraten	156
	Literaturverzeichnis	158
	Abbildungsverzeichnis	165
	Tabellenverzeichnis	178
	Abkürzungsverzeichnis	179
	Anhang	183
	Erklärungen	186

1. Einleitung und theoretische Grundlagen

1.1 Einleitung

Die Diagnostik von Krankheiten, Pathogenen, Lebensmittelverunreinigungen und der Überwachung von Umweltparametern^[1-7] benötigen in den meisten Fällen aufwändige Laboruntersuchungen. Zudem muss neben dem apparativen Aufwand speziell geschultes Personal für die Untersuchungen eingesetzt werden, und die Analytik erfolgt zentralisiert.^[8,9] Für viele Krankheitserreger und Analyten, existieren heutzutage Schnelltests für den Heimgebrauch, dies wird als patientennahe Sofortdiagnostik (*Point-of-Care-Test*, POCT) bezeichnet. Die Durchführung dieser Tests variiert je nach diagnostischer Fragestellung, ebenso die Testflüssigkeiten, die Durchführungsvorschriften und der apparative Aufwand. Für die POCT können kleine elektronische Geräte zum Einsatz kommen. Das prominenteste Beispiel dafür ist die Blutzuckerselbstkontrolle aus Kapillarblut bei Diabetes Mellitus.^[10-13] Diese Tests werden unter Zuhilfenahme von tragbaren Auswertegeräten durchgeführt. Neben der gerätegestützten POCT existieren papier- und membranbasierte Testmethoden, welche ohne zusätzliche Hilfsmittel zu einem diagnostischen Ergebnis führen.

Papierbasierte POCT sind seit über einem Jahrhundert bekannt. Zur Untersuchung des Glucose- und Proteingehalts in Urin, wurden in den 1880er Jahren Prototypen von papierbasierte *Dipstick-Assays* eingesetzt, welche in den 1950er Jahren zur Marktreife geführt wurden.^[14] Durch Eintauchen der Tests in eine Prüfflüssigkeit (z.B. Urin) wird nach einer definierten Einwirkzeit der Farbumschlag von einem oder mehreren Testfelder mit einer Vergleichsskala verglichen.^[15-17] Dadurch lassen sich heutzutage bis zu zehn Biomarker semiquantitativ mit einem einzigen Test nachweisen.^[18] Neben den *Dipstick-Assays* kam es parallel zur Entwicklung von so genannten *Lateral-Flow-Assays/Tests* (LFA/LFT). Diese wurden in den 1980er Jahren eingeführt, seitdem wurden über 500 Patente für diese Technik angemeldet.^[14,19] Der mit Abstand in der breiten Gesellschaft bekannteste LFT war bis zum Frühjahr 2020 der hCG-Assay (humanes Choriongonadotropin, Schwangerschaftstest). Der Wunsch zur Feststellung einer Schwangerschaft wurde bereits in altägyptischen Dokumenten festgehalten. Dort wurde ein Test beschrieben, bei dem eine potenziell schwangere Frau über mehrere Tage hinweg auf Weizen- und Gerstensamen urinieren sollte. Die Ergebnisse: "Wenn Gerste wächst, bedeutet das ein männliches Kind. Wenn Weizen wächst, bedeutet das ein weibliches Kind. Wenn beides nicht wächst, wird sie überhaupt nicht gebären".^[20-22] Noch in den 1960er-Jahren wurde zur Früherkennung einer Schwangerschaft einem Krallenfrosch Urin oder Blutserum einer Testperson in den dorsalen Lymphsack injiziert. Wenn die weiblichen Frösche nach 12 – 24 h Laich absetzten oder die männlichen Frösche einen Samenfluss aufwiesen, dann galt die getestete Frau als Schwanger.^[23-25] So spannend und abenteuerlich diese Testmethoden auch klingen, sind diese heutzutage ethisch nicht mehr konform und werden den derzeitigen Standards nicht mehr gerecht. Mit der Entwicklung von LFTs zur Schwangerschaftsdiagnostik wurden die Froschtests durch die neuen Verfahren abgelöst.^[26,27] LFTs bestehen in der Regel aus mehreren Bestandteilen, welche zusammengesetzt den eigentlichen Assay bilden. Diese sind ein *Sample-Pad* auf dem die Probe aufgebracht wird, ein *Conjugate-Pad* auf dem die Probe mit Antikörper-Konjugaten interagiert, dem Membranmaterial mit Test- und Kontrolllinie, sowie dem *Wicking-Pad* welches überflüssige Prüfflüssigkeit aufnimmt.^[20] die einzelnen Bestandteile und der Aufbau von diagnostischen LFTs werden in Abschnitt 1.2 näher beschrieben. Im Gegensatz zu *Dipstick-Assays* wird bei LFTs eine Prüfflüssigkeit über die verschiedenen Bestandteile durch ein Membranmaterial transportiert, auf dem der enthaltene Analyt gezielt mit Antikörpern detektiert werden

kann. Diese Art der LFTs wird auch als *Immunoassay* bezeichnet.^[20,28] Das Herzstück dieser Assays ist das Membranmaterial, dieses besteht in den meisten Fällen aus Nitrocellulose (NC).^[29] Die Entwicklung von NC-Membranen geht bis in die 1910er Jahre zurück und mündete in den 1980er Jahren in den heute bekannten Membranmaterialien.^[30] Die Herstellung der Membranen erfolgt in der Regel durch Beschichtung von Trägerfolien aus Polyethylenterephthalat (PET) mit komplexen Gemischen aus NC, Lösemitteln, Nicht-Lösemitteln und Additiven.^[29] Die Zusammensetzung der NC-Lösungen und die Herstellungsparameter werden von den Membranherstellern streng geschützt und bei der Herstellung der Membranen penibel überprüft.^[29]

Neben den Membranmaterialien werden kontinuierlich alle Bestandteile solcher LFTs weiterentwickelt, um neuen Herausforderungen der Diagnostik gerecht zu werden. So z.B. auch während der SARS-CoV-2-Pandemie. Während dieser kam es zur zügigen Entwicklung von Schnelltests zur Früherkennung von SARS-CoV-2-Infektionen, sodass bereits im Februar 2020 mehr als 100 Hersteller COVID-19 LFTs auf den Markt gebracht hatten.^[31] Die Weiterentwicklung von LFTs geht rapide voran und es wird stetig versucht diese sensitiver, performanter, selektiver, kostengünstiger und/oder anwenderfreundlicher zu gestalten.^[14] Zudem wird häufig versucht, dass mehrere Analyte in einem Test gemeinsam detektiert werden können.^[32] Um dies zu erfüllen wird sich in der Regel stets an Richtlinien der WHO orientiert, welche fordern, dass LFTs erschwinglich, sensitiv, spezifisch, benutzerfreundlich, schnell durchzuführen, robust und ohne Geräte durchzuführen sind (*ASSURED*).^[33] Selbstverständlich dienen diese Entwicklungen stets einer verbesserten Sicherstellung von diagnostischen Möglichkeiten fernab von Laboren, allerdings wird bei der Entwicklung in den seltensten Fällen das Augenmerk auf die Nachhaltigkeit der Neuentwicklungen gelegt. Fast alle der auf dem Markt befindlichen Schnelltests bestehen zu großen Teilen aus Kunststoffen, welche nach der Verwendung der Assays häufig entsorgt werden, ohne diesen in die Wertstoffketten zurückzuführen. Eine geringe Anzahl an wissenschaftlichen Arbeiten existieren zum Thema papierbasierte LFT Materialien^[34,35], aber marktreife Membranmaterialien und Schnelltests auf Papierbasis sind schwer zu finden. Am Beispiel des Schwangerschaftstests existierte ein Hersteller (Lia), der mit einem Test aus 100% Papier wirbt, welcher kompostierbar ist und sich in Wasser vollständig auflöst.^[36] Das Hauptargument dieses Tests ist die Diskretion, da der Test in der Toilette entsorgt werden kann, als weiteres Argument wurde die Nachhaltigkeit der Lösung beworben. Nach aktuellen Recherchen wurde die Produktion von Lia eingestellt.^[37] Das Konzept des diskreten, papierbasierten und nachhaltigen Schwangerschaftstest wird seit 2021 vom Start-Up *Hoopsy* weitergeführt und ist derzeit auf dem Markt verfügbar.^[38]

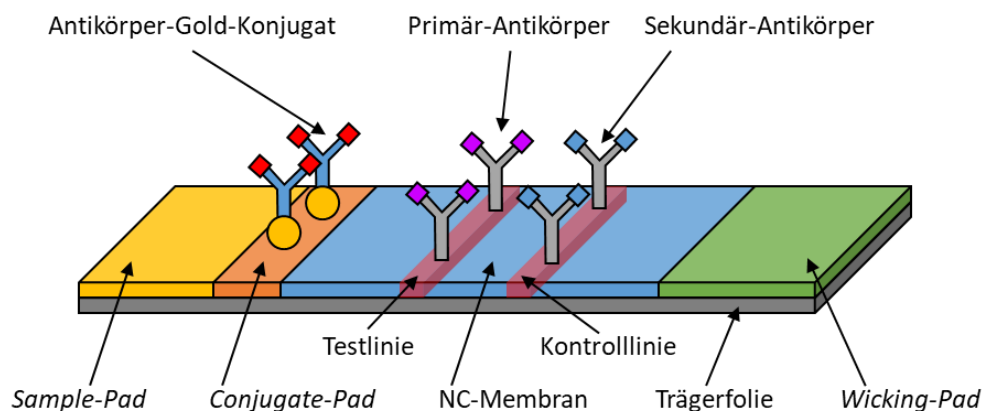
Die Entwicklung für nachhaltige Membranmaterialien für diagnostische Assays spielt bis dato eine untergeordnete Rolle. Im übertragenen Sinne lässt sich das Zitat von *zero-waste*-Köchin Anne Marie Bonneau auf die nachhaltige Entwicklung bei Membranen übertragen: „Wir brauchen nicht eine Handvoll Menschen, die *Zero-Waste* perfekt umsetzen. Wir brauchen Millionen von Menschen, die es unvollkommen tun“.^[39] Dies bedeutet, dass jegliche Reduktion von Kunststoff in Membranmaterialien ein richtiger Schritt zur Nachhaltigkeit der Assays führt, auch wenn es nicht zu 100% aus nachhaltigen Materialien besteht. Mittels gezielten Anpassungen und Strategien (Abschnitt 2.2) bei der Herstellung alternativer Membranmaterialien könnte der Kunststoffanteil in diagnostischen Assays und Membranen drastisch reduziert werden. Dabei ist die Entwicklung von neuen LFTs ist ein komplexes Umfeld in dem multiple Parameter stets

iterativ angepasst werden müssen.^[40,41] Die dabei entwickelten alternativen Membranmaterialien ließen sich im Idealfall für verschiedene diagnostische Assays anwenden, ohne dass Hersteller dieser LFTs ihre Verfahren umstellen müssten.

1.2 Diagnostische Schnelltests

Zur schnellen, gerätfreien und anwenderfreundlichen Untersuchung von Analyten in Prüfflüssigkeiten kommen diagnostische Schnelltests, so genannte POCT zum Einsatz.^[20] Diese Tests können dezentral, ohne speziell geschultes Personal und in kürzester Zeit durchgeführt werden. Die ersten LFTs wurden in den 1960er Jahren im klinischen Umfeld zur Untersuchung von Proteinen in Serum verwendet.^[42] Seit 1976 stehen für den Heimgebrauch LFTs zur Untersuchung des Urins auf das humane Choriongonadotropin (hCG), dem Schwangerschaftshormon zur Verfügung.^[42] Das Detektionsprinzip beruht dabei auf der spezifischen Interaktion von Antikörpern und Antigenen, weshalb LFTs auch als *Immunoassays* bezeichnet werden. Nach der Etablierung der LFTs wurde eine Vielzahl verschiedener Tests entwickelt, diese umfassen beispielsweise Assays zur Detektion von Tumormarkern^[43], Mikroorganismen^[44], Mykotoxinen^[45], Schwermetallen^[46,47] und Pestiziden^[48,49]. Die Anforderungen an die LFTs, die verwendeten Designs, Reagenzien, Membranmaterialien können dabei stark variieren.^[42] Nachfolgend werden die Bestandteile von LFTs anhand des hCG-Assays beschrieben, welcher bis heute den am weitest verbreitetsten Assays mit dem größten Marktanteil darstellt.^[50]

Im Gegensatz zu einfachen *Dipstick-Assays* bestehen LFTs aus mehreren Komponenten, deren aufeinander abgestimmte Eigenschaften zur erfolgreichen Herstellung von diagnostischen Assays zusammenspielen. LFTs zur Detektion von hCG aus Urin bestehen in der Regel aus 8 verschiedenen Komponenten. Der Aufbau eines klassischen LFTs ist in Schema 1-1 dargestellt.

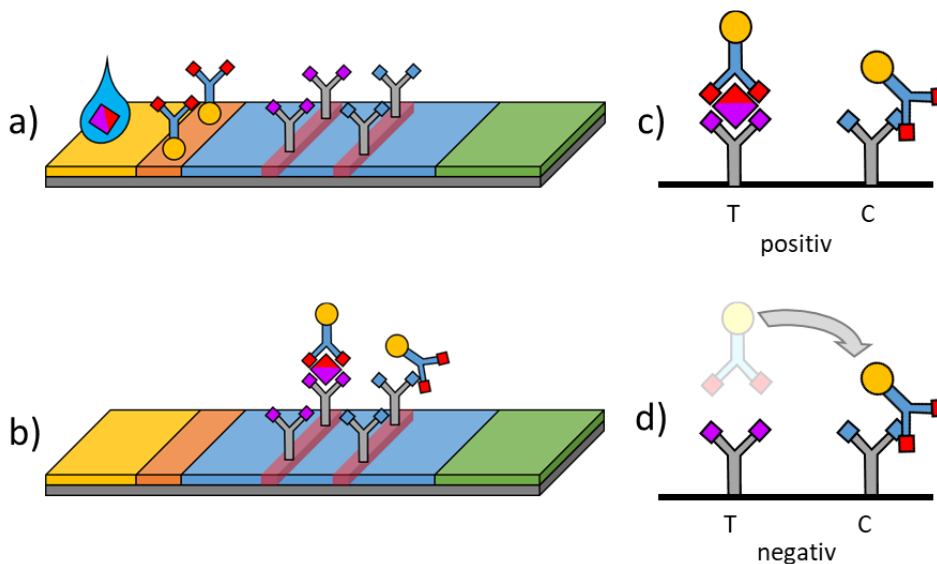


Schema 1-1: Aufbau eines klassischen LFTs zur Detektion von hCG in Urin. Der LFT besteht aus einer Trägerfolie, *Sample-Pad*, *Conjugate-Pad*, Membranmaterial (NC) mit Test- und Kontrolllinie und dem *Wicking-Pad*. Zur besseren Handhabung werden diese Tests in einem Kunststoffgehäuse verbaut (nicht dargestellt).

Klassische LFTs werden aus verschiedenen Bestandteilen zusammengesetzt, welche auf eine *Backingcard* (Klebefolie als Trägermaterial) aufgeklebt werden.^[51,52] Der Probenauftrag erfolgt auf dem *Sample-Pad*. Dieses besteht häufig aus Cellulosepapier und sorgt dafür, dass die aufgebrachte Probe gleichmäßig verteilt in Richtung des *Conjugate-Pads* geleitet wird.^[53] Ebenfalls

hat das *Sample-Pad* filtrierende Eigenschaften und ist in der Lage größere Verunreinigungen, Agglomerate oder Staub aus der Analytmischung zu entfernen.^[54] Hersteller von LFTs beschichten je nach *Assay* das *Sample-Pad* mit Proteinen (z.B. Albumin), Detergenzien oder Puffern.^[53] Nach dem *Sample-Pad* wird die Probe auf das *Conjugate-Pad* geleitet. Dieses besteht häufig aus Glasfasermaterialien, welche eine geringe Proteinbindeaffinität aufweisen.^[19] Auf dem *Conjugate-Pad* werden Biomarker (z.B. Antikörper) aufgebracht, welche beispielsweise an kolloidalem Gold^[51,55–57] oder Latexpartikeln^[27,28,58,59] gebunden sind (Antikörper-Partikel-Konjugate). Die im Fluidfluss enthaltenen Analyten interagieren mit den Antikörper-Partikel-Konjugaten und werden auf das Membranmaterial des LFTs geleitet. Das Membranmaterial besteht aus Polymeren (z.B. NC, Nylon, Polyethersulfon, Polyvinylidenfluorid, ...) wobei am häufigsten NC-Membranen für LFTs verwendet werden.^[53] Auf dem Membranmaterial sind die Test- und Kontrolllinien für den *Assay* aufgebracht. Auf der Testlinie befinden sich so genannte Primär-Antikörper, welche spezifisch für den Analyt sind. Die Kontrolllinie beinhaltet Antikörper, welche spezifisch für die auf den Gold/Latex-Partikeln aufgetragenen Antikörper sind (Sekundär-Antikörper). Der Aufbau von LFTs wird durch ein *Wicking-Pad* komplettiert. Dieses nimmt die am Ende des Membranmaterial ankommende Flüssigkeit auf und sorgt somit für ein aufrechterhalten des Fluidflusses über den kompletten *Assay* hinweg.^[42] Durch das *Wicking-Pad* wird ein Flüssigkeitsrückfluss auf das Membranmaterial unterbunden.^[42]

Die Signalentstehung in LFTs basiert auf der Interaktion von Analyt, Konjugat-Antikörpern und Antikörpern auf der Test- und Kontrolllinie. Nachfolgend wird dies anhand des hCG-Assays erläutert. Das Schwangerschaftshormon hCG ist ein Glycoprotein, welches aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten (α - und β -Einheit) besteht. Diese Untereinheiten sind nicht-kovalent miteinander verbunden.^[60] Für jede der Untereinheiten wurden unterschiedliche Antikörper entwickelt, welche spezifisch an die verschiedenen Domänen binden. Die Funktionsweise von LFTs ist in Schema 1-2 dargestellt.



Schema 1-2: a) LFT vor dem Aufbringen der Testflüssigkeit. In dieser ist der Analyt (z.B. hCG) gelöst. b) LFT nachdem die Testflüssigkeit mit Analyt den Teststreifen durchlaufen hat. c) Positives Testergebnis durch *Sandwich*-Komplex auf der Testlinie und gebundenes Antikörper-Gold-Konjugat auf der Kontrolllinie. d) Negatives Testergebnis, durch Abwesenheit des Analyts wird kein *Sandwich*-Komplex gebildet und nur die Antikörper-Gold-Konjugate an den Sekundär-Antikörper der Kontrolllinie gebunden.

Die zu untersuchende Probe wird auf das *Sample-Pad* aufgebracht (Schema 1-2 a). Dieses leitet den in der Probe enthaltenen Analyten (hier hCG) zum *Conjugate-Pad*. Auf diesem sind an Gold- oder Latexpartikel konjugierte Antikörper gegen eine der hCG-Untereinheiten^[60] (z.B. anti- β) abgelegt. Die Antikörper-Partikel-Konjugate werden durch die Probe in Lösung gebracht, wo diese mit dem Analyten (β -Untereinheit von hCG) binden können.^[20] Die Antikörper-Antigen-Konjugate werden mit dem Fluidfluss über das Membranmaterial transportiert und treffen auf die Testlinie. Auf dieser sind Antikörper gegen die komplementäre hCG-Untereinheit (hier anti- α) aufgebracht. Die freie α -Untereinheit im Antikörper-Antigen-Konjugat bindet an die anti- α -Antikörper, welche sich auf der Testlinie befinden (Schema 1-2 b). Dies resultiert in einem Sandwich-Komplex (Schema 1-2 c). Durch die Bildung von Sandwich-Komplexen^[61] kommt es auf der Testlinie zur Akkumulation von Gold- bzw. Latexpartikeln, welche die Ausbildung einer mit dem bloßen Auge sichtbaren Linie zu Folge haben. Antikörper-Konjugate ohne gebundenem Antigen (Schema 1-2 d) werden von der Testlinie nicht festgehalten und werden mit dem Fluidfluss zur Kontrolllinie transportiert. Auf dieser sitzen die Testlinienantikörper, welche nicht an den Analyten binden, sondern an die Konjugat-Antikörper (Schema 1-2 d).^[62] Dies soll sicherstellen, dass auf der Kontrolllinie auch in Abwesenheit des Analyts Antikörper-Konjugate festgehalten werden und somit eine mit dem Auge sichtbare Kontrolllinie erhalten wird.^[62] Alle nicht gebundenen Antikörper und Analytmoleküle werden am Ende des LFTs im *Wicking-Pad* aufgenommen. Aufgrund der zuvor beschriebenen Interaktionen lassen sich die Einstufungen der Tests wie in Abbildung 1-1 beschreiben.

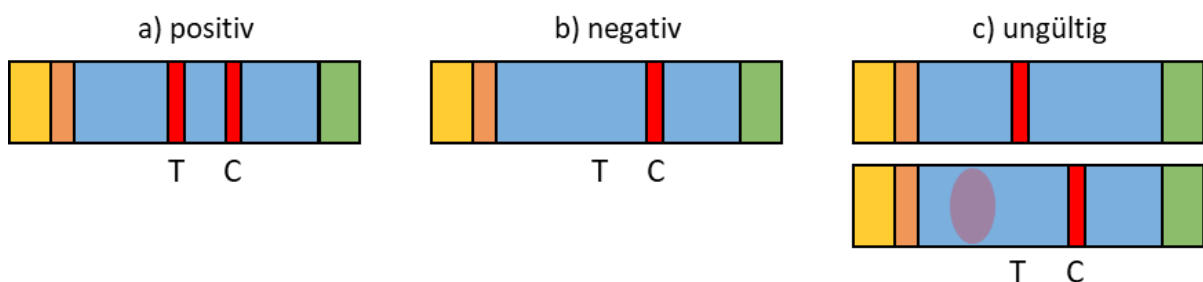


Abbildung 1-1: a) Positiver LFT, b) negativer LFT, c) ungültige LFTs.

Bei einem positiven Testergebnis (Abbildung 1-1 a) kommt es zur Ausbildung der Sandwich-Komplexe (vgl. Schema 1-2 b) auf der Testlinie, auf welcher deutlich eine Färbung zu sehen ist.^[63] Da im *Conjugate-Pad* im Regelfall mehr Antikörper-Partikel-Konjugate vorhanden sind als Analyt, werden diese immer die Testlinie passieren (Schema 1-2 c) und auf der Kontrolllinie ein Signal hervorrufen. Dies geschieht durch die Bindung der Kontrolllinienantikörper mit den Antikörper-Konjugaten.^[63] Liegt kein Analyt in der Probe vor, so kommt es zu keiner Ausbildung von Sandwichkomplexen an der Testlinie und die Antikörper-Partikel-Konjugate werden zur Kontrolllinie transportiert, wo diese an den Kontrolllinienantikörper binden (Schema 1-2 d). Als Resultat wird ein negativer LFT erhalten (Abbildung 1-1 b). Bei kommerziell erhältlichen LFTs treten die beiden zuvor genannten Fälle (positiv/negativ) am häufigsten auf. Seltener kommt es dazu, dass LFTs ungültig sind (Abbildung 1-1 c). Dies ist der Fall, wenn beim Assay keine Kontrolllinie erhalten wird. Ebenfalls kann es dazu kommen, dass bereits vor der Testlinie eine Akkumulation von Antikörper-Partikel-Konjugaten durch unspezifische Bindung dieser am Membranmaterial zustande kommt.^[64] In diesen Fällen zählen LFTs ebenfalls als ungültig. Für

den Erhalt von ungültigen LFTs gibt es mehrere mögliche Ursachen. Diese sind beispielsweise eine zu geringe Probenmenge, eine zu dickflüssige Probe, falsche oder zu lange Lagerung der Assays oder Fehler bei der Assay Herstellung.^[65]

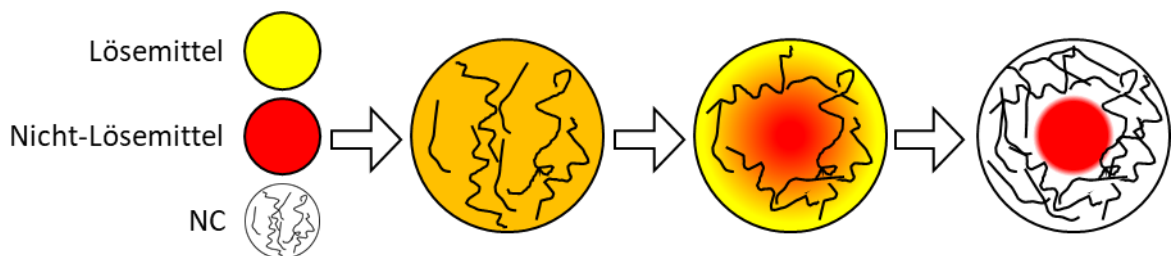
1.3 NC-Membranen für diagnostische Assays

Das Herzstück eines jeden LFTs bildet das Membranmaterial. Die Aufgabe dessen ist es die Analyten an der Test- und Kontrolllinie zu binden und somit ein positives oder negatives Testergebnis anzuzeigen.^[19] Dafür ist es wichtig, dass die Marker auf den Linien über die komplette Lagerungszeit ihre Aktivität beibehalten.^[19] Während des LFTs muss das Membranmaterial in der Lage sein, die Analytlösung gleichmäßig zu transportieren ohne dass die Analytmoleküle und Marker unspezifisch an der Membran binden.^[19] Ein idealer Fluidfluss durch die Membran erfolgt durch Kapillarkräfte und benötigt keine externen Pumpen.^[51,66] In den meisten LFTs kommen NC-Membranen^[19] zum Einsatz, allerdings gab es in der Vergangenheit öfters bestreben Membranmaterialien aus Nylon, Polyethersulfon oder Polyvinylidenfluorid herzustellen.^[53] Diese Versuche waren allerdings nur begrenzt erfolgreich, da Faktoren wie Kosten, eingeschränktem Nutzen, Schulungsaufwand aufgrund einer neuen Oberflächenchemie, Anpassung von Herstellungsabläufen und dem Widerstand von Testherstellern gegen Veränderungen aufgrund des großen Erfahrungsschatzes im Umgang mit der etablierten NC als Membranmaterial vorlagen.^[67]

Nitrocellulose weist einige Eigenschaften auf, welche NC-Membranen in der Anwendung für LFTs beliebt machen. Diese sind beispielsweise eine kapillargetriebene Fluidimbibition, hohe Proteinbindekapazität, relativ einfache Handhabung und eine Vielzahl verschiedener Produkte auf dem Markt mit verschiedenen Fließgeschwindigkeiten und Detergensbeschichtungen.^[19] Die Herstellungskosten von LFTs sind im Vergleich zu aufwändigen Labortests eher gering. Neben den zuvor genannten positiven Aspekten des Materials, gibt es einige Charakteristiken die eine Anwendung von NC als Membranmaterial erschweren. Die Herstellung von NC-Membranen unterliegt Schwankungen, welche für eine ungenaue Reproduzierbarkeit der Membranqualität innerhalb und zwischen verschiedenen Chargen sorgen können. Die Qualitätsschwankungen lassen sich unter anderem auf unterschiedliche Löslichkeit der Nitrocellulose zwischen verschiedenen Chargen zurückführen, was sich auf die Fällungseigenschaften dieser auswirkt und somit inhomogene Porenstrukturen erhalten werden können.^[29] Bei der Herstellung der Membranen liegt die Nassfilmdicke des Lacquers deutlich unterhalb eines Millimeters, was bei Schwankungen der Trocknungsparameter zu Störungen in der *Lacquer*-Zusammensetzung führt und sich in einer inakzeptablen Variation der Membrandicke und strukturellen Artefakten widerspiegelt.^[29] Des Weiteren kann es bei der Lagerung der Membranen zu Haltbarkeitsproblemen durch Alterungserscheinungen kommen. NC-Membranen sind zudem leicht entflammbar und besitzen eine geringe mechanische Stabilität, was vor allem bei der Verarbeitung zu Beschädigungen durch Knicke, Einkerbungen und Komprimierung des Materials führen kann.^[19] Aus diesen Gründen wird nach wie vor viel Aufwand betrieben um die Herstellungsprozesse für NC-Membranen konsequent weiter zu entwickeln.

Die Herstellung von NC-Membranen erfolgt durch langsames und kontrolliertes Ausfällen von Polymer (NC) aus einem Lösemittelsystem auf einer Trägerfolie.^[29,68–70] Die zur Herstellung verwendeten Lösungen werden als *Lacquer* bezeichnet. Dieser besteht aus NC, Lösemitteln, Nicht-Lösemitteln und Prozessadditiven. Die Qualität der verwendeten *Lacquer* Komponenten

ist entscheidend für die reproduzierbare Herstellung der Membranen. Lösemittel, Nicht-Lösemittel und Additive können in der Regel einfach auf Reinheit und Zusammensetzung überprüft werden, wohin gegen NC aus Cellulose hergestellt wird und natürlichen Schwankungen in den Molekulargewichten aufweist.^[29] Zudem kommt, dass nur ein geringer Anteil der weltweit produzierten NC in die Membranherstellung einfließt, was zur Folge hat, dass NC-Chargen gemischt werden müssen um die idealen Herstellungsparameter (z.B. Viskosität) einzustellen.^[29] Bei der Membranherstellung wird angestrebt, dass die erhaltenen Membranen eine konsistente Struktur aufweisen, eine gleichmäßige Dicke haben und die mikrofluidischen Eigenschaften konsistent sind.^[68] Dies wird durch eine akribische Kontrolle der Trocknungs- und Verdampfungsparameter des Lacquers sichergestellt. Durch sehr langsames Verdampfen der Lösungsbestandteile kommt es zur Assoziation der Polymerketten bevor diese gemeinsam ausfallen und poröse Strukturen bilden.^[29] Das Nicht-Lösemittel sollte dabei am langsamsten Verdunsten und den Polymerketten als Template zur Porenbildung dienen. Dieser Prozess ist in Schema 1-3 dargestellt.



Schema 1-3: Mechanismus der Entstehung von porösen Strukturen bei der Herstellung von NC-Membranen.

Die Porenstruktur der Nitrocellulose sorgt dafür, dass Flüssigkeiten diese nicht ohne weiteres benetzen können (vgl. Abschnitt 5.1.1, Abbildung 5-1).^[29] Aus diesem Grund müssen NC-Membranen mit Detergens beschichtet werden, um einen Fluidfluss im Material etablieren zu können.^[29] Die Detergensbeschichtung ermöglicht es den Testflüssigkeiten in die Poren der Membran vorzudringen. Das aufgebrauchte Detergens kann die *Performance* von LFTs beeinflussen, weshalb bei der Entwicklung von *Assays* verschiedene Membranmaterialien iterativ getestet werden müssen.^[19] Neben der Detergensbeschichtung spielt die Porengröße im Membranmaterial eine wichtige Rolle für den Fluidfluss. Diese lässt sich durch geeignete Auswahl der Herstellungsparameter einstellen. In NC-Membranen kommt es zu einer Ausbildung von schwammartigen porösen Strukturen, weshalb die Porengröße als Begriff zur Charakterisierung der Membranen inakkurat ist.^[19] Zur Charakterisierung von Membranen werden aus diesem Grund die Fluidinteraktion mit der Membran herangezogen. Da die Fließgeschwindigkeit mit fortschreitender Distanz im Membranstreifen abnimmt (Vgl. Abschnitt 1.4) wird diese nicht zur Membrancharakterisierung verwendet.^[68] Stattdessen wird die kapillare Fließzeit (CFT) für die Beschreibung von Membranmaterialien und deren Eigenschaft Fluide zu transportieren verwendet.^[19] Die CFT (vgl. Abschnitt 8.6) ist definiert als die Zeit, die ein Fluid benötigt um 4 cm entlang eines definierten Membranstreifens zurückzulegen und stellt eine Endpunktmethode dar.^[68-70] Vereinfacht kann gesagt werden, dass mit steigender Porengröße der Membran die Fließgeschwindigkeit des Fluids zunimmt und damit die CFT abnimmt (vgl. Abschnitt 5.3). Die Auswahl der Membranen anhand der CFT wirkt sich auf die zu erwartende Sensitivität der *Assays* aus. Eine hohe CFT (niedrige Fließgeschwindigkeit) ermöglicht längere Verweilzeiten

auf dem Membranmaterial, was die Interaktionswahrscheinlichkeit zwischen Analyt und Antikörpern erhöht.^[53] Dies erhöht die Sensitivität des Assays. Bei Verwendung von niedrigen CFT ist der Fluidfluss schneller, was zu geringeren Interaktionszeiten und zu weniger sensitiven Assays führt.^[53] Die CFT der Membranmaterialien kann zudem verwendet werden um den Assay auf den Analyten anzupassen. Bei Proben mit einer höheren Viskosität, wie z.B. Blut, Serum oder Plasma kann die Verwendung einer niedrigen CFT (schneller Fluidfluss) von Vorteil sein.^[53]

1.4 Cellulose und Papier

Die Entwicklung von Membranmaterialien und diagnostischen Assays ist in Vergangenheit rasant vorangeschritten.^[71] Jedoch standen dabei die Weiterentwicklung hinsichtlich der Sensitivität, Spezifität und der Detektion mehrere Analyten parallel im Vordergrund.^[34,72-76] Eine nachhaltigere Gestaltung der Assays stand dabei nicht im Fokus. Dieses Interesse ist seit Mitte der 2010er Jahre kontinuierlich am Zunehmen.^[77] Zur nachhaltigeren Gestaltung von Membranmaterialien ist eine drastische Änderung der verwendeten Komponenten nötig. Dabei sollte im Vordergrund stehen, dass verwendete Materialien zurück in den Wertstoffkreislauf geführt werden können und dass ein Großteil dieser aus nachwachsenden Rohstoffen besteht. Ein Weg zur nachhaltigeren Gestaltung von Membranmaterialien stellt die Verwendung von Papieren aus Cellulose dar.

Cellulose ist ein praktisch in allen Pflanzen der Welt vorkommendes Naturprodukt, ist reichlich vorhanden und daher kostengünstig.^[78] In den meisten organischen Lösungsmitteln und Wasser ist Cellulose unlöslich, was sich mit der Struktur dieser Verbindung erklären lässt. Diese ist in Abbildung 1-2 dargestellt.

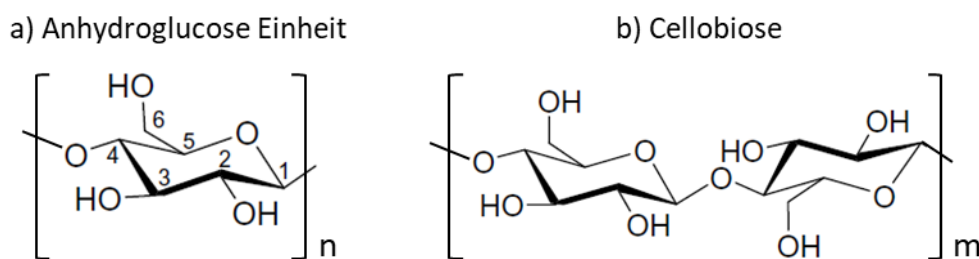


Abbildung 1-2: Strukturformel von a) der Anhydroglucose Einheit (AGU) und b) Cellobiose Einheit bestehend aus zwei β -(1,4)-verknüpften AGUs.^[14]

Cellulose ist ein homopolymer aus D-Anhydroglucopyranose Einheiten (AGU) (Abbildung 1-2 a), welche β -(1,4)-verknüpft vorliegen. Die Verknüpfung zweier AGUs führt zur strukturellen Monomereinheit der Cellulose (Abbildung 1-2 b), diese wird als Cellobiose bezeichnet. Aus der β -glycosidischen Verknüpfung der Momomere geht eine lineare Polymerstruktur hervor.^[14] Je nach Quelle der Cellulose variieren die Polymerisationsgrade, sprich die Anzahl an Monomereinheiten die das Polymer bilden. Diese liegen zwischen 300 – 1.700 Monomereinheiten für Cellulose aus Holzzellstoff und zwischen 800 – 10.000 Monomereinheiten für Cellulose aus

Baumwolle und anderen Faserhaltigen Pflanzen.^[14] Die Struktur der Cellulose wurde erstmals 1920 von Hermann Staudinger aufgeklärt, was den Grundstein für die modernen Polymerwissenschaften legte.^[79] Dabei stellte Staudinger fest, dass Cellulose aus kovalent verknüpften Bausteinen besteht, und nicht aus nicht-kovalent angeordneten Glucose-Einheiten.^[80,81] Neben der kovalenten Verknüpfung von AGUs, kommt es durch Wasserstoffbrückenbindungen zur Ausbildung von Überstrukturen der Cellulose. Diese sind in Abbildung 1-3 dargestellt.

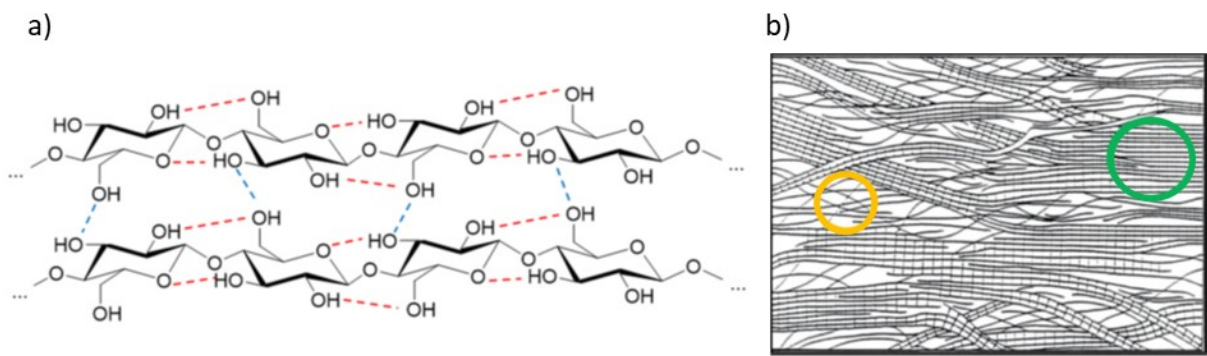


Abbildung 1-3: a) Ausschnitt der Cellulose Überstruktur, welche durch intramolekulare (Rot) und intermolekulare (Blau) Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden.^[14] b) Fransen-Fibrillen-Modell der Celluloseüberstruktur mit kristallinen Bereich (Grün) und amorphen Bereich (Gelb).

Durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 1-3 a), kommt es durch Ausrichtung der einzelnen Celluloseketten zu Überstrukturen. Diese werden als Elementarfibrillen bezeichnet. Die Anordnung dieser, kann wie in Abbildung 1-3 b) dargestellt werden. Dabei kommt es zur Ausbildung von kristallinen Bereichen mit einer hohen Ordnung der Fibrillen und zur Ausbildung von amorphen Bereichen. Diese Modelle werden als Fransen-Fibrillen-Modell oder kristallin-amorphes Zweiphasenmodell bezeichnet.^[82-84] Die Überstruktur der Cellulose wirkt sich auf die mechanischen Eigenschaften dieser aus. Kristalline Teilbereiche sorgen für eine hohe Festigkeit und Steifigkeit, wohingegen amorphe Bereiche für Elastizität und Flexibilität der Cellulose sorgen.^[85] Die Überstruktur und Teilkristallinität führt zu einer chemischen Stabilität gegenüber gewöhnlichen organischen Lösemitteln und Wasser.^[86] Die Ausbildung von Überstrukturen der Cellulose zu Fibrillen setzt sich zu größer werdenden Strukturen bis hin zur Cellulosefaser fort. Dies ist in Abbildung 1-4 dargestellt.

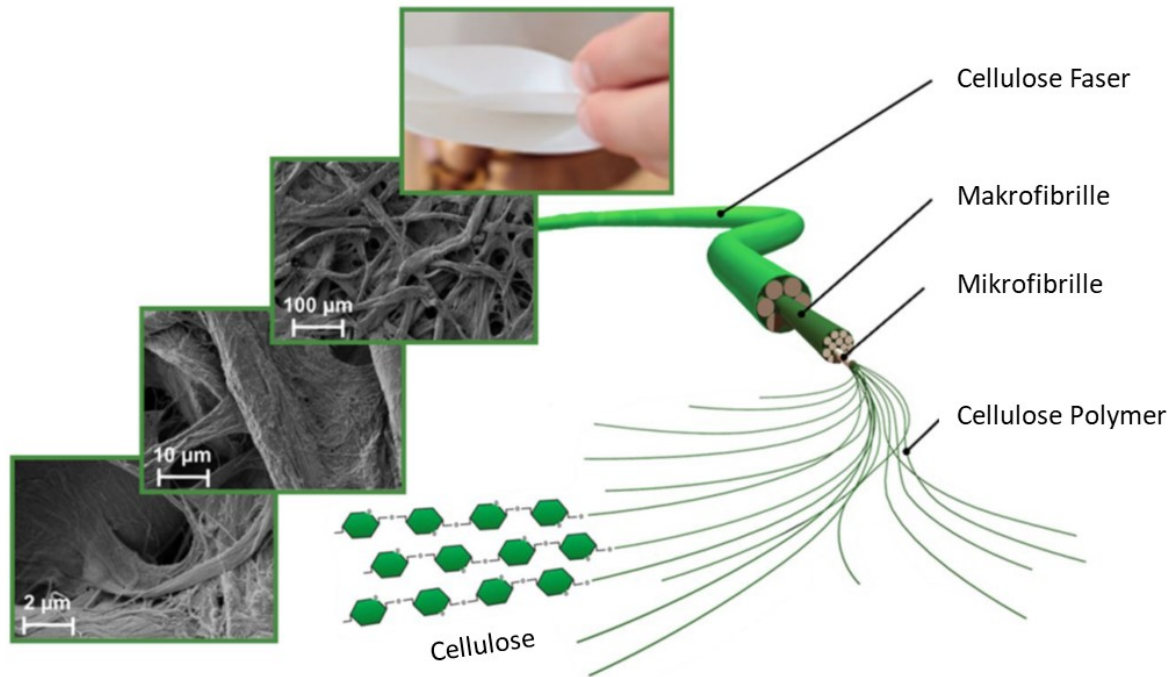


Abbildung 1-4: Überstrukturen von Cellulose ausgehend vom Polymer bis hin zur Faser und REM-Mikrographen verschiedener Cellulosestrukturen.^[14]

Wie zuvor geschildert, lagern sich die Celluloseketten zu Überstrukturen zusammen.^[87] Zuerst erfolgt die Aneinanderlagerung mehrerer Ketten zu Elementarfibrillen mit einem Durchmesser von ca. 3,5 nm.^[88] Diese gehen im weiteren Verlauf zu ca. 10 – 35 nm großen Mikrofibrillen über.^[89] Diese bilden eingebettet in Hemicellulosen und Lignin die Makrofibrillen. Letzendlich entsteht durch zusammlagern der Makrofibrillen die Cellulosefaser.^[90,91] Die Dimensionen der Fasern ist abhängig von der Herkunft der Faserquelle, im Durchmesser variieren Fasern von 10 µm – 50 µm, wohingegen ihre Länge im Bereich von 1 mm – 3 mm liegt.^[87]

Aus Cellulosefasern lassen sich Papiere durch Entwässern von Fasersuspensionen über ein Sieb und Trocknen unter Druck bei erhöhter Temperatur herstellen. Papier ist ein seit fast 2.000 Jahre bekanntes Material, bei dem die Papierfasern statistisch verteilt übereinander liegen und nicht miteinander verwoben sind.^[92–96] Die Anfänge der Papierherstellung erfolgte durch händisches Schöpfen der Fasern aus einer Suspension mit einem Sieb. Die Hauptanwendung der Papiere diente überwiegend zur Dokumentation von Wissen und Weitergabe von Informationen.^[14] Heutzutage lassen sich Papiere großtechnisch herstellen und sind aus dem Alltag nicht wegzudenken. Die weltweite Produktion von Papieren lag 2021 bei ca. 417 Millionen Tonnen, welches zu einem Großteil in China, den USA, Japan und Deutschland hergestellt wurde.^[97] Die Anwendung der Papiere beschränkt sich bei weitem nicht mehr alleine auf Dokumentationszwecke. Der größte Teil der Papiere sind derzeit Verpackungspapiere und Pappen (53,0%), grafische Papiere (34,2%), Hygienepapiere (6,6%) und Spezialpapiere (6,2%).^[98] Zu den Spezialpapieren zählen Produkte die in diagnostische Papiere, Dekorpapiere, Filterpapiere oder Isolatorpapiere für Energiespeicher fließen. Gemessen an der gesamt produzierten Jahresmenge entsprechen Spezialpapiere einer Masse von 1,4 Millionen Tonnen.^[14]

Papier ist ein günstiges und robustes Material^[99], welches thermisch stabil, einfach zu lagern und gut transportierbar ist.^[71] Da es aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt wird ist es gut zersetzbar, rezyklierbar und unproblematisch zu entsorgen.^[77] Der strukturelle und chemische Aufbau von Papieren ermöglicht es, dass durch kapillarkräfte Flüssigkeiten durch das poröse Material transportiert werden können, ohne dass extrinsische Kräfte z.B. durch Pumpen aufgewendet werden müssen.^[100] Auch wenn dies sehr einfach erscheint, so spielen Phänomene wie Benetzung, Transport, Verdampfung und Diffusion bei diesem komplexen Vorgang eine Rolle.^[71] Vereinfacht lässt sich der Fluidtransport über die Lucas-Washburn-Gleichung (Gleichung (1)) beschreiben. Diese lässt sich durch Kombination der Hoffmann-Tenner-Gleichung^[71], der Young-Gleichung^[101] und der Young-Laplace-Gleichung^[102] erhalten. Die Ausführliche Herleitung ist bei Masoodi *et al.* beschrieben.^[102]

$$x(t) = \sqrt{\frac{\gamma r \cos \theta}{2 \mu} t} \quad (1)$$

Die Lucas-Washburn-Gleichung beschreibt den proportionalen Zusammenhang zwischen der zurückgelegten Strecke x eines Fluids in einem Bündel paralleler zylindrischer Röhren mit der Wurzel der Fließzeit t .^[103] Bezogen auf den Fluidfluss in Papier ist die zurückgelegte Strecke der Fließfront x abhängig von der Oberflächenspannung γ zwischen Flüssigkeit und Luft, den effektiven Porenradius des Papiers r , dem Kontaktwinkel zwischen Faser und Flüssigkeit θ und der Fluidviskosität μ beschrieben.^[71,104] Da die tatsächliche Struktur von Papieren sich stark von zylindrischen Röhren unterscheidet, müssen Näherungen angenommen werden, damit die Gleichung Anwendung finden kann. Vereinfacht wird angenommen, dass der Querschnitt von Papieren gleichmäßig und ohne Verunreinigungen ist. Zudem sind die Poren einheitlich und zylindrisch und das Flüssigkeitsreservoir ist unendlich. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass die Papiere keine Mikrostrukturierung aufweisen.^[104] In Bezug auf Membranmaterialien für diagnostische Assays, spielt die zurückgelegte Strecke eine nebensächliche Rolle, da Membranmaterialien auf definierte Längen geschnitten und verwendet werden. Wichtiger ist die Zeit die benötigt wird um den Membranstreifen zu durchfließen. Dafür kann die Washburn-Gleichung (Gleichung (1)) nach der benötigten Fließzeit t zu Gleichung (2) umgestellt werden.

$$t(x) = \frac{x^2 2 \mu}{\gamma r \cos \theta} \quad (2)$$

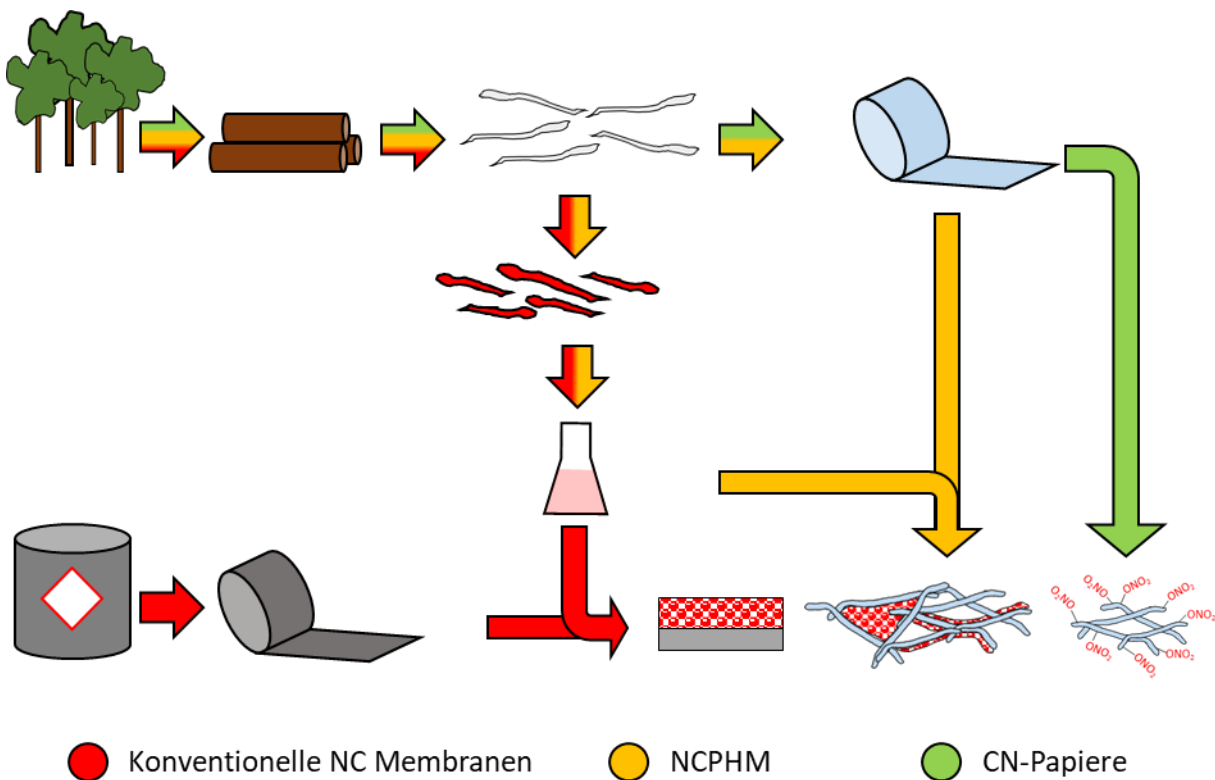
Nach dem Umstellen der Washburn-Gleichung können Zusammenhänge für zu erwartende Zeiten nach einer definierten Fließzeit getroffen werden. In klassischen LFTs kann die zurückgelegte Strecke über den gesamten Membranstreifen als konstant angenommen werden. Dies gilt ebenfalls für den Kontaktwinkel θ , der Fluidviskosität μ und der Oberflächenspannung γ . Demnach ist wie in Gleichung (3) zu erkennen die benötigte Zeit zum Erreichen einer definierten Strecke antiproportional zum Porenradius des Membranmaterials.

$$t \sim \frac{1}{r} \quad (3)$$

Dieser Zusammenhang zeigt, dass Membranmaterialien mit großen Poren geringere Fließzeiten und somit eine größere Fließgeschwindigkeit aufweisen, als Membranen mit kleinen Poren.

1.5 Motivation

Die Entwicklung von porösen NC-Membranen geht zurück bis in die 1910er Jahre, wo diese für Filtrationsanwendungen genutzt wurden.^[30] Durch konsequente Weiterentwicklung des Materials wurden Mitte der 1980er Jahre mehrere Patente eingereicht welche den Fluidfluss von gefärbten und mit Antikörper beschichteten Partikeln beschreiben. Diese Patente markieren die Geburtsstunde der *Lateral Flow Immuno Assays*.^[19] Bereits 1988 erfolgte die Markteinführung des ersten Schwangerschaftstests (hCG-Assay) für die Anwendung zu Hause. Bis Heute, sind NC-Membranen aus modernen diagnostischen Assays aufgrund ihren herausragenden Eigenschaften nicht wegzudenken und kommen in einer Vielzahl von Assays und analytisch- diagnostischen Fragestellungen zum Einsatz. Die dabei angewendeten Tests sind in der Regel Einwegartikel, was wie zuletzt während der SARS-CoV-2 Pandemie zu sehen war, zu großen Mengen Einwegabfällen führt.^[105] Eine Rückführung der bei den Assays verwendeten Wertstoffe findet in der Regel nicht statt. In dieser Arbeit wird die Herstellung und Charakterisierung von alternativen Membranmaterialien auf Papierbasis diskutiert. Die verschiedenen Herstellungswege für alternative Membranmaterialien und konventionellen NC-Membranen sind in Schema 1-4 skizziert.



Schema 1-4: Darstellung der verschiedenen Herstellungswege für konventionelle NC-Membranen (Rot), NCPHM (Orange) und CN-Papiere (Grün).

Der Herstellungsweg für konventionelle NC-Membranen ist in Schema 1-4 im roten Herstellungspfad dargestellt. Für diagnostische Assays werden NC-Membranen überwiegend auf PET-Folien hergestellt, die der porösen NC als Trägermaterial dienen. Die Herstellung von PET aus fossilen Rohstoffen ist energieaufwändig, was sich in den Rohstoffkosten des Materials wieder spiegelt. NC selbst, wird direkt aus Cellulose hergestellt, welche aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden kann.^[106,107] Allerdings ist NC nicht biologisch abbaubar und teurer in der Herstellung als Papier aus Cellulose. Durch Beschichtung von PET-Trägerfolien mit NC-Lösungen werden konventionelle NC-Membranen erhalten. Werden anstelle der PET-Trägerfolie Papiere mit NC-Lösungen beschichtet, so können NC-Papier-Hybridmaterialien (NCPHM) erhalten werden (Schema 1-4, orangener Pfad). Durch diese Maßnahme ließe sich gänzlich auf PET-Trägerfolien verzichten und den Anteil an fossilen Grundmaterialien im Membranmaterial reduzieren. Ein direkter Weg zum Membranmaterial ohne die Notwendigkeit aus Fasern zuerst NC herzustellen und diese beschichtend aufzubringen (NCPHM), ist die reaktive Umsetzung von Papieren zu CN-Papieren (Schema 1-4, grüner Pfad). Dieser direkte Weg ist weniger komplex und benötigt weniger Zwischenschritte als die Herstellung konventioneller NC-Membranen und NCPHM. Mit der Herstellung von NCPHM und CN-Papieren sollte es möglich sein, die zuvor erwähnten Vorteile von Papieren und NC miteinander in einem neuartigen Material zu vereinen.

2. Ziele und Strategie

Wie einleitend thematisiert gibt es zahlreiche etablierte Membranmaterialien für diagnostische Assays. Für einen Großteil dieser kommen NC-Membranen zum Einsatz, welche auf PET-Trägerfolien aufgebracht sind. Diagnostische Assays an sich, bestehen neben dem Membranmaterial zu einem großen Anteil aus Kunststoffen, welche nach der Anwendung nicht zurück in die Wertschöpfungskette geführt werden. Dies ist mit einem zunehmenden Nachhaltigkeitsbewusstsein in der Gesellschaft und Industrie nicht mehr in Einklang zu bringen. Zudem ist die Reduktion von Einwegplastikabfällen politischer Wille, was beispielsweise an der Einwegplastik-Richtlinie der Europäischen Union deutlich zu erkennen ist.^[108] Besonders deutlich, auch für die breite Weltbevölkerung, war dies während der SARS-CoV-2 Pandemie zu beobachten, bei der ca. $8,4 \pm 1,4$ Millionen Tonnen pandemieassoziiertes Abfall angefallen ist.^[105] Davon wurden ca. 40.000 Tonnen allein durch Schnelltests verursacht.^[105] Diese dienten der Gesundheit aller, zu Lasten unserer Umwelt.

Neben dem Nachhaltigkeitsaspekt wird anhand der intrinsischen Eigenschaften von NC-Membranen und Papieren klar, dass diese bereits für sich genommen spannende Eigenschaften aufweisen. Papiere besitzen eine inhärente Flexibilität und Stabilität und lassen sich in großem Maßstab auf Rolle herstellen, sowie einfach transportieren und lagern. Während der Papierherstellung lassen sich die Makroporen im Fasernetzwerk einstellen, was zu einer guten Kontrollierbarkeit des Fluidflusses im Papier führt. Nachteilig an diesem aus nachwachsenden Rohstoffen gewinnbaren Material ist eine geringe Proteinbindeaffinität. NC-Membranen, welche bis heute den Goldstandard für Membranmaterialien darstellen, weisen hervorragende Proteinbindeigenschaften auf. Die Porengrößen des Materials lassen sich durch Kontrolle der Herstellungsparameter einstellen, was die Kontrollierbarkeit des Fluidflusses nach zusätzlicher Detergensbeschichtung gewährleistet. Allerdings weisen NC-Membranen aufgrund ihrer Porenstruktur eine gewisse Brüchigkeit auf, welche öfters zu Beschädigungen des Membranmaterials führen. Darüber hinaus sind bei Transport und Lagerung von NC-Membranen besondere Vorkehrungen aufgrund der leichten Entflammbarkeit des Materials zu treffen. Zu Papieren und NC-Membranen wurde in der Vergangenheit viel Forschung betrieben, weniger bekannt sind dagegen Systeme in denen NC und Papier miteinander kombiniert werden. Auf diesem Wege könnten neuartige Hybridmaterialien entstehen, deren Eigenschaftsprofile eine besondere Eignung als alternative Membranmaterialien für diagnostische Assays aufweisen.

2.1 Ziele

Durch Kombination der positiven und inhärenten Eigenschaften von Papier und Nitrocellulose, sollen neuartige NC-Papier-Hybridmaterialien hergestellt werden. Diese sollen durch etablierte Herstellungsverfahren (Tauchbeschichtung und Liniendruckverfahren) hergestellt und charakterisiert werden. Durch die Kombination dieser Materialien, sollte sich der Anteil an NC im neuartigen Hybridmaterial reduzieren lassen und auf Trägerfolien wie bei konventionellen NC Membranen verzichtet werden können. Auch die direkte reaktive Umsetzung von Papieren zu Cellulosenitrat-Papieren ist eine mögliche Route zu neuartigen Membranen. Die zuvor genannten Materialien werden zudem dem Nachhaltigkeitsanspruch gerecht, da eine Reduktion des benötigten NC-Gehalts und ein größerer Anteil an nachwachsenden Rohstoffen zum Einsatz kommen.

Aus dieser Zielstellung lassen sich folgende Fragestellungen ableiten:

- Ist es möglich neuartige Membranmaterialien herzustellen, die ohne eine PET-Trägerfolie in diagnostischen Assays Anwendung finden können?
- Lässt sich durch gezielten Einsatz von NC und cellulosebasierten Papieren ein Membranmaterial mit reduziertem NC-Gehalt im Vergleich zu konventionellen Membranen herstellen?
- Welche Herstellungsmethoden sind für diese neuartigen Membranmaterialien geeignet?
- Können durch die Kombination dieser Materialien vergleichbare Fließeigenschaften eingestellt werden?
- Können durch den Einsatz von unbehandelten Papieren oder durch reaktiv modifizierte Papiere Membranmaterialien erhalten werden, welche vollständig ohne Applikation von NC auf ein Trägermaterial auskommen?
- Lässt sich die Eignung der hergestellten Materialien als Membranmaterial durch die Anwendung von etablierten Assays überprüfen?

2.2 Strategie

Die in dieser Arbeit hergestellten Materialien werden mit konventionellen NC-Membranen und unbehandelten Baumwoll-Linters-Papieren verglichen. Um die aus den Zielen abgeleiteten Fragestellungen zu behandeln, kommen verschiedene Konzepte zum Einsatz, welche für die Herstellung von alternativen Membranmaterialien in Abbildung 2-1 herangezogen werden können.

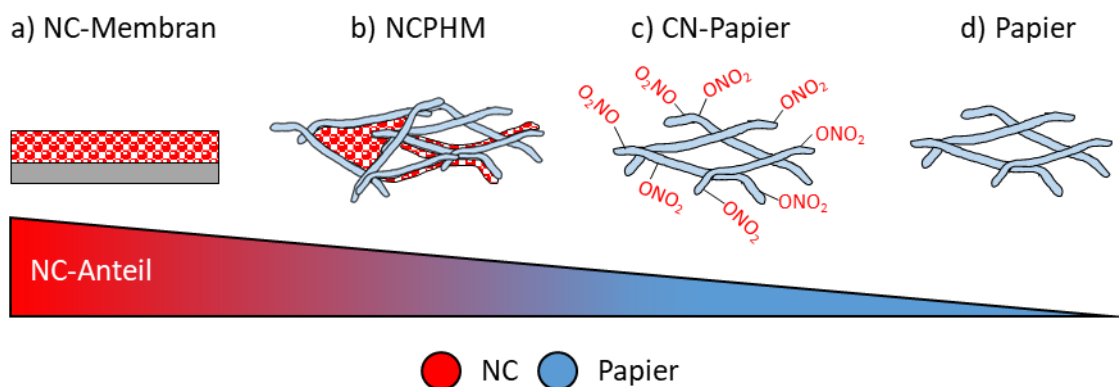


Abbildung 2-1: Zu erwartende neuartige Membranmaterialien b) und c) im Vergleich zu a) konventionellen NC-Membranen und d) Baumwoll-Linters-Papieren. Die zu erwartenden NC-Anteile der verschiedenen Materialien nimmt von den konventionellen NC-Membranen a) hin zum unbehandelten Baumwoll-Linters-Papier d) ab.

Die alternativen Membranmaterialien lassen sich entweder durch Beschichtung von Papieren mit *NC-Lacquern* oder durch reaktive Umsetzung von Papieren herstellen. Durch die Beschichtung werden NCPHM erhalten (Abbildung 2-1 b). Eine reaktive Umsetzung der Papiere ermöglicht die Herstellung von CN-Papieren (Abbildung 2-1 c). Nachfolgend werden die Konzepte der beiden Materialklassen beschrieben.

Terminologie Cellulosenitrat/Nitrocellulose

In den nachfolgenden Konzepten wird sowohl der fachlich korrekte Begriff Cellulosenitrat, als auch der umgangssprachliche Begriff Nitrocellulose verwendet. Beide Begrifflichkeiten beschreiben die selbe chemische Verbindung, welche aus Veresterung von Cellulose mit Salpetersäure hergestellt werden kann. Die unterschiedlichen Bezeichnungen wurden gezielt gewählt um in der Terminologie der alternativen Membranmaterialien die Herstellungsmethode dieser zu implizieren. Materialien die durch eine reaktive Umsetzung von Papieren durch Säuremischungen erhalten werden (Abschnitt 2.2.2), sind nachfolgend als Cellulosenitrat-Papiere (CN-Papiere) bezeichnet. Wird eine Lösung von kommerziell erworbenem Cellulosenitrat zur Beschichtung von Papieren verwendet, (Abschnitt 2.2.1), so wird die umgangssprachliche Bezeichnung Nitrocellulose genutzt, da dies eine Vereinigung von zwei unterschiedlichen Materialien zu NCPHM deutlicher hervorhebt.

2.2.1 Konzept NC-Papier-Hybridmaterialien

NC-Membranen finden aufgrund ihrer herausragenden Proteinbindeeigenschaften und ihren mikrofluidischen Eigenschaften große Beliebtheit in der Anwendung in diagnostischen Assays.^[20] Allerdings sind NC-Membranen brüchig und weisen eine geringe mechanische Stabilität auf, weshalb die NC auf PET-Trägerfolien aufgebracht werden müssen.^[29] Um alternative Membranmaterialien ohne Trägerfolien herstellen zu können, sollen offenporige Baumwoll-Linters-Papiere mit NC-Lösungen beschichtet werden. Die Papiere sollen dabei als dreidimensionales Stützmaterial für die NC dienen. Bei der Herstellung von NCPHM lassen sich verschiedene Parameter und deren Auswirkung auf die Morphologie der Materialien, den Fluidfluss und die Anwendbarkeit in diagnostischen Assays testen. Die getesteten Parameter umfassen die Grammatik des verwendeten Basispapiers, die Zusammensetzung des aus acht Komponenten bestehenden NC-Lacquers, die Temperatur und die relative Luftfeuchtigkeit bei der Beschichtung. Zudem werden Beschichtungsparameter wie die Ziehgeschwindigkeit und Dosierung des Lacquers betrachtet.

Um ein gleichmäßig und vollflächig beschichtetes Membranmaterial erhalten zu können, bietet sich das Tauchbeschichtungsverfahren an. Bei der Tauchbeschichtung können Papiere durch Eintauchen in eine NC-Lösung, auch NC-Lacquer genannt, vollständig und durchdringend mit NC beschichtet werden. Die dabei erhaltenen Materialien sollen eine gleichmäßige NC-Verteilung über das gesamte Material besitzen, was eine Substitution der konventionellen NC-Membranen in Assays mit dem neuartigen Membranmaterial vereinfachen würde.

Zur Reduktion des benötigten NC-Anteils auf den Membranmaterialien kann darüber hinaus die Beschichtung der Papiere durch eine ortsdefinierte Auftragung der NC-Lösung erfolgen. Hierbei werden ortsdefinierte NCPHM erhalten. Die NC befindet sich nur im Bereich der Test- und Kontrolllinie der diagnostischen Assays. Bei der Anwendung in einem Assay wird dabei der Fluidfluss bis zum mit NC beschichteten Bereich durch die Fließeigenschaften des unbehandelten Papiers bestimmt. Solch eine Art von Membranaufbau ist bei konventionellen NC-Membranen auf PET-Trägerfolien nicht realisierbar.

Die Vereinigung von NC und Papier in einem Hybridmaterial stellt hinsichtlich der mikrofluidischen Eigenschaften, proteinbindenden Eigenschaften, Flexibilität und Nachhaltigkeit ein span-

nendes Material dar. Eine Kombination dieser Materialien und deren Anwendbarkeit in diagnostischen Assays ist bis dato völlig neu und kann ein großes Potential als alternative zu konventionellen NC-Membranen bieten.

2.2.2 Konzept CN-Papiere

Bevor auf CN-Papiere als alternative Membranmaterialien eingegangen werden kann, muss zunächst eine terminologische Abgrenzung zu Begrifflichkeiten wie „*paper based lateral flow assay*“ oder „*Nitrocellulose Papers*“ getroffen werden, wie sie häufig in der Fachliteratur zu finden sind.^[109–112] Diese haben im Regelfall nichts mit Papieren oder papierbasierten Materialien wie in Abschnitt 1.4 beschrieben zu tun. Es handelt sich dabei um NC-Membranen, deren einzige Ähnlichkeiten zu Papier die Farbe, Form und Dicke der Materialien ist. Selbst der Fakt, dass NC aus Cellulose hergestellt wird, welche ebenfalls der Hauptbestandteil von Papier ist, rechtfertigt die Bezeichnung von „papierbasierten Membranen“ nicht.

Die Herstellung von alternativen Membranmaterialien ist nicht auf die Beschichtung von Papieren mit NC limitiert. Durch reaktive Umsetzung von Papieren zu CN-Papieren lassen sich Membranmaterialien erhalten, welche vollständig aus Cellulosenitrat bestehen und nicht aus einer Kombination mehrerer Materialien. Bei der Umsetzung der Cellulose zu Cellulosenitrat soll die Struktur des Fasernetzwerks erhalten bleiben. Dies soll sicherstellen, dass ein Fluidfluss im Material möglich ist. Da das Material in allen Dimensionen aus Cellulosenitrat bestehen soll, wird davon ausgegangen, dass eine bessere Proteinbindung im Vergleich zu unbehandelten Papieren zu beobachten sein wird. Dies ist für die Herstellung von diagnostischen Assays wichtig, da eine gute Proteinbindung zu schmalen und kontrastreichen Test- und Kontrolllinien führt.^[29]

Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen NCPHM muss durch die direkte Umsetzung keine zusätzliche NC aufgebracht werden. Der benötigte Rohstoffbedarf für diese Materialien ist dadurch geringer. Ebenfalls ist keine PET-Trägerfolie zur Herstellung der Cellulosenitrat Papiere nötig. Die Anzahl der Herstellungsparameter ist deutlich geringer als bei NCPHM. Die Eigenschaften der Cellulosenitrat-Papiere wird lediglich durch die Zusammensetzung der aus drei Komponenten bestehenden Nitriersäuremischung, der Papiergrammatur und der Reaktionszeit bestimmt. Eine aufwändige Kontrolle der klimatischen Bedingungen wie bei der Herstellung von NCPHM und konventionellen NC-Membranen ist nicht nötig.

Cellulosenitrat-Papiere sind die logische Konsequenz aus dem Bestreben den benötigten NC-Gehalt bei der Herstellung von Membranmaterialien zu reduzieren. Die einfache Herstellungsmethode, geringerer Rohstoffbedarf und die ausschließliche Umsetzung des nachwachsenden Rohstoffs Papier zu einem funktionalen Membranmaterial kann großes Potential bieten, diese Materialien als alternative zu konventionellen NC-Membranen in diagnostischen Assays zu verwenden.

3. Methodenteil

3.1 Bildgebende Charakterisierungsmethoden für alternative Membranmaterialien

Zur morphologischen Charakterisierung von NCPHM und CN-Papieren können verschiedene Mikroskopietechniken eingesetzt werden. Die Auswahl der geeigneten Technik ist abhängig von der zu untersuchenden Probe und Präparationsmethode.

3.1.1 Konfokalmikroskopie

Die Betrachtung von vollflächigen und ortsdefinierten NCPHM mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie (CLSM) ermöglicht es durch Anfärbung verschiedener Komponente diese voneinander auf den Hybridmaterialien zu unterscheiden. Je nach verwendetem Objektiv kommt es zu unterschiedlichen großen Sehfeldern bei der Aufnahme. Um große Probenflächen aufzunehmen, können Kachelbildaufnahmen erstellt werden, bei dem mehrere nebeneinanderliegende Sehfelder zu einem großen Bild zusammengefügt werden.

Bei der Konfokalmikroskopie handelt es sich um eine spezielle Technik der Fluoreszenzmikroskopie, bei der ein punktwises Abrastern der Probe stattfindet.^[113] Der Lichtweg eines Konfokalmikroskops ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

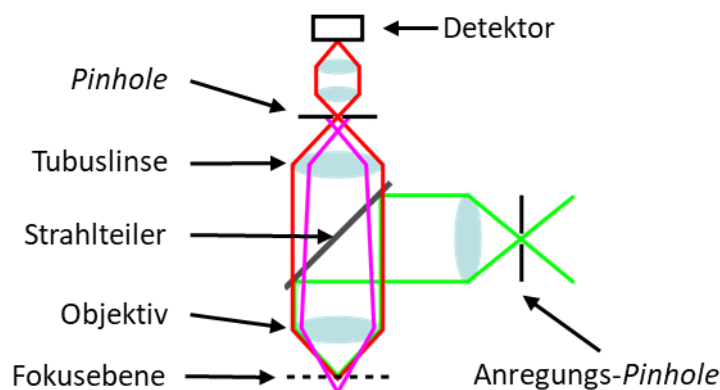


Abbildung 3-1: Lichtweg eines Konfokalmikroskops bestehend aus dem Anregungsstrahlengang (Grün), dem Emissionsstrahlengang (Rot) und des Lichtwegs von Fluoreszenzsignalen außerhalb der Fokusebene (Magenta).^[114]

Das Anregungslicht (Laser) wird durch eine Lochblende (*Pinhole*) fokussiert und über einen Strahlteiler (Dichroid) in das Objektiv gelenkt. Durch das Objektiv wird das Anregungslicht als Abbildung des *Pinholes* in die Fokusebene der Probe projiziert. Auf der Probe werden die entsprechenden Fluorophore angeregt, welche Licht mit einer längeren Wellenlänge im Vergleich zum Anregungslicht emittieren. Das emittierte Licht wird vom Objektiv aufgefangen und zurück zum Strahlteiler gelenkt, welcher das längerwellige Emissionssignal passieren lässt. Durch die Tubuslinse wird die Emission durch ein weiteres *Pinhole* fokussiert. Dieses hat die Aufgabe Licht von der Probe, welches nicht aus der Fokusebene stammt aus dem Strahlengang zu entfernen. Das verbleibende Licht was das *Pinhole* passiert, wird anschließend von einem Detektor aufge-

nommen und digital verarbeitet. Um ein zweidimensionales Bild zu erhalten, wird das Anregungslicht mit Hilfe von *Scanning*-Spiegeln über die Probe gelenkt und diese Punkt für Punkt abgerastert. Die erhaltene Bildinformation stammt bei dieser Technik nur aus der Fokusebene, was einem optischen Schnitt durch das Präparat entspricht. Durch die Aufnahme mehrerer Fokusebenen (z-Stapel) lassen sich durch geeignete Bildverarbeitung dreidimensionale Informationen über die Verteilung von Fluoreszenzsignalen erhalten.^[113]

Um Fluoreszenzaufnahmen mit dieser Technik anfertigen zu können, bedarf es einer Fluoreszenzfärbung der verschiedenen Bestandteile der Probe. Zur Anfärbung von Papieren kann Calcofluor White M2R verwendet werden, welches bei einer Wellenlänge von 405 nm angeregt werden kann.^[115] Die *NC-Lacquer* werden unspezifisch mit Rhodamin B markiert. Zur Anregung von Rhodamin wird ein Laser mit 552 nm verwendet. Diese Kombination von Fluorophoren liefert bei der Untersuchung der NC-Verteilung in NCPHM reproduzierbare Ergebnisse. In Abbildung 3-2 sind exemplarisch CLSM-Aufnahmen eines vollflächig beschichteten NCPHM gefärbt mit Calcofluor White M2R und Rhodamin B dargestellt.

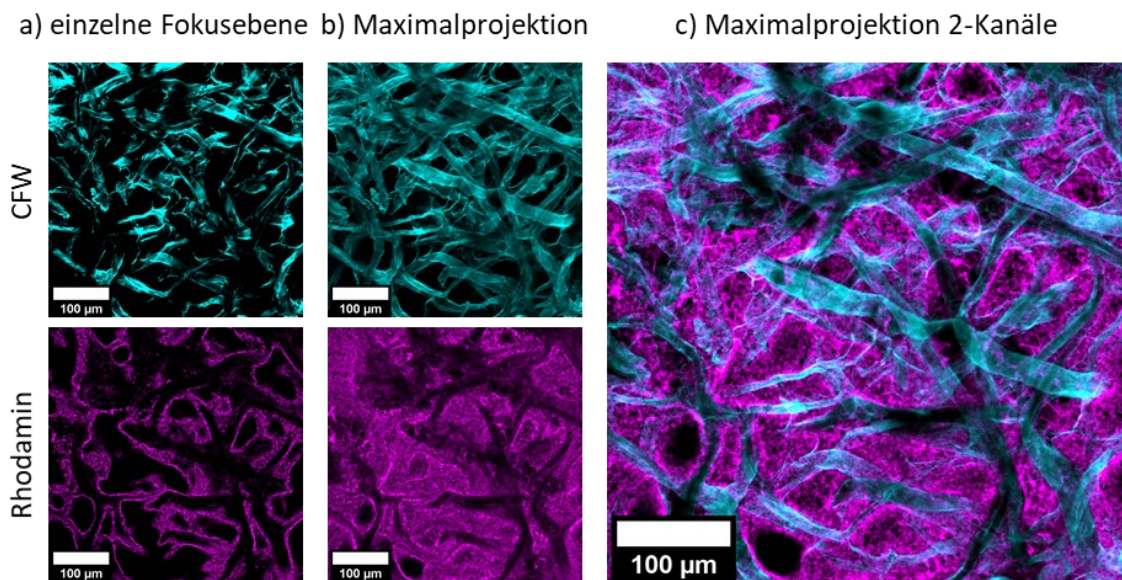


Abbildung 3-2: CLSM Aufnahmen von vollflächigen NCPHM. Die Papierfasern sind mit Calcofluor White M2R gefärbt (Cyan) und die NC mit Rhodamin B (Magenta). a) Aufnahme einer einzelnen Fokusebene in je einem Kanal, b) Maximalprojektionen in je einem Kanal, c) überlagerte Maximalprojektionen beider Fluoreszenzkanäle.

Zur Betrachtung der Proteinbindung an NCPHM, wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet, welches entweder an Bovines Serumalbumin (BSA)^[116] oder Dextran gebunden war. Dieses kann mit einem Laser bei 488 nm angeregt werden. Die Aufnahmesoftware des Konfokalmikroskops erlaubt die sequenzielle Aufnahme mehrerer Fluorophore nacheinander, sodass in einem Bildausschnitt orts aufgelöste Informationen über mehrere Farbstoffe erhalten werden können. Dies spielt vor allem bei der Betrachtung der Proteinbindeigenschaften von BSA an NC eine Rolle (vgl. Abschnitt 6.1). Befindet sich FITC-markiertes BSA und NC an derselben Stelle, so kann dies durch eine Kolokalisation der beiden Fluorophore beobachtet werden. Dabei kommt es zu einer Überlagerung der einzelnen Farben der Fluorophore (z.B. Rot und Grün) was sich in einer Kolokalisationsfarbe (z.B. Gelb) zeigt (vgl. Abschnitt 6.1, Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2).

Mit CLSM-Aufnahmen lassen sich Bildinformationen sowohl lateral als auch axial aus der Probe ermitteln. Die tiefe der axialen Bildinformation und dessen Auflösung hängt stark von den optischen Eigenschaften der Probe ab. Im Fall von Papieren, NC-Membranen und NCPHM beträgt die Eindringtiefe nur wenige Mikrometer, da die Materialien eine hohe Lichtstreuung aufweisen. Um Informationen über die NC-Verteilung im Inneren von NCPHM zu erhalten, können Querschnittsaufnahmen angefertigt werden. Hierfür müssen die Proben in transparentes Harz eingebettet werden. Nach dem Aushärten des Harzes können Querschnitte durch Verwendung eines Mikrotoms erstellt werden und für die Bildgebung genutzt werden. Das Harz füllt die Hohlräume in den Materialien aus, und verleiht diesen Stabilität, sodass beim Schneiden keine Beschädigung der Materialstruktur auftritt. Die beim Anfertigen der Mikrotomschnitte erhaltenen Artefakte sind gering.

3.1.2 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Morphologie der in dieser Arbeit verwendeten Materialien, kann die Rasterelektronenmikroskopie (REM) eingesetzt werden. Diese Mikroskopiertechnik zeichnet sich durch eine sehr hohe Auflösung aus. Zudem ermöglicht die Technik Aufnahmen mit einer großen Tiefenschärfe. Um Proben mittels REM untersuchen zu können, müssen diese vakuumstabil und elektrisch leitfähig sein. Proben die eine zu geringe Leitfähigkeit aufweisen, müssen zuvor mit einer leitfähigen Schicht versehen werden, dies kann z.B. durch *Sputtercoating* realisiert werden. Der schematische Aufbau eines REMs ist in Abbildung 3-3 dargestellt.

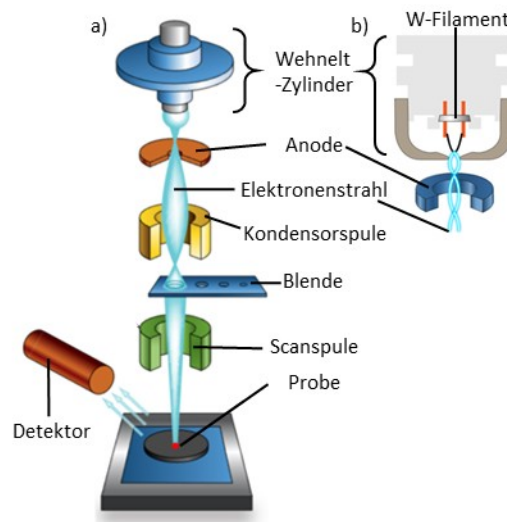


Abbildung 3-3: a) Vereinfachter Querschnitt durch ein Rasterelektronenmikroskop. b) Querschnitt durch einen Wehnelt-Zylinder (Elektronenquelle).^[117,118]

Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie werden für die Bildgebung Elektronen benötigt. Damit diese genutzt werden können, muss das gesamte System unter Hochvakuum stehen. Die Elektronen werden in der Elektronenquelle erzeugt. Diese besteht aus dem Wehnelt-Zylinder, in dem z.B. ein Wolfram-Filament verbaut ist. Durch einen angelegten Heizstrom am Filament, wird dieses

auf Temperaturen von ca. 2800 K erhitzt. Beim Anlegen einer Hochspannung, gehen die Elektronen vom Filament ins Vakuum über. Eine an der Anode angelegte Beschleunigungsspannung beschleunigt die ausgetretenen Elektronen in die so genannte Elektronensäule hinein. Um den Elektronenstrahl zu formen und diesen auf einen schmalen Durchmesser zu bringen, passiert der Strahl verschiedene Kondensorenspulen. Diese bündeln den Elektronenstrahl, welcher durch eine Aperturblende fällt. Diese entfernt einen Großteil an Elektronen, die Trajektorien aufweisen, welche außerhalb der optischen Achse der Elektronensäule liegen. Mit der Aperturblende kann eine orthogonale Strahlausrichtung zur Probenoberfläche realisiert werden. Der ausgegerichtete und schmale Elektronenstrahl wird im letzten Schritt durch die Scanspulen auf die Probe gelenkt. Die Scanspulen sorgen dafür für ein punktwises Abrastern der Probenoberfläche, ähnlich wie es mittels Scanspiegeln beim CLSM realisiert wird. Zudem ist die Scanspule für die Einstellung der Fokusebene zuständig. Beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probenoberfläche kommt es zur Interaktion der Elektronen mit der Probe. Dabei entsteht eine Vielzahl verschiedener Signale, welche über spezifische Detektoren in der Probenkammer aufgenommen werden.

Die drei wichtigsten entstehenden Signale sind Sekundärelektronen (SE), Rückstreuelektronen (BSE) und charakteristische Röntgenstrahlung. Beim Auftreffen des Primärelektronenstrahls auf die Atome der Probe, kommen Elektronen aus der Probe frei, welche durch inelastische Streuung entstehen. Diese niederenergetischen Elektronen werden als Sekundärelektronen bezeichnet und stammen aus den oberen Schichten der Probe. Die Bildgebung mit Sekundärelektronen ist nur im Hochvakuum möglich und liefert eine sehr gute Auflösung und Topographiekontraste der Probe. Eine Unterscheidung verschiedener Komponenten im aufgenommenen Bereich sind nicht möglich. Neben der Entstehung von Sekundärelektronen kommt es durch elastische Streuung in der Probe zur Entstehung von Rückstreuelektronen. Diese stammen hauptsächlich aus dem Primärelektronenstrahl und haben eine hohe Energie. Rückstreuelektronen entweichen aus der Probe annähernd in Eindringrichtung und können direkt am Polschuh mit einem geeigneten Rückstreudetektor aufgezeichnet werden. Das Rückstreusignal der Probe kommt aus Bereichen, die bis ca. $5 \mu\text{m}$ tief in der Probe liegen können, was zu einer verminderten lateralen Auflösung im Vergleich zur Bildgebung mit Sekundärelektronen führt. Die Energie der Rückstreuelektronen variiert je nach Materialzusammensetzung und ist abhängig von der Atommasse der Probe. Atome mit höherer Ordnungszahl erzeugen mehr Rückstreuelektronen und liefern höhere Signalintensitäten, als Atome mit geringer Ordnungszahl. Dies ermöglicht Aufnahmen mit einem Materialkontrast wodurch unterschiedliche Materialien voneinander unterschieden werden können. Allerdings ist für die Unterscheidung verschiedener Materialien ein gewisser Massenunterschied der beinhalteten Elemente nötig. Eine Unterscheidung von NC und unbehandelter Cellulose ist im Rückstreukontrast nicht möglich. Aufgrund der hohen Energie von Rückstreuelektronen können diese auch bei der Bildgebung bei höheren Drücken in der Kammer, sprich bei schlechteren Vakuumkonditionen genutzt werden. Neben Sekundär- und Rückstreuelektronen werden bei der Interaktion zwischen Elektronenstrahl und Probe charakteristische Röntgenstrahlen frei. Diese können zur genauen Identifizierung von Elementen in der Probe im Bereich von zehntel Atomprozenten genutzt werden. Charakteristische Röntgenstrahlung entsteht, wenn der Primärelektronenstrahl aus den Atomen der Probe Elektronen aus den inneren Schalen herausschlägt. Die dadurch entstehenden Lücken werden durch Elektronen aus höheren Schalen gefüllt. Der Sprung der Elektronen von höheren Schalen zu niedrigen erfolgt unter Aussendung von Röntgenquanten. Diese haben eine charakteristische Energie und können mit einem geeigneten Röntgendetektor aufgenommen werden. Als Resultat werden Röntgenspektren der Probe erhalten. Durch Aufzeichnung von Röntgenspektren in

jedem Bildpunkt, können Elementverteilungen auf der Probe aufgezeichnet und kartographiert werden. Die Emission von Röntgenquanten ist abhängig von der Ordnungszahl der Elemente und der verwendeten Beschleunigungsspannung des Primärelektronenstrahls. Bei leichteren Elementen als Natrium (Ordnungszahl <11) ist die Nachweisgrenze deutlich geringer. Dies ermöglicht in den meisten Fällen keine Unterscheidung der leichten Elemente, sodass eine Unterscheidung von Kohlenstoff und Stickstoff nicht möglich ist. Eine Kartographierung von NCPHM und CN-Papieren würde demnach keine verwertbare Materialverteilung liefern. Die von der Probe emittierten Röntgenstrahlung kann aus bis zu 10 μm Tief aus der Probe stammen, sodass die laterale Auflösung bei der Kartographierung der Proben niedriger ist, als bei der Bildgebung mit Rückstreu- und Sekundärelektronen.

Die Verwendung der Elektronenmikroskopie ist für die morphologische Betrachtung der verschiedenen Proben dieser Arbeit eine unerlässliche Methode. Papiere, NC-Membranen, NCPHM und CN-Papiere weisen eine hohe Lichtstreuung auf, weshalb lichtmikroskopische Methoden für die Untersuchungen der Mikrostruktur an ihre Grenzen stoßen. Die kleinsten Details auf den untersuchten Proben liegen in einem Größenbereich, welcher Unterhalb der Auflösungsgrenze der Konfokalmikroskopie liegt. Mit der Elektronenmikroskopie lassen sich je nach Probenpräparation und Probe Auflösungen von bis zu 3 nm erzielen. Nachteilig bei dieser Methode ist jedoch, dass keine Unterscheidung von NC, Cellulosenitrat und Papier aufgrund des geringen Materialkontrasts und der niedrigen Nachweisgrenze der Röntgensignale leichter Elemente möglich ist. Die Materialverteilung von NC lässt sich nur anhand von morphologischen Unterschieden und Ausbildung von Strukturen abschätzen. Aus diesem Grund ist die Verwendung der komplementären Mikroskopiemethoden (REM und CLSM) für die Beurteilung der Probenmorphologie wichtig. In Abbildung 3-4 sind exemplarisch REM-Mikrographen von einem Baumwoll-Linters-Papier und einer NC-Membran dargestellt.

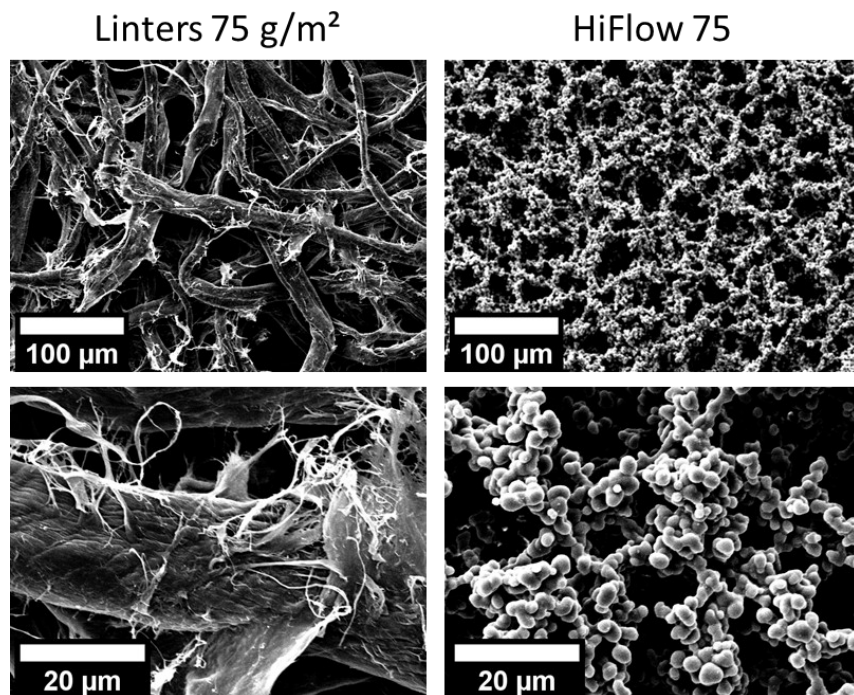


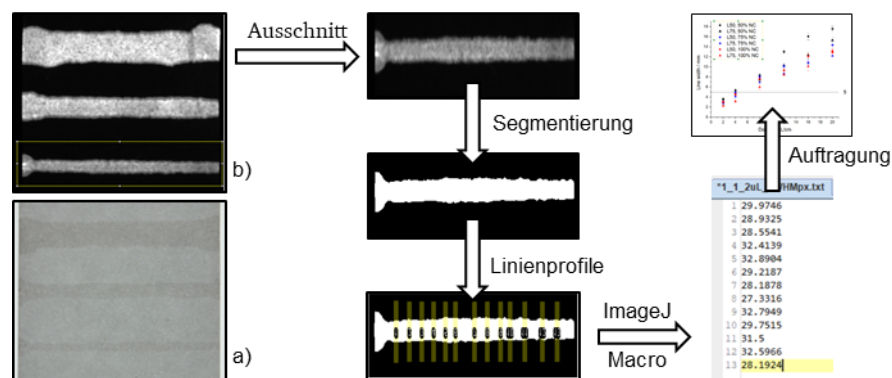
Abbildung 3-4: REM-Mikrographen von Baumwoll-Linters-Papier (75 g/m²) und einer NC-Membran (HiFlow 75) bei unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Aufnahmen wurden mittels SE-Detektor aufgenommen.

Die Anfertigung von Querschnittsaufnahmen ist bei der Rasterelektronenmikroskopie ebenfalls möglich. Hierfür muss die Probe axial geschnitten werden. Ein Einbetten der Probe ist nicht möglich da das Harz die Poren füllt und kein Topographiekontrast bei der Detektion der Sekundärelektronen zu erhalten ist. Aus diesem Grund müssen andere Schnitttechniken angewandt werden, wie z.B. der Guillotinschnitt. Dies kann aufgrund der Probenbeschaffenheit zu Präparationsartefakten, wie z.B. Quetschung der Probe führen.

3.1.3 Fluoreszenz-Imager

Zur Betrachtung großer Proben bzw. Probenflächen kann ein Fluoreszenzimager eingesetzt werden. Dieser ermöglicht Bildaufnahmen von fluoreszenzmarkierten Proben bis zu einer Größe von 12,0 cm x 12,0 cm. Zur Anwendung kommt diese Technik bei der Anfertigung kontrastreicher Fluoreszenzaufnahmen, welche zur Untersuchung der proteinbindenden Eigenschaften von vollflächigen NCPHM (Abschnitt 6.1) und der Auswertung von Linienbreiten der ortsdefinierten NCPHM (Abschnitt 4.3.2) verwendet werden können.

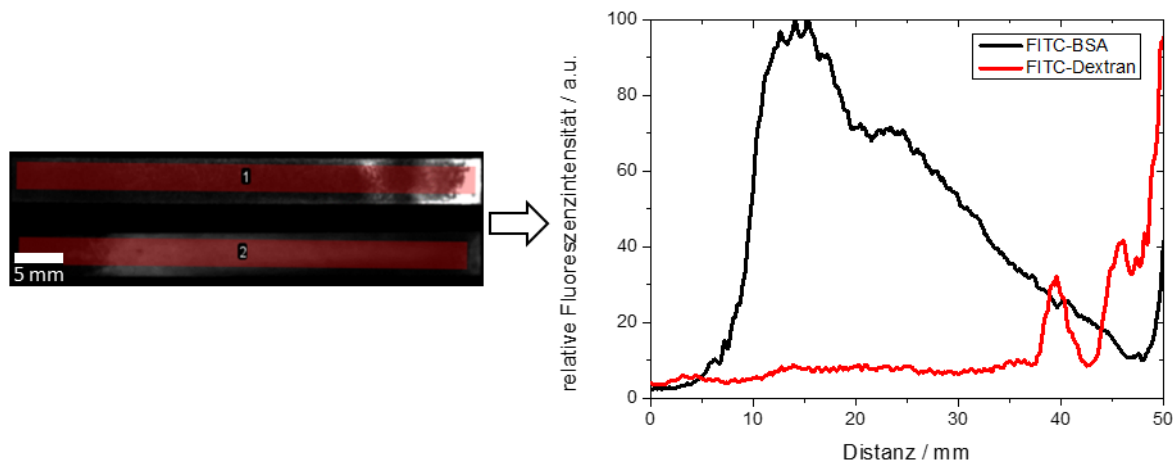
Die Vorgehensweise zur Auswertung der Linienbreiten bei ortsdefinierten NCPHM sind in Schema 3-1 dargestellt.



Schema 3-1: Vorgehensweise zur Auswertung von Linienbreiten von ortsdefinierten NCPHM durch Verwendung eines Fluoreszenzimaggers. a) Foto von ortsdefinierten NCPHM mit schwachem Kontrast. b) Fluoreszenzaufnahme von ortsdefinierten NCPHM mit Rhodaminfärbung.

Die Fotoaufnahmen von ortsdefinierten NCPHM (Schema 3-1 a) weisen nur schwache Kontraste auf, welche zur Bildauswertung nicht ideal sind. Durch Anfärben des NC-Lacquers bei der Herstellung, lässt sich eine deutliche Kontraststeigerung durch Fluoreszenzaufnahmen erzielen (Schema 3-1 b). Die Fluoreszenzaufnahmen werden mittels Bildbearbeitung auf den benötigten Bereich beschränkt und schwellwertbasiert segmentiert. Orthogonal zu den aufgedruckten Linien werden Linienprofile angelegt, aus welchen die Halbwertsbreiten der Linien bestimmt werden. Diese werden anschließend graphisch gegen die Dosierung des NC-Lacquers aufgetragen.

Zur Bestimmung der Proteinbindung an vollflächigen NCPHM (Abschnitt 6.1) werden die Fluoreszenzintensitäten entlang eines Linienprofils wie in Schema 3-2 dargestellt bestimmt.



Schema 3-2: Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten entlang vollflächig beschichteter NCPHM zur Bestimmung der proteinbindenden Eigenschaften und Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Positionsinformation auf den Proben.

Durch Platzierung von Linienprofilen entlang vollflächiger NCPHM, können die relativen Fluoreszenzintensitäten entlang der Probe ermittelt werden. Diese können graphisch gegen die Position auf dem Material aufgetragen werden. Dies führt zu einer Intensitätsverteilung entlang der Probe, welche in Korrelation zur gebundenen Proteinmenge steht.

3.2 Benetzungseigenschaften und mikrofluidische Charakterisierung

Bei der Entwicklung von Membranmaterialien für diagnostische Schnelltests, kommen Membranmaterialien in Kontakt mit Testflüssigkeiten. Die Testflüssigkeiten sollen von den Membranmaterialien in diagnostischen Assays transportiert werden.

Zur Ermittlung des Benetzungsverhaltens der Materialien mit Wasser, werden Kontaktwinkelmessungen eingesetzt. Diese Methode ermöglicht es durch Aufbringen eines Flüssigkeitstropfens auf Oberflächen die Wechselwirkung zwischen flüssiger Phase und Festkörper zu bestimmen. Eine Benetzbarkeit der Materialoberfläche muss gegeben sein, damit ein Fluidfluss im Material realisiert werden kann. Bei unzureichender Benetzbarkeit wird eine Beschichtung der Membranoberflächen mit Detergens nötig. Dies ist bei konventionellen NC-Membranen gängige Praxis und ist ebenfalls bei neuartigen Membranmaterialien eine Möglichkeit die Benetzbarkeit zu erhöhen. Zudem werden auf diesem Wege identische Bedingungen geschaffen, die eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Materialien ermöglichen.

Bei einer ausreichend guten Benetzbarkeit der Materialoberfläche, lässt sich ein Fluidfluss in den Materialien etablieren. Für die Charakterisierung von Membranen, spielt die kapillare Fließzeit (CFT) eine wichtige Rolle. Die CFT ist definiert, als die Zeit die benötigt wird eine definierte Strecke auf einem Membranmaterial zurückzulegen. Dabei wird lediglich der Endpunkt der Zeitmessung verwendet. Je niedriger die CFT ist, desto schneller ist der Fluidfluss in der Membran. Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, ist die Fließgeschwindigkeit entlang des Membranstreifens nicht gleichmäßig, sondern nimmt mit fortschreitender Distanz ab. Aufgrund einer Vielzahl an unterschiedlichen Membranmaterialien auf dem Markt, kann die passende

Membran mit den geeigneten Fließeigenschaften für die gewünschten Assays ausgesucht und verwendet werden. Der Messaufbau für die Bestimmung von kapillaren Fließzeiten ist in Abbildung 3-5 dargestellt.

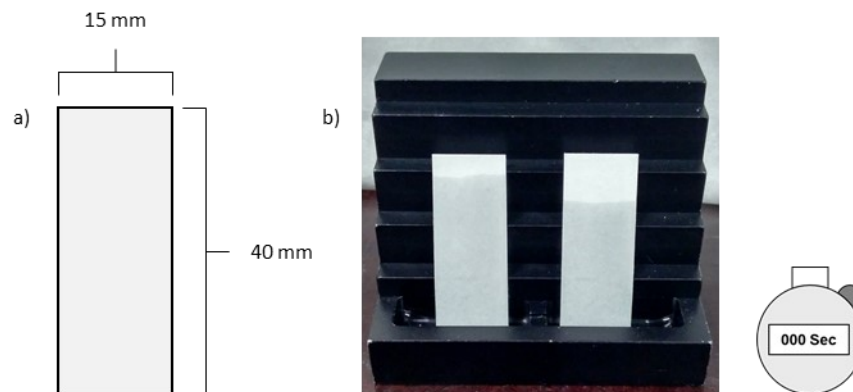


Abbildung 3-5: a) Dimensionen der getesteten Membranmaterialien. b) Ständer zur parallelen Durchführung zweier Messungen der kapillaren Fließzeiten.

Die kapillaren Fließzeiten sind abhängig von der Porenstruktur der Membranmaterialien. Zudem wird diese durch die Viskosität der Testflüssigkeit beeinflusst. Zur Charakterisierung der Membranmaterialien kommt häufig Milli-Q® Wasser zum Einsatz. In der tatsächlichen Anwendung von diagnostischen Assays besteht die Testflüssigkeit häufig aus (verdünnten) Körperflüssigkeiten wie Urin, Sputum, Serum, Schweiß oder Blut.^[19]

3.3 Diagnostische Assays zur Membrancharakterisierung

Neben der Herstellung und Charakterisierung von alternativen Membranmaterialien müssen diese in diagnostischen Assays getestet werden. Als Referenzmaterialien dienen konventionelle NC-Membranen und unbehandelte Baumwoll-Linters-Papiere. Da es eine Vielzahl an diagnostisch relevanten Assays gibt, wird sich in dieser Arbeit auf zwei verschiedene Anwendungen beschränkt.

Seit des ersten Schwangerschaftstest für den Heimgebrauch in den 1980er Jahren, wurden viele diagnostische *Lateral Flow Assays* auf den Markt gebracht.^[53] Die Anwendungsgebiete dieser Assays sind vielfältig und werden in der Diagnostik, Lebensmittelsicherheit, Umweltuntersuchungen, Veterinärmedizin, pharmazeutischer Analytik und Drogentests eingesetzt.^[53] Der am weitesten verbreiteten Schnelltest für den Heimgebrauch stellte vor 2020 der Schwangerschaftstest und Ovaluationstest dar. Diese Assays brachten es im Jahr 2005 zu Umsätzen von ungefähr 565 Millionen US Dollar, was ca. 87% des Marktanteils für Schnelltests zur Heimanwendung betrug.^[20] Aus diesem Grund zählt der Schwangerschaftstest (hCG-Assay) heute noch zu einem der wichtigsten Assays, weshalb dieser für die Qualitätskontrolle bei der Herstellung von Membranmaterialien immer wieder als Referenz verwendet wird. Der hCG-Assay wird deshalb auch in dieser Arbeit als *Referenz Assay* für die neuartigen Membranmaterialien verwendet.

Neben der Feststellung von Schwangerschaften finden *Lateral Flow Assays* Anwendung in der Früherkennung von Krankheiten. Dies sollte spätestens seit der SARS-CoV-2 Pandemie weltweit bekannt sein. Im Gegensatz zu SARS-CoV-2 tritt eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus in der Frühphase unbemerkt auf.^[119] Die Frühphase einer akuten Hepatitis-B Erkrankung ist schwierig festzustellen, da die Detektion der Krankheitsmarker häufig aufwändige Reagenzien und Geräte erfordert.^[119] Die Sensitivitäts- und Spezifitätsanforderungen an HBsAg-Assays (Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen) sind sehr hoch, sodass Stand 2023 nur zwei HBsAg-Assays von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) validiert und zugelassen wurden.^[120,121] Diese Assays erfüllen die regulatorischen Standards der Europäischen Union für die analytische Sensitivität von HBsAg und weist den internationalen HBsAg-Standard nach.^[122,123] Aufgrund der hohen Anforderungen für diesen Assay, wurde in dieser Arbeit der Schnelltest zur Früherkennung des Hepatitis-B-Oberflächenantigens (HBsAg) ausgewählt.

Die Durchführung aller Assays in dieser Arbeit sollen anhand etablierter Vorschriften durchgeführt werden, um eine Vergleichbarkeit zu Standardtestverfahren von Membranherstellern zu gewährleisten. Durch einen Austausch der konventionellen NC-Membranen durch alternative Membranmaterialien, wird die Eignung dieser Materialien für diagnostische Schnelltests geprüft.

4. Herstellung und Charakterisierung von NCPHM und CN-Papieren

Zur Herstellung neuartiger, alternativer Membranmaterialien, lassen sich verschiedene Herstellungsmethoden wählen. Durch Beschichtung von Baumwoll-Linters-Papieren mit *NC-Lacquer* können vollflächige NCPHM mittels Tauchbeschichtung (Abschnitt 4.1) und ortsdefinierte NCPHM mittels Liniendruckverfahren (Abschnitt 4.3.1) hergestellt werden. Die Herstellung dieser NCPHM ist detailliert in Abschnitt 0 beschrieben. Nachfolgend wird die bevorzugte Herstellungsmethode so wie die verschiedenen variierten Parameter in der Herstellungsweise diskutiert. Die Charakterisierung der trockenen vollflächigen NCPHM umfasst überwiegend die Morphologie der Materialien und Beschichtungsgewichte (Abschnitt 4.2). Bei den ortsdefinierten NCPHM wird zudem die erzielten Linienbreiten untersucht (Abschnitt 4.3). Die mikrofluidischen Eigenschaften der Materialien und die Eignung dieser als Membranmaterial für diagnostische Assays wird in Abschnitt 5.2, Abschnitt 6.2 und Abschnitt 6.3 untersucht.

4.1 Herstellung von vollflächig beschichteten NCPHM

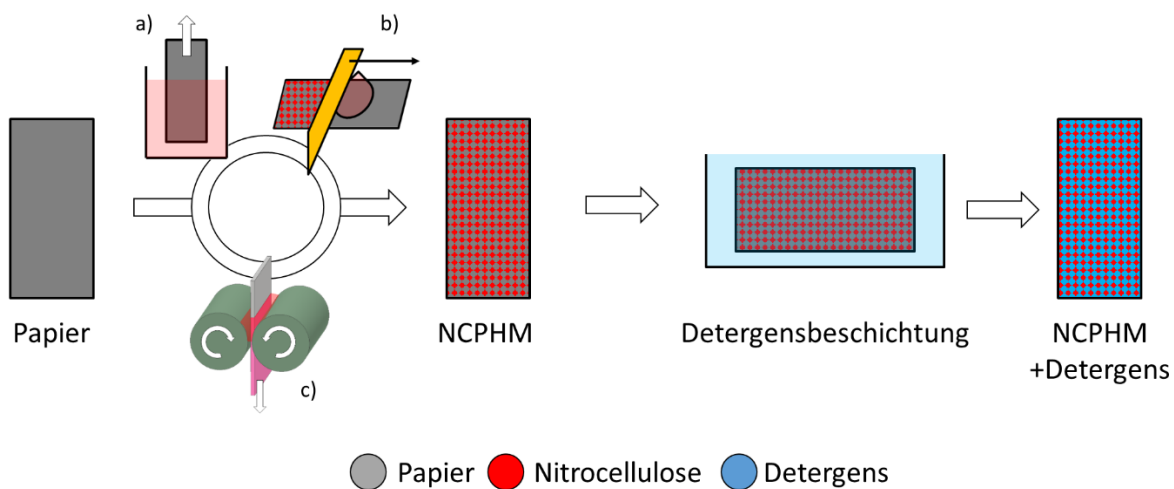
Für die Beschichtung und Veredelung von Papieren, gibt es mannigfaltige Beschichtungsverfahren. Diese sind sowohl im Labormaßstab, als auch großtechnisch etabliert. Bei der Beschichtung der Papiere spielt die Flüssigkeitsaufnahmefähigkeit des Papiers eine entscheidende Rolle über die finale Materialverteilung nach der Beschichtung.^[124]

Wird eine oberflächliche Beschichtung von Papieren angestrebt, muss ein Eindringen der Beschichtungslösungen in das Material verhindert werden. Dies kann beispielsweise durch ein vorheriges Beschichten von Papieren zur Hydrophobierung der Oberfläche geschehen. Eine Reduktion der Flüssigkeitspenetration lässt sich auch mechanisch durch Verschließen der porösen Oberfläche erzielen.^[125] Hierfür können Füllstoffe aufgebracht werden, die sich auf die Papieroberfläche legen und ein Eindringen von Flüssigkeiten reduzieren.^[126] Eine weitere mechanische Methode zur Verschließung der Poren ist die Kalandrierung, bei der die Faserzwischenräume durch Verpressen des Papiers zwischen Walzen verschlossen werden.^[127,128] Zu den häufigsten Vertretern für Methoden zur Oberflächenbeschichtungen zählen das Rakeln und das *Curtain Coating*.^[129,130] Bei diesen Verfahren werden Beschichtungen als dünner Film aufgetragen, wobei diese nur geringfügig in das Fasergefüge eindringen. Oberflächenbeschichtete Papiere finden u.a. Anwendung als Schreib- oder Grafikipapiere, oder auch als Verpackungsmaterialien.^[95,131]

Vollflächige bzw. imprägnierende Beschichtungen lassen sich durch die Verwendung von saugfähigen Papieren erzielen. Gewünscht ist dabei ein vollständiges Eindringen der Beschichtungslösungen in das Fasernetzwerk.^[132,133] Papiere die ohne spezielle Nachbehandlung hergestellt wurden sind in der Lage Beschichtungslösungen vollständig aufzunehmen. Durch Kapillarkräfte wird die Lösung in das Innere des Fasernetzwerks transportiert.^[100] Dabei spielt die Beschichtungsmethode eine untergeordnete Rolle, da der Flüssigkeitstransport zu jeder Zeit stattfindet. Die Beschichtungsmethode kann allerdings dazu beitragen, die im Fasernetzwerk deponierte Menge an Beschichtungslösung zu kontrollieren. Unterschiedliche Beschichtungsmethoden sind in Schema 4-1 dargestellt. Beim Aufbringen der Lösungen durch Rakeln (Schema 4-1 b), kann überschüssiges Material von der Papieroberfläche abgetragen werden, bzw. nur eine definierte Menge deponiert werden.^[134] Die Verwendung einer Leimpresse (Schema 4-1 c) ermöglicht es

durch den kontrollierbaren Anpressdruck und die Geschwindigkeit zweier Walzen die deponierte Menge an Beschichtung zu steuern. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sich sehr geringe Beschichtungsgewichte erzielen lassen.^[135] Neben den zuvor genannten Methoden kann auch eine Tauchbeschichtung (Schema 4-1 a) verwendet werden. Bei Tauchbeschichtungen wird das saugfähige Papier für eine definierte Zeit vollständig in die Beschichtungslösung eingetaucht. Das Auftragsgewicht der Beschichtung kann durch die Verweilzeit bzw. die Zuggeschwindigkeit des Papiers aus der Lösung heraus kontrolliert werden.^[136]

Die verschiedenen Beschichtungsmethoden und der schematische Ablauf der Herstellung von vollflächig beschichteten NCPHM sind in Schema 4-1 dargestellt.



Schema 4-1: Schematischer Ablauf der Herstellung von vollflächigen NCPHM. a) - c) Die Beschichtung der Papiere mit NC-Lacquer kann mit verschiedenen Beschichtungsmethoden (Tauchbeschichtung a), Rakeln b), Leimpresse c) realisiert werden. Die NCPHM werden mit Detergens beschichtet, um das Material für die Anwendung als in diagnostischen Assays einsetzbar zu machen.

Konventionellen NC-Membranen werden in der Regel mittels *Curtain Coating* auf einer nicht saugenden PET-Folie hergestellt.^[29] Der auf diesem Wege aufgebraute NC-Lacquer wird unter streng kontrollierten klimatischen Bedingungen getrocknet. Bei der Trocknung kommt es zur Ausbildung von Poren durch Mikrophasenseparation im NC-Lacquer.^[29]

Bei der Herstellung von NCPHM wird eine vollflächige und imprägnierende Beschichtung der Papiere angestrebt. Aus diesem Grund wurden Beschichtungsmethoden, welche klassischerweise für rein oberflächliche Beschichtungen (Rakeln, *Curtain Coating*) nicht angewendet. Wie zuvor beschrieben bietet die Beschichtung von Papieren mittels einer Leimpresse eine homogene, kontrollierbare und reproduzierbare Beschichtung. Diese ist ebenfalls großtechnisch realisierbar und skalierbar. In dieser Arbeit wurde die Tauchbeschichtung als reproduzierbares, kontrollierbares und anpassbares Beschichtungsverfahren für die Herstellung vollflächiger NCPHM gewählt.

Die Tauchbeschichtung kann in einer vollständig klimatisch kontrollierten Umgebung (T, RH) durchgeführt werden. Hierfür wurde ein Klimaschrank verwendet, in dem ein *Dip Coater* platziert wurde. Mit diesem konnten semiautomatisch reproduzierbare Beschichtungsprozesse

durchgeführt werden. Von konventionellen NC-Membranen ist bekannt, dass die Leistungsfähigkeit dieser im Hinblick auf kapillare Fließzeiten und der Sensitivität in diagnostischen Assays von der Porenstruktur der Membranen abhängig ist.^[29] In dieser Arbeit werden die unterschiedlichen Einflussfaktoren auf die Porenbildung bei der Beschichtung von Papieren mit NC-*Lacquer* untersucht. Als Beschichtungslösung (NC-*Lacquer*) wird sich dabei an gängigen Zusammensetzungen orientiert, wie sie bei konventionellen NC-Membranen zur Anwendung kommen. Zudem werden die Zusammensetzungen dieser in ihrem NC-Anteil variiert. Neben der Zusammensetzung des *Lacquers* werden ebenfalls Prozessparameter wie die Zuggeschwindigkeit im Beschichtungsprozess und die klimatischen Bedingungen (T, RH) variiert. Die hergestellten Materialien werden nachfolgend mit verschiedenen Methoden hinsichtlich ihrer Morphologie und den Beschichtungsgewichten charakterisiert. Nach einer Detergensbeschichtung werden die Materialien für mikrofluidische Untersuchungen (Abschnitt 5.3) verwendet und deren Eignung als alternatives Membranmaterial für diagnostische Schnelltests erprobt (Abschnitt 6.2).

4.2 Charakterisierung von konventionellen NC-Membranen und vollflächig beschichteten NCPHM

Die unter Variation verschiedener Parameter hergestellten NCPHM werden hinsichtlich ihrer Morphologie und den Beschichtungsgewichten charakterisiert. Bei der Tauchbeschichtung werden verschiedene NC-Anteile im *Lacquer* verwendet und die Ziehgeschwindigkeit variiert. Ebenfalls wird die Temperatur und relativen Luftfeuchtigkeit variiert und deren Einfluss auf die erhaltenen Materialien untersucht. Als Basispapiere kommen Baumwoll-Linters-Papiere mit Grammaturen von 50 g/m² und 75 g/m² zum Einsatz. Ferner werden die Hybridmaterialien mit konventionellen NC-Membranen verglichen.

Durch Variation verschiedener NC-Anteile im *Lacquer*, sollen bei der Applikation verschiedene Massenanteile NC auf das Papier übertragen werden. Es ist zu erwarten, dass mit steigendem NC-Gehalt auch die eingebrachte Menge NC zunehmen wird. Bei konventionellen NC-Membranen wird die Morphologie sowie die mikrofluidischen Eigenschaften vollständig von der NC bestimmt. Bei vollflächigen NCPHM ist zu erwarten, dass bei ausreichend hohen NC-Anteilen eine annähernd identische Morphologie erreicht werden kann, wie bei konventionellen NC-Membranen. Bei geringen NC-Anteilen auf den Papieren ist zu erwarten, dass diese zu einer Beschichtung der Faseroberflächen und Auskleidung der Makroporen des Fasergefüges führen, ohne die Papieroberfläche vollständig zu bedecken.

Bei unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten bei der Tauchbeschichtung ist anzunehmen, dass unterschiedliche Mengen NC-*Lacquer* auf die Papiere übertragen werden. Bei niedrigen Ziehgeschwindigkeiten ist zu erwarten, dass die Beschichtungsgewichte geringer ausfallen, als bei schnellen Ziehgeschwindigkeiten. Bei niedrigen Geschwindigkeiten sollte der *Lacquer* ausreichend schnell in das Vorratsgefäß fließen können, ohne auf dem Papiersubstrat einen größeren Flüssigkeitsfilm auszubilden. Bei schnellen Ziehgeschwindigkeiten sollte ein oberflächlicher Flüssigkeitsfilm auf dem Substrat zurückbleiben, welcher zu höheren Beschichtungsgewichten führen sollte. Ebenfalls ist anzunehmen, dass mit steigendem NC-Gehalt die zuvor beschriebenen Zusammenhänge in Kombination mit einer höheren Viskosität des *Lacquers* ebenfalls zu höheren Beschichtungsgewichten führen. Die Struktur der erhaltenen Hybridmaterialien sollte unabhängig der Ziehgeschwindigkeit sein. Es wird erwartet, dass die erhaltenen Strukturen im

Falle einer vollständigen Durchdringung des Papiers mit *Lacquer*, primär von der Zusammensetzung des *Lacquers* abhängig sind, und nicht zur aufgetragenen Menge. Durch das vollständige Eintauchen der Papiere in den *Lacquer* ist eine gleichmäßige und homogene Verteilung des *Lacquers* zu erwarten.

Die Variation von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit dient der Einschätzung von Prozessparametern bei der Herstellung. Eine höhere Temperatur während der Beschichtung sollte sich nur geringfügig auf die Beschichtungsgewichte der Papiere auswirken. Es ist anzunehmen, dass eine erhöhte Temperatur zu niedriger viskosen *Lacquern* führt, was zu einem Abnehmen der Beschichtungsgewichte führen sollte. Bei niedrigeren Temperaturen sollte die Viskosität des *Lacquers* höher sein, weshalb mehr *Lacquer* aufgebracht werden sollte. Da die Hybridmaterialien direkt nach der Beschichtung unter identischen klimatischen Bedingungen wie im Tauchprozess getrocknet wurden, wird erwartet, dass die Morphologie der NCPHM sich in Abhängigkeit der Temperatur ändern wird. Bei einer geringen Temperatur wird erwartet, dass sowohl Lösemittel als auch Nicht-Lösemittel des *Lacquers* langsamer verdunsten. Dies sollte dazu führen, dass es bei der Mikrophasenseparation des *Lacquers* zur Ausbildung von größeren Poren auf dem Material kommt, da vor allem das Nicht-Lösemittel langsamer verdunstet und damit als Porenbildner länger zur Verfügung steht. Aus diesem Grund kann erwartet werden, dass die erhaltene Morphologie sich durch ein gleichmäßigeres Porenbild und einer gleichmäßigeren Probenoberfläche auszeichnen. Bei höheren Temperaturen sollte es zu einer schnelleren Trocknung und Verdunstung der flüssigen Bestandteile kommen, was zu einer geringeren Porengröße und einer inhomogeneren Porenbildung führen sollte.

4.2.1 Morphologie konventioneller NC-Membranen und vollflächig beschichteter NCPHM

Anhand von REM-Mikrographen wird die Morphologie von konventionellen NC-Membranen und vollflächig beschichteten NCPHM untersucht. Die Aufnahmen der konventionellen NC-Membranen als Referenzen sind in Abbildung 4-1 dargestellt.

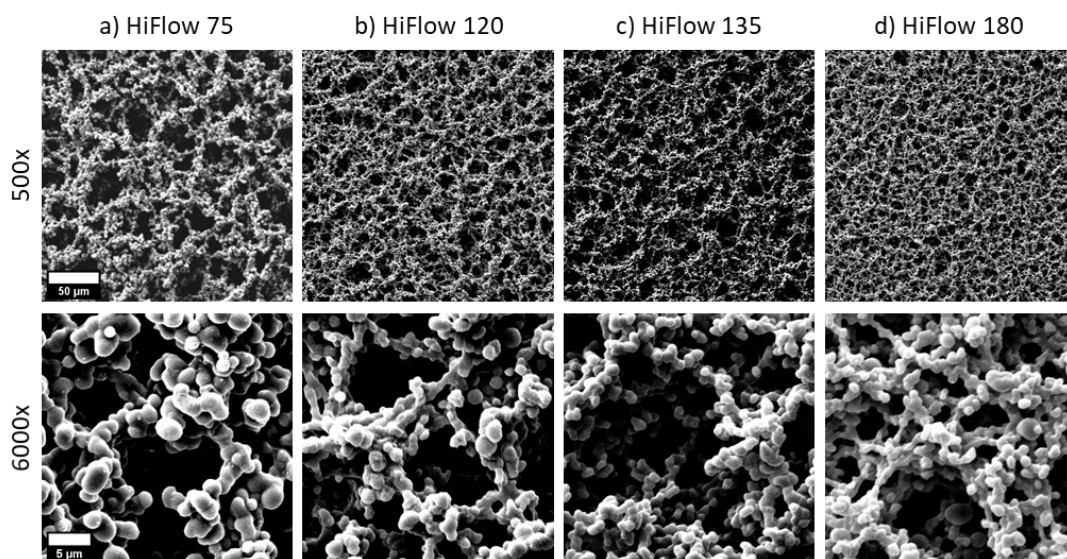


Abbildung 4-1: REM-Mikrographen von konventionellen NC-Membranen bei 500-facher und 6000-facher Vergrößerung. Der Skalierungsbalken für 500x entspricht 50 µm und ist gültig für die obere Reihe, die Skalierung der 6000-fachen Vergrößerung beträgt 5 µm. Dargestellt sind die Mikrographen der HiFlow 75, 120, 135 und 180 Membranen.

Die Morphologie der unterschiedlichen NC-Membranen zeigen vergleichbare Strukturen. Die Übersichtsaufnahmen (500-fach) zeigen eine gleichmäßige Verteilung der porösen NC über die gesamte Membranfläche. Es ist ebenfalls zu erkennen, dass von Abbildung 4-1 a) nach Abbildung 4-1 d) eine Änderung der Porenradien stattfindet. Bei der HiFlow 75 Membran a) sind große Radien zu erkennen, welche hin zur HiFlow 180 Membran (Abbildung 4-1 d) abnehmen. Dies ist ebenfalls in den Detailaufnahmen erkennbar. Neben den kleiner werdenden Porenradien ist auch eine Verringerung der Partikeldurchmesser zu beobachten. Kleiner werdende Partikel gehen einher mit kleiner werdenden Poren. Die Partikelgrößen der HiFlow Membranen sind in Abbildung 5-6 a) aufgetragen.

Zur Betrachtung der Morphologie von vollflächig beschichteten NCPHM wurden REM- und CLSM-Aufnahmen gemacht. Der Einfluss des NC-Anteils im *Lacquer* auf die Morphologie ist in Abbildung 4-2 dargestellt.

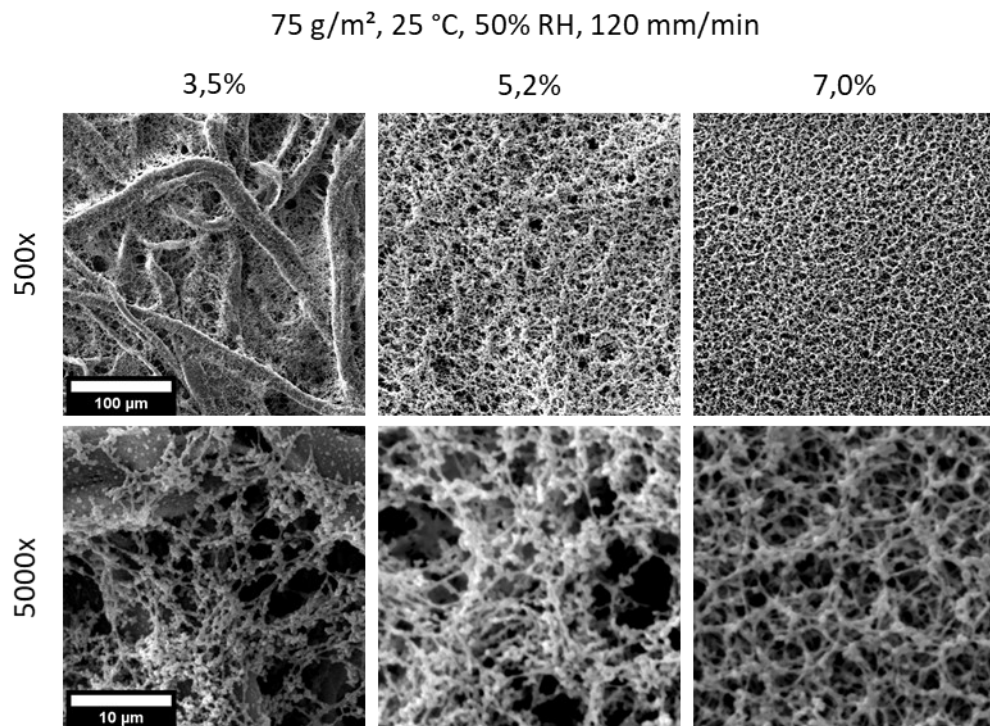


Abbildung 4-2: REM-Mikrographen von vollflächig beschichteten NCPHM, hergestellt auf 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren bei 25 °C und 50% RH bei einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min. Verwendet wurden *Lacquer* mit NC-Anteilen von 3,5%, 5,2% und 7,0% (w/w). Der Skalierungsbalken der 500-fachen Vergrößerung beträgt 100 μm, die Skalierung bei 5000-facher Vergrößerung entspricht 10 μm.

Die Verwendung von unterschiedlichen NC-Anteilen hat einen deutlich sichtbaren Einfluss auf die Morphologie von vollflächigen NCPHM. Die Übersichtsaufnahmen (500-fach) zeigen deutlich, dass bei einem NC-Anteil von 3,5% die ursprüngliche Struktur des Fasernetzwerks zu erkennen ist. Die Cellulosefasern sind mit poröser NC überzogen. Eine vollständige Bedeckung der gesamten Papieroberfläche wird bei diesem Anteil nicht beobachtet. Die Mikrostruktur der NC in den Detailaufnahmen (5000-fach) ähnelt der Struktur von konventionellen NC-Membranen. NC-Partikel bilden ein poröses Netzwerk, welches im Vergleich zu den höheren NC-Anteilen größere Porenradien bildet. Die Faseroberflächen werden nicht vollständig von poröser NC

umgeben. Bei einer Erhöhung des NC-Anteils auf 5,2% wird die Papieroberfläche komplett von poröser NC überzogen. Die Faserstruktur ist nicht mehr zu erkennen. Die auf diesem Wege erhaltene Hybridoberfläche ist nicht vollständig plan und weist Unebenheiten auf, welche durch die darunterliegenden Fasern verursacht werden. Die Mikrostruktur in der Detailaufnahme unterscheidet sich im Vergleich zum niedrigeren NC-Anteil nur in den Porenradien. Diese sind beim NC-Anteil von 5,2% kleiner, als beim Anteil von 3,5%. Der höhere NC-Anteil sorgt für eine größere Füllung der Makroporen des Basispapiers. Bei einer weiteren Erhöhung des NC-Anteils im *Lacquer* auf 7,0% ist ebenfalls eine vollständige Bedeckung der Papieroberfläche mit poröser NC zu erkennen. Die Porenradien sind im Vergleich zu den niedrigeren NC-Anteilen kleiner und die erhaltene Oberfläche ist plan ohne Unebenheiten. Die Mikrostruktur in der Detailaufnahme unterscheidet sich nur geringfügig im Bezug auf die Porenradien von der mit 5,2% NC im *Lacquer* hergestellten Probe. Diese sind bei einem NC-Anteil von 7,0% geringer. Neben der Betrachtung der Probenoberfläche, wird in Abbildung 4-3 die Verteilung der NC innerhalb des Hybridmaterials untersucht.

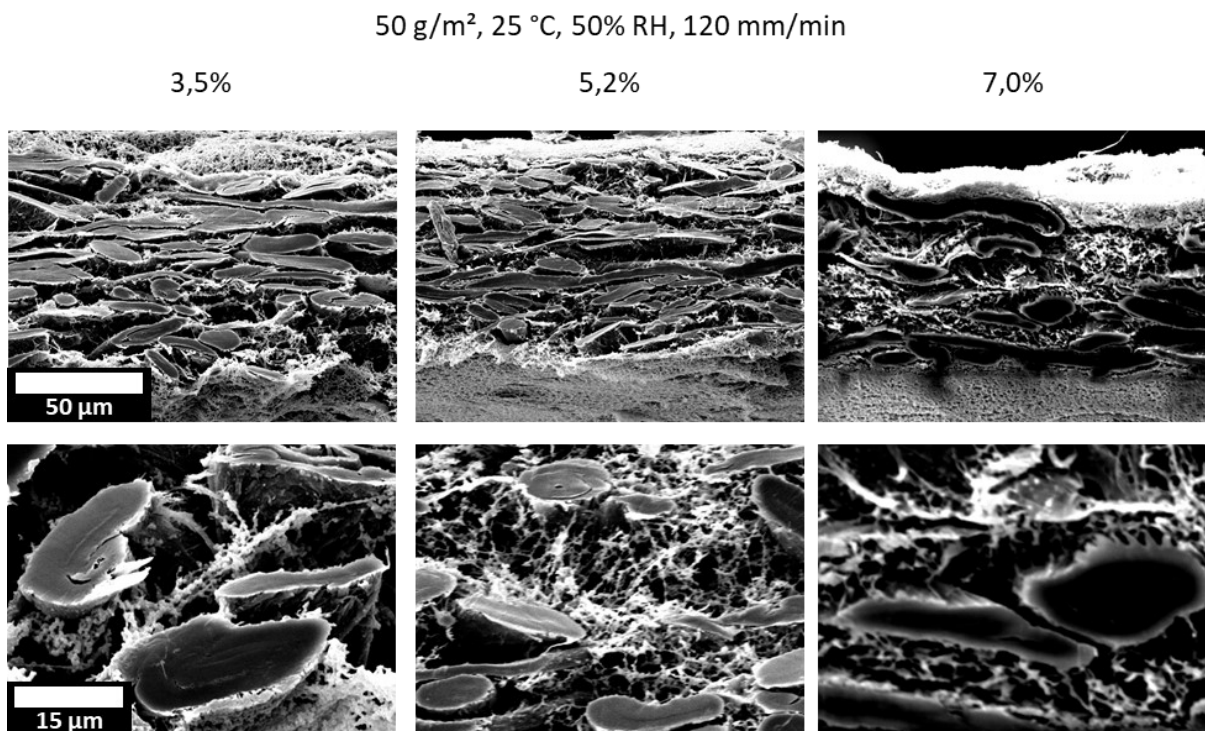


Abbildung 4-3: REM-Querschnittsaufnahmen von vollflächig beschichteten NCPHM hergestellt auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papier bei 25 °C und 50% RH bei einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min. Verwendet wurden *Lacquer* mit NC-Anteilen von 3,5%, 5,2% und 7,0% (w/w). Die Skalierungen sind jeweils für die dargestellte Reihe gültig.

Die Verteilung der NC innerhalb der Papiersubstrate und deren Morphologie wird anhand Querschnittsaufnahmen (Abbildung 4-3) betrachtet. Bei der Probenpräparation kommt es zu einer deutlichen Kompression der Hybridmaterialien entlang der Probendicke. Dies ist besonders bei der Übersichtsaufnahme des NCPHM mit einem NC-Anteil von 5,2% zu erkennen. Die Übersichtsaufnahmen aller Hybridmaterialien zeigen, dass beide Außenseiten der Hybride mit poröser NC überzogen sind. Wie auch zuvor zu erkennen (Abbildung 4-2) ist bei einem NC-Anteil

von 3,5% noch die Faserstruktur der Basispapiers oberflächlich erkennbar. Bei 5,2% ist die Papieroberfläche deutlich deckender mit NC beschichtet, wobei noch Unebenheiten aufgrund des Fasernetzwerks erkennbar sind, welche bei einem NC-Anteil von 7,0% nicht mehr sichtbar sind. Die NC-Verteilung innerhalb des Materials ist am deutlichsten anhand der Detailaufnahmen zu erkennen. Bei einem NC-Anteil von 3,5% ist in den Makroporen des Papiers poröse NC erkennbar. Diese ist Großteils an den Faseroberflächen lokalisiert. In einigen Fällen ist eine Abscheidung poröser NC auch innerhalb der Makroporen erkennbar, welche allerdings nicht vollständig ausgefüllt werden. Dies führt zu größeren Porenradien innerhalb des Materials. Bei einem NC-Anteil von 5,2% kann deutlich die Bildung eines porösen Netzwerks innerhalb der Makroporen des Papiers beobachtet werden. Diese werden nahezu vollständig ausgefüllt. Bei einer weiteren Erhöhung des NC-Anteils im *Lacquer* auf 7,0% sind die Makroporen ebenfalls vollständig mit poröser NC gefüllt. Die Porenradien sind allerdings kleiner, als bei den niedrigeren NC-Anteilen.

Um die Materialverteilung im Inneren der Hybridmaterialien ohne Präparationsartefakte beurteilen zu können, wurden CLSM-Aufnahmen angefertigt. Diese sind in Abbildung 4-4 dargestellt.

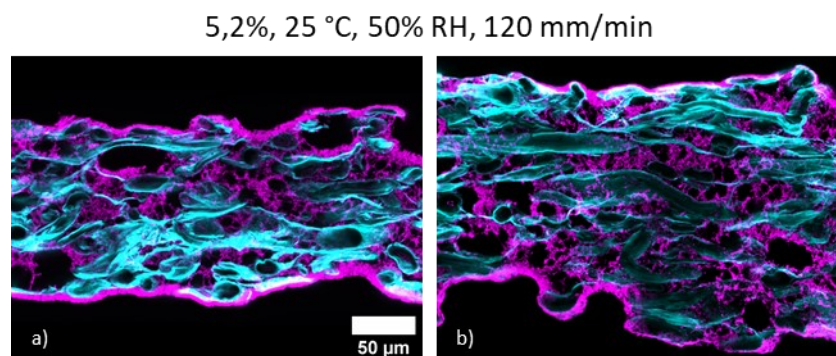


Abbildung 4-4: CLSM-Querschnittsaufnahmen (Maximalprojektionen) von vollflächigen NCPHM hergestellt mittels Tauchbeschichtung bei 25 °C und 50% RH bei einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min. Verwendet wurde ein *Lacquer* mit 5,2% (w/w) NC-Gehalt. Es wurden Basispapiere mit a) 50 g/m² und b) 75 g/m² verwendet. Der Skalierungsbalken in a) ist gültig für beide Aufnahmen und entspricht 50 µm. Die Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgebrachte NC-*Lacquer* in Magenta (Rhodamin B).

Aufgrund der in Abschnitt 8.11 beschriebenen Probenpräparation für die CLSM-Aufnahmen sind keine Präparationsartefakte zu erwarten. Die Papierfasern werden vor der NC-Beschichtung mit Calcofluor White M2R angefärbt, dieses bindet unspezifisch an Cellulose.^[115] Der NC-*Lacquer* wird mit einer geringen Menge Rhodamin B versetzt, welches diesen einfärbt, aber nicht spezifisch an NC bindet. Für die Querschnittsaufnahmen werden die NCPHM in Harz eingebettet und mittels eines Mikrotoms geschnitten. Durch das Einbetten werden die Hohlräume im Material gefüllt, sodass beim Schneiden die Porenstruktur erhalten und unbeschädigt bleibt. Die Querschnitte zeigen NCPHM hergestellt mit einem NC-Anteil von 5,2% im *Lacquer* unter Verwendung von a) 50 g/m² und b) 75 g/m² Papieren. In beiden Fällen ist deutlich zu erkennen, dass beide Oberflächen des Papiers mit einer porösen NC-Schicht überzogen sind. Die Hybridoberflächen weisen aufgrund des darunterliegenden Fasernetzwerks eine gewisse Rauigkeit auf. Im Inneren der Hybridmaterialien ist eine deutliche Ausprägung von porösen Strukturen in den Makroporen erkennbar. In einigen Bereichen scheinen die Makroporen eine Größe aufzuweisen, welche nicht vollständig durch NC gefüllt werden können.

Neben den NC-Anteilen im *Lacquer*, wurde auch der Einfluss von Herstellungsparametern wie die Ziehgeschwindigkeit bei der Materialherstellung auf die Morphologie untersucht. Die REM-Mikrographen dazu sind in Abbildung 4-5 gezeigt.

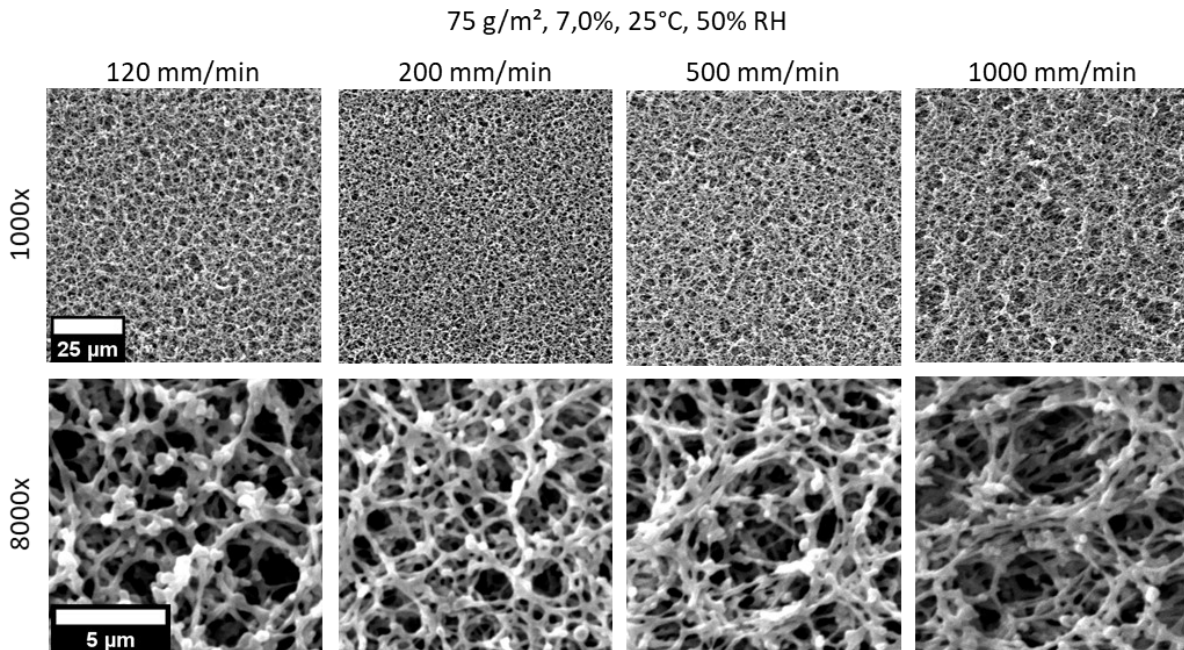


Abbildung 4-5: REM-Mikrographen zur Untersuchung des Einflusses der Ziehgeschwindigkeit auf die Morphologie mittels Tauchbeschichtung hergestellter vollflächiger NCPHM. Die Hybride wurden auf 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren bei 25 °C, 50% RH mit einem NC-Anteil von 7,0% (w/w) im *Lacquer* hergestellt. Der Skalierungsbalken der 1000-fachen Vergrößerung beträgt 25 µm und der Skalierungsbalken der 8000-fachen Vergrößerung entspricht 5 µm.

Eine Betrachtung der verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten bei der Herstellung von NCPHM mit einem NC-Anteil von 7,0% im *Lacquer* auf 75 g/m² Papieren zeigt, dass die Oberflächenstrukturen aller Ziehgeschwindigkeiten sich ähneln. Anhand den Übersichtsaufnahmen ist zu erkennen, dass die Hybridoberflächen vollständig mit poröser NC bedeckt sind. Die Detailaufnahmen (8.000-fach) zeigen, dass von 200 mm/min bis 1000 mm/min die Porengrößen des Hybridmaterials zunehmen. Bei 120 mm/min sind diese scheinbar vergleichbar groß, wie bei einer Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min. Die REM-Mikrographen der Variation der Ziehgeschwindigkeit von 50g/m² Papieren mit 7,0% NC-Anteil im *Lacquer* sind aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit zu den 75 g/m² Papieren im Anhang (Seite 183) dargestellt.

Deutlich größer ist der Einfluss der Ziehgeschwindigkeit auf die Morphologie bei der Verwendung eines *Lacquers* mit einem NC-Anteil von 3,5%. Die REM-Mikrographen hierzu sind in Abbildung 4-6 gezeigt.

75 g/m², 3,5%, 25 °C, 50% RH

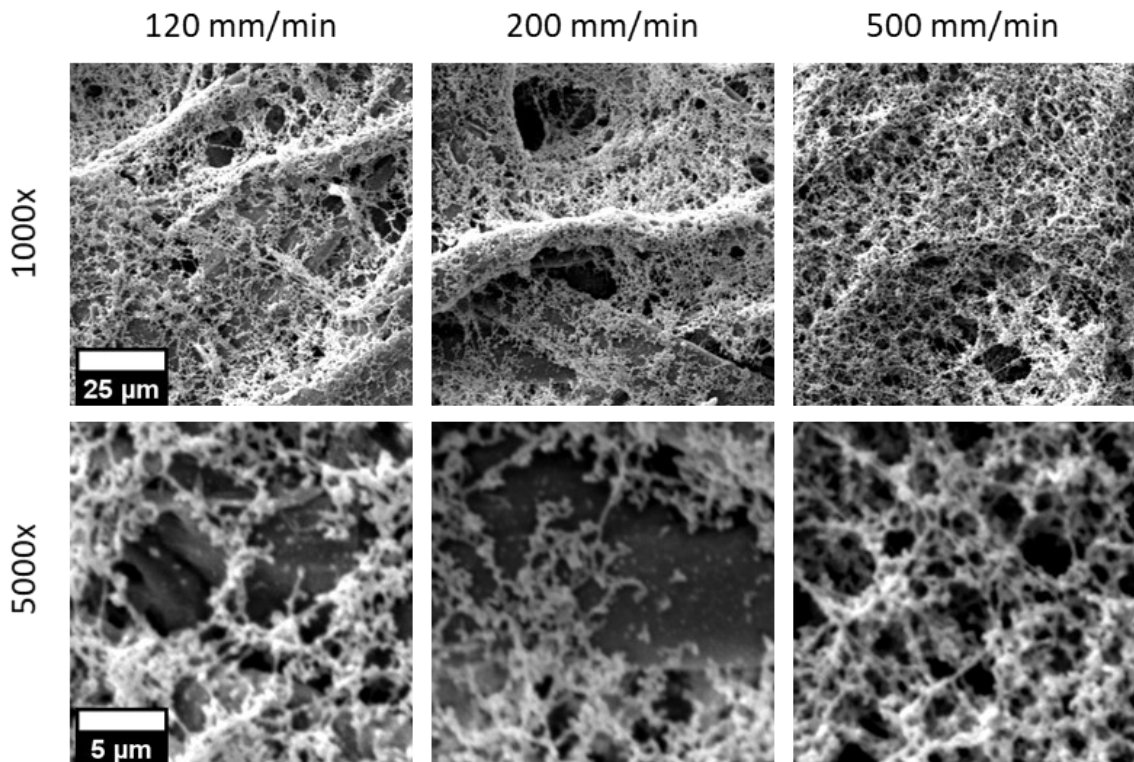


Abbildung 4-6: REM-Mikrographen von flächig beschichteten NCPHM hergestellt auf 75 g/m² Papieren mit einem NC-Anteil von 3,5% (w/w) im *Lacquer* bei 25 °C, 50% RH und variierenden Ziehgeschwindigkeiten von 120 mm/min, 200 mm/min und 500 mm/min. Der Skalierungsbalken der 1000-fachen Vergrößerung beträgt 25 μm und der Skalierungsbalken der 5000-fachen Vergrößerung entspricht 5 μm.

Bei der Verwendung eines geringeren NC-Anteils von 3,5% im *Lacquer* ist ein deutlicher Einfluss der Ziehgeschwindigkeit auf die Morphologie der Hybridmaterialien zu erkennen. Anhand der Übersichtsaufnahmen ist zu sehen, dass keine vollständige Bedeckung der Oberfläche bei Geschwindigkeiten von 120 mm/min und 200 mm/min erreicht wird. Dies spiegelt sich ebenfalls in den Detailaufnahmen dieser beiden Ziehgeschwindigkeiten wieder. Es sind in beiden Fällen noch Faseroberflächen sichtbar. Bei der Erhöhung der Ziehgeschwindigkeit auf 500 mm/min wird eine vollständig bedeckte Hybridoberfläche erhalten. Die darunterliegenden Papierfasern sind vollständig bedeckt, aber aufgrund der Unebenheit der Materialoberfläche zu erahnen. Die höhere Oberflächenabdeckung bei größeren Ziehgeschwindigkeiten lässt sich vermutlich durch ein langsames Abfließen des *Lacquers* im Vergleich zur niedrigeren Ziehgeschwindigkeit bei der Herstellung erklären. Dies lässt sich anhand der Bestimmung der Beschichtungsgewichte in Abschnitt 4.2.2 überprüfen.

Als weiterer Produktionsparameter wird der Einfluss der Temperatur bei der Herstellung und Trocknung der Materialien untersucht. Die REM-Mikrographen dazu sind in Abbildung 4-7 illustriert.

50 g/m², 3,5% NC, 50% RH, 120 mm/min

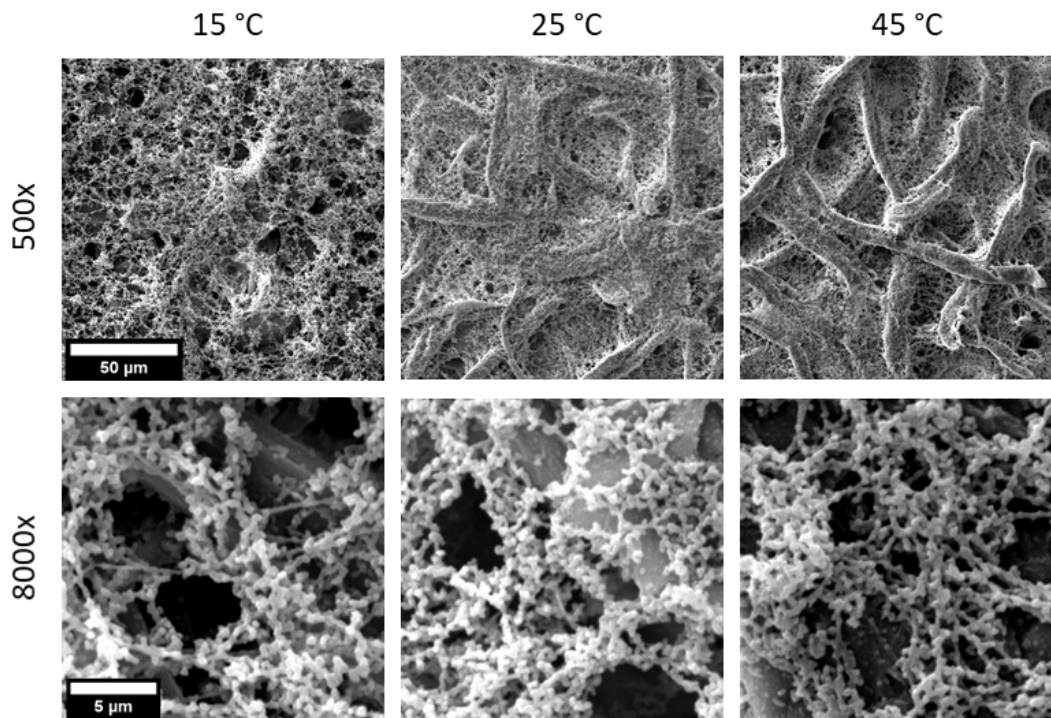


Abbildung 4-7: REM-Mikrographen zur Untersuchung des Temperatureinflusses bei der Herstellung von vollflächig beschichteten NCPHM mittels Tauchbeschichtung. Die Materialien wurden auf 50 g/m² Papieren unter Verwendung eines *Lacquers* mit 3,5% (w/w) NC-Anteil und einer Luftfeuchtigkeit von 50% RH hergestellt. Die Temperatur bei der Herstellung wurde zwischen 15 °C, 25 °C und 45 °C variiert. Die Skalierung der 500-fachen Vergrößerung beträgt 50 µm, die der 8000-fachen Vergrößerung 5 µm.

Anhand der REM-Mikrographen kann ein deutlicher Einfluss der Herstellungs- und Trocknungstemperatur auf die ausgebildeten Strukturen der NCPHM festgestellt werden. Bei niedrigen Temperaturen (15 °C) wird eine vollständige Oberflächenabdeckung durch die aufgebrauchte NC erhalten. Das ursprüngliche Fasernetzwerk ist nicht mehr zu erkennen. Die porösen Strukturen zeigen relativ große Porenradien. Die Oberflächenabdeckung könnte durch ein höheres Auftragsgewicht durch eine geringere temperaturbedingte Viskosität des *Lacquers* im Vergleich zu höheren Temperaturen erklärt werden. Zudem ist zu erwarten, dass bei niedrigeren Temperaturen die Ausbildung größerer Porenradien durch ein langsames Verdunsten der flüssigen Bestandteile begünstigt wird. Bei einer Erhöhung der Temperatur wird die Faserstruktur des Basispapiers deutlich sichtbar. Die Papieroberfläche ist mit NC überzogen, allerdings mit einer vergleichbar dünneren Schicht. Bei einer weiteren Temperaturerhöhung lässt sich dies noch deutlicher beobachten. Die Faserstruktur ist prägnanter zu erkennen, wobei die NC tiefer zwischen den Fasern lokalisiert zu sein scheint, als auf der Papieroberfläche. Dies könnte durch ein geringeres Beschichtungsgewicht aufgrund einer niedrigeren Viskosität der NC-*Lacquer* bei höheren Temperaturen erklärt werden. Ebenfalls kann auch eine schnellere Trocknung zu geringeren Porendurchmessern führen, welche sich in den Aufnahmen durch eine geringere Oberflächenabdeckung auszeichnen könnten.

Neben dem Temperatureinfluss auf die Porenbildung wurde der Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit bei der Herstellung und Trocknung der Hybridmaterialien betrachtet. Die hierfür angefertigten REM-Mikrographen sind in Abbildung 4-8 gezeigt.

75 g/m², 3,5%, 25 °C, 120 mm/min

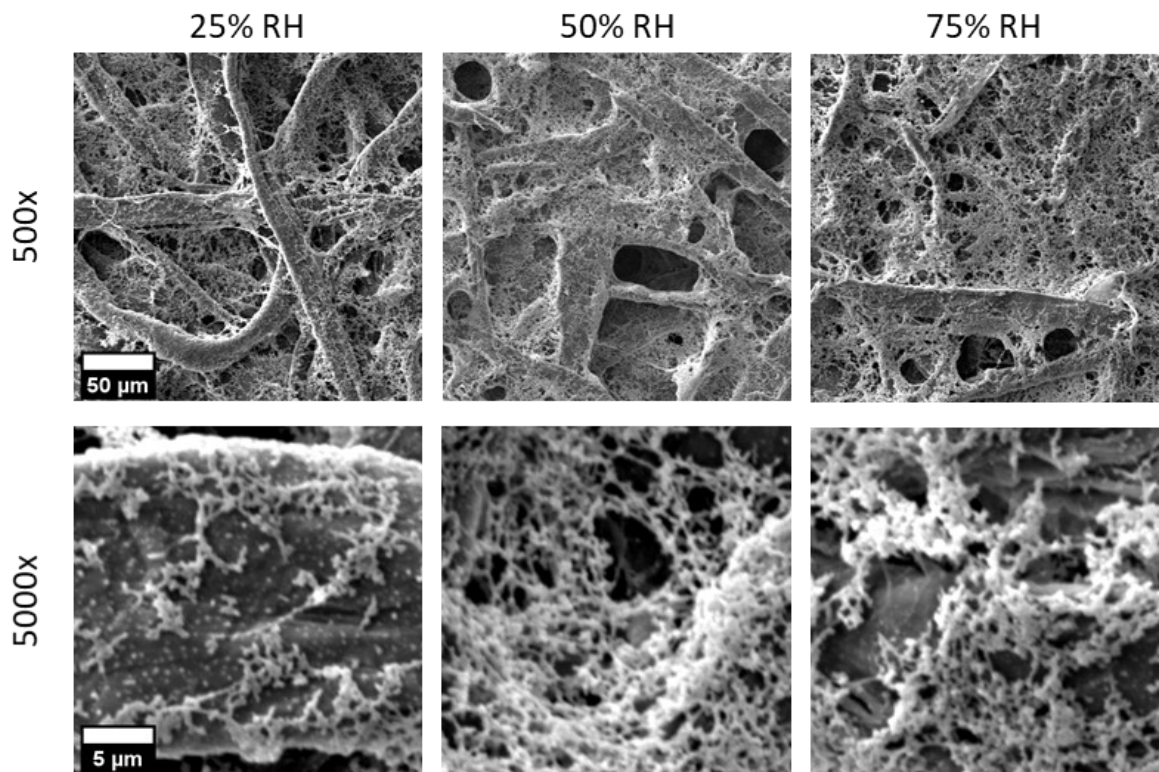


Abbildung 4-8: REM-Mikrographen von vollflächig beschichteten NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung von 75 g/m² Papieren mit einem *Lacquer* mit 3,5% NC-Anteil bei einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min und 25°C. Variiert wurde die Luftfeuchtigkeit im Bereich von 25% RH, 50% RH und 75% RH. Der Skalierungsbalken der 500-fachen Vergrößerung entspricht 50 μm und der Skalierungsbalken der 5000-fachen Vergrößerung entspricht 5 μm.

Bei der Verwendung eines *Lacquers* mit einem NC-Anteil von 3,5%, zeigt sich ein Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf die Porenbildung auf den Hybridmaterialien. Unter Annahme, dass die Luftfeuchtigkeit keinen Einfluss auf die aufgebrauchte *Lacquer* Menge hat, könnten die Änderungen der Morphologie anhand der Verdunstung des Wasseranteils bei der Trocknung erklärt werden. Bei einer niedrigen Luftfeuchtigkeit (25%) sollte die Verdunstung des Wasseranteils schneller sein, als bei einer höheren Luftfeuchtigkeit. Eine schnelle Verdunstung würde zu einer geringeren Porengröße führen, da das Nicht-Lösemittel (Wasser) schneller entfernt wird. Dies ist bei 25% Luftfeuchtigkeit zu beobachten. Bei 50% Luftfeuchtigkeit ist eine großflächigere Abdeckung der Papieroberfläche mit poröser NC zu beobachten, was für die Ausbildung von größeren Porenradien spricht. Bei einer deutlich höheren Luftfeuchtigkeit von 75% wird eine Zunahme der Oberflächenabdeckung mit größeren Poren erkennbar. Dies könnte durch eine verlangsamte Verdunstung von Wasser aus dem *Lacquer* und damit durch Bildung von größeren Poren erklärbar sein. Zusätzlich wurde der Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf die Porenbildung für *Lacquer* mit einem NC-Anteil von 5,2% untersucht. Dies ist in Abbildung 4-9 dargestellt.

75 g/m², 5,2%, 25 °C, 120 mm/min

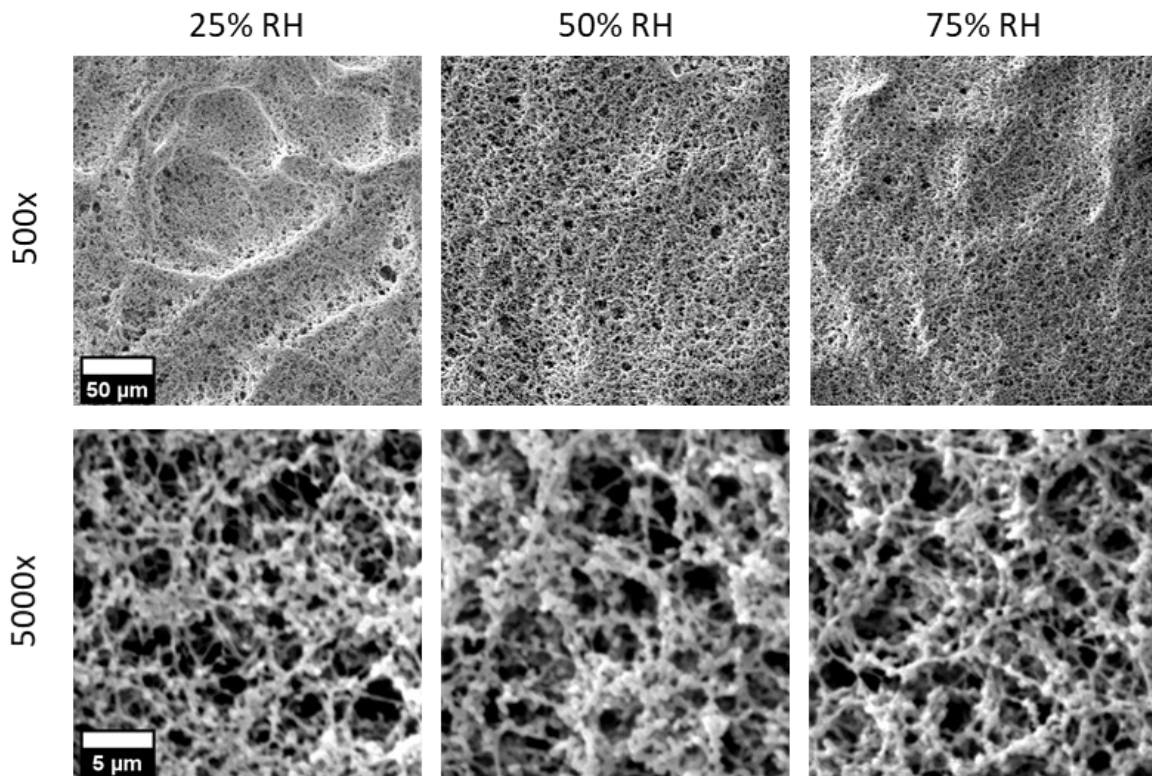


Abbildung 4-9: REM-Mikrographen von vollflächig beschichteten NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung von 75 g/m² Papieren mit einem *Lacquer* mit 5,2% NC-Anteil bei einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min und 25°C. Variiert wurde die Luftfeuchtigkeit im Bereich von 25% RH, 50% RH und 75% RH. Der Skalierungsbalken der 500-fachen Vergrößerung entspricht 50 μm und der Skalierungsbalken der 5000-fachen Vergrößerung beträgt 5 μm.

Bei Verwendung des *Lacquers* mit einem NC-Anteil von 5,2% lassen sich die zuvor beobachteten Phänomene erneut beobachten. Bei niedrigerer Luftfeuchtigkeit ist eine geringere Oberflächenabdeckung bei geringeren Porengrößen zu erkennen. Bei steigender Oberflächenabdeckung nimmt die Porengröße sowie die Bedeckung der Hybridoberfläche zu. Dies stützt die zuvor getätigte Hypothese, dass die Verdunstung von Wasser als Nicht-Lösemittel einen Einfluss auf die Ausbildung verschiedener Porengrößen hat. Ein geringerer Wasseranteil (25% RH) führt zur Ausbildung geringerer Porengrößen, als größere Wasseranteile (75% RH).

Neben der rein morphologischen Betrachtung der Materialien wurden die mikrofluidischen Eigenschaften der Materialien charakterisiert (Abschnitt 8.6). Aufgrund dieser wurde eine Kombination verschiedener Herstellungsparameter gewählt, um die kapillaren Fließzeiten anzupassen. Auf die Morphologie dieser Materialien wird nachfolgend eingegangen. Gewählt wurde die Herstellung von vollflächigen NCPHM auf 50 g/m² und 75 g/m² Papieren bei 25 °C, 75% RH, einer Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min und NC-Anteilen von 3,5% und 5,2% im *Lacquer*. Die REM-Mikrographen aus dem kombinierten Ansatz sind in Abbildung 4-10 dargestellt.

25 °C, 75% RH, 500 mm/min

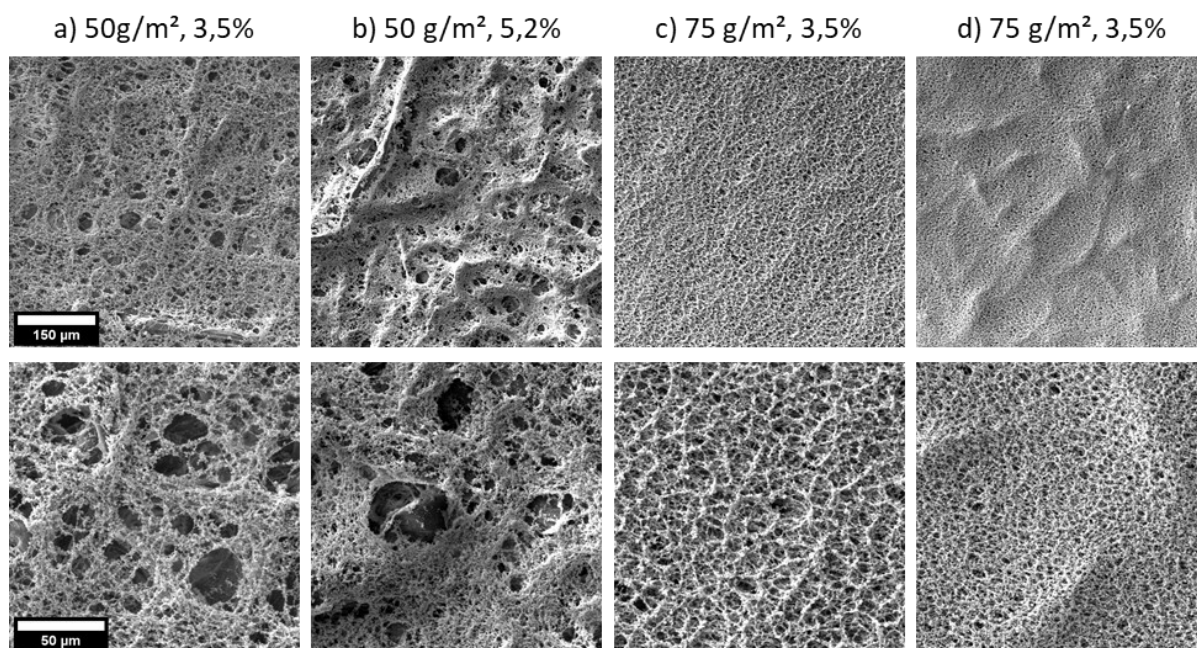


Abbildung 4-10: REM-Mikrographen zur Untersuchung der Morphologie von vollflächig beschichteten NCPHM, hergestellt durch Tauchbeschichtung. Die Hybridmaterialien wurden alle mit einer Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min, einer Temperatur von 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 75% RH hergestellt. Als Papiere wurden a), b) 50 g/m² und c), d) 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papiere verwendet. Die NC-Anteile im *Lacquer* waren a), c) 3,5% und b), d) 5,2%. Die Skalierungsbalken der niedrigeren Vergrößerung sind 150 µm, die höher vergrößerten Aufnahmen haben einen Skalierungsbalken von 50 µm.

Im Rahmen des kombinierten Ansatzes zur Herstellung verschiedener vollflächiger NCPHM werden bei Verwendung von *Lacquern* mit einem NC-Anteil von 5,2% (Abbildung 4-10 b, d) Hybridmaterialien mit vollständiger Oberflächenabdeckung erhalten. Bei der Verwendung von 50 g/m² Papieren ist dabei die Struktur der Faser Oberfläche nicht mehr erkennbar, da der NC-Anteil ausreichend hoch ist um das Material vollständig zu überdecken. Die Detailaufnahme (Abbildung 4-10) zeigt, dass die erhaltenen Porengrößen größer sind, als beim 75 g/m² Papier (Abbildung 4-10 d). Bei 75 g/m² Papieren ist die Materialoberfläche deutlich unebener aufgrund des darunterliegenden Fasernetzwerks. Die Porengrößen sind kleiner als bei der Verwendung des Papiers mit der niedrigeren Grammatur. Wird ein *Lacquer* mit einem Anteil von 3,5% zur Beschichtung verwendet a), c), so kann eine deutlich offenerporigere Morphologie des Hybridmaterials erhalten werden. Auf den Hybriden, welche aus 50 g/m² Papieren hergestellt wurden (Abbildung 4-10 a) ist die Faserstruktur des Basispapiers kaum zu erkennen, das Papier ist mit poröser NC mit einer großen Porengröße überzogen. Bei Verwendung von 75 g/m² Papieren (Abbildung 4-10 c) sind die Poren ebenfalls größer, allerdings ist die Oberfläche des Materials unebener als bei der niedrigeren Grammatur.

Anhand von mikroskopischen Aufnahmen (REM und CLSM) wurde die NC-Verteilung und die Morphologie von vollflächig beschichteten NCPHM betrachtet. Bei der Tauchbeschichtung dringt der NC-*Lacquer* vollständig in die verwendeten Papiere ein. Dies führt zu einer gänzlichen Verteilung der NC auf der Paperoberfläche und in den Makroporen der Papiere (Abbildung 4-3). Mit einem steigenden NC-Anteil im *Lacquer* ist eine zunehmende Bedeckung der Faser Oberfläche mit NC zu beobachten (Abbildung 4-2). Dies geht einher mit einer Reduktion

der erhaltenen Porengrößen und kann zudem in Querschnittsaufnahmen beobachtet werden (Abbildung 4-3 und Abbildung 4-4). Eine zunehmende Oberflächenbedeckung der Hybridmaterialien wird auch bei der Variation der Ziehgeschwindigkeiten erhalten (Abbildung 4-5 und Abbildung 4-6). Dies ist vor allem bei der Verwendung von *Lacquern* mit einem NC-Anteil von 3,5% zu beobachten. Bei der Herstellung der Materialien durch Tauchbeschichtung war zu erwarten, dass bei höheren Ziehgeschwindigkeiten ein *Lacquer* Film auf der Papieroberfläche zurückbleibt und für einen höheren Auftrag des *Lacquers* führt. Bei niedrigen Ziehgeschwindigkeiten kann der *Lacquer* ausreichend schnell in das mit *Lacquer* gefüllte Vorratsgefäß zurückfließen. Der Einfluss klimatischer Herstellungsparameter wie die Herstellungs- und Trocknungstemperatur (Abbildung 4-7) als auch der relativen Luftfeuchtigkeit (Abbildung 4-8) wurde betrachtet. Bei der Betrachtung des Temperatureinflusses auf die Porenbildung kommen zwei Punkte zum Tragen. Die Temperaturänderung bei der Beschichtung führt zu einer Änderung der *Lacquer* Viskosität. Bei niedrigen Temperaturen steigt diese an, was zu einem größeren Auftrag an *Lacquer* auf dem Papier führt, wohin gegen die aufgebrachte Menge des *Lacquers* bei höheren Temperaturen geringer ausfällt. Des Weiteren begünstigt eine niedrigere Temperatur ein langsames Verdunsten der flüssigen Bestandteile im *Lacquer*, was zu einer Ausbildung von größeren Poren führt. Bei erhöhten Temperaturen fallen die Porengrößen geringer aus. Der Einfluss der Verdunstung der flüssigen Bestandteile kann auch bei der Betrachtung der relativen Luftfeuchtigkeit beobachtet werden (Abbildung 4-8). Eine niedrige Luftfeuchtigkeit begünstigt eine schnellere Trocknung des *Lacquers* auf dem Papier. Dies führt zur Ausbildung von kleineren Poren. Beim Erhöhen der Luftfeuchtigkeit kann beobachtet werden, wie die Porengrößen sichtbar zunehmen und damit verbunden die Oberflächenabdeckung durch poröse NC ebenfalls zunimmt. Der kombinierte Ansatz durch Variation von Herstellungsparametern (Abbildung 4-10) zeigt, dass sich gezielt die Oberflächenmorphologie der vollflächigen NCPHM bei der Tauchbeschichtung einstellen lässt.

Die durch Tauchbeschichtung erhaltenen NCPHM weisen im Vergleich zu konventionellen NC-Membranen (Abbildung 4-1) deutlich geringere Porengrößen auf. Durch Anpassung der Herstellungsparameter können NCPHM hergestellt werden, die ebenfalls vollflächig mit poröser NC überzogen sind, sodass die Oberfläche denen von konventionellen Membranen sehr nahekommt. Bevorzugt wird für die Herstellung der Materialien ein *Lacquer* mit einem NC-Anteil von 3,5%, eine Temperatur von 25 °C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 75% RH und eine Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min verwendet.

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Beschichtungsgewichte der NCPHM mit dem NC-Anteil von konventionellen Membranen verglichen. Eine Charakterisierung der mikrofluidischen Eigenschaften von vollflächig beschichteten NCPHM ist in Abschnitt 5.3 thematisiert.

4.2.2 Beschichtungsgewichte vollflächiger NCPHM

Wie in Abschnitt 8.4 beschrieben, wurden die Beschichtungsgewichte von vollflächigen NCPHM und konventionellen NC-Membranen ermittelt. Die Beschichtungsgewichte in Abhängigkeit des NC-Anteils im *Lacquer* sind in Abbildung 4-11 dargestellt.

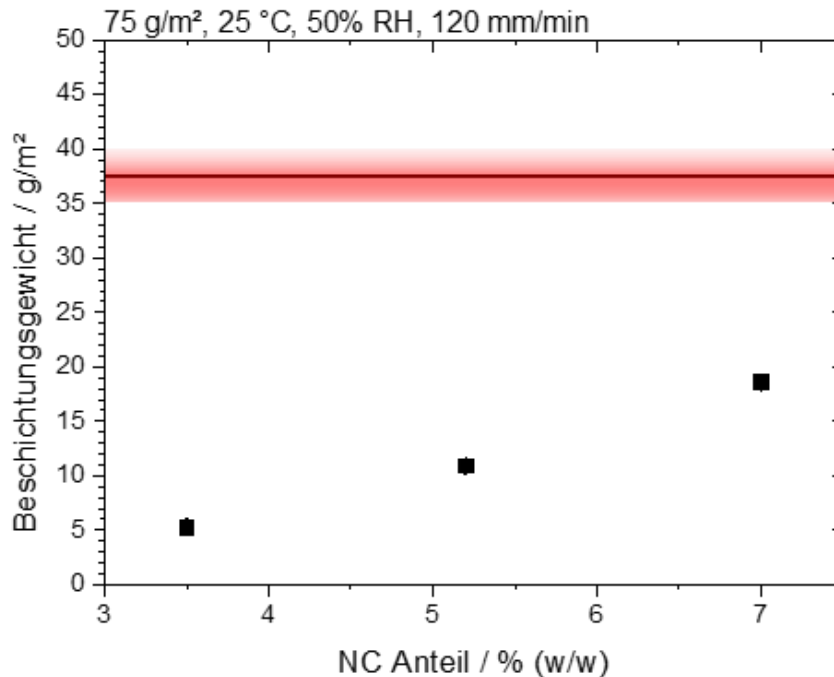


Abbildung 4-11: Beschichtungsgewichte von vollflächig beschichteten NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung. Verwendet wurden 75 g/m² Papiere, welche mit verschiedenen NC-Anteilen im *Lacquer* bei 25 °C, 50% RH mit einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min hergestellt wurden. Der rot markierte Bereich entspricht den Beschichtungsgewichten konventioneller NC-Membranen. Dieser liegt in einem Bereich von 37,5 g/m² ± 2,5 g/m².

Die Beschichtungsgewichte der NCPHM in Abhängigkeit zum NC-Anteil im verwendeten *Lacquer* sind in Abbildung 4-11 dargestellt. Es ist eine lineare Zunahme der Beschichtungsgewichte mit steigendem NC-Anteil zu erkennen. Die geringe Standardabweichung der Messungen zeigt, dass der Beschichtungsprozess reproduzierbar ist. Der in der Abbildung rot markierte Bereich stellt die Bandbreite der NC-Beschichtungsgewichte von konventionellen NC-Membranen dar. Diese liegen in einem Bereich von 37,5 g/m² ± 2,5 g/m² für die verschiedenen Membranmaterialien (HiFlow 75, 120 und 180). Die für die Herstellung von NCPHM benötigte Masse an NC ist wesentlich geringer, als die auf NC-Membranen vorhandene Masse an NC. Der NC-Anteil in NCPHM entspricht lediglich 14,1% - 49,6%.

Der Einfluss der Ziehgeschwindigkeit und Herstellungstemperatur auf die Beschichtungsmassen ist in Abbildung 4-12 dargestellt.

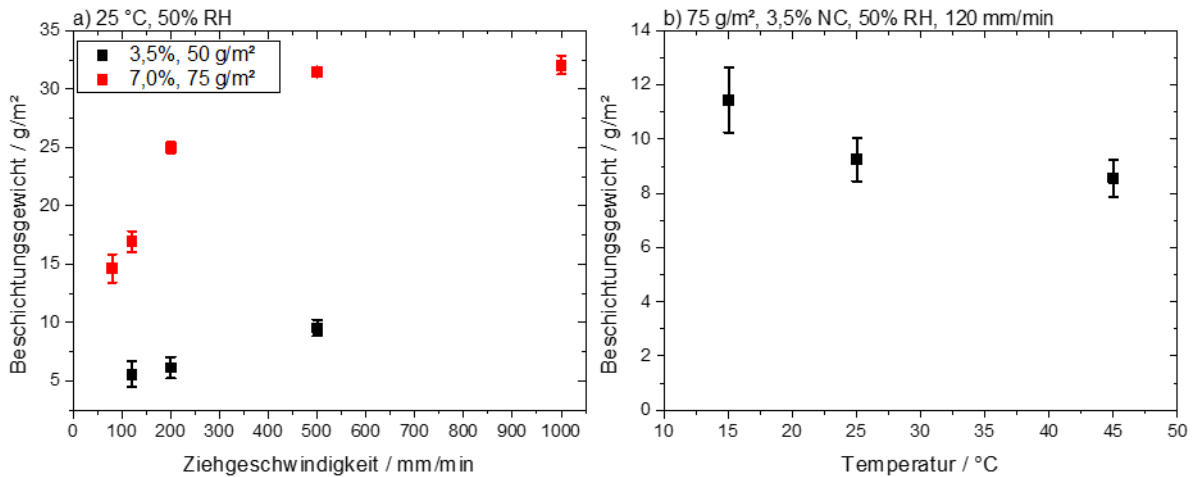


Abbildung 4-12: Beschichtungsgewichte von vollflächigen NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung. a) Variation der Ziehgeschwindigkeiten bei 25 °C und 50% RH auf (Schwarz) 50 g/m² Papieren mit einem NC-Anteil von 3,5% im *Lacquer* und (Rot) 75 g/m² Papieren mit einem NC-Anteil von 7,0% im *Lacquer*. b) Variation der Temperatur bei Verwendung von 75 g/m² Papieren mit einem NC-Anteil von 3,5% im *Lacquer* bei 50% RH und einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min.

Die Beschichtungsgewichte in Abhängigkeit der Ziehgeschwindigkeit (Abbildung 4-12 a) zeigen, dass mit zunehmender Geschwindigkeit ein Ansteigen der Beschichtungsgewichte zu erkennen ist. Dies ist bei beiden Grammaturen und NC-Anteilen zu sehen. Anhand der Messdaten des 7,0% NC-Anteils auf 75 g/m² Papieren ist zu erkennen, dass die Zunahme der Beschichtungsgewichte sich asymptotisch an einen Wert von 32,5 g/m² annähern. Im Bereich von 80 mm/min – 200 mm/min ist ein linearer Anstieg zu erkennen. Der Verlauf der Beschichtungsgewichte entspricht den zuvor getroffenen Erwartungen. Bei geringen Ziehgeschwindigkeiten kann überschüssiger NC-*Lacquer* direkt aus dem Papier und von der Papieroberfläche zurück in das Vorratsbehältnis laufen. Bei zunehmender Geschwindigkeit kommt es zu einer zunehmenden Filmbildung auf dem Papier, was zu höheren Beschichtungsgewichten führt. Dies ist bis ca. 500 mm/min zu beobachten. Bei höheren Ziehgeschwindigkeiten kann keine weitere Zunahme der Beschichtungsgewichte beobachtet werden, da die erhaltene Flüssigfilmdicke nicht weiter zuzunehmen scheint. Die Zusammenhänge von Flüssigfilmdicke und Ziehgeschwindigkeit ist Literaturbekannt und auf die hier durchgeführten Beschichtungen übertragbar.^[136]

Der Temperatureinfluss auf die Beschichtungsgewichte ist in Abbildung 4-12 b) gezeigt. Bei zunehmender Herstellungs- und Trocknungstemperatur ist eine Abnahme der Beschichtungsgewichte zu erkennen. Diese ist möglicherweise auf die Änderung der Viskosität des NC-*Lacquers* in Abhängigkeit der Temperatur zu erklären. Bei niedrigen Temperaturen ist die Viskosität des *Lacquers* höher. Dies verhindert ein schnelles Abfließen des *Lacquers* von der Papieroberfläche. Der auf dem Papier erhaltene Flüssigfilmdicke ist größer, als bei niedriger viskosen *Lacquern*.^[137] Mit steigender Temperatur nimmt die Viskosität des *Lacquers* ab. Dies führt zu einem schnelleren Abfließen und einer geringeren Flüssigfilmdicke bei der Herstellung.

Durch gezielte Variation von Herstellungsparametern lassen sich die Beschichtungsgewichte der NCPHM einstellen. Diese wirken unmittelbar auf die Ausbildung der porösen Strukturen ein. Die Verwendung von Papier als Substrat zu Herstellung von NCPHM gegenüber dem klassischen Herstellungsweg von NC-Membranen, kann die benötigte Menge an NC drastisch reduzieren.

Eine geringere NC-Masse bei der Herstellung von Membranmaterialien ist besonders im ökonomischen Sinne von Vorteil um Herstellungskosten zu reduzieren. Darüber hinaus bietet Papier gegenüber PET-Folien als Trägermaterial deutliche Vorteile hinsichtlich der Ökonomie als auch der Nachhaltigkeit.

Eine weitere Methode zur Reduzierung der benötigten NC auf alternativen Membranmaterialien stellt die gezielte und ortsdefinierte Beschichtung von Papieren dar. Durch gezieltes Aufbringen von NC in den Bereichen, in denen bei diagnostischen Assays die Reaktionslinien aufgebracht werden müssen, kann zu weiteren Materialeinsparungen führen. Das Konzept der ortsdefinierten NCPHM für diagnostische Assays wurde in Abschnitt 2.2.1 beschrieben.

4.2.3 Fazit zu vollflächig beschichteten NCPHM

Die Herstellung und Charakterisierung von vollflächig beschichteten NCPHM sind in den Abschnitten 4.1 - 4.2.2 ausführlich diskutiert worden. Die Herstellung erfolgte durch Tauchbeschichtung von Baumwoll-Linters-Papieren in NC-Lacquer, dabei wurde eine Vielzahl an Herstellungsparametern wie z.B. die Grammaturn der Papiere, die Zusammensetzung des Lacquers, die Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Ziehgeschwindigkeit bei der Beschichtung variiert. In Abschnitt 4.2.2 wurden die Beschichtungsgewichte der Hybridmaterialien bestimmt und diskutiert. Diese variierten in Abhängigkeit der gewählten Herstellungsparameter in einem Bereich von $4,4 \text{ g/m}^2$ - $32,9 \text{ g/m}^2$ und lagen damit unterhalb der Beschichtungsgewichte von konventionellen NC-Membranen ($37,5 \text{ g/m}^2 \pm 2,5 \text{ g/m}^2$). Niedrige Beschichtungsgewichte wurden durch die Verwendung eines niedrigeren NC-Anteils im Lacquer, geringere Ziehgeschwindigkeiten und Verwendung einer höheren Herstellungstemperatur erreicht. Durch Beschichtung von Baumwoll-Linters-Papieren mit NC-Lacquer ließ sich die benötigte NC-Menge reduzieren und somit Rohstoffe bei der Herstellung einsparen. Die durch die Beschichtung erhaltene Oberflächenstruktur wurde in Abschnitt 4.2.1 untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Morphologie der Materialien variierte. Es wurden sowohl offenporigen Strukturen bei denen das Fasernetzwerk des Basispapiers erkennbar waren, bis hin zu vollständig mit poröser NC überzogenen Materialien deren Struktur der von konventionellen NC-Membranen sehr ähnelte erhalten. Bei allen Tauchbeschichtungen kam es zu einer vollständigen Durchdringung des Papiers mit dem NC-Lacquer. Bei der Vorbereitung der vollflächigen NCPHM für diagnostische Assay musste kein besonderes Augenmerk auf die genaue Platzierung von Antikörperlinien gelegt werden, da eine homogene NC-Verteilung auf der gesamten Materialoberfläche und im Querschnitt vorlag. Bezüglich der Skalierbarkeit der Herstellung vollflächiger NCPHM ist es denkbar, dass dies auf relativ einfachem Wege für Membranhersteller möglich sein sollte. Ein Austausch der PET-Trägerfolie gegen geeignete Papierbahnen könnte bereits ausreichend sein um vollflächige NCPHM ohne große Anpassungen auf vorhandenen Beschichtungsmaschinen mit vorhandenen oder geringfügig modifizierten NC-Lacquern herstellen zu können.

4.3 Herstellung und Charakterisierung von ortsdefinierten NCPHM

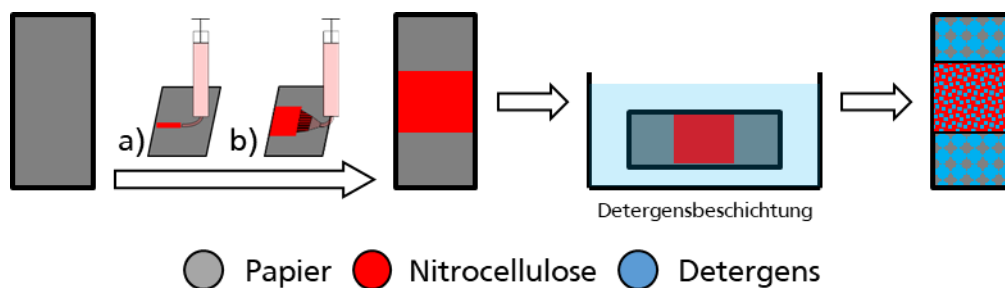
In den nachfolgenden Abschnitten werden makroskopisch die Homogenität und die Linienbreiten der ortsdefinierten NCPHM mittels fotografischen Aufnahmen und Aufnahmen am Fluoreszenzimager untersucht (Abschnitt 4.3.2). Aus den Linienbreiten wird mit Hilfe des Massenanteils der NC im Lacquer und der Dosierung auf dem Papier die Beschichtungsgewichte errechnet

(Abschnitt 4.3.3). Die Verteilung des *Lacquers* im Papier und die Morphologie der Hybridmaterialien wird mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und Elektronenmikroskopie charakterisiert (Abschnitt 4.3.4). Die Charakterisierung der mikrofluidischen Eigenschaften und die Untersuchung der Eignung dieser Materialien als Membranen für diagnostische *Assays* sind in den Abschnitten 5.4 und 6.3 beschrieben.

4.3.1 Herstellungsmethoden für ortsdefinierte NCPHM

Als Alternative zur vollflächigen Beschichtung von Papieren zur Herstellung von NCPHM (Abschnitt 4.1) lassen sich ortsdefinierte Beschichtungsmethoden verwenden. Im Allgemeinen gibt es zahlreiche Beschichtungsverfahren, welche das ortsdefinierte Aufbringen von Farben, Lacken und Lösungen ermöglichen. Zu diesen gehören beispielsweise die klassischen Druckverfahren wie Hochdruck, Tiefdruck, Offsetdruck und Siebdruck, sowie die Beschichtungsverfahren des Tintenstrahldrucks oder des Flüssigkeits-Dispenserdrucks.^[138] Die zuvor genannten Druck- und Beschichtungsverfahren sind sowohl im Labor- als auch im großtechnischen Maßstab realisierbar.

Zur Herstellung von ortsdefinierten NCPHM wurde in dieser Arbeit auf das Flüssigkeits-Dispenserdruckverfahren verwendet, welches hier auch als Liniendruckverfahren bezeichnet wird. Bei diesem wurde mittels eines modifizierten 3D-Druckers mit Spritzenhalterung verschiedene *NC-Lacquer* auf Papiersubstrate aufgebracht. Die Herstellung der ortsdefinierten NCPHM ist in Abschnitt 8.2.2 und Abschnitt 8.5 beschrieben, eine schematische Darstellung des Herstellungsprozesses ist in Schema 4-2 dargestellt.



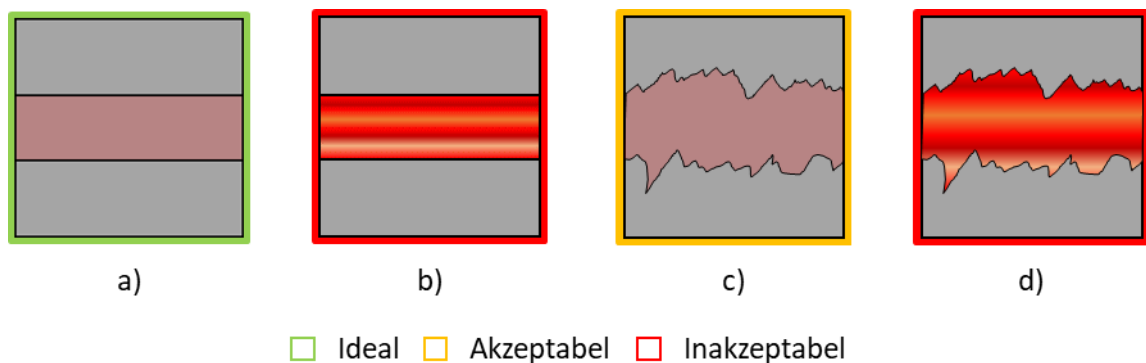
Schema 4-2: Herstellungsprozess für ortsdefinierte NCPHM. Liniendruckverfahren unter Verwendung a) einer gebogenen Kanüle und b) eines Dosierpinsels zum Aufbringen des *NC-Lacquers*. Zur Beschichtung mit Detergens werden die Materialien in eine Detergentslösung eingelegt.

Eine ortsdefinierte Beschichtung von Papieren mit *NC-Lacquer* bietet wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, einige Vorteile gegenüber konventionellen *NC*-Membranen und vollflächig beschichteten NCPHM. Ziel der Beschichtung ist es, *NC* nur an den notwendigen Bereichen des Materials aufzubringen, an denen eine erhöhte Proteinbindung zur Applikation der Test- und Kontrolllinie für diagnostische *Assays* erforderlich ist. Mit dem Liniendruckverfahren lässt sich die benötigte Menge an *NC* pro Membran deutlich reduzieren.

Dies bedeutet, dass durch die hypothetische Einsparung von Material können die Rohstoffkosten zur Herstellung von Membranmaterialien gesenkt werden. Eine Rückführung von verwendeten Membranmaterialien aus diagnostischen Assays in den Wertstoffkreislauf ist aufgrund einer potentiellen Kontamination mit Pathogenen schwierig, da die Entsorgung häufig als Sonderabfall bzw. Restmüll stattfindet. Allerdings spricht theoretisch nichts dagegen als Ausgangsmaterial für diese Membranmaterialien Recyclingpapiere einzusetzen. Dadurch ließe sich der Einfluss von Frischfasern reduzieren.

4.3.2 Linienqualität und Linienbreiten ortsdefinierter NCPHM

Für die Anwendung von ortsdefinierten NCPHM in diagnostischen Assays spielt die Homogenität des mit NC beschichteten Bereiches eine wichtige Rolle. Bei der Beschichtung der Papiere kann es dabei zu unterschiedlichen Szenarien kommen. Diese lassen sich Anhand von Schema 4-3 eingestuft werden.



Schema 4-3: Schema zur Einstufung verschiedener Linienqualitäten von ortsdefinierten NCPHM. Das Basispapier ist in Grau dargestellt, der aufgebrauchte NC-Lacquer in Rot. a) Konstante Linienbreite und homogene Verteilung des aufgebrauchten NC-Lacquers innerhalb der Linie. b) Konstante Linienbreite mit inhomogener Materialverteilung innerhalb der Linie. c) Variation in der Linienbreite mit homogener Verteilung des NC-Lacquers. d) Variation in der Linienbreite und inhomogene Verteilung des NC-Lacquers innerhalb der Linie. Die Umrandung der verschiedenen Fälle entspricht den verschiedenen Materialverteilungen: Ideal (a, Grün), akzeptabel (c, Orange) und inhomogen/inakzeptabel (b, d, Rot).

Die optimale Verteilung der aufgebrauchten NC wird in Schema 4-3 a) illustriert. Die erhaltene Linie weist entlang der Auftragungsrichtung eine konstante Linienbreite auf. Der aufgebrauchte Lacquer verteilt sich homogen innerhalb des beschichteten Bereichs. Eine konstante Linienbreite aber inhomogene Materialverteilung innerhalb der Linie ist in Schema 4-3 b) gezeigt. Schema 4-3 c) zeigt Proben mit einer homogenen Materialverteilung innerhalb der Linie aber variierender bzw. inkonsistenter Linienbreite. Die Kombination aus variierender Linienbreite und inhomogener Materialverteilung auf der Linie ist in Schema 4-3 d) dargestellt.

Für die Anwendung der Materialien in diagnostischen Schnelltests wird eine möglichst homogene Linienbreite und Materialverteilung angestrebt (Schema 4-3 a). Eine variierende Linienbreite bei homogener Materialverteilung (Schema 4-3 c) sollte für die Anwendung ebenfalls akzeptabel sein, sofern die erhaltene Linie breit genug ist und die spätere Applikation von Antikörpern für Test- und Kontrolllinie innerhalb des mit NC beschichteten Bereiches aufgedruckt

werden kann. In Schema 4-3 a) und c) ist zu erwarten, dass die Morphologie der aufgetragenen NC über die komplette Linienbreite identisch bleibt. Bei Schema 4-3 b) und d) kann davon ausgegangen werden, dass die Inhomogenität innerhalb der Linie zu unterschiedlichen Morphologien führen, welche sich auf die mikrofluidischen Eigenschaften der Materialien auswirken und die Leistungsfähigkeit der Assays einschränken könnten.

Zur Charakterisierung der Linienbreiten von ortsdefinierten NCPHM wurden fotografische Aufnahmen gemacht. Die Fotos dafür wurden unter rückseitiger Beleuchtung an einer Fotostation aufgenommen. Dies führt dazu, dass die mit NC beschichteten Bereiche der Papiere dunkler in Erscheinung treten, als das nicht beschichtete Papiersubstrat. Die Hybridmaterialien auf Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von 50 g/m² sind in Abbildung 4-13 dargestellt, die Hybride auf 75 g/m² Papieren sind in Abbildung 4-14 zu finden. Die Herstellung dieser Materialien ist in Abschnitt 8.2.2 beschrieben. Anhand der Fotoaufnahmen wird qualitativ die Homogenität der Beschichtung auf der Linie betrachtet und die resultierenden Linienbreiten in Anlehnung an Abschnitt 3.1.3 ermittelt.

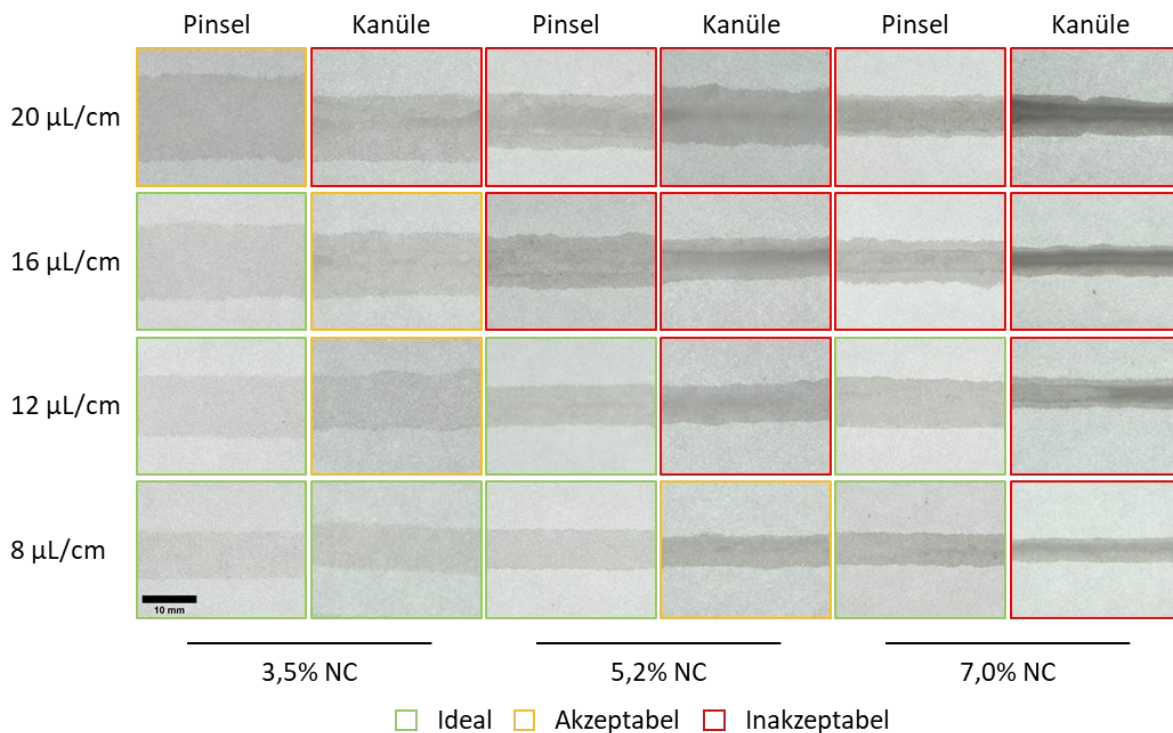


Abbildung 4-13: Fotoaufnahmen von ortsdefinierten NCPHM, hergestellt aus Baumwoll-Linters-Papieren (50 g/m²) mit verschiedenen NC-Massenanteilen im *Lacquer* von 3,5%, 5,2% und 7,0% (w/w), verschiedenen Dosierungen (8 – 20 µL/cm) und Applikationsmethode (Kanüle, Pinsel). Der Skalierungsbalken ist für alle Bilder gültig und beträgt 10 mm. Die rot markierten Aufnahmen zeigen Hybridmaterialien mit Inhomogenitäten innerhalb der Linie, die orange markierten Aufnahmen zeigen eine homogene Materialverteilung innerhalb der Linie bei inkonsistenter Linienbreite. Die grün markierten Aufnahmen zeigen eine homogene Materialverteilung bei konstanter Linienbreite.

Abbildung 4-13 zeigt NCPHM, hergestellt mittels Liniendruckverfahren auf Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von 50 g/m². Bei der Herstellung wurde die aufgetragene Menge an NC-*Lacquer* im Bereich von 8 – 20 µL/cm und dessen NC-Anteile von 3,5 – 7,0% (w/w) variiert. Die Auftragung des *Lacquers* über eine Kanüle wird mit der Auftragung über einen

Dosierpinsel verglichen. Qualitativ werden die Linienbreiten und die Homogenität der Materialverteilung auf der Linie verglichen.

Bei allen hergestellten Materialien ist zu beobachten, dass die Linienbreiten auf den Papieren mit zunehmender Dosierung des *NC-Lacquers* zunehmen. Bei höheren Dosierungen steht mehr *Lacquer* zur Verfügung, welcher in das Papier aufgenommen werden kann. Dieser breitet sich getrieben durch Kapillarkräfte orthogonal zur Auftragsrichtung aus. Allgemein ist zu erkennen, dass die Linienbreiten beim Auftrag mit dem Dosierpinsel ähnlich sind, wie die Linien mit der Auftragung über eine Kanüle.

Identische Herstellungsparameter wurden bei der Herstellung der Materialien auf Baumwoll-Linters-Papieren mit einer Grammatur von 75 g/m² gewählt und die Materialien auf demselben Weg charakterisiert. Die Fotoaufnahmen dieser Materialien sind in Abbildung 4-14 dargestellt.

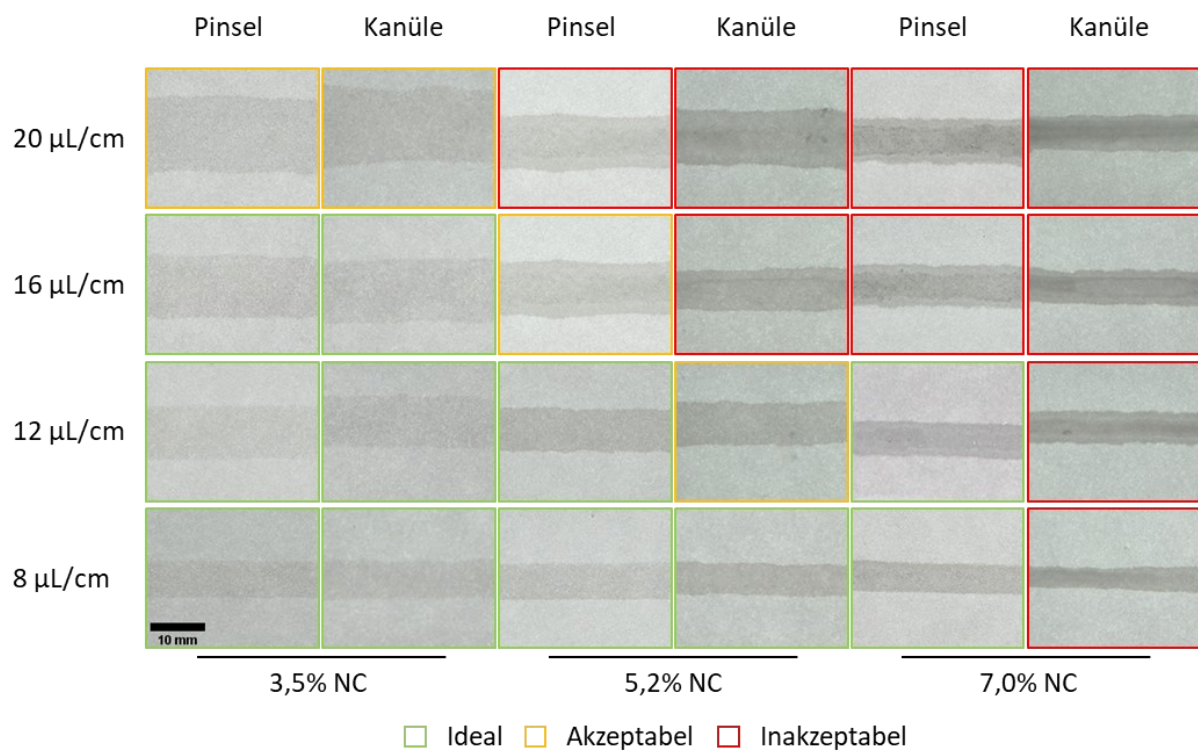


Abbildung 4-14: Fotoaufnahmen von ortsdefinierten NCPHM, hergestellt aus Baumwoll-Linters-Papieren (75 g/m²) mit verschiedenen NC-Massenanteilen im *Lacquer* (3,5%, 5,2% und 7,0%, je w/w), verschiedenen Dosierungen (8 – 20 µL/cm) und Applikationsmethode (Kanüle, Pinsel). Der Skalierungsbalken ist für alle Bilder gültig und beträgt 10 mm. Die rot markierten Aufnahmen zeigen Hybridmaterialien mit Inhomogenitäten innerhalb der Linie, die orange markierten Aufnahmen zeigen eine homogene Materialverteilung in der Linie bei inkonstanter Linienbreite und die grün markierten Aufnahmen zeigen eine homogene Materialverteilung bei konstanter Linienbreite.

Wie bei den NCPHM auf 50 g/m² Papieren (Abbildung 4-13) ist bei der Verwendung einer Grammatur von 75 g/m² (Abbildung 4-14) eine Zunahme der Linienbreiten mit steigender Dosierung des *NC-Lacquers* zu beobachten. Bei höheren Dosierungen steht mehr *Lacquer* zur Verfügung, welcher in das Papier aufgenommen werden kann. Die Linienbreiten sind bei der Auftragung des *Lacquers* mittels Dosierpinsel ähnlich breit wie bei der Applikation mittels einer Kanüle.

Die Linienqualitäten der ortsdefinierten NCPHM aus Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14 sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der erhaltenen Linienqualitäten von ortsdefinierten NCPHM auf 50 g/m² und 75 g/m² Papieren. Dargestellt sind die Anzahl der erhaltenen idealen, akzeptablen und inakzeptablen Linienqualitäten in Abhängigkeit der Dosierung, des NC-Anteils im *Lacquer* und der Applikationsmethode. Die höchsten Werte sind in dunkelblau dargestellt, die niedrigen Werte in dunkelrot.

		50 g/m ²			75 g/m ²		
		ideal	akzeptabel	inakzeptabel	ideal	akzeptabel	inakzeptabel
Dosierung / $\mu\text{L}/\text{cm}$	8	4	1	1	5	0	1
	12	3	1	2	4	1	1
	16	1	1	4	2	1	3
	20	0	1	5	0	2	4
NC Anteil / %	3,5	4	3	1	6	2	0
	5,2	2	1	5	3	2	3
	7	2	0	6	2	0	6
Applikation	Pinsel	7	1	4	7	2	3
	Kanüle	1	3	8	4	2	6
Gesamt		24	12	36	33	12	27

Die Betrachtung der zusammengefassten Linienqualitäten aus Tabelle 4-1 zeigt, dass unabhängig der verwendeten Papiergrammatur die meisten idealen Linienqualitäten bei einer Dosierung von 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ erhalten werden. Mit steigender Dosierung nimmt die Anzahl inakzeptabler Linienqualitäten zu. Die Verwendung von niedrigen NC-Anteilen im *Lacquer* wirkt sich positiv auf die Linienhomogenität aus. So werden die meisten homogenen Linien bei der Verwendung eines NC-Anteils von 3,5% erhalten. Mit steigenden NC-Anteilen nimmt die Anzahl an inhomogenen Linien deutlich zu. Der Einfluss der Applikationsmethode (Pinsel oder Kanüle) zeigt, dass eine Auftragung der *NC-Lacquer* über einen Dosierpinsel die Ausbildung idealer Linienqualitäten fördert, wohingegen das Aufbringen des *Lacquers* über eine Kanüle mehr inhomogene Linien zur Folge hat. Im Allgemeinen ist zu erkennen, dass bei der Verwendung von 75 g/m² Papieren eine höhere Anzahl idealer Linienqualitäten erhalten werden können, als bei der Verwendung von 50 g/m² Papieren. Dies ist auf eine höhere Aufnahmekapazität des Papiers durch die höhere Grammatur erklärbar. Papiere mit 75 g/m² sind dicker und haben auf einer identischen Fläche wie bei 50 g/m² Papieren mehr freies Volumen das mit *Lacquer* gefüllt werden kann. Der Flüssigkeitsauftrag breitet sich so nicht nur orthogonal zur Auftragsrichtung aus, sondern kann auch tiefer in das Papier hinein eindringen. Zur Maximierung der Ausbeute an idealen und akzeptablen Linienqualitäten ist die Verwendung von 75 g/m² Papieren, einer Dosierung von 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ und die Applikation des *NC-Lacquers* über einen Dosierpinsel die bevorzugte Kombination der Herstellungsparameter.

Die größere Ausbeute homogener Linien durch die Verwendung eines Dosierpinsels lässt sich möglicherweise in den Auftragsbreiten der Kanüle und des Dosierpinsels finden. In Abbildung 4-15 sind die zu betrachtenden Dimensionen schematisch dargestellt.

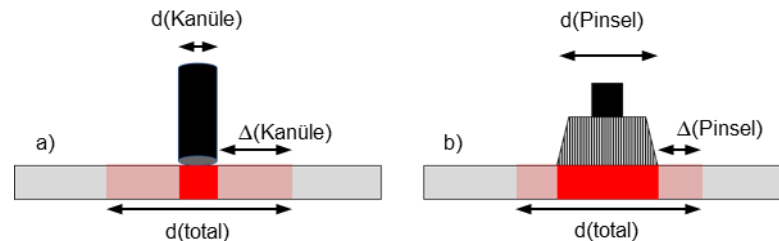


Abbildung 4-15: Schematische Darstellung der Applikationsmethoden mit Blick auf deren Dimensionen. Applikation des NC-Lacquers über a) eine Kanüle mit dem Durchmesser $d(\text{Kanüle})$, der Gesamtbreite der resultierenden Linie $d(\text{total})$ und dem Längenunterschied zwischen Kanüledurchmesser und resultierender Linienbreite $\Delta(\text{Kanüle})$ und b) einem Dosierpinsel mit dem Durchmesser $d(\text{Pinzel})$, der Gesamtbreite der resultierenden Linie $d(\text{total})$ und dem Längenunterschied zwischen Pinseldurchmesser und resultierender Linienbreite $\Delta(\text{Pinzel})$.

Die bei der Applikation des *Lacquers* verwendete Kanüle (Abbildung 4-15 a) hat einen geringeren Durchmesser als der verwendete Dosierpinsel (Abbildung 4-15 b). Aus der Betrachtung der Linienbreiten in Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14 geht hervor, dass die Linienbreiten mit dem Auftrag über den Dosierpinsel ähnlich sind. Die exakten Linienbreiten sind in Abbildung 4-17 und Abbildung 4-18 dargestellt. Vergleicht man die Kanülen- und Pinselbreite (Auftragsbreite) mit der Breite der erhaltenen Linie ist erkenntlich, dass die Differenz zwischen Kanülen- und Pinselbreite im Fall der Kanüle ($\Delta(\text{Kanüle})$) größer ist, als beim Pinsel ($\Delta(\text{Pinzel})$).

Dies bedeutet, dass bei der Auftragung mit der Kanüle der NC-Lacquer nur auf einen sehr schmalen Bereich des Papiers aufgetragen wird und sich anschließend durch Kapillarkräfte getrieben orthogonal zur Applikationsrichtung und in das Papier hinein ausbreitet. Hypothetisch betrachtet kann es während der Ausbreitung in den Papieren bereits zu einer Mikrophasenseparation des *Lacquers* und dem damit verbundenen Ausbilden von porösen NC-Strukturen kommen. Dies sorgt vermutlich dazu, dass kein ungehinderter Fluidfluss des *Lacquers* in orthogonaler Richtung möglich ist, und es zu einer inhomogenen NC-Verteilung kommt. Dies tritt vor allem bei hohen Dosiervolumina auf, sowie einem steigenden NC-Gehalt im *Lacquer*. Ein steigender NC-Gehalt im *Lacquer* sorgt für eine zunehmende Viskosität dessen. *Lacquer* mit niedrigen NC-Anteilen können schneller in das Fasernetzwerk eindringen und sich homogener verteilen, als *Lacquer* mit einer höheren Viskosität. Dieser Zusammenhang ist in der Washburn-Gleichung beschrieben (vgl. Abschnitt 1.4). Die Zeit für eine zurückgelegte Strecke im porösen Material steht in einem proportionalen Zusammenhang zur Viskosität der benetzenden Flüssigkeit ($t \sim \eta$). Bei der Applikation des *Lacquers* über eine Kanüle müssen so höher viskose *Lacquer* eine lange Strecke im Papier zurücklegen, bei einer reduzierten Fließgeschwindigkeit, was die Ausbildung von inhomogenen Hybridmaterialien zur Folge hat und begünstigt.

Bei Verwendung eines Dosierpinsels zur Beschichtung von Papieren mit NC-Lacquer ist die Auftragsbreite vergleichsweise groß. Dies sorgt dafür, dass der *Lacquer* auf einer breiteren Fläche aufgetragen wird und in das Papier eindringen kann. Die zurückgelegte Strecke innerhalb des Papiers orthogonal zur Auftragsrichtung fällt dadurch im Vergleich zum Auftrag mit der Kanüle

deutlich kürzer aus. Dies führt zu einer homogeneren Verteilung der NC, da bei den geringen zurückgelegten Strecken die NC noch keine Strukturen ausbildet, die den nachfolgenden Fluidfluss behindern könnten. *Lacquer* mit niedrigeren NC-Anteilen werden aufgrund ihrer geringen Viskosität schneller vom Papier aufgenommen, als *Lacquer* mit einem höheren NC-Gehalt und somit einer höheren Viskosität. Bei der Auftragung über den Dosierpinsel lassen sich aufgrund der größeren Auftragsbreite noch homogen beschichtete Linien bei größeren Dosierungen und höheren NC-Gehalten erreichen, als bei der Applikation mittels einer Kanüle.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Betrachtung von ortsdefinierten NCPHM mit Hilfe von Fotoaufnahmen zeigt, dass die Homogenität und Linienbreiten der Hybridmaterialien in Abhängigkeit vom dosierten Volumen, dem NC-Gehalt im *Lacquer*, dem verwendeten Papier und der verwendeten Applikationsmethode abhängig ist. Die meisten homogenen ortsdefinierten NCPHM ließen sich durch Verwendung von Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von 75 g/m² unter Verwendung eines Dosierpinsels erhalten. Dabei wirkte sich zudem eine geringe Dosierung des *Lacquers* und ein niedrigerer NC-Gehalt im *Lacquer* positiv auf die Homogenität der Beschichtung aus. Die Einflüsse der Grammatur, NC-Gehalt, Dosiervolumen und Auftragsbreite (Kanüle vs. Pinsel) sind in Abbildung 4-16 schematisch zusammengefasst.

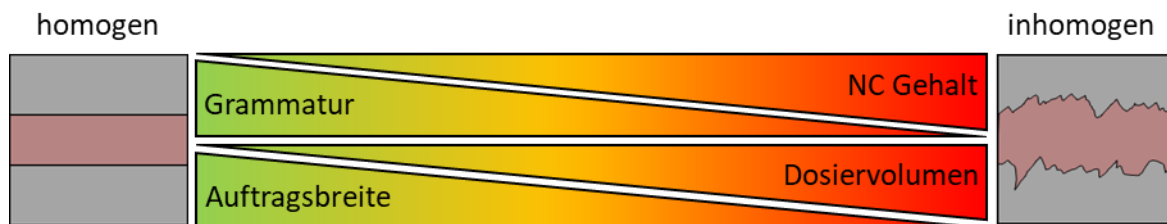


Abbildung 4-16: Schematische Zusammenfassung der Parameter, welche sich positiv auf eine homogenen und konstante Linienbreite bei der Herstellung von ortsdefinierten NCPHM auswirken.

Bestimmung der Linienbreiten von ortsdefinierten NCPHM

Neben der zuvor durchgeführten qualitativen Beurteilung der ortsdefinierten NCPHM, werden anhand der Fotoaufnahmen (Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14) mit der in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen Vorgehensweise die Linienbreiten der Materialien bestimmt. Diese sind in Abbildung 4-17 für Hybridmaterialien dargestellt, bei denen der *Lacquer* über eine Kanüle appliziert wurde und in Abbildung 4-18 Materialien bei denen die Applikation mit einem Dosierpinsel durchgeführt wurde.

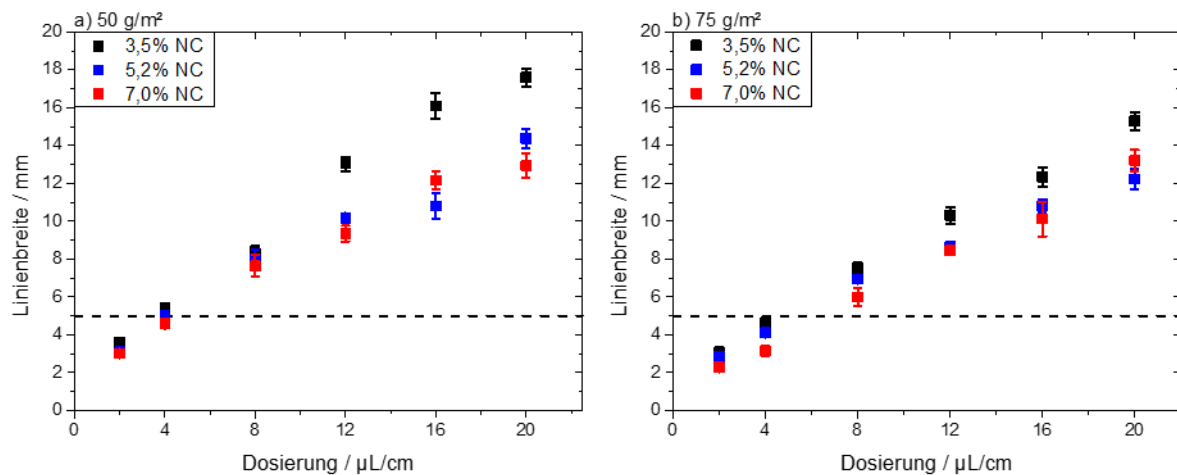


Abbildung 4-17: Linienbreiten von ortsdefinierten NCPHM in Abhängigkeit zur Dosierung der verschiedenen NC-Lacquers. Der Auftrag des NC-Lacquers erfolgte über eine Kunststoffkanüle. Die NC-Anteile im jeweiligen Lacquer sind 3,5% (Schwarz), 5,2% (Blau) und 7,0% (Rot). Die Materialien wurden auf Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammaturn von a) 50 g/m² und b) 75 g/m² hergestellt. Die gestrichelte Linie symbolisiert eine Linienbreite von 5 mm.

Die Linienbreiten der ortsdefinierten NCPHM, hergestellt durch Liniendruck unter Verwendung einer Kanüle zur Dosierung von NC-Lacquern, sind in Abbildung 4-17 dargestellt. Betrachtet wird die Auswirkung unterschiedlicher NC-Gehalte und Dosierungen des Lacquers auf die resultierenden Linienbreiten. Da für die spätere Anwendung auf die NCPHM die Antikörper für diagnostische Schnelltests aufgebracht werden müssen, dürfen die NC-Linien nicht zu schmal ausfallen. In diagnostischen Assays sind die Test- und Kontrolllinie in der Regel 5 mm voneinander entfernt. Dies bedeutet, dass nur NCPHM mit mindestens >5 mm Linienbreite für die Anwendung als alternatives Membranmaterial geeignet sind. Dies ist für alle Dosierungen von 8 µL/cm und höher der Fall.

Die Linienbreiten der mittels Liniendruckverfahren auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren hergestellten NCPHM sind in Abbildung 4-17 a) abgebildet. Bei allen drei verwendeten NC-Anteilen ist zu erkennen, dass mit steigender Dosierung die erhaltenen Linienbreiten größer werden. Bei Verwendung eines NC-Lacquers mit 3,5% (w/w) wird eine maximale Linienbreite von 17,6 mm ± 0,5 mm erhalten. Die Linienbreiten nehmen mit zunehmenden NC-Gehalt im Lacquer ab. Dies lässt sich auf das Eindringverhalten des Lacquers in das Papier zurückführen. Der NC-Lacquer mit dem geringsten NC-Anteil (3,5%) hat die niedrigste Viskosität. Dies ermöglicht ein schnelleres Verteilen des Lacquers durch Kapillarkräfte im Papier, als bei höheren NC-Gehalten. Die geringste Linienbreite kann bei einer Dosierung von 2 µL/cm und der Verwendung eines 7,0% (w/w) NC-Gehalts mit 3,0 mm ± 0,2 mm erhalten werden. Eine Betrachtung der Standardabweichungen der Linienbreiten zeigt, dass diese mit zunehmender Dosierung und steigendem NC-Gehalt zunehmen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der Linienhomogenität wie sie in Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14 beobachtet wurden.

Die NCPHM auf 75 g/m² Papieren (Abbildung 4-17 b) zeigen identische Trends wie die der niedrigeren Grammaturn. Die Linienbreiten steigen mit zunehmender Dosierung an. Bei Verwendung des Lacquers mit 3,5% (w/w) werden die breitesten Linien bei einer Dosierung von 20 µL/cm erhalten. Die schmalsten Linien sind 2,3 mm ± 0,2 mm breit und werden durch Verwendung eines NC-Lacquers mit 7,0% (w/w) NC-Gehalt und einer Dosierung von 2 µL/cm

erhalten. Im Allgemeinen sind die Linienbreiten auf 75 g/m² Papieren schmaler als auf 50 g/m² Papieren. Dies liegt daran, dass in 75 g/m² Papieren mehr freies Volumen pro Fläche zur Aufnahme von *Lacquer* zu Verfügung steht, als in 50 g/m² Papieren. Der Aufgebrachte *Lacquer* kann sich neben der orthogonalen Ausbreitung zur Applikationsrichtung zusätzlich mehr in die Tiefe des Papiers verteilen. Um Linienbreiten von >5 mm zu erhalten, sind ebenfalls Dosierungen von mindestens 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ oder mehr erforderlich.

Als zweite Applikationsmethode wurde der NC-*Lacquer* über einen Dosierpinsel aufgetragen. Die Linienbreiten der ortsdefinierten NCPHM bei denen der *Lacquer* über einen Dosierpinsel aufgetragen wurde, sind in Abbildung 4-18 dargestellt. Aufgrund der Erkenntnisse aus den Linienbreiten der Hybridmaterialien die mittels einer Kanüle hergestellt wurden, wurde bei der Herstellung der Materialien mit dem Dosierpinsel auf Dosierungen unterhalb von 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ verzichtet, da wie in Abbildung 4-15 gezeigt, die Auftragsbreite des Dosierpinsels größer ist als bei der Kanüle.

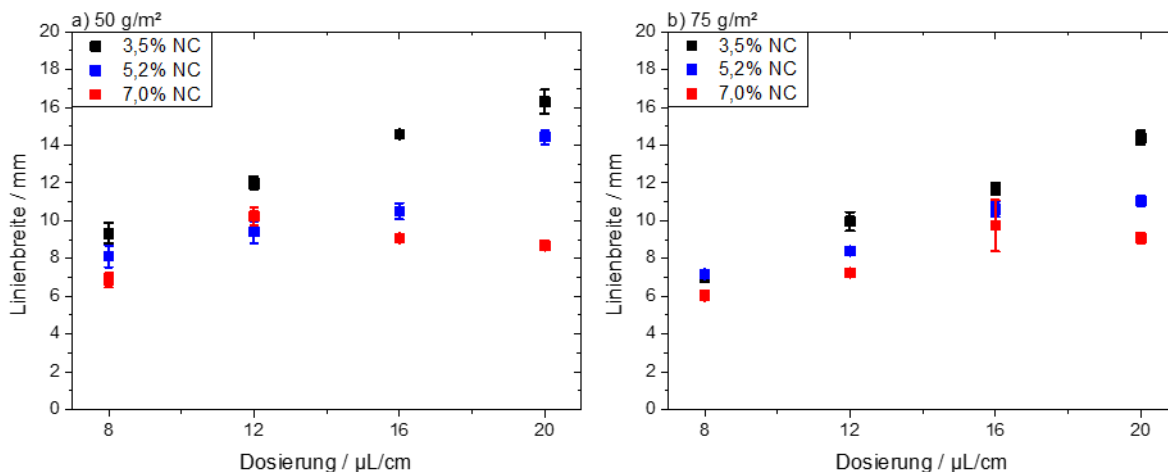


Abbildung 4-18: Linienbreiten von ortsdefinierten NCPHM in Abhängigkeit der Dosierung verschiedener NC-*Lacquer*. Der Auftrag des NC-*Lacquers* erfolgte über einen Dosierpinsel aus Kunststoff. Die NC-Anteile im jeweiligen *Lacquer* sind 3,5% (Schwarz), 5,2% (Blau) und 7,0% (Rot). Die Materialien wurden auf Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammaturn von a) 50 g/m² und b) 75 g/m² hergestellt.

Alle Linienbreiten die mit 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ oder mehr hergestellt wurden, sind größer als 5 mm. Wie auch zuvor sind identische Trends des Verlaufs der Linienbreiten zu erkennen. Bei steigender Dosierung des *Lacquers* nehmen die Linienbreiten konstant zu. Durch Erhöhung des NC-Anteils im *Lacquer* lassen sich schmalere Linien erhalten. Auch bei der Verwendung einer höheren Grammaturn (Abbildung 4-18 b) sind die Linienbreiten wie zuvor beschrieben kleiner. Die größte Linienbreiten werden bei der Verwendung eines NC-*Lacquers* mit 3,5% (w/w) NC-Anteil und einer Dosierung von 20 $\mu\text{L}/\text{cm}$ auf einem Papier mit einer Grammaturn von 50 g/m² erhalten. Die Linien sind bei dieser Kombination der Herstellungsparameter 16,3 mm \pm 0,6 mm breit. Die schmalsten Linien werden auf 75 g/m² Papieren mit einem NC-Gehalt von 7,0% (w/w) und einer Dosierung von 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ erhalten. Die Linien sind in diesem Fall 6,9 mm \pm 0,4 mm breit.

In Abbildung 4-18 a) sind Abweichungen im Verlauf der Linienbreiten bei Verwendung des *Lacquers* mit 7,0% (w/w) NC-Anteils zu beobachten. Bei einer Dosierung von 16 $\mu\text{L}/\text{cm}$ ist eine

schmalere Linienbreite zu beobachten, als bei geringeren Dosierungen. Dies lässt sich mit den zuvor diskutierten Erkenntnissen nicht erklären. Die Begründung für diese Abweichungen sind in der Beschaffenheit des Dosierpinsels zu finden. Während der Herstellung dieser Materialien zeigte sich mit zunehmender Zeit ein Verstopfen des Pinsels durch Ausfällen von NC, was zu einer Abnahme der Linienqualität führt. Dies ist vor allem an den Randbereichen des Pinsels zu beobachten. Die Folge daraus ist, dass die tatsächliche Pinselbreite durch die verstopften Bereiche vermindert werden. Aus diesem Grund sind die Linienbreiten geringer und inhomogener, als bei der vollständigen Nutzung der Pinselbreite. Hinsichtlich einer Skalierung des Beschichtungsprozesses ist dies zu berücksichtigen, indem bei längerer Benutzungsdauer des Pinsels oder einer Mehrfachbenutzung geeignete Reinigungsschritte berücksichtigt werden müssen, was sich nachteilig auf die Produktionsgeschwindigkeit, den Verschleiß des Pinsels und die Herstellungskosten auswirkt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Linienbreiten und Homogenität von ortsdefinierten NCPHM vom NC-Gehalt, Dosierung, Applikationsmethode und Grammaturn der Basispapiere beeinflusst werden. Wie in diesem Abschnitt diskutiert, ließen sich wie in Abbildung 4-16 gezeigt, allgemeine Trends für die Herstellung von homogen beschichteten Hybridmaterialien mit konstanter Linienbreite ableiten.

Hinsichtlich der geplanten Anwendung der ortsdefinierten NCPHM in diagnostischen Assays wurden Linienbreiten von mehr als 5 mm angestrebt. Diese werden bei den verschiedenen *Lacquern* und Papieren ab einer Dosierung von mindesten 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ erhalten. Aufgrund der homogen porösen Oberflächenstruktur von NC-Membranen, wird für ortsdefinierte NCPHM als alternative Membranmaterialien ebenfalls eine homogene Beschichtung angestrebt. Diese sollte im Idealfall neben einer homogenen Verteilung der NC auch eine konstante Linienbreite aufweisen (Schema 4-3 a). Anhand der Fotoaufnahmen (Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14) und der darin dargestellten Farbcodierung für homogene Beschichtungen mit konstanter Linienbreite, werden Materialien für die Anwendung in diagnostischen Assays als alternatives Membranmaterial ausgewählt.

In Abschnitt 6.3 werden ausgewählte ortsdefinierte NCPHM als alternative Membranmaterialien auf deren Eignung für diagnostische Assays untersucht. Basierend auf den hier ermittelten Eigenschaften hinsichtlich konstanter Linienbreite und Homogenität wird eine Auswahl zur Untersuchung der Materialien getroffen. Für die Tests der Materialien in diagnostischen Schnelltest (Abschnitt 6.3) werden die nachfolgenden Hybridmaterialien ausgewählt und in Tabelle 4-2 aufgelistet.

Tabelle 4-2: Übersicht der ausgewählten ortsdefinierten NCPHM für die Untersuchung als alternatives Membranmaterial in diagnostischen Schnelltests basierend auf den Erkenntnissen aus der Betrachtung der Linienbreite und Homogenität.

Grammaturn / g/m^2	50		75	
NC Gehalt / $\%(\text{w}/\text{w})$	3,5	5,2	3,5	5,2
Dosierung / $\mu\text{L}/\text{cm}$	8/12/16	8/12	8/12/16	8/12

4.3.3 Beschichtungsgewichte ortsdefinierter NCPHM

Die Verwendung der ortsdefinierten Beschichtung zur Herstellung von NCPHM soll der Einsparung benötigter NC dienen. Dieses Konzept wurde in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Aus den in Abschnitt 4.3.2 ermittelten Linienbreiten werden unter Zuhilfenahme der bekannten Dosierung und NC-Anteile des *Lacquers* die Beschichtungsgewichte der ortsdefinierten NCPHM errechnet. Hierfür wird anhand der Linienbreite und einer gedruckten Distanz von z.B. 1 cm die beschichtete Fläche errechnet. Aus der bekannten Dosierung und den NC-Gehalt im jeweiligen *Lacquer* wird die aufgebrauchte Masse errechnet. Die Beschichtungsmasse auf der aufgetragenen Linie errechnet sich aus der Bildung des Quotienten aus aufgetragener Masse und beschichteter Fläche. Es kann erwartet werden, dass mit zunehmender Dosierung die Beschichtungsgewichte zunehmen. Da die in Abschnitt 4.3.2 ermittelten Linienbreiten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Applikation der *Lacquers* über eine Kanüle und über einen Dosierpinsel gezeigt haben, ist zu erwarten, dass die Beschichtungsgewichte unabhängig zur Applikationsmethode sein sollten.

Die Auftragung der Beschichtungsgewichte gegen die Dosierung in Abhängigkeit zum NC-Gehalt der *Lacquer* ist in Abbildung 4-19 dargestellt.

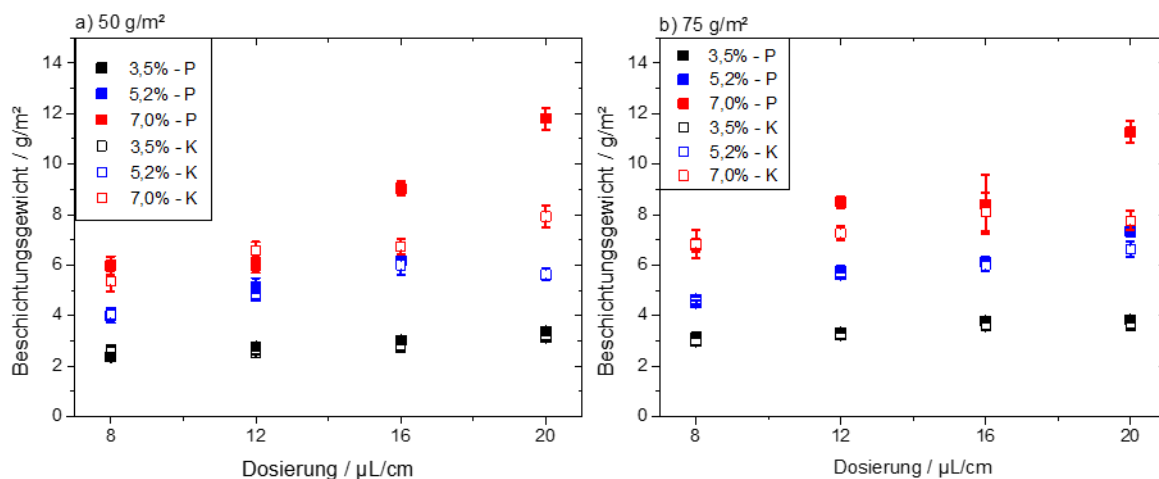


Abbildung 4-19: Errechnete Beschichtungsgewichte auf der beschichteten Fläche von ortsdefinierten NCPHM in Abhängigkeit der Dosierung und der NC-Anteile in den verwendeten *Lacquern*. Für die Herstellung wurden Baumwoll-Linters-Papiere mit einer Grammatur von a) 50 g/m² und b) 75 g/m² verwendet. Die Gewichtsanteile NC-Anteile im *Lacquer* sind 3,5% (Schwarz), 5,2% (Blau) und 7,0% (Rot). Die Applikation des *Lacquers* mittels eines Dosierpinsels (P) ist mit gefüllten Datenpunkten dargestellt, die Applikation des *Lacquers* über eine Kanüle (K) ist über die leeren Datenpunkte illustriert.

Die Auftragung der Beschichtungsgewichte (Abbildung 4-19) gegen die Dosierung zeigt, dass im Allgemeinen eine Zunahme der Beschichtungsgewichte mit steigender Dosierung zu beobachten ist. Bei niedrigen NC-Anteilen im *Lacquer* (Abbildung 4-19, a),b), Schwarz) ist zu beobachten, dass die Beschichtungsgewichte unabhängig der Applikationsmethode sind. Die resultierenden Linienbreiten sind aufgrund der niedrigen Viskosität des *Lacquers* annähernd identisch, was sich ebenfalls in den Beschichtungsgewichten widerspiegelt. Dies ist für beide

Grammaturen zu erkennen. Die Beschichtungsgewichte steigen im Allgemeinen mit zunehmender Dosierung an. Dieser Effekt ist bei den niedrigen NC-Anteilen (Abbildung 4-19, a),b), Schwarz) nur geringfügig zu beobachten. Die Massenzunahme auf der beschichteten Linie ist hier verhältnismäßig gering. Bei einer Dosierung von $8 \mu\text{L}/\text{cm}$ auf Papieren mit $50 \text{ g}/\text{m}^2$ (Abbildung 4-19 a) wird ein Beschichtungsgewicht von $2,4 \text{ g}/\text{m}^2 \pm 0,1 \text{ g}/\text{m}^2$ erzielt, welches bei einer Dosierung von $20 \mu\text{L}/\text{cm}$ auf $3,4 \text{ g}/\text{m}^2 \pm 0,1 \text{ g}/\text{m}^2$ ansteigt. Dies lässt sich durch die niedrige Viskosität des *Lacquers* erklären. Der *Lacquer* kann aufgrund seiner Viskosität schnell und homogen in das Fasernetzwerk durch Kapillarkräfte aufgenommen werden. Dabei scheint die Zunahme der Linienbreite in einem proportionalen Verhältnis zur Dosierung zu stehen, bzw. im gleichen Maße anzusteigen, da der Quotient aus aufgebrachtener NC-Masse und der Linienbreite über die komplette Dosierungsspanne nur gering ansteigt.

Mit zunehmenden NC-Gehalt im *Lacquer* steigt das Beschichtungsgewicht an. So liegen bei der Beschichtung von Papieren mit $50 \text{ g}/\text{m}^2$ (Abbildung 4-19 a) die Beschichtungsgewichte unter Verwendung des NC-*Lacquers* mit 5,2% (w/w) NC im Bereich von $4,0 \text{ g}/\text{m}^2 \pm 0,3 \text{ g}/\text{m}^2$ bis $5,6 \text{ g}/\text{m}^2 \pm 0,2 \text{ g}/\text{m}^2$. Die Beschichtungsmethoden liefern ebenfalls annähernd identische Beschichtungsgewichte, da die erhaltenen Linienbreiten der Applikation mittels Kanüle denen der Auftragung mittels des Dosierpinsels sehr ähneln. Die Verwendung des NC-*Lacquers* mit einem NC-Anteil von 7,0% (w/w) zeigen einen stärker ansteigenden Verlauf (Abbildung 4-19 a) rote Datenpunkte). Bei zunehmender Dosierung steigt die Linienbreite der Applikation mittels Kanüle weniger stark an, als die Abgeschiedene Masse. Dies führt zu einem Anstieg des Beschichtungsgewichtes der Materialien. Besonders stark steigt das Beschichtungsgewicht bei der Applikation mittel des Dosierpinsels an. Wie bereits in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, kam es bei der Applikation zum teilweisen Verstopfen des Pinsels, was zu einer geringeren Linienbreite führte. Allerdings wurde dennoch eine höhere Menge *Lacquer* auf das Papier dosiert. Dies führt zu einer ansteigenden applizierten Masse bei verhältnismäßig geringeren Linienbreite als mittels der Kanüle applizierten Linien.

Bei Verwendung von $75 \text{ g}/\text{m}^2$ Papieren zur Herstellung der ortsdefinierten NCPHM (Abbildung 4-19 a) sind die Trends der Beschichtungsmassen ähnlich zur Beschichtung von $50 \text{ g}/\text{m}^2$ Papieren (Abbildung 4-19 b).

Vergleich der Beschichtungsgewichte von NCPHM und konventionellen NC-Membranen

Die Beschichtungsgewichte der ortsdefinierten NCPHM sind im Vergleich zu konventionellen NC-Membranen und vollflächigen NCPHM deutlich geringer. Sie liegen je nach verwendeter Dosierung, NC-Anteil im *Lacquer* und Grammaturn in einem Bereich von $2,4 \text{ g}/\text{m}^2 - 11,8 \text{ g}/\text{m}^2$. Bei vollflächigen NCPHM werden Beschichtungsgewichte im Bereich von $4,4 \text{ g}/\text{m}^2 - 32,9 \text{ g}/\text{m}^2$ erhalten (Abschnitt 4.2.2). Die Beschichtungsgewichte konventioneller NC-Membranen wurden wie in Abschnitt 8.4 beschrieben ermittelt. Diese liegen in einem Bereich von $35 \text{ g}/\text{m}^2 - 40 \text{ g}/\text{m}^2$. Zum Vergleich sind die Spannen der Beschichtungsgewichte in Abbildung 4-20 zusammengefasst. Diese repräsentieren alle ermittelten Werte, wobei die Standardabweichungen in den Balken berücksichtigt sind.

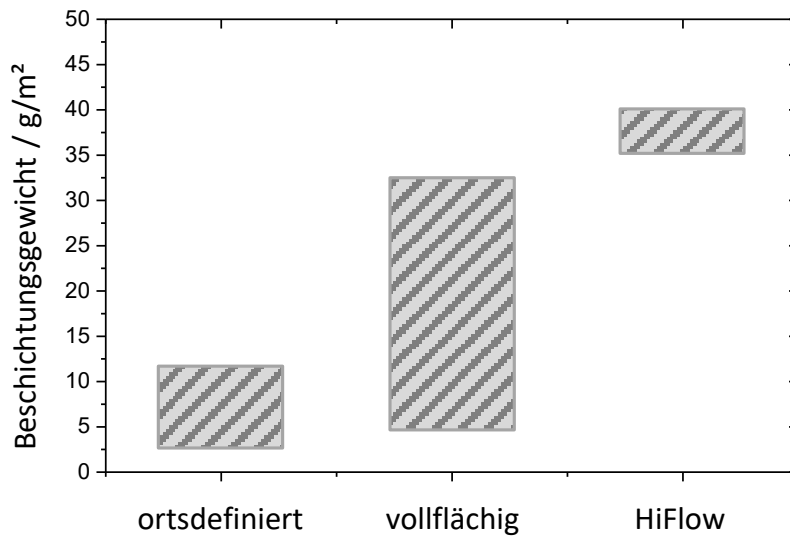
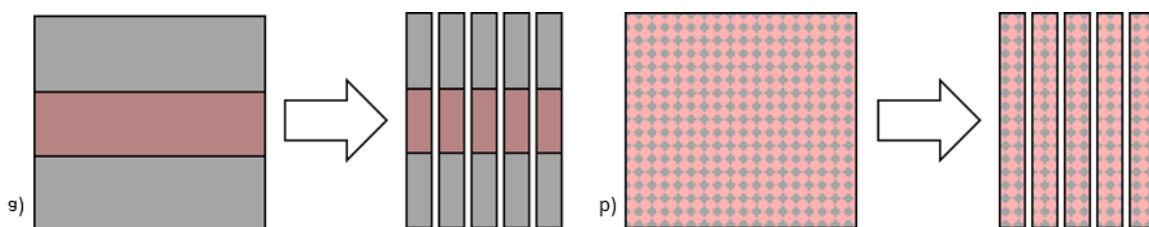


Abbildung 4-20: Übersicht der Beschichtungsgewichte von NCPHM. Dargestellt sind die Spannen der Beschichtungsgewichte von ortsdefinierten NCPHM, vollflächigen NCPHM und konventionellen NC-Membranen.

Die Beschichtungsgewichte der ortsdefinierten NCPHM im Vergleich zu vollflächigen Hybridmaterialien und konventionellen NC-Membranen (Abbildung 4-20) zeigt, dass signifikant weniger NC für die Herstellung von ortsdefinierten NCPHM benötigt wird. Dies sollte sich positiv auf anfallende Produktionskosten auswirken. Der Anteil an unbeschichtetem Papier auf den ortsdefinierten Materialien ist höher, als bei den flächigen Materialien. Zudem ist weniger NC auf dem Material und es kommt völlig ohne PET- Trägerfolie im Vergleich zu konventionellen NC-Membranen aus. Ortsdefinierte NCPHM stellen die nachhaltigere Form der Hybridmaterialien da.

Bezieht man die Beschichtungsgewichte nicht nur auf die tatsächlich beschichtete Fläche, sondern auf die verwendete NC-Masse pro Membranstreifen für einen diagnostischen Assay, so ist zu erkennen, dass der NC-Anteil wesentlich geringer ist als bei flächig beschichteten Hybridmaterialien. Dies ist in Schema 4-4 gezeigt.



Schema 4-4: Schematische Darstellung von vollständigen und geschnittenen Hybridmaterialien. a) stellt ortsdefinierte und b) vollflächig beschichtete NCPHM dar.

Interessant ist die Betrachtung der Beschichtungsmasse von Hybridmaterialien auf der Fläche einer zurechtgeschnittenen Schnelltestmembran. Schneidet man flächig beschichtete Hybridmaterialien in Streifen (Schema 4-4 b), so ändert sich die Beschichtungsmasse nicht. Ein schneiden der ortsdefinierten Hybridmaterialien (Schema 4-4 a) zieht zwar keine Änderung der Beschichtungsmasse auf der beschichteten Fläche mit sich, aber der mit NC beschichtete Anteil ist geringer als die Gesamtfläche der Schnelltestmembran.

Für vollflächig beschichtete NCPHM und konventionellen NC-Membranen errechnet sich die tatsächliche NC-Masse auf einem Membranstreifen aus den Beschichtungsgewichten und der tatsächlichen Fläche des Membranstreifens. Die Berechnung erfolgt gemäß Gleichung (4) am Beispiel von konventionellen NC-Membranen.

$$\rho_A = \frac{m}{A} \rightarrow m = \rho_A \cdot A = 40 \frac{g}{m^2} \cdot 0,0015 m^2 = 0,006 g = 6,0 mg \quad (4)$$

mit ρ_A = Beschichtungsgewicht in g/m², A = Fläche eines Membranstreifens, m = Masse NC auf Membranstreifen

Für ortsdefinierten NCPHM wird mittels dem Dosiervolumen, der beschichteten Strecke, der Dichte des *Lacquers* und dem NC-Anteil im *Lacquer* die abgeschiedene Masse berechnet. Dies erfolgt gemäß Gleichung am Beispiel eines ortsdefinierten NCPHM, hergestellt mit einer Dosierung von 20 µL/cm und einem NC-Anteil von 7,0%.

$$V = d \cdot D$$

$$m_{NC} = V \cdot \rho_{Lacquer} \cdot w \quad (5)$$

$$m_{NC} = 0,5 cm \cdot 0,02 \frac{mL}{cm} \cdot 0,7 \frac{g}{mL} \cdot 0,07 = 0,00049 g = 0,49 mg$$

mit V = Dosiervolumen in µL, d = beschichtete Strecke in cm, D = Dosierung in µL/cm, $\rho_{Lacquer}$ = Dichte des *Lacquers* in g/mL, w = Massenanteil NC in % (w/w), m_{NC} = Masse NC auf Membranstreifen.

Für konventionelle NC-Membranen beträgt die Masse NC pro Membranstreifen 5,3 mg – 6,0 mg. Auf vollflächig beschichteten NCPHM werden je nach Wahl der Herstellungsparameter zwischen 0,7 mg – 4,9 mg NC pro Membranstreifen aufgebracht. Mittels einer ortsdefinierten Beschichtung durch Anwendung des Liniendruckverfahrens lässt sich die aufgebrachte Masse an NC weiter reduzieren, sodass nur noch 0,05 mg – 0,5 mg der NC aufgebracht werden. Dies entspricht einer Reduktion der benötigten NC-Masse um 91% gegenüber konventionellen NC-Membranen.

Der Vergleich der tatsächlichen applizierten NC-Masse pro Membranstreifen zeigt, dass die in dieser Arbeit hergestellten neuartigen Hybridmaterialien aus NC und Baumwoll-Linters-Papieren deutlich weniger NC zur Herstellung benötigen. Durch Anwendung der Tauchbeschichtung kann die NC-Masse um bis zu 89% reduziert werden. Eine gezielte Applikation der NC über das Liniendruckverfahrens reduziert die aufgebrachte NC-Masse pro Membranstreifen auf 91% im Vergleich zu konventionellen NC-Membranen. Ein geringerer Bedarf an NC führt aufgrund ei-

nes niedrigeren Rohstoffbedarfs zu sinkenden Produktionskosten bei der Herstellung von alternativen Membranmaterialien. Zudem kann bei der Herstellung von NCPHM auf PET-Trägerfolien wie bei der Herstellung konventioneller NC-Membranen verzichtet werden. Die Rohstoffkosten für Baumwoll-Linters-Papiere als Basismaterial für NCPHM sind im Vergleich zu PET-Folien geringer. Durch die Verwendung von Papieren als Basismaterial lassen sich alternative Membranmaterialien mit einem reduzierten Kunststoffgehalt herstellen, da Papiere aus nachwachsenden Quellen hergestellt werden können.

4.3.4 Morphologie von ortsdefinierten NCPHM

Neben der in Abschnitt 4.3.2 behandelten makroskopischen Beurteilung der Linienbreiten und Linienhomogenität wird im Nachfolgenden das Augenmerk auf die Mikrostruktur von ortsdefinierten NCPHM gelegt. Aufgrund der erfolgten makroskopischen Betrachtung der Linienqualität kann davon ausgegangen werden, dass es innerhalb der NC beschichteten Bereiche zur Ausbildung verschiedener NC-Strukturen kommen kann. Idealerweise würde sich bei der mikroskopischen Betrachtung zeigen, dass im gesamten Bereich der Beschichtung die Porenstrukturen gleichmäßig und homogen sind. Von ausgewählten Materialien sind nachfolgend mikroskopische Aufnahmen (CLSM, REM) dargestellt, anhand denen die Materialverteilung und Mikrostruktur der Hybridmaterialien charakterisiert und beschrieben wird. Die CLSM-Aufnahmen wurden zum einen in der Draufsicht erstellt (Abbildung 4-21 und Abbildung 4-22) und in Querschnitten (Abbildung 4-23, Abbildung 4-24, Abbildung 4-25).

CLSM-Aufnahmen zur Untersuchung der Morphologie von ortsdefinierten NCPHM

CLSM-Aufnahmen bieten bei der Charakterisierung von NCPHM den Vorteil, dass durch Anfärbung der Komponenten, hier der Fasern und dem *Lacquer*, diese voneinander unterschieden werden können. Die Aufnahmen liefern gute Kontraste und eine gute Auflösung in allen Dimensionen. Nachteilig an der Konfokalmikroskopie ist die geringe Tiefenschärfe der Aufnahmen. Pro Aufnahme wird nur eine schmale Fokusebene aufgenommen. Um die Verteilung des Materials untersuchen zu können, müssen Bildstapel von mehreren Aufnahmen in z-Richtung aufgenommen werden. Diese Stapel fallen je nach Unregelmäßigkeit der Probenoberfläche unterschiedlich groß aus. Aus den einzelnen z-Ebenen lassen sich räumliche Informationen über die NC-Verteilung erhalten. Die CLSM-Aufnahmen wurden sowohl zur Betrachtung der Materialoberfläche, sowie für die Begutachtung von Querschnitten eingesetzt. Für die Querschnittsbetrachtung wurden die Materialien in Harz eingebettet (Abschnitt 8.11).

Als exemplarische Membranmaterialien werden nachfolgend Hybridmaterialien betrachtet, welche auf Papieren mit einer Grammaturn von 50 g/m^2 hergestellt wurden. Der NC-*Lacquer* wurde mittels Kanüle aufgetragen und die NC-Anteile im *Lacquer* variiert. Wie in Abbildung 4-13 zu gezeigt wurde, können bei einer Dosierung von $8 \mu\text{L/cm}$ auf 50 g/m^2 Papieren je nach NC-Anteil ideal homogene Hybride (3,5% (w/w) NC), homogene Hybride mit inkonsistenter Linienbreite (5,2% (w/w) NC) und inhomogene Hybride mit inkonsistenter Linienbreite (7,0% (w/w) NC) erhalten werden. Die CLSM-Aufnahmen sind in Abbildung 4-21 dargestellt.

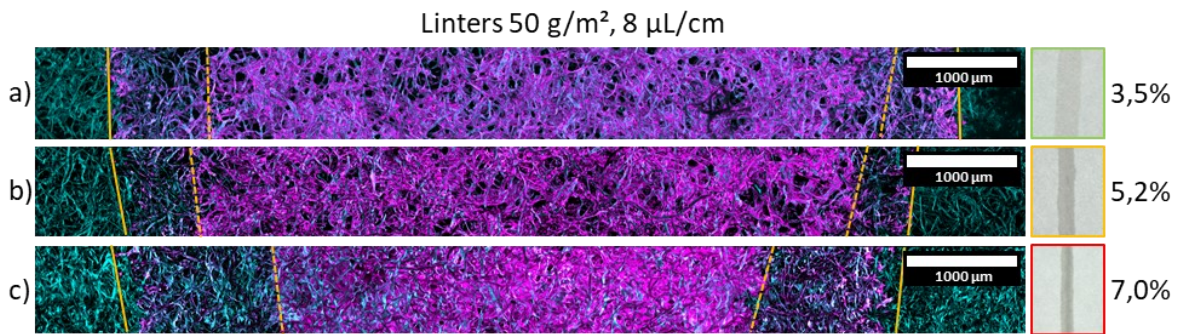


Abbildung 4-21: CLSM-Aufnahmen (Maximalprojektion) der Probenoberfläche (Draufsicht) von ortsdefinierte NCPHM hergestellt auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren bei einer Dosierung von 8 µL/cm. Die NC-Gehalte der *Lacquer* wurden variiert. Diese sind a) 3,5%, b) 5,2% und c) 7,0% (w/w). Die *Lacquer* wurden mittels einer Kanüle aufgebracht. Die Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgebraachte NC-*Lacquer* in Magenta (Rhodamin B). Die verschiedenen Ausbreitungsweiten des *Lacquers* im Papier sind durch die gelben Linien dargestellt. Die Bildausschnitte auf der rechten Seite zeigen die Fotoaufnahmen aus Abbildung 4-13.

Die CLSM-Aufnahmen (Abbildung 4-21) zeigen die Oberfläche verschiedener ortsdefinierte NCPHM. Wie zuvor in Abschnitt 4.3.2 beschrieben und in Abbildung 4-17 gezeigt, werden mit *Lacquern* mit einem niedrigerem NC-Gehalt größere Linienbreiten erhalten, als bei NC-*Lacquern* mit hohen Anteilen. Dies kann ebenfalls bei der Untersuchung der Materialien mittels CLSM (Abbildung 4-21) bestätigt werden. Die größte Linienbreite ist bei einem NC-Gehalt von 3,5% (w/w) zu erkennen (Abbildung 4-21 a), wobei die Linienbreite bei der Verwendung des 7,0% (w/w) NC-*Lacquers* (Abbildung 4-21 c) am geringsten ist. Bei allen drei Dosierungen kann beobachtet werden, dass es zwei Ausbreitungsweiten des *Lacquers* zu geben scheint. Dies war bei den Fotoaufnahmen zuvor nicht zu beobachten. Das Auftreten verschiedener Ausbreitungsweiten könnten mehrere Ursachen haben.

Zur Herstellung der NCPHM wurde gemäß Abschnitt 8.10 der NC-*Lacquer* mit Rhodamin B versetzt, um diesen anzufärben. Dabei wird der gesamte *Lacquer* gefärbt, aber keine spezifische Anfärbung der NC erzielt. Das verwendete Rhodamin B ist sowohl in den Lösemitteln, als auch den Nichtlösemitteln löslich. Dies bedeutet, dass der komplette *Lacquer* gefärbt ist und sich Rhodamin B überall niederschlägt, wo der *Lacquer* mit dem Papier in Kontakt gekommen ist, auch unabhängig von der abgeschiedenen NC. Der Äußere Rand der gedruckten Linie (gelbe Linie) könnte demnach durch Rhodamin B gefärbtes Lösemittel und Nichtlösemittel zustande kommen, auch in Abwesenheit von NC. Der innere Rand der Beschichtung (gelbe gestrichelte Linie) könnte im Umkehrschluss den Rand des tatsächlich mit NC beschichteten Bereiches darstellen. Um diese These zu überprüfen, müssten die Hybridmaterialien in Wasser eingelegt werden, um unspezifisch adsorbiertes Rhodamin von den Fasern zu entfernen. Das Rhodamin B im inneren der Linie, sollte sich nicht auswaschen lassen, da davon ausgegangen werden könnte, dass ein gewisser Anteil an Rhodamin von NC eingeschlossen wird und nicht zugänglich für das Extraktionsmedium sein sollte. Sollte bei der Extraktion der äußere Rand entfernt werden können, so würde dies die These stützen.

Eine weitere Ursache der Ausbildung zweier Randbereiche könnte auf die Ausbildung poröser Strukturen der NC zurückzuführen sein. Die Ausbildung dieser Strukturen ist ein komplexer Prozess, welcher abhängig ist von Faktoren wie z.B. der Trocknungstemperatur, der Luftfeuchtigkeit und der *Lacquer* Zusammensetzung. Vor allem bei der Auftragung mittels Kanüle legt der NC-*Lacquer*, wie in Abbildung 4-15 dargestellt, nach der Applikation eine größere Distanz

innerhalb des Papiers zurück. Dabei kann bereits während der Verteilung des *Lacquers* im Papier die Porenbildung einsetzen, wodurch sich möglicherweise verschiedene Strukturen entlang der Ausbreitungsrichtung ausbilden. Vermutlich entsteht der außenliegende Bereich aus einer dünnen und homogenen NC-Beschichtung auf den Fasern. Am innenliegenden Rand findet vermutlich ein Übergang von der homogenen Faserbeschichtung zur Ausbildung von porösen NC-Strukturen statt. Diese These könnte durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Proteinen, welche an der NC binden können, untersucht werden. Durch Einlegen der Membranmaterialien in z.B. FITC-BSA Lösung oder mittels Etablieren eines Fluidflusses von FITC-BSA-Lösungen durch die gedruckte Linie kann die Aufnahme des Proteins durch die NC untersucht werden. Bindet das Protein an der gesamten Linienbreite bis hin zum äußeren Rand, so würde dies für unterschiedliche NC-Strukturen (glatt/homogen vs. porös) entlang der Linienbreite sprechen. Sollte nach dem Fluidfluss das FITC-BSA nur im inneren Bereich zu erkennen sein, so würde es für die zuerst genannte These sprechen (adsorbiertes Rhodamin an Fasern ohne NC).

Im Rahmen der Untersuchungen zur Proteinbindung an ortsdefinierten NCPHM (Abschnitt 6.1) konnten Beobachtungen gemacht werden, welche die These der unterschiedlichen NC-Strukturen entlang der gedruckten Linie stützen. In Abbildung 6-2 sind CLSM-Aufnahmen dargestellt, bei denen die Proteinbindung an einer aufgedruckten NC-Linie untersucht wird. Bei den Aufnahmen nach dem Fluidfluss mit FITC-BSA ist zu erkennen, dass das Protein komplett und auf der vollen Breite der NC-Linie an die NC gebunden wird. Am Ende des Streifens ist weder Protein zu erkennen, noch abgelöstes Rhodamin B. Würde am Ende des Streifens Rhodamin B aufkonzentriert werden so würde das die These stützen, dass der äußere Rand der ortsdefinierten NCPHM durch adsorbiertes Rhodamin an den Papierfasern zustande kommt, ohne dass sich dort NC niederschlägt. Die Abwesenheit von Rhodamin B am Ende des Streifens und die Bindung von FITC-BSA über die gesamte mit NC beschichtete Fläche spricht dafür, dass entlang der Linienbreite verschiedene NC-Strukturen vorliegen müssen.

Detailaufnahmen aus den verschiedenen Bereichen der aufgedruckten NC-Linien sind in Abbildung 4-22 dargestellt.

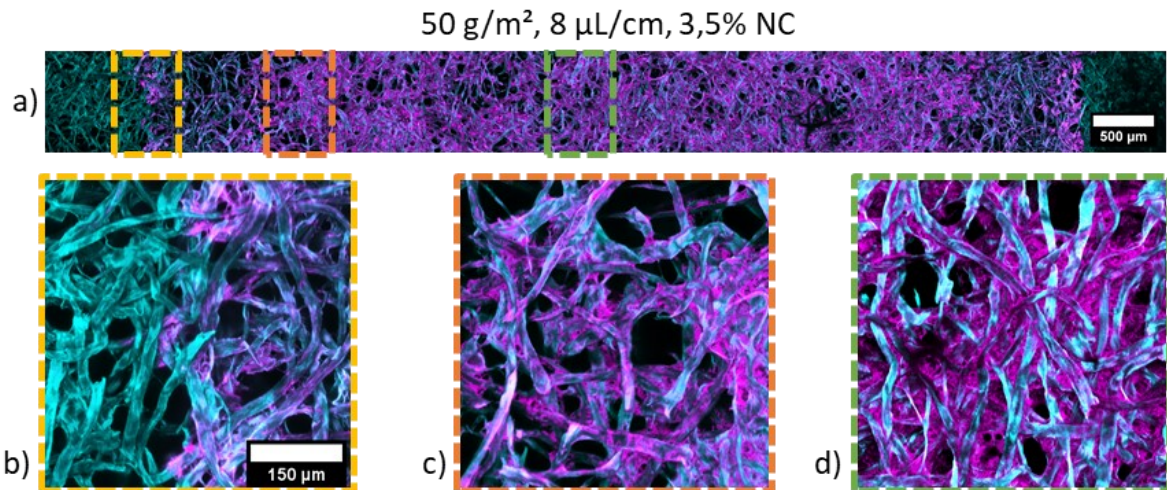


Abbildung 4-22: CLSM-Aufnahmen (Maximalprojektion) der Probenoberfläche (Draufsicht) von ortsdefinierte NCPHM hergestellt auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren bei einer Dosierung von 8 μL/cm und einem NC-Anteil von 3,5% (w/w). Die Applikation des *Lacquers* erfolgte mittels einer Kanüle. Auf der Probenübersicht a) sind drei verschiedene Bereiche hervorgehoben. Von diesen Bereichen sind Detailaufnahmen dargestellt. b) äußerer Rand des Hybridmaterials (gelb), c) innenliegender Randbereich (Orange) und d) mittlerer Bereich des Materials, direkt im Bereich der *Lacquer* Applikation. Die Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgebrachte NC-*Lacquer* in Magenta (Rhodamin B). Der Skalierungsbalken für die Übersicht a) ist 500 μm, der Skalierungsbalken in b) ist gültig für b) – d) und beträgt 100 μm.

Detailaufnahmen aus den verschiedenen Bereichen der aufgedruckten NC-Linien sind in Abbildung 4-22 dargestellt. Die Aufnahme des äußeren Randbereichs (Abbildung 4-22 b) zeigt den Übergang vom unbeschichteten Papier (Cyan) zum mit NC beschichteten Bereich (Magenta). Anhand der Aufnahme ist zu erkennen, dass die NC homogen auf den Fasern verteilt ist. Es können keine porösen Strukturen auf der Faseroberfläche oder in den Faserzwischenräumen beobachtet werden. Eine Betrachtung des inneren Randbereichs (Abbildung 4-22 c) zeigt, dass es zur Ausbildung poröser Strukturen der NC kommt. Auf den Faseroberflächen und in Bereichen von Faserkreuzungspunkten sind poröse Strukturen erkennbar. Diese füllen allerdings nicht die Makroporen im Fasernetzwerk aus. Im Zentrum der aufgebrachten Linie (Abbildung 4-22 d) sind wesentlich mehr poröse Strukturen im Vergleich zu den Randbereichen erkennbar. Die porösen Bereiche befinden sich auf der Faseroberfläche, den Faserkreuzungspunkten und Großteils auch in den Makroporen. Letztere werden allerdings nicht vollständig gefüllt.

Die Detailaufnahmen entlang der Linienbreite verdeutlichen, dass die porösen Strukturen sich nicht gleichmäßig entlang der gesamten Breite verteilen. Die Ausbildung von porösen Strukturen nimmt vom Ort der *Lacquer*-Applikation (Abbildung 4-22 d) hin zu den äußeren Bereichen ab. Dies kommt vermutlich durch eine Änderung der *Lacquer*-Zusammensetzung aufgrund von Verdunstungseffekten während der Verteilung im Papier. Ebenfalls könnte eine Änderung der *Lacquer*-Zusammensetzung aufgrund von unterschiedlichen Eindringgeschwindigkeiten der einzelnen *Lacquer*-Komponenten in das Fasergefüge der Grund für eine Ungleichverteilung der porösen Strukturen sein. Die unterschiedlichen flüssigen Bestandteile des *Lacquers* haben verschiedene Oberflächenspannungen, dies sollte unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten der einzelnen Bestandteile zu Folge haben. Bei Botta et al.^[139,140] wurden der Einfluss der Oberflächenspannung und Viskosität auf die radiale Flüssigkeitsaufnahme von applizierten

Flüssigkeitstropfen auf Papieren untersucht. Die Materialeigenschaften der untersuchten Flüssigkeiten sind in Tabelle 4-3 dargestellt. Es wurde festgestellt, dass Flüssigkeiten mit einer geringeren dynamischen Viskosität wie Aceton (0,306 mPa s) und Wasser (0,89 mPa s) eine größere Ausbreitungsgeschwindigkeit in Papier aufweisen, als Flüssigkeiten mit einer höheren Viskosität, wie z.B. Isopropanol (1,96 mPa s) und Glycerin (648 mPa s). Die bei Botta et al. ^[139,140] untersuchten Flüssigkeiten sind ebenfalls Bestandteile der verwendeten NC-Lacquer. Überträgt man deren Erkenntnisse auf die Ausbreitung des Lacquers im Papier, so kann angenommen werden, dass sich die einzelnen Bestandteile unterschiedlich schnell im Papier ausbreiten könnten. Dies bedeutet, dass sowohl Aceton und auch Wasser schneller aus dem Lacquer in die Fasern aufgenommen werden und dadurch ein höherer Anteil organischer Nichtlösemittel zurückbleibt. Dies könnte eine Ausbildung von porösen NC-Strukturen begünstigen. Eine voraussetzende Wasser/Aceton-Fließfront könnte in der Lage sein, NC mit sich zu führen, welche sich dann aufgrund von einem gestörten Lösemittel/Nichtlösemittel-Verhältnis als homogener Film auf den Fasern abscheidet. Die Erkenntnisse von Botta et al. ^[139,140] übertragen auf die hier durchgeführten arbeiten können die Ausbildung unterschiedlicher NC-Strukturen entlang der aufgedruckten Linienbreite erklären.

Tabelle 4-3: Materialeigenschaften der bei Botta et al. ^[140] verwendeten Flüssigkeiten.

	Dichte / g/mL	Dynamische Viskosität bei 20 °C / mPa s	Oberflächenspannung / mN/m
DI Wasser	0,997	0,89	72,2
Aceton	0,791	0,306	23,7
Isopropanol	0,781	1,96	21,79
Glycerin	1,26	648	63,4

Neben der Betrachtung der Oberflächen der ortsdefinierten NCPHM, wird ebenfalls die Verteilung der NC im Hybridmaterial untersucht. Hierfür wurden Querschnittsproben der Hybridmaterialien wie in Abschnitt 8.11 beschrieben hergestellt und mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Die Querschnitte sind in Abbildung 4-23 dargestellt.

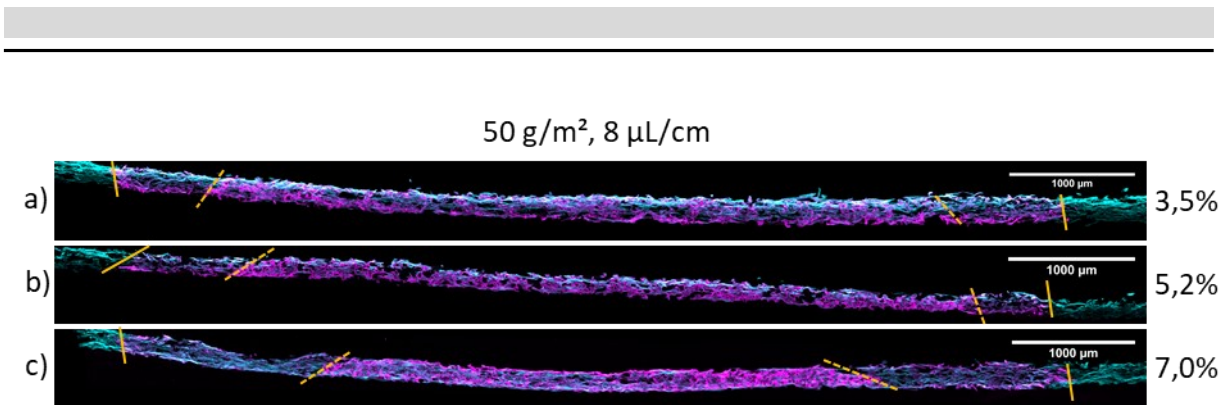


Abbildung 4-23: CLSM-Aufnahmen (Maximalprojektion) der Probenquerschnitte von ortsdefinierten NCPHM hergestellt auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren bei einer Dosierung von 8 µL/cm. Die NC-Anteile der *Lacquer* wurden variiert. Diese sind a) 3,5%, b) 5,2% und c) 7,0% (w/w). Die *Lacquer* wurden mittels einer Kanüle aufgebracht. Die Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgebrachte NC-*Lacquer* in Magenta (Rhodamine B). Die verschiedenen Ausbreitungsweiten des *Lacquers* im Papier sind durch die gelben Linien dargestellt.

Analog zu den Aufnahmen der Materialoberfläche (Abbildung 4-21), lassen sich bei den Querschnittsproben (Abbildung 4-23) ebenfalls einen inneren und äußeren Randbereich der Beschichtung im Papier erkennen. Die Ausbildung dieser Randbereiche wurde zuvor diskutiert. Bei allen Dosierungen scheint die maximale Ausbreitungsweite der Beschichtung annähernd identisch zu sein. Die Breite des inneren Bereiches ist beim Hybridmaterial mit einem NC-Anteil von 5,2% (w/w) am größten und nimmt mit zunehmenden NC-Anteil ab. Beim Hybridmaterial mit einem NC-Anteil von 7,0% (w/w) ist zudem eine poröse aber geschlossene Beschichtung der Materialoberfläche zu erkennen. Diese zeigt sich am oberen Rand des Hybridmaterials durch eine deutliche Anhäufung von NC.

Anhand des Hybridmaterials auf 50 g/m² Papier mit einer Dosierung von 8 µL/cm und einem NC-Anteil von 3,5% (w/w) werden die Randbereiche im inneren des Materials näher untersucht. Die Detailaufnahmen dazu sind in Abbildung 4-24 illustriert.

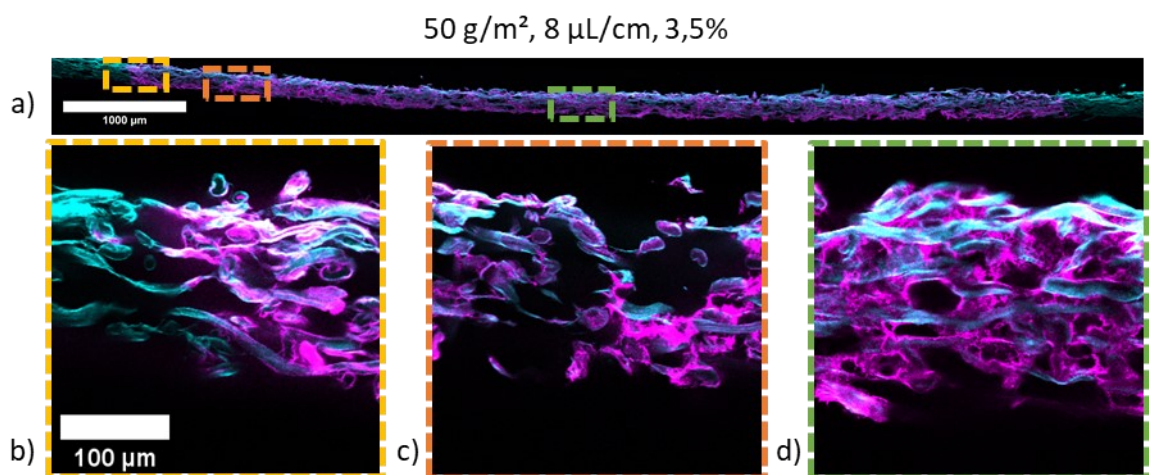


Abbildung 4-24: CLSM-Aufnahmen (Maximalprojektion) des Probenquerschnitts von ortsdefinierte NCPHM hergestellt auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren bei einer Dosierung von 8 µL/cm und einem NC-Anteil von 3,5% (w/w). Die Applikation des *Lacquers* erfolgte mittels einer Kanüle. Auf der Probenübersicht a) sind drei verschiedene Bereiche hervorgehoben. Von diesen Bereichen sind Detailaufnahmen dargestellt. b) Äußerer Rand des Hybridmaterials (Gelb), c) innenliegender Randbereich (Orange) und d) mittlerer Bereich des Materials, direkt im Bereich der *Lacquer* Applikation. Die Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgebrachte NC-*Lacquer* in Magenta (Rhodamin B). Der Skalierungsbalken für die Übersicht a) ist 1000 µm, der Skalierungsbalken in b) ist gültig für b) – d) und beträgt 100 µm.

Im Übersichtsbild (Abbildung 4-24 a) sind die inneren Randbereiche (Gelb und Orange) sowie der zentrale Bereich der *Lacquer*-Applikation auf das Papier (Grün) markiert. Die Detailaufnahmen sind in Abbildung 4-24 b)-c) dargestellt. Der äußere Randbereich (Abbildung 4-24 b) zeigt das Hybridmaterial im Querschnitt. Im linken Teil des Bildausschnittes ist das blanke Baumwoll-Linters-Papier (Cyan) ohne NC-Beschichtung zu sehen. Im rechten Teil ist der Anfang der Beschichtung zu erkennen. Die NC (Magenta) umgibt die Fasern und bildet eine gleichmäßige Oberflächenbeschichtung aus. Dabei dringt diese auch in das Innere der Fasern ein. Eine Ausbildung von porösen Strukturen ist nicht zu beobachten. Am innenliegenden Randbereich (Abbildung 4-24 c) ist ein Übergang von gleichmäßig beschichteten Fasern zu einer porösen Beschichtung auf den Fasern und an den Faserkreuzungspunkten bzw. Zwischenräumen erkennbar. Auf der linken Seite des Bildausschnitts sind die Fasern noch rein oberflächlich und gleichmäßig beschichtet. Eine beginnende Ausbildung der porösen Strukturen ist im rechten Bildausschnitt erkennbar. Ein Blick ins Zentrum der aufgetragenen Linie (Abbildung 4-24 d) zeigt, dass das Hybridmaterial an dieser Stelle deutlich mehr NC enthält, als in den zuvor gezeigten Randbereichen. Direkt im Bereich des *Lacquer* Auftrags ist eine deutliche Porenbildung der NC zu erkennen. Diese füllt einen großen Teil der Makroporen und ummantelt scheinbar die Fasern vollständig. Eine geschlossene NC-Schicht auf der Probenoberfläche ist nicht zu erkennen.

Zu besserer Vergleichbarkeit sind in Abbildung 4-25 die Querschnittsaufnahmen im Bereich des *Lacquer* Auftrags dargestellt.

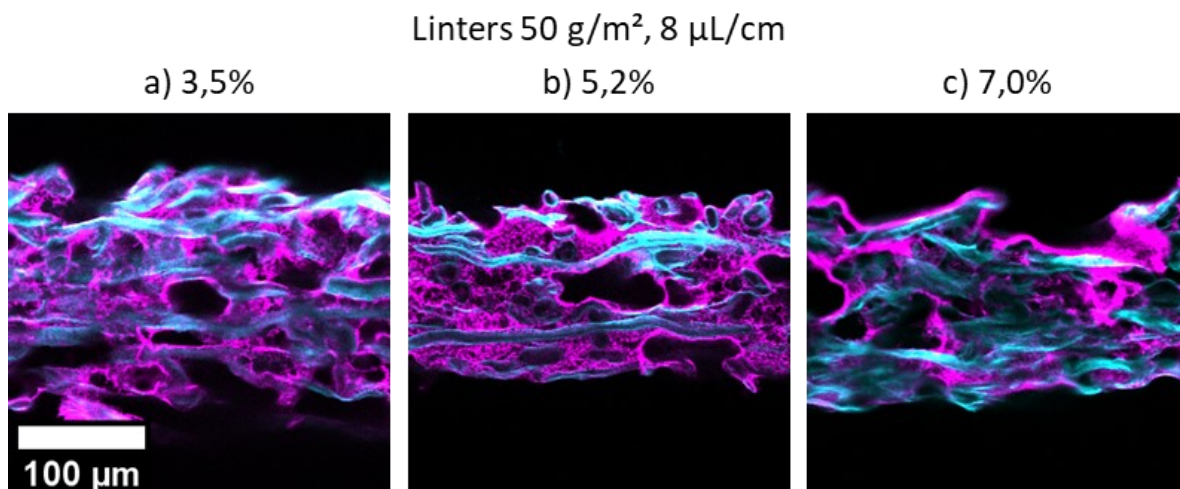


Abbildung 4-25: Querschnittsaufnahmen (CLSM) von ortsdefinierten NCPHM hergestellt auf 50 g/m² Papieren mit einer Dosierung von 8 μL/cm und variierenden NC-Anteilen von a) 3,5%, b) 5,2% und c) 7,0%. Die Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgetragene NC-*Lacquer* in Magenta (Rhodamin B). Der Skalierungsbalken in a) entspricht 100 μm und gültig für alle abgebildeten Aufnahmen.

Die zentralen Bereiche der Hybridmaterialien sind im Querschnitt in Abbildung 4-25 dargestellt. Wie bereits zuvor beobachtet, wird im Bereich des *Lacquer* Auftrags immer eine poröse Struktur der NC im Material enthalten. Die Strukturen der NC-Anteile von 3,5% und 5,2% (Abbildung 4-25 a, b) weisen vergleichbare Strukturen auf. In beiden Fällen ist keine vollständige Bedeckung der Materialoberfläche durch NC zu erkennen. Bei der Verwendung von höher dosierten NC-*Lacquern* (7,0%) kann zudem eine Bedeckung der Materialoberfläche auf dem Hybridmaterial beobachtet werden (Abbildung 4-25 c).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mittels CLSM-Aufnahmen eine Ausbildung von unterschiedlichen Strukturen der NC im Fasergefüge kommt. Das Vorhandensein von gleichmäßig beschichteten Arealen, vor allem in den äußeren Bereichen der Hybridmaterialien konnte mittels dieser Methode bestätigt werden. In den zuvor angefertigten Fotoaufnahmen (Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14) war dies nicht zu erkennen. Neben der rein oberflächlichen Materialverteilung konnte auch die Verteilung innerhalb des Papiers beschrieben werden. Beim Auftragen der NC-Lacquer auf Papier kommt es zu einem vollständigen Einsaugen des Lacquers und Verteilung dessen durch den kompletten Papierquerschnitt hinweg. Die Ausbildung von porösen Strukturen kann sowohl an der Papieroberfläche, als auch im inneren der Makroporen des Fasernetzwerks sowie den unteren Bereichen der Papiere beobachtet werden. Bei höheren NC-Anteilen der Lacquer ist zudem eine vollständige Bedeckung der Papieroberfläche mit poröser NC zu beobachten.

Elektronenmikroskopische Charakterisierung von ortsdefinierten NCPHM

Zur Charakterisierung der Materialoberfläche wurden zusätzlich zur Konfokalmikroskopie die Elektronenmikroskopie zur Beschreibung der Oberfläche verwendet. Die Elektronenmikroskopie zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass sie eine oberflächensensitive Mikroskopiemethode ist. Nachteilig ist allerdings, dass sich bei den beiden chemisch sehr ähnlichen Hybridkomponenten (Papier und NC) keine Unterscheidung der einzelnen Komponenten (z.B. durch EDX Analysen oder BSE-Materialkontrast) möglich ist. Eine Differenzierung zwischen Faser und NC kann nur aufgrund der Morphologischen unterschiede erahnt und abgeschätzt werden. Eine homogene Membranoberfläche mit gleichbleibenden proteinbindenden und mikrofluidischen Eigenschaften ist essenziell für sensitive diagnostische Assays.

Im Nachfolgenden werden mittels Elektronenmikroskopie die zentralen Bereiche der Hybridmaterialien im Bereich des Lacquer-Auftrags betrachtet. Die dargestellten Aufnahmen sind jeweils repräsentativ für die untersuchten Proben und sind in Abbildung 4-26 dargestellt.

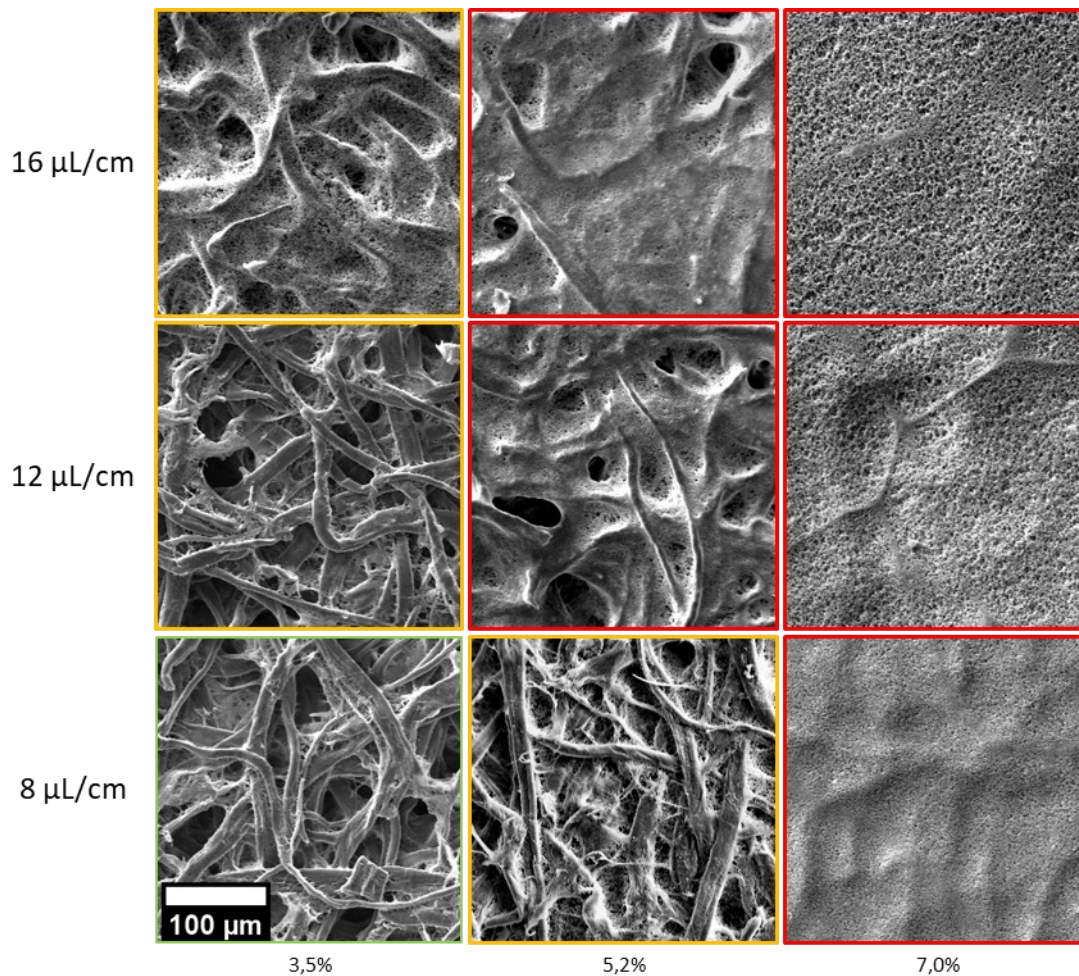


Abbildung 4-26: REM-Aufnahmen bei 300-facher Vergrößerung von ortsdefinierten NCPHM hergestellt auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren. Der NC-Lacquer wurde mittels einer Kanüle appliziert. Die NC-Anteile im Lacquer waren 3,5%, 5,2% und 7,0% (w/w) und die Dosierungen 8 µL/cm, 12 µL/cm und 16 µL/cm. Der Skalierungsbalken entspricht 100 µm und ist gültig für alle Abbildungen. Die Farbkodierung der Abbildungen entspricht der Beurteilung der Homogenität der Linien wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben.

Die REM-Aufnahmen der zentralen Bereiche der Hybridmaterialien im Bereich des *Lacquer*-Auftrags sind in Abbildung 4-26 dargestellt. Zu sehen sind die verschiedenen Dosierungen des *Lacquers* bei verschiedenen NC-Anteilen auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren, aufgebracht mit einer Kanüle. Die farbliche Kodierung der Bildausschnitte entspricht der Beurteilung der Linienhomogenität wie in Abschnitt 4.3.2 diskutiert. Die fotografische Beurteilung der Linien (Abschnitt 4.3.2) zeigte für die niedrigste Dosierung und NC-Anteil eine homogene Verteilung der Beschichtung und eine konstante Linienbreite. Die exemplarische REM-Aufnahme (Bildausschnitt 300 x 300 µm) zeigt, dass die Papieroberfläche nicht vollständig mit NC bedeckt ist. Die applizierte NC ist überwiegend zwischen den Fasern und an den Faserzwischenräumen lokalisiert und bildet poröse Strukturen aus. Die Makroporen des Materials sind größtenteils offen und nicht mit NC ausgefüllt. Bei einer höheren Dosierung von 12 µL/cm des *Lacquers* mit 3,5% (w/w) NC-Anteil ist eine deutliche Zunahme an NC-Abscheidung zu erkennen. Die Faseroberfläche wird noch nicht vollständig mit NC überspannt und die Makroporen sind nicht gefüllt. Es kann eine homogene Verteilung der NC beobachtet werden. Erst bei einer Dosierung von 16 µL/cm (3,5% (w/w)) ist eine vollständige Bedeckung der Faseroberfläche mit poröser NC

zu beobachten. Diese überspannt die Faseroberfläche und auch die Makroporen, sodass annähernd eine Oberflächenstruktur entsteht, die konventionellen NC-Membranen ähnelt. Diese Strukturen können entlang der kompletten Linienbreite beobachtet werden.

Eine Erhöhung des NC-Anteils im *Lacquer* auf 5,2% (w/w) führt bei einer niedrigen Dosierung von 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ zu einer homogenen Beschichtung ohne vollständige Bedeckung der Papieroberfläche. An Faserkreuzungspunkten und in überwiegend gefüllten Makroporen des Papiers ist poröse NC erkennbar. Erst bei einer höheren Dosierung von 12 $\mu\text{L}/\text{cm}$ tritt eine Bedeckung der Faseroberflächen durch die NC auf. Die Oberfläche wird von der NC nur unvollständig überspannt. Es sind größere Fehlstellen erkennbar, welche sich über die komplette Linienbreite verteilen. Diese Inhomogenität lässt sich bereits bei der makroskopischen Begutachtung der Fotoaufnahmen in Abschnitt 4.3.2 erkennen. Bei einer noch höheren Dosierung (16 $\mu\text{L}/\text{cm}$) kommt es zur teilweise sehr dichten und wenig porösen Beschichtung, welche sich unregelmäßig über die komplette Beschichtungsfläche ausbreitet. Die Oberflächenstrukturen dieser inhomogenen Materialien stellen keine geeigneten alternativen Membranmaterialien für diagnostische Assays dar.

Wird hingegen ein *Lacquer* mit einem NC-Anteil von 7,0% (w/w) verwendet, so lassen sich auf dem 50 g/m² Papier über den Auftrag mit einer Kanüle keine homogen beschichteten Materialien mehr erhalten. Bei allen Dosierungen werden poröse Strukturen erhalten, welche das Fasernetzwerk vollständig überspannen. Die beschichteten Bereiche weisen häufig vollständig verdichtete Regionen ohne poröse Bestandteile auf. Vollständig verdichtete Bereiche ohne sichtbare Porosität sollten zu unregelmäßigem Fluidfluss führen oder diesen entlang des Materials unterbinden. Eine Untersuchung der innenliegenden Strukturen durch Querschnitte wurde nicht durchgeführt, da bereits die oberflächlichen Strukturen unzureichend für die Anwendung in Assays sind. Wie bereits in Abschnitt 4.3.2 diskutiert, werden weniger homogen beschichtete Materialien mittels der Applikation des *Lacquers* über eine Kanüle erhalten, als bei der Verwendung eines Dosierpinsels. Die REM-Aufnahmen der *Lacquer* Applikation über einen Dosierpinsel sind in Abbildung 4-27 dargestellt.

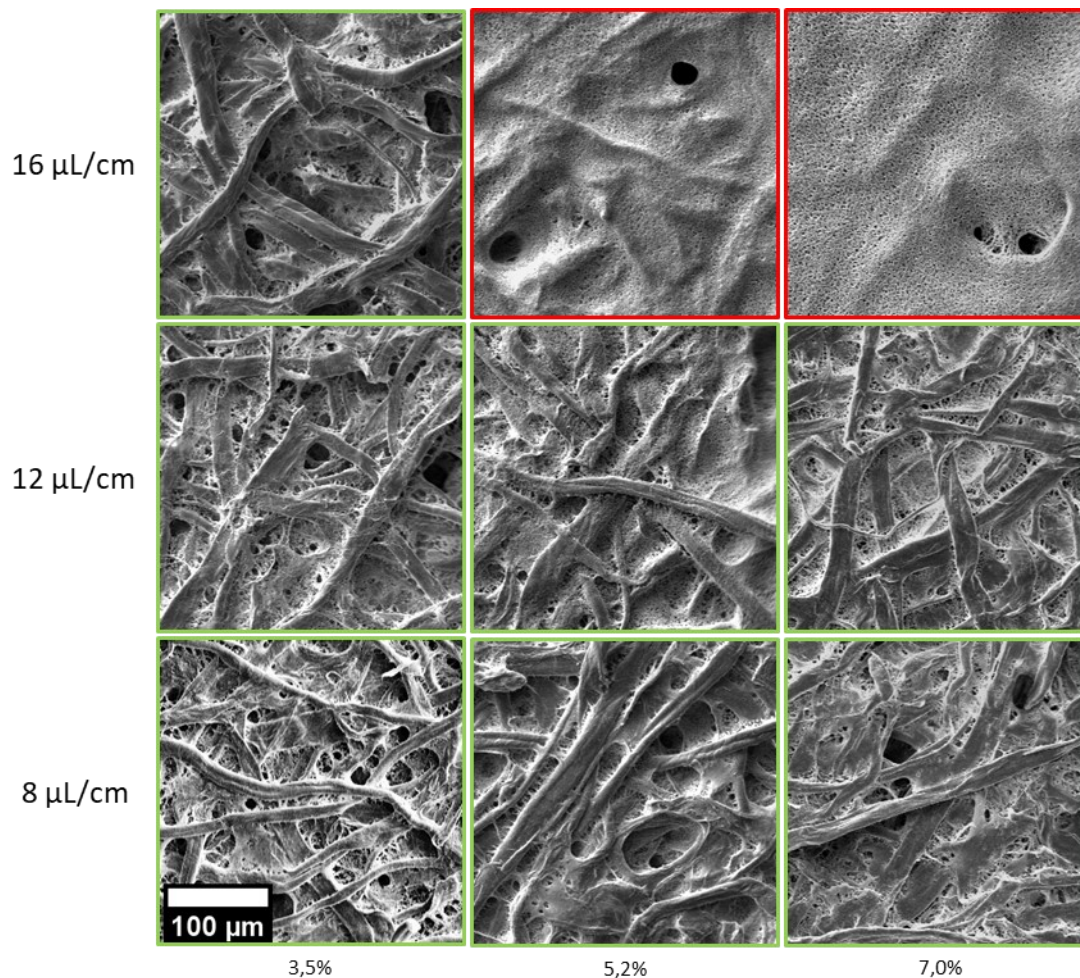


Abbildung 4-27: REM-Aufnahmen bei 300-facher Vergrößerung von ortsdefinierten NCPHM hergestellt auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren. Der NC-Lacquer wurde mittels eines Dosierpinsels appliziert. Die NC-Anteile im Lacquer waren 3,5%, 5,2% und 7,0% (w/w) und die Dosierungen 8 μL/cm, 12 μL/cm und 16 μL/cm. Der Skalierungsbalken entspricht 100 μm und ist gültig für alle Abbildungen. Die Farbkodierung der Abbildungen entspricht der Beurteilung der Homogenität der Linien wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben.

Unter Verwendung eines Dosierpinsels lassen sich auch wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, unter Verwendung von höheren Lacquer Dosierungen und NC-Anteilen ortsdefinierte NCPHM mit einer homogenen Materialverteilung erhalten.

Unabhängig der Dosierung und des NC-Anteils im Lacquer, ähnelt sich die Morphologie der verschiedenen Hybridmaterialien. Lediglich die Materialien mit einer Dosierung von 16 μL/cm bei einem NC-Anteil von 5,2% und 7,0% (w/w) weisen inhomogene Oberflächenstrukturen auf. Bei diesen hohen Dosierungen der Lacquer mit einer höheren Viskosität ist eine vollständige Bedeckung des Fasernetzwerks mit poröser NC zu erkennen, welche allerdings des Öfteren inhomogene Bereiche wie Löcher oder dichte NC-Beschichtungen aufweist. Die Inhomogenität dieser Linien und der Einfluss der Viskosität sowie der Art der Applikationsmethode wurde ein Abschnitt 4.3.2 ausführlich diskutiert.

Bei Verwendung von niedrigeren Dosierungen (bis max. 12 μL/cm) und niedrigeren NC-Anteilen, lassen sich homogen beschichtete Bereiche erhalten, bei denen die Fasernetzwerke nicht vollständig mit NC überspannt sind. Poröse NC-Strukturen finden sich vor allem in Bereichen

von Faserkreuzungen, an parallelverlaufenden Fasern mit geringem Abstand zueinander und in den Porenradien der Makroporen. Die applizierte Menge an NC kann diese ausreichend füllen. Bei höheren NC-Anteilen ist eine Zunahme der Füllung von Makroporen zu erkennen, allerdings ohne dass diese von NC überspannt werden. Die hier gezeigten Aufnahmen der homogen beschichteten ortsdefinierten NCPHM stellen alle mögliche Alternativen zu konventionellen NC-Membranen für diagnostisches Schnelltests dar.

4.3.5 Fazit zu ortsdefinierten NCPHM

Die Charakterisierung von ortsdefinierten NCPHM wurde in Abschnitt 4.3 thematisiert. Diese umfasst die Linienbreiten und Homogenität dieser mittels Fotoaufnahmen (Abschnitt 4.3.2). Die Vermessung der Linienbreiten zeigt, dass mit zunehmender Dosierung des NC-Lacquers, breitere Linien erhalten werden können. Die Breite der Linien nimmt ebenfalls mit sinkender Viskosität des Lacquers zu. Die Viskosität dessen steht im Zusammenhang zum NC-Anteil im Lacquer und sinkt mit einem sinkenden NC-Anteil. Wird ein Basispapier mit einer höheren Grammaturnummer verwendet, sind die Linienbreiten aufgrund der größeren Aufnahmekapazität des Papiers ebenfalls kleiner. Um die Materialien als alternative Membranmaterialien für diagnostische Schnelltests anwenden zu können, sollte die Linienbreite nicht unterhalb von 5 mm liegen, da dies dem Abstand zwischen der Test- und Kontrolllinie in Assays entspricht. Linienbreiten von >5 mm ließen sich bei allen NC-Anteilen bereits bei Dosierungen von mindestens $8 \mu\text{L}/\text{cm}$ erhalten. Die Homogenität der Beschichtungsbereiche wurde ebenfalls anhand Fotoaufnahmen beurteilt. Hierbei konnte unterschieden werden zwischen homogener Materialverteilung mit konstanter Linienbreite, homogener Materialverteilung bei inkonsistenter Linienbreite und inhomogener Materialverteilung bei konstanter oder inkonsistenter Linienbreite. Aus den Aufnahmen lassen sich allgemeingültige Zusammenhänge für homogene Membranmaterialien ableiten (Abbildung 4-16). Eine homogene Materialverteilung wird durch die Verwendung von Papieren mit höherer Grammaturnummer begünstigt. Zudem spielt die Auftragsbreite des Lacquers eine wichtige Rolle. Bei einer breitflächigen Auftragungsweise, z.B. über einen Dosierpinsel, lässt sich die Anzahl an homogen beschichteten Materialien im Rahmen der getesteten Parameter erhöhen. Bei der Variation des NC-Anteils erwiesen sich niedrigere NC-Anteile aufgrund der niedrigeren Viskosität des Lacquers als vorteilhaft für eine bessere Verteilung des Lacquers im Papier und somit für den Erhalt von homogen beschichteten Materialien. Ein geringes Dosiervolumen führt dazu, dass der Lacquer besser und gleichmäßiger vom Papier aufgenommen werden kann, als ein größeres aufgebracht Volumen.

Anhand der ermittelten Linienbreiten und der bekannten Zusammensetzung des Lacquers und der verwendeten Dosierung wurden in Abschnitt 4.3.3 die Beschichtungsmassen der ortsdefinierten NCPHM errechnet. Diese nehmen mit steigender Dosierung als auch steigenden NC-Anteilen im Lacquer zu. Die auf dem Papier deponierte Masse an NC ist im Vergleich zu konventionellen Membranmaterialien und zu vollflächig beschichteten NCPHM geringer. Besonders bei der Betrachtung der tatsächlich benötigten NC-Masse pro diagnostischem Assay, stellen ortsdefinierte NCPHM eine besonders NC einsparende Alternative zu den zuvor genannten Membrantypen dar.

Abschließend wurde in Abschnitt 4.3.4 die Morphologie der ortsdefinierten NCPHM mittels Konfokalmikroskopie und Elektronenmikroskopie untersucht. Mittels Konfokalmikroskopie

konnte gezeigt werden, dass es orthogonal zur Auftragsrichtung zu unterschiedlich ausgeprägten NC-Strukturen kommt. Im Randbereich der Auftragung wird eine eher gleichmäßige Beschichtung auf der Faseroberfläche erhalten, wohingegen in einem inneren Randbereich ein Übergang von gleichmäßiger Oberflächenbeschichtung zu porösen Strukturen stattfindet. Im Zentrum der *Lacquer*-Applikation werden poröse NC-Strukturen erhalten, welche unter anderem auch die Makroporen über die komplette Papierdicke auskleiden. Bei hohen NC-Anteilen im *Lacquer* wird zudem eine vollständige Beschichtung der Oberfläche beobachtet. Anhand von REM-Aufnahmen konnte erneut bestätigt werden, dass sich eine Auftragung des NC-*Lacquers* über einen Dosierpinsel vorteilhaft auf die homogene Verteilung der NC auf dem Papier auswirkt. Nur bei höheren Dosierungen und NC-Anteilen im *Lacquer* kommt es zu inhomogenen Beschichtungen, welche für die spätere Anwendung in diagnostischen Assays ungeeignet sind.

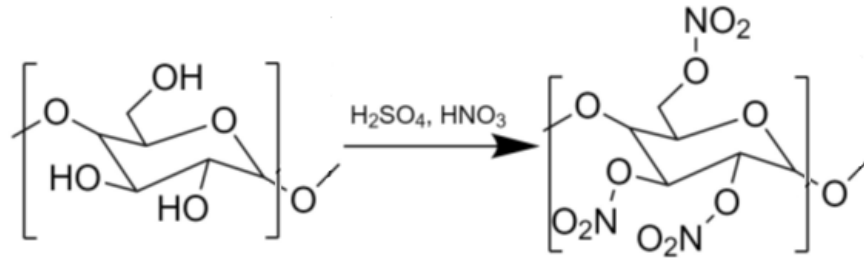
Eine Charakterisierung der mikrofluidischen Eigenschaften und die Anwendbarkeit in diagnostischen Assays werden in den Abschnitten 5.4 und 6.3 diskutiert.

4.4 Herstellung und Charakterisierung von CN-Papieren durch Veresterung von Baumwoll-Linters-Papieren

CN-Papiere bieten eine spannende und ernstzunehmende Alternative zu konventionellen NC-Membranen und NCPHM (vgl. Abschnitt 2.2.2). Wie in Abschnitten 2.2.2 und 0 erörtert, können durch eine reaktive Umsetzung von Papieren, CN-Papiere erhalten werden, welche ohne eine NC-Beschichtung als Membranmaterialien verwendet werden können. Die Herstellung der CN-Papiere ist hinsichtlich der Herstellungsparameter weniger komplex, als konventionelle NC-Membranen oder NCPHM. In den nachfolgenden Abschnitten wird die Herstellung (Abschnitt 4.4.1) und Charakterisierung (Abschnitte 4.4.1 - 4.4.7) der CN-Papiere beschrieben und diskutiert.

4.4.1 Herstellung von CN-Papieren durch Veresterung von Baumwoll-Linters-Papieren

Durch das Einlegen von Baumwoll-Linters-Papieren in eine Nitrierlösung aus Salpetersäure und Schwefelsäure ist eine Veresterung der Hydroxylgruppen der Cellulose zu erwarten.^[141] Der Substitutionsgrad beschreibt die Anzahl der umgesetzten Hydroxylgruppen in Nitratgruppen. Das Monomer der Cellulose ist β -D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$). Diese ist β -1,4-glycosidisch verknüpft (vgl. Abschnitt 1.4). Daraus ergibt sich strukturell die Wiederholeinheit der Cellobiose ($C_{12}H_{20}O_{10}$), welche das lineare Polysaccharid bilden.^[14] Pro Monomereinheit der Cellulose existieren zwei äquatorial angeordnete Hydroxylgruppen an C_2 und C_3 , sowie eine endständige CH_2OH -Gruppe (Schema 4-5). Diese drei Hydroxylgruppe können bei der säurekatalysierten Veresterungsreaktion mit Salpetersäure in Nitratgruppen überführt werden. Der maximal erreichbare Substitutionsgrad bei dieser Umsetzung liegt bei 3, was einem theoretischen Stickstoffgehalt von 14,14% entspricht.^[142] Real lässt sich ein maximaler Stickstoffgehalt von 13,50% erhalten.^[143] Das Reaktionsschema zur Umsetzung von Cellulose in Cellulosenitrat ist in Schema 4-5 dargestellt.



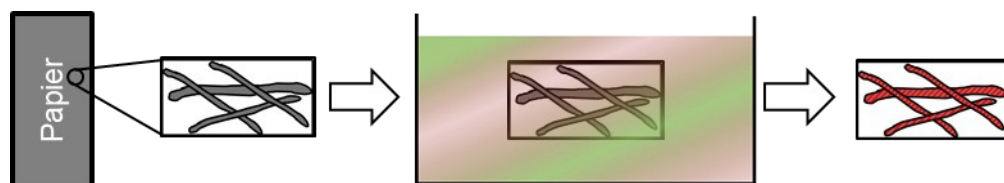
Schema 4-5: Reaktionsschema zur Umsetzung von Cellulose zu Cellulosenitrat. Abbildung erstellt mit Chemdraw.

Der Substitutionsgrad und Stickstoffgehalt kann durch die Zusammensetzung der Nitriersäure, der Reaktionsdauer und Reaktionstemperatur eingestellt werden.^[106,107] Anhand des Stickstoffgehalts, welcher durch Elementaranalyse ermittelt werden kann, lässt sich der Substitutionsgrad mittels Gleichung (6) errechnen.^[144]

$$DS = \frac{3,6 \cdot \text{Stickstoffgehalt}[\%]}{31,13 - \text{Stickstoffgehalt}[\%]} \quad (6)$$

Die potentiellen Anwendungsbereiche für Cellulosenitrat variieren je nach Stickstoffgehalt. Cellulosenitrat wird u.a. bei der Herstellung von Tischtennisbällen, als additiv in Farben und Lacken, in Klebstoffen, als Treibladung in Sprengstoffen und rauchschwachem Schießpulver, sowie als Membranmaterial in molekularbiologischen-, biochemischen-, analytischen- und diagnostischen Membranmaterialien verwendet.^[141] Bei hohen Stickstoffgehalten >12,75% liegt Cellulosetrinitrat vor, welches aufgrund der sehr leichten Entflammbarkeit und Explosionsfähigkeit als Schießbaumwolle bezeichnet wird.^[145] Unterhalb von 12,75% liegt Cellulosedinitrat vor, welches auch als Kollodiumwolle bezeichnet wird.^[142]

Im Gegensatz zu kommerziell hergestelltem, pulverartigem Cellulosenitrat, welches überwiegend als Additiv in Lösungen oder Lacken verwendet wird, ist ein Erhalt des Fasergefüges der eingelegten Baumwoll-Linters-Papiere angestrebt. Damit sollten auf diesem Weg erhaltenen Materialien direkt als Membranmaterial für diagnostische oder analytische Zwecke verwendet werden. Die Herstellung der CN-Papieren wird detailliert in Abschnitt 8.3 beschrieben und ist in Schema 4-6 dargestellt.



Schema 4-6: Darstellung der Herstellung von CN-Papieren durch Einlegen von Baumwoll-Linters-Papier für verschiedene Reaktionszeiten in Nitriersäurelösungen.

Die Oberflächenstruktur und Morphologie von CN-Papieren wurden mittels Elektronenmikroskopie untersucht (Abschnitt 4.4.2). Zum Nachweis der erfolgreichen Umsetzung der Papiere wurden IR-Spektroskopische Untersuchungen durchgeführt (Abschnitt 4.4.3). Anhand Elementaranalysen konnte der Stickstoffgehalt der Proben ermittelt und darüber der Substitutionsgrad berechnet werden (Abschnitt 4.4.4). Ferner wurde hinsichtlich der Anwendung von CN-Papieren in diagnostischen und analytischen Assays die Festigkeit der Papiere im trockenen und nassen Zustand untersucht (Abschnitt 4.4.6). Die Beständigkeit der Materialien gegenüber erhöhten Temperaturen, z.B. Trocknungsverfahren bei der Herstellung oder Sterilisation, wird in Abschnitt 4.4.7 diskutiert. Die mikrofluidischen Eigenschaften der Materialien wird in Abschnitt 5.5 thematisiert, die Anwendbarkeit der Materialien als alternatives Membranmaterial für diagnostische Schnelltests wird in Abschnitt 6.4 beschrieben.

4.4.2 Bestimmung der Oberflächenstruktur von CN-Papieren

Zur Beurteilung des Einflusses der Säureeinwirkung auf die Morphologie von Baumwoll-Linters-Papieren, wurden Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Proben angefertigt. Die Probenpräparation erfolgte wie in Abschnitt 8.9 beschrieben.

Die reaktive Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papieren soll zu CN-Papieren unter Erhalt der Faserstruktur bei gleichzeitiger Oberflächenmodifikation erfolgen. Dabei soll der Einfluss der Reaktionszeit auf die Oberflächenstruktur untersucht werden. Es ist zu erwarten, dass bei der reaktiven Umsetzung ganzer Baumwoll-Linters-Papiere die Faserstruktur erhalten werden kann und die resultierenden CN-Papiere in ihrer Form und Flexibilität den Ausgangspapieren ähneln.

Die REM-Mikrographen der reaktiven Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papieren mit einer Säuremischung mit einem Wasseranteil von 8% (w/w) sind in Abbildung 4-28 dargestellt.

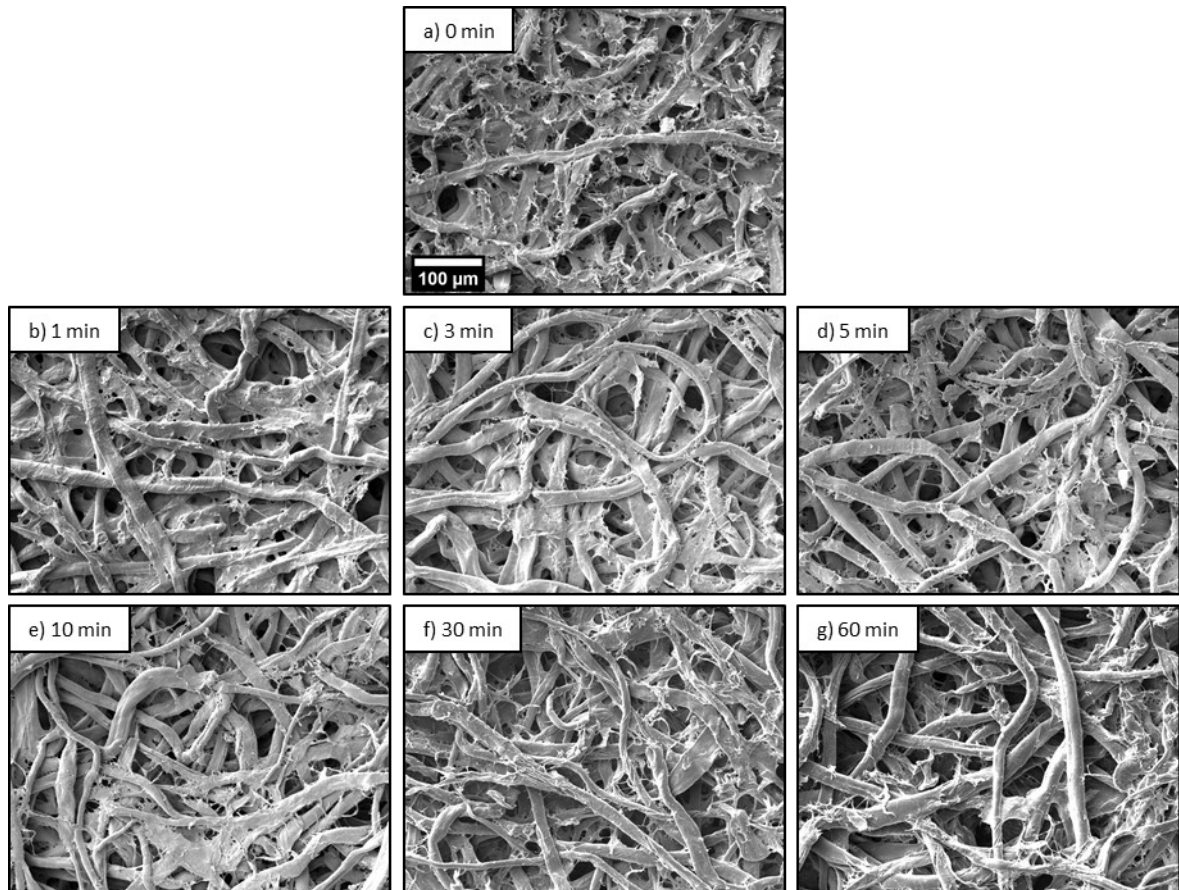
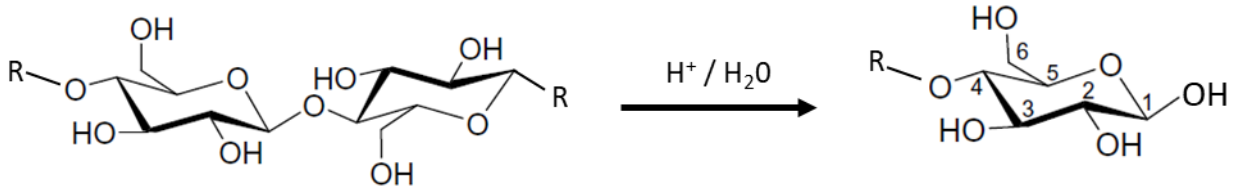


Abbildung 4-28: REM-Mikrographen bei mit 500-facher Vergrößerung von a) unbehandeltem Baumwoll-Linters-Papier und CN-Papieren hergestellt bei unterschiedlichen Einlegezeiten mit einer Säurelösung mit 8% (w/w) Wassergehalt b) – g). Der Skalierungsbalken bei a) ist gültig für alle gezeigten Aufnahmen.

Die unbehandelten Baumwoll-Linters-Papiere (Abbildung 4-28 a) zeigen ein offenporiges, homogenes Fasergewebe. Die Oberfläche der Papierfasern ist gezeichnet von Mikrofibrillen, welche von der Faseroberfläche abstehen. Die Faserzwischenräume sind Großteils mit Feinstoffen und Fibrillen gefüllt. Nach einer Einwirkzeit von 1 min in der Säurelösung mit einem Wassergehalt von 8% (w/w), sind deutliche Veränderungen zu erkennen (Abbildung 4-28 b). Die oberflächlichen Fibrillen erscheinen glatter und liegen nun mehr an der Faseroberfläche an. Die Faserzwischenräume sind nach wie vor durch Feinstoffe gefüllt. Nach 3 min Reaktionszeit verstärkt sich dieser Effekt, die Faseroberflächen wirken zunehmend glatter, was auf Abbaureaktionen der Fasern durch Spaltung der glykosidischen Bindungen hinweisen könnte (Schema 4-7).^[146] Die fibrillären Strukturen sind kaum noch sichtbar. Die Füllung der Faserzwischenräume ist geringer, und scheint mit steigender Reaktionszeit weiter abzunehmen. Nach 5 min liegen die Faserzwischenräume fast vollständig frei. Das Fasergefüge wirkt offenporiger. Auf den Faseroberflächen lassen sich wieder Fibrillen erkennen. Ab 10 Minuten tritt eine deutliche Rissbildung entlang der Faseroberfläche auf, welche mit fortschreitender Reaktionszeit zunimmt. Dadurch steigt der Anteil an fibrillenartigen Strukturen in den CN-Papieren wieder an.

Die säurekatalysierte Spaltungsreaktion der glykosidischen Bindungen der Cellulose ist Schema 4-7 dargestellt.



Schema 4-7: Bindungsspaltung einer Cellobioseeinheit durch Protonenangriff und nachfolgender Hydrolyse.

Die Veresterung von Baumwoll-Linters-Papier mit Nitriersäure lässt sich durch mehrere Prozesse beschreiben. Anfänglich werden Fibrillen und Feinstoffe vollständig zu Cellulosenitrat umgesetzt. Dies geht unter anderem mit einer Zersetzung der Faserbestandteile einher.^[147–149] Bei dieser Zersetzung kommt es zusätzlich zur Vernetzung zwischen Cellulose/Cellulosenitratketten. Dies spiegelt sich morphologisch in einer Glättung der Faseroberfläche wieder. Durch weitere Einwirkzeit der Nitriersäure schreiten diese Prozesse kontinuierlich fort. Nach der Umsetzung der äußerlichen und freiliegenden Cellulosebestandteile, dringt die Nitrierlösung über die Oberfläche in die Fasern ein. Durch die konzentrierte Schwefelsäure in der Nitrierlösung kommt es zum Wasserentzug in den Fasern.^[148] Das Aufdrehen der Fasern ist literaturbekannt und wurde bereits Mitte des 20. Jahrhunderts mit der Quellung der Cellulosefasern verbunden.^[150,151] Detailaufnahmen dieses Aufdrehens sind in Abbildung 4-29 dargestellt.

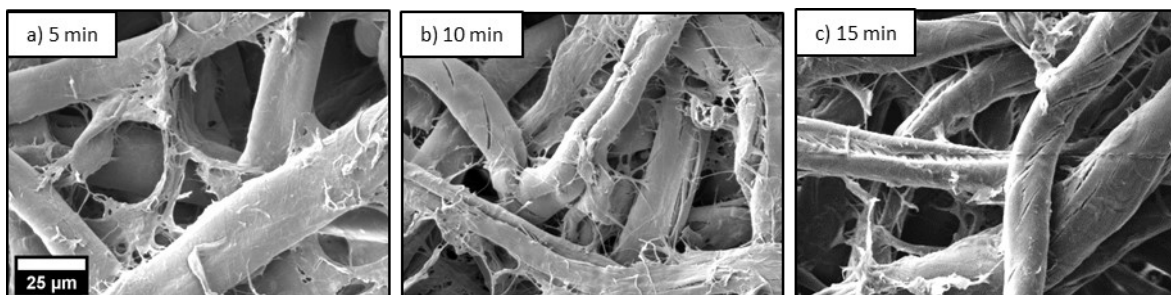


Abbildung 4-29: REM-Detaillaufnahmen bei 2000-facher Vergrößerung von CN-Papieren nach a) 5 min, b) 10 min und c) 15 min Reaktionszeit. Der Skalierungsbalken ist gültig für alle dargestellten Bilder.

Neben dem Aufdrehen wurde von Nikolsky et al.^[149] eine Zunahme der Faserdurchmesser mit zunehmender Reaktionszeit beobachtet. Diese Zunahme lässt sich im entfernteren Sinne ebenfalls bei der Umsetzung der Baumwoll-Linters-Papieren zu CN-Papieren erkennen. Der Verlauf der Faserdurchmesser ist in Abbildung 4-30 dargestellt. Die breite Verteilung der Faserbreiten ist typisch für

papierbasierte Materialien mit natürlichem Ursprung. Die Faserbreiten wurden an mehreren Stellen der Fasern gemessen. Pro Probe wurden 300 – 600 Faserbreiten ermittelt.

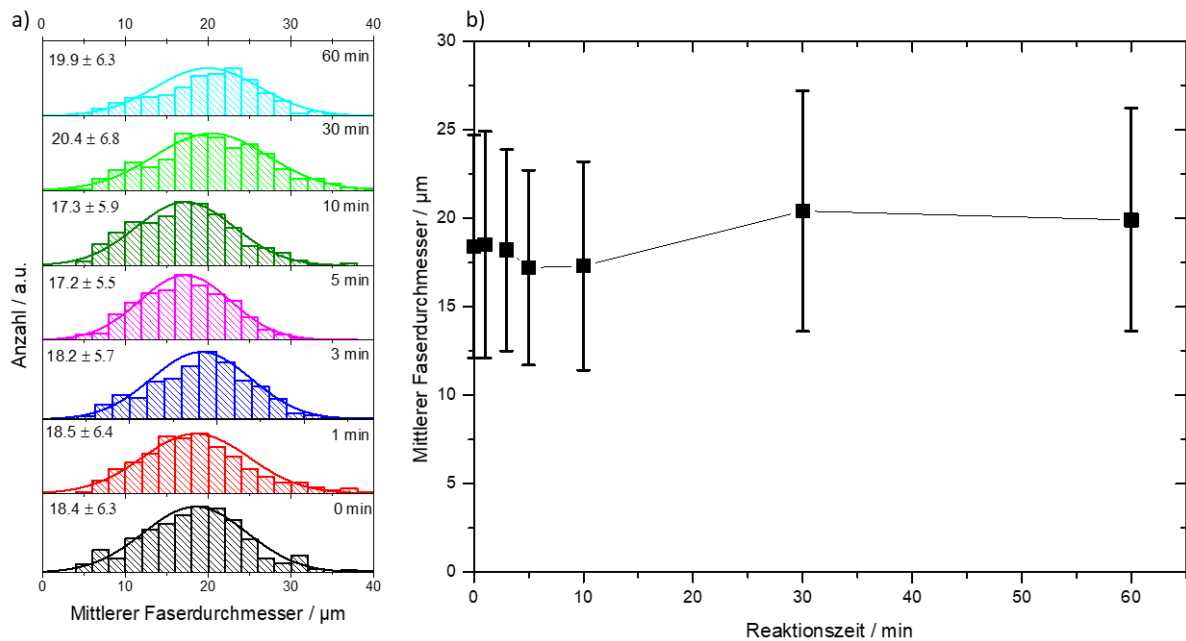


Abbildung 4-30: a) Mittlere Faserdurchmesser in Abhängigkeit zur Reaktionszeit. b) Die Faserdurchmesser wurden aus REM-Mikrographen ermittelt und gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

Die Auftragung der mittleren Faserdurchmesser gegen die Reaktionszeit zeigt eine anfängliche Reduktion des Faserdurchmessers. Dies ist auf den Abbau und die Zersetzung der äußeren Schichten und Mikrofibrillen der Fasern zu erklären. Dieser Prozess findet bis ca. 5 min Reaktionszeit statt. Bei höheren Reaktionszeiten kommt es zum Eindringen der Nitrierlösung in das Innere der Fasern. Dies geht mit einer Quellung des Faserinneren bzw. der internen Fibrillen einher. Diese Quellung führt zu einem Aufdrehen der Faser.

Die morphologischen Veränderungen von Baumwoll-Linters-Papier bei der Veresterung zu CN-Papieren entsprechen literaturbekannten Veränderungen.^[149] Das intakt gebliebene und offene Fasernetzwerk sollte entsprechend der Erwartungen (vgl. Abschnitt 2.2.2) als neuartiges Membranmaterial für diagnostische Assays geeignet sein. Die mikrofluidische Charakterisierung der Materialien wird in Abschnitt 5.5 diskutiert. Die Anwendbarkeit der Materialien in einem *Lateral-Flow-Assay* wird in Abschnitt 6.4 untersucht.

Da bei der Betrachtung der Oberflächenstrukturen der CN-Papiere kein deutlicher Einfluss des Wassergehalts erkennbar war, wurden nur die Materialien beschrieben, welche mit einem Wassergehalt von 8% (w/w) in der Säurelösung hergestellt wurden (Abbildung 4-28). Die REM-Mikrographen der CN-Papiere unter Verwendung der Säurelösung mit 19% (w/w) sind im Anhang (Seite 183) dargestellt.

4.4.3 Bestimmung der chemischen Oberflächenfunktionalität von CN-Papieren

Die chemische Funktionalität von CN-Papieren wurde mittels IR-Spektroskopie und Elementaranalysen untersucht. Die Veresterung von Baumwoll-Linters-Papieren wurde wie in Abschnitt

8.3 beschrieben mit zwei verschiedenen konzentrierten Nitriersäuren durchgeführt. Die Umsetzung der Cellulose zu Cellulosenitrat wird mittels Infrarotspektroskopie charakterisiert. Es ist zu erwarten, dass mit zunehmender Reaktionszeit eine Zunahme der Schwingungsbanden von Nitratgruppen zu sehen ist. Im Gegenzug ist eine Abnahme von OH-Schwingungsbanden der freien Hydroxid-Gruppen zu erwarten.

Baumwoll-Linters-Papiere bilden das Ausgangsmaterial für die Umsetzung von Cellulose zu Cellulosenitrat. Die IR-Spektren des Rohpapiers ist in Abbildung 4-31 dargestellt.

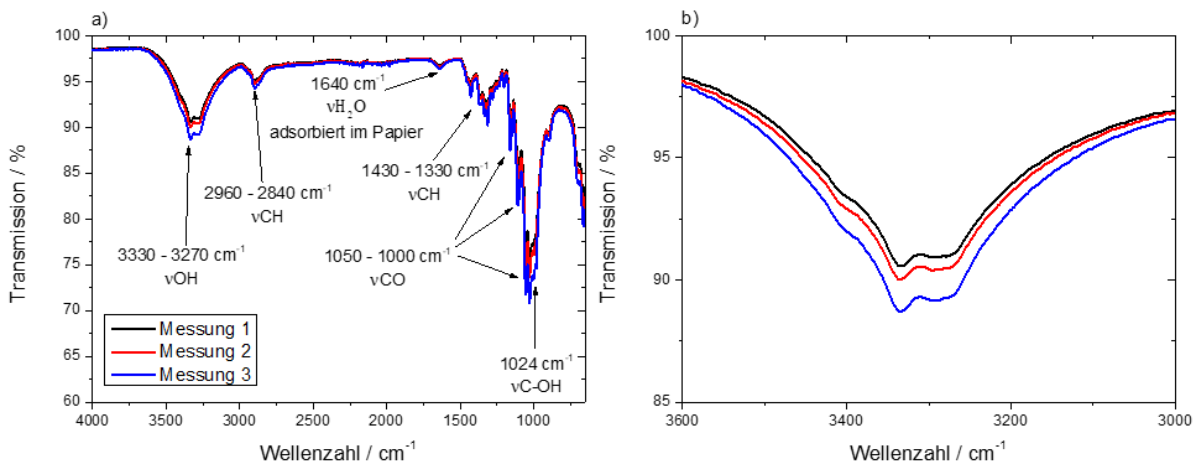


Abbildung 4-31: IR Spektren von Baumwoll-Linters-Papier, aufgenommen an drei verschiedenen Stellen der Probe. Die Streckschwingungen werden mit v abgekürzt. a) vollständiges IR Spektrum von Baumwoll-Linters-Papier. b) Spektrenausschnitt im Bereich von 3600 cm^{-1} – 3000 cm^{-1} im Bereich der OH-Schwingungsbanden.

Abbildung 4-31 a) zeigt die IR-Spektren des reinen Baumwoll-Linters-Papiers. Die Spektren wurden nicht auf eine Schwingungsbande normiert. Im Bereich von 3330 cm^{-1} – 3270 cm^{-1} sind Valenzschwingungsbanden der OH-Gruppen an C_2 , C_3 und C_6 der Cellulose zu erkennen. Die Zugehörigen C-O-Streckschwingungen sind bei 1050 cm^{-1} – 1000 cm^{-1} und die C-OH-Streckschwingungen bei 1024 cm^{-1} zu sehen. Die Schwingungen der C-H-Gruppen sind als Streck-schwingungen in den Bereichen von 2960 cm^{-1} – 2840 cm^{-1} sowie 1430 cm^{-1} – 1330 cm^{-1} zu erkennen. Neben diesen charakteristischen Schwingungsbanden für Cellulose ist eine zusätzliche Schwingungsbande bei 1640 cm^{-1} zu beobachten. Diese Streckschwingung stammt vermutlich von adsorbierten Wasser an die Cellulose. Abbildung 4-31 b) zeigt einen Ausschnitt des IR-Spektrums zwischen 3600 cm^{-1} – 3000 cm^{-1} der OH-Valenzschwingungen. Anhand dieses Ausschnitts wird deutlich, dass unterschiedliche Bereiche des identischen Materials zu unterschiedlich intensiven Schwingungsbanden führen können. Dies liegt am Funktionsprinzip der IR-Messung und der Struktur der Probe. Dies ist schematisch in Abbildung 4-32 dargestellt. Aufgrund des Messprinzips kommt es an unterschiedlichen Stellen der Probe zu unterschiedlichen Intensitäten in den IR Spektren.



Abbildung 4-32: Schematische Darstellung der Kristallabdeckung bei IR-Messungen bei porösen Baumwoll-Linters-Papieren. Geringer Anteil a) und hoher Anteil b) an Fasern im Bereich des Detektorkristalls.

Bei einem konstanten Anpressdruck bei der IR-Messung, können je nach Probenausschnitt ein geringerer (Abbildung 4-32 a) oder größerer Anteil (Abbildung 4-32 b) an Cellulosefasern in Kontakt mit dem Kristall auf der Messfläche des IR-Spektrometers zur Signalentstehung beitragen. Aus diesem Grund kann wie in Abbildung 4-31 b) eine Variation der Messwerte erkannt werden. Zur qualitativen Betrachtung der Messergebnisse ist diese Abweichung akzeptabel.

Die hergestellten CN-Papiere wurden ebenfalls mittels IR-Spektroskopie charakterisiert. In Abbildung 4-33 ist ein Vergleich des Spektrums von Baumwoll-Linters-Papier und CN-Papier dargestellt. Die gezeigten Spektren wurden nicht auf eine Schwingungsbande normiert.

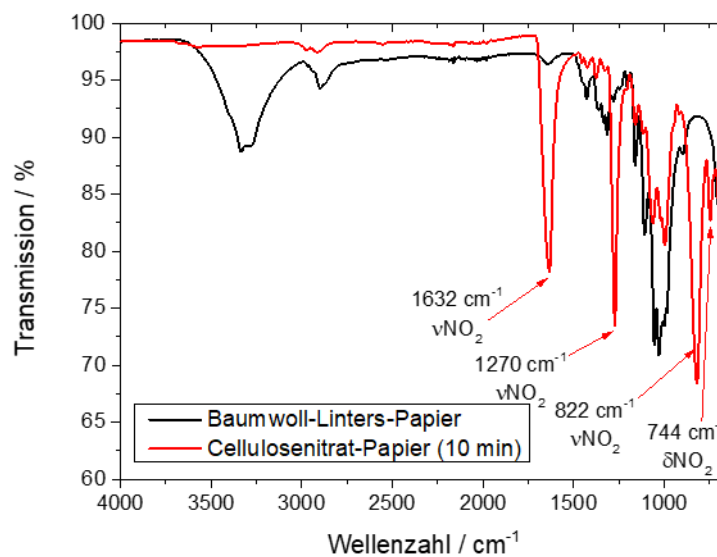


Abbildung 4-33: IR-Spektrum von Baumwoll-Linters-Papier (Schwarz) und CN-Papier (Rot), welches nach einer zehnmütigen Einwirkzeit in konzentrierter Nitriersäure erhalten wurde. Die Pfeile markieren die charakteristischen NO_2 -Streckschwingungen.

Das IR-Spektrum von CN-Papier zeigt keine OH-Schwingungsbanden im Bereich von 3330 cm^{-1} – 3270 cm^{-1} (Abbildung 4-33, Rot). Dies liefert Hinweise auf eine nahezu vollständige Veresterung der Hydroxylgruppen mit Salpetersäure. Die CH-Valenzschwingungen an C_2 , C_3 , C_5 und C_6 sind im Vergleich zu reinem Baumwoll-Linters-Papieren zu höheren Wellenzahlen verschoben. Bei $\sim 1632 \text{ cm}^{-1}$, 1270 cm^{-1} und 822 cm^{-1} liegen die charakteristischen Streckschwingungen

der NO₂-Gruppen vor. Die NO₂-Deformationsschwingungen sind bei 744 cm⁻¹ im Fingerprintbereich des Spektrums zu erkennen (Abbildung 4-33, Rot). Die Bandenzuordnung deckt sich mit der in der Literatur zu findenden Zuordnungen^[142,152].

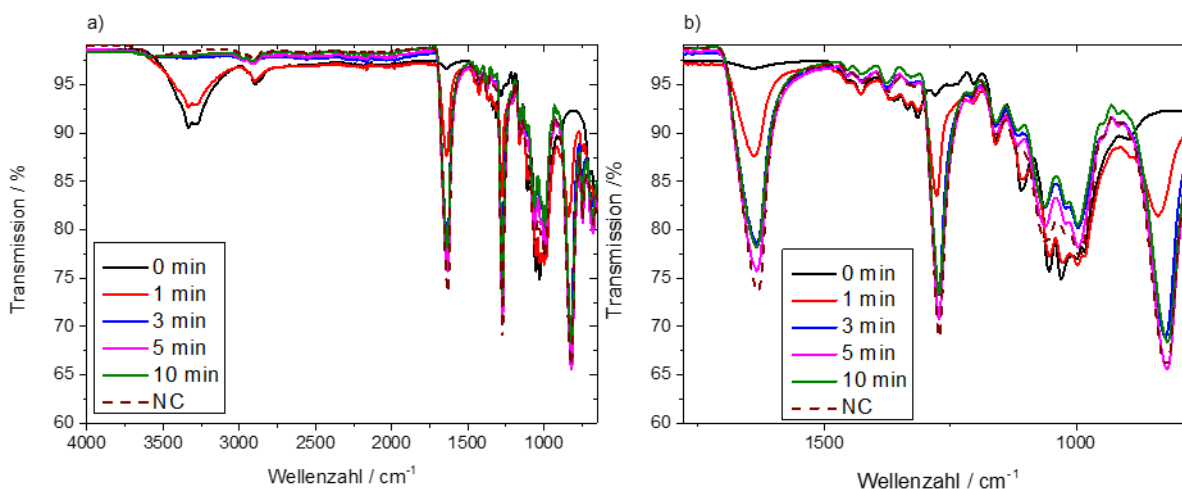


Abbildung 4-34: a) IR-Spektren von Baumwoll-Linters-Papier (Schwarz) und CN-Papieren hergestellt bei unterschiedlichen Reaktionszeiten in konzentrierter Nitriersäure mit einem Wassergehalt von 8% (w/w). Die Reaktionszeiten waren 1 min (Rot), 3 min (Blau), 5 min (Magenta) und 10 min (Grün). Zusätzlich ist das gemessene IR-Spektrum von NC dargestellt, welche für die Herstellung von NCPHM in den Abschnitten 8.2.1 und 8.2.2 verwendet wurde. b) Vergrößerter Ausschnitt der Spektren im Bereich von 1800 cm⁻¹ – 800 cm⁻¹ in dem die NO₂-Streckschwingungen auftreten.

Abbildung 4-34 zeigt die IR-Spektren von Baumwoll-Linters-Papier und verschiedenen CN-Papieren, welche nach unterschiedlichen Reaktionszeiten erhalten wurden. Ebenfalls ist das Spektrum reiner NC dargestellt, wie sie in den Abschnitten 8.2.1 und 8.2.2 für die Herstellung von NCPHM genutzt wurde. Anhand der OH-Valenzschwingungen 3600 cm⁻¹ – 3000 cm⁻¹ ist zu erkennen, dass nach 1 min Reaktionszeit noch Hydroxylgruppen detektiert werden können. Es ist davon auszugehen, dass die Veresterung der Cellulose noch nicht vollständig abgelaufen ist. Ab 3 min Reaktionszeit sind keine OH-Schwingungsbanden mehr vorhanden, was auf eine vollständige Umsetzung der oberflächlich vorhandenen Hydroxylgruppen hindeutet.

Im Wellenzahlbereich von 1800 cm⁻¹ – 800 cm⁻¹ sind die NO₂-Streckschwingungen zu finden (Abbildung 4-34 b). Anhand der Schwingungsbanden lässt sich erkennen, dass die Intensitäten dieser mit steigender Reaktionszeit zunehmen. Dies lässt vermuten, dass dem Trend folgend der Stickstoffgehalt und damit der Substitutionsgrad in den CN-Papieren steigen sollte.

Aufgrund der Limitierung der IR-Spektroskopie auf oberflächennahe funktionelle Gruppen, kann der Stickstoffgehalt und Substitutionsgrad mit dieser Methode nicht bestimmt werden. Für diese Bestimmung wurden Elementaranalysen durchgeführt, da diese den Gesamtgehalt an Stickstoff aus der kompletten Probe liefern.

4.4.4 Quantitative Bestimmung des Substitutionsgrades von CN-Papieren

Zur Berechnung des Substitutionsgrad der CN-Papieren wurden Elementaranalysen durchgeführt. Der dabei gemessene Stickstoffgehalt ist repräsentativ für die gesamte Probe (*Bulkmethode*). Die ermittelten Stickstoffgehalte und die daraus berechneten Substitutionsgrade sind in Abbildung 4-35 dargestellt. Die Substitutionsgrade der CN-Papiere wurden Anhand Gleichung (6) in Abschnitt 4.4.1 errechnet.

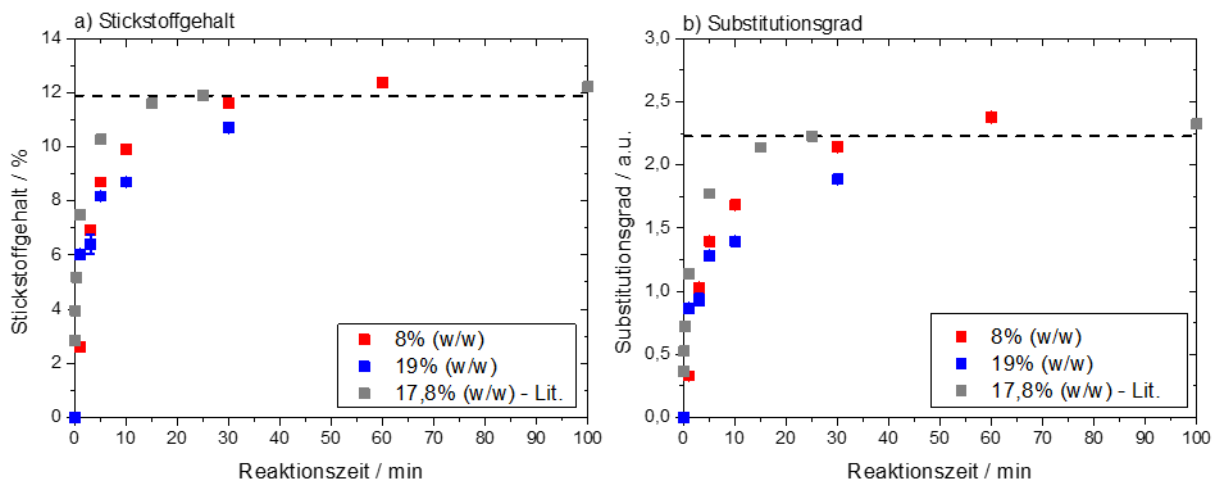


Abbildung 4-35: Durch Elementaranalyse ermittelte Stickstoffgehalte verschiedener CN-Papiere a) und die daraus errechneten Substitutionsgrade b) in Abhängigkeit zur Reaktionszeit. Für die Veresterung wurde eine Nitriersäurelösung mit einem Wassergehalt von (Rot) 8% (w/w) und eine Lösung mit (Blau) 19% (w/w) verwendet. In Grau dargestellt sind Stickstoffgehalte und Substitutionsgrade, welche in der Literatur^[106] mit einem Wassergehalt von 17,8% (w/w) erzielt wurden. Die horizontale Linie entspricht dem gemessenen Stickstoffgehalt (11,89%) und Substitutionsgrad (2,22) der kommerziell erhältlichen NC, welche für die Herstellung der NCPHM verwendet wurde.

Die Auftragung (Abbildung 4-35 a) der ermittelten Stickstoffgehalte gegen die Reaktionszeit zeigt, dass mit zunehmender Reaktionszeit der Stickstoffgehalt der CN-Papiere zunimmt. Bei niedrigen Reaktionszeiten ist bereits ein starker Anstieg des Stickstoffgehalts zu erkennen. Dies ist bei allen verwendeten Säuremischungen und in der Literatur^[106] zu beobachten. Die Stickstoffgehalte nähern sich bei Atsuki et al. einem Wert von 12,2% an. Experimentell ermittelt werden Stickstoffgehalte welche sich 12,4% (Säure 8% (w/w) Wasseranteil) und 10,7% (Säure 19% (w/w) Wasseranteil) annähern. Der maximal erreichbare Stickstoffgehalt bei der Nitrierung beträgt wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben 14,14%^[142], die NC die für die Herstellung von NCPHM verwendet wurde hat einen Stickstoffgehalt von 11,89%.

Die rapide Zunahme des Stickstoffgehalts in den ersten Minuten der Reaktion lässt sich durch die Eindringgeschwindigkeit der Säuremischung in die Fasern erklären. Zu Beginn der Reaktion ist diese schnell und pro Zeiteinheit werden viele Hydroxylgruppen der Fasern verestert. Mit voranschreitender Zeit nimmt die Eindringgeschwindigkeit der Mischung ab. Zudem kommt es bei der Veresterung zur Freisetzung von Wasser, welches zwar durch die Schwefelsäure gebunden wird, allerdings zu einer Verdünnung der Säure führen sollte. Das Verdünnen der Säuremischung führt im Umkehrschluss zu einer weiteren Verlangsamung der Eindringgeschwindigkeit und der Reaktionsgeschwindigkeit. Bei Atsuki et al.^[106] wird dieses Verhalten ebenfalls

beschrieben. Zudem wird davon ausgegangen, dass das freiwerdende Wasser nicht nur die Säuremischung verdünnt, sondern auch dafür sorgt, dass Abbaureaktionen der Cellulosefasern stattfinden können und zunehmen.

Im Vergleich zu Atsuki et al. wurde in dieser Arbeit eine Säuremischung mit einem niedrigeren (8% (w/w)) und einem höheren (19% (w/w)) Wassergehalt gearbeitet. Rein von diesen Anteilen ausgehend wäre zu erwarten, dass die Umsetzung der Cellulose bei niedrigerem Wasseranteil schneller verläuft, als bei einem höheren. Dies ist für die beiden verschiedenen Säuren zu beobachten, allerdings im direkten Vergleich zur Literatur nicht. Dies lässt sich auf zwei verschiedenen Wegen erklären. Atsuki und Ishiwara^[106] verwendeten für Ihre Umsetzungen Baumwollwolle („cotton wool“), welche vermutlich in der Säuremischung agitiert wurde. Zudem war das Massenverhältnis 10:1000 (w/w) zwischen Baumwollwolle und Säuremischung und die Reaktion wurde bei 30 °C durchgeführt. In den hier durchgeführten Arbeiten war das Massenverhältnis von Papier zu Säuremischung annähernd identisch, die Reaktionstemperatur hingegen war niedriger (RT) und die Papiere wurden nicht agitiert. Aufgrund der nicht stattfindenden Bewegung der Papiere in der Nitrierlösung, ist von einem langsameren Eindringen der Säure in die Fasern auszugehen. Dies könnte die langsamere Zunahme des Stickstoffgehalts der durchgeführten Experimente erklären. Betrachtet man die Stickstoffgehalte der Literatur mit denen der Reaktion mit der Säure mit 8% (w/w) Wassergehalt nach 30 min Reaktionszeit, so ist zu beobachten, dass der experimentelle Stickstoffgehalt höher liegt, als in der Literatur. Dies liegt höchst wahrscheinlich an den niedrigeren Wassergehalt in den Experimenten, da ein niedriger Wassergehalt zu höheren Stickstoffanteilen führt^[153]. Darüber hinaus kann auch die Reaktionstemperatur einen Einfluss darauf haben. Bei Munro und Short^[107] wurde gezeigt, dass die Stickstoffgehalte und Substitutionsgrade bei höheren Temperaturen niedriger sind, als bei Reaktionen die bei niedrigen Temperaturen durchgeführt wurden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Stickstoffgehalte bei der Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papieren mit Nitriersäuremischungen mit den in der Literatur^[106,107,153] beschriebenen Erkenntnissen korrelierbar sind. Die Stickstoffgehalte lassen sich bei Raumtemperatur über die Reaktionszeit einstellen. Aus diesem Grund, wurde auf die Verwendung der Nitriersäuremischung mit einem höheren Wassergehalt von 19% (w/w) im weiteren Verlauf dieser Arbeit verzichtet. Die mit dieser Säuremischung erzielten Stickstoffgehalte konnten durch kürzere Verweilzeiten in der Säure mit 8% (w/w) Wassergehalt ebenfalls erreicht werden.

4.4.5 Löslichkeit von CN-Papieren in organischem Medium

Die Ergebnisse der Infrarotspektroskopie (Abschnitt 4.4.3) und der Elementaranalyse (Abschnitt 4.4.4) zeigen, dass die Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papieren zu CN-Papieren erfolgreich verlaufen ist. Basierend auf den IR-Spektroskopie Ergebnissen ist zu erkennen, dass bereits ab mehr als 1 min Reaktionszeit keine OH-Schwingungsbanden mehr zu erkennen sind. Dies spricht zumindest für eine vollständige Umsetzung der Cellulose an der Faseroberfläche. Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes lässt sich gemäß Joachim Oelichmann^[154] über Gleichung (7) ermitteln.

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2(\theta) - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \quad (7)$$

Mit λ = Wellenlänge des verwendeten Lichts, n_1 = Brechungsindex des verwendeten Kristalls (2,38 – 2,41), n_2 = Brechungsindex der Probe (1,504) und θ = den Einfallswinkel des verwendeten Lichts (45°).

Die theoretisch errechneten Eindringtiefen bei der IR-Spektroskopie sind in Abbildung 4-36 gegen die Wellenzahl aufgetragen. Es lässt sich erkennen, dass die Eindringtiefe im Bereich der OH-Valenzschwingungen ($\sim 3330\text{ cm}^{-1}$) bei nur $0,5\text{ }\mu\text{m}$ - $0,7\text{ }\mu\text{m}$ liegt. Bei den NO_2 -Schwingungen (1630 cm^{-1} und 1270 cm^{-1}) ist die Eindringtiefe bei $1,1\text{ }\mu\text{m}$ – $1,4\text{ }\mu\text{m}$ und $1,4\text{ }\mu\text{m}$ – $1,8\text{ }\mu\text{m}$. Diese Berechnungen stützen die Annahme, dass die Faseroberflächen ab 3 min vollständig zu Cellulosenitrat umgesetzt wurden. Die innenliegenden Bereiche in den Baumwoll-Linters-Papieren werden mit fortschreitender Zeit weiter umgesetzt. Dies geht aus den zunehmenden Stickstoffgehalten mit steigender Reaktionszeit wie in Abschnitt 4.4.4 beschrieben hervor.

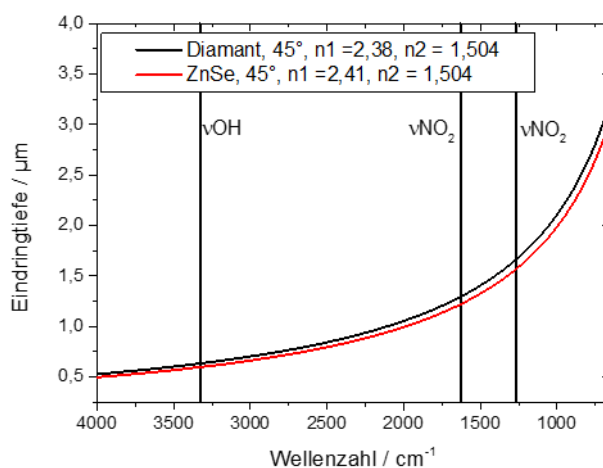


Abbildung 4-36: Errechnete Eindringtiefen der IR-Spektroskopie in Baumwoll-Linters-Papier in Abhängigkeit der Wellenzahl und des verwendeten Kristalls. Die vertikalen Linien kennzeichnen die Bereiche der OH-Valenzschwingungen ($\sim 3330\text{ cm}^{-1}$) und der NO_2 -Banden (1630 cm^{-1} und 1270 cm^{-1}).

Durch Löseversuche in Aceton soll eine Abschätzung des Nitriergrades und der Eindringtiefe ermöglicht werden. Die Löslichkeit von Cellulosenitrat ist abhängig vom Stickstoffgehalt. Bei steigenden Stickstoffgehalten steigt die Löslichkeit in organischen Lösemitteln. Niedrigsubstituierte Cellulosenitrate sind alkohollöslich wobei Cellulosenitrate mit höheren Substitutionsgraden keine Alkohollöslichkeit aufweisen.^[142] Aus diesem Grund wurde Aceton als Lösemittel ausgewählt. Es ist zu erwarten, dass bei geringen Reaktionszeiten noch keine vollständige Umsetzung bis ins Faserinnere zu Cellulosenitrat stattgefunden haben wird. Die CN-Papiere mit niedrigen Reaktionszeiten und Stickstoffgehalten sollten sich nicht vollständig in Aceton auflösen. Ab einer ausreichenden Umsetzung der CN-Papiere bis ins Faserinnere ist zu erwarten, dass diese nahezu vollständig in Lösung gehen.

Um dies zu überprüfen wurden Stanzlinge mit 15 mm Durchmesser CN-Papiere für 16 h in Aceton gelegt. Nach der Einlegezeit wurden die Proben dreimal mit frischem Aceton gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Von den erhaltenen Proben werden REM-Mikrographen angefertigt. Diese sind in Abbildung 4-37 und Abbildung 4-38 dargestellt.

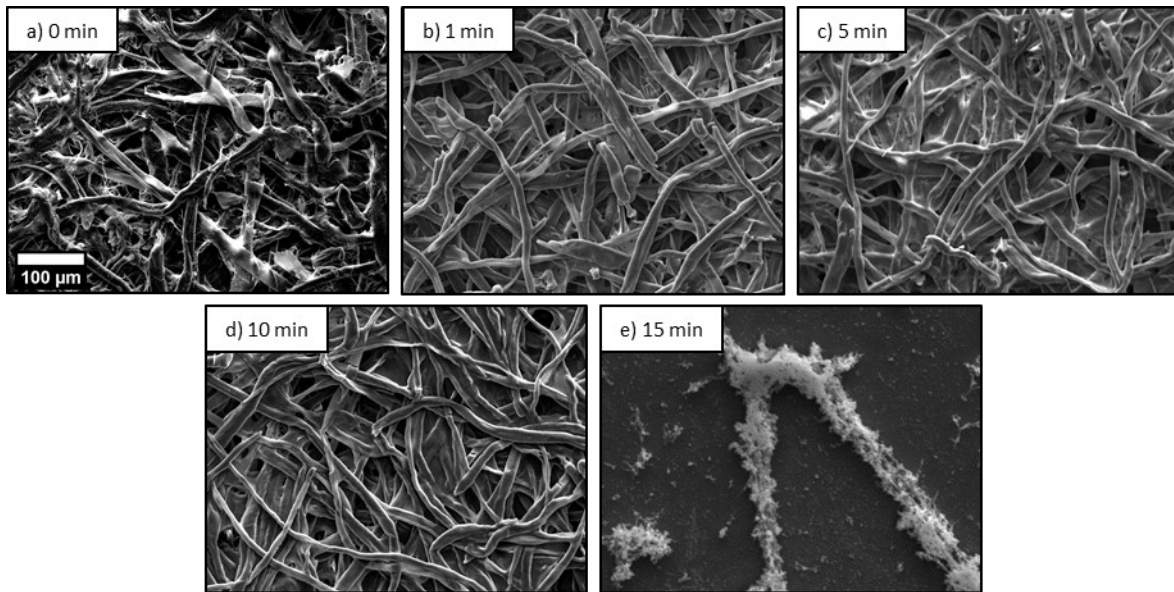


Abbildung 4-37: REM-Mikrographen bei 200-facher Vergrößerung von CN-Papieren nach dem Einlegen 16h in Aceton. Die dargestellten Zeiten entsprechen den Reaktionszeiten bei der Umsetzung der Baumwoll-Linters-Papiere mit der Säurelösung mit 8% (w/w) Wassergehalt. Der Skalierungsbalken ist gültig für alle dargestellten Aufnahmen.

Die Acetonbehandlung von reinem Baumwoll-Linters-Papier (Abbildung 4-37 a) zeigt im Vergleich zum unbehandelten Papier (Abbildung 4-28 a) nur geringfügige Veränderungen. Die Faseroberfläche weist einen geringeren Anteil an Fibrillen auf, auch der Feinstoffanteil in den Faserzwischenräumen ist reduziert. Diese Reduktion ist auf ein Auswaschen des Feinstoffs und einer Umverteilung der Fibrillen auf der Oberfläche begründbar. Die CN-Papiere, welche bei einer Reaktionszeit von 1 min in der Säurelösung hergestellt wurden (Abbildung 4-28 b), zeigen eine deutlich Faserglättung nach der Acetonbehandlung. Gegenüber dem unbehandelten CN-Papier (Abbildung 4-37 b) sind keine Fibrillen auf den Faseroberflächen erkennbar. Ebenfalls sind keine Feinstoffe mehr zu erkennen und die Faserdurchmesser scheinen im Vergleich zu den Ausgangspapieren reduziert zu sein. Diese Beobachtungen setzen sich bis zu den CN-Papieren mit Herstellungszeiten von 10 min fort. Ab einer Herstellungszeit von 15 min ist zu erkennen, dass keine intakten Fasern mehr nach der Acetonbehandlung vorliegen. Lediglich sind Agglomerate zu erkennen, welche vermutlich durch ausfällen aus Aceton bei der Trocknung entstehen. Detailaufnahmen der Löseversuche in Aceton sind in Abbildung 4-38 dargestellt.

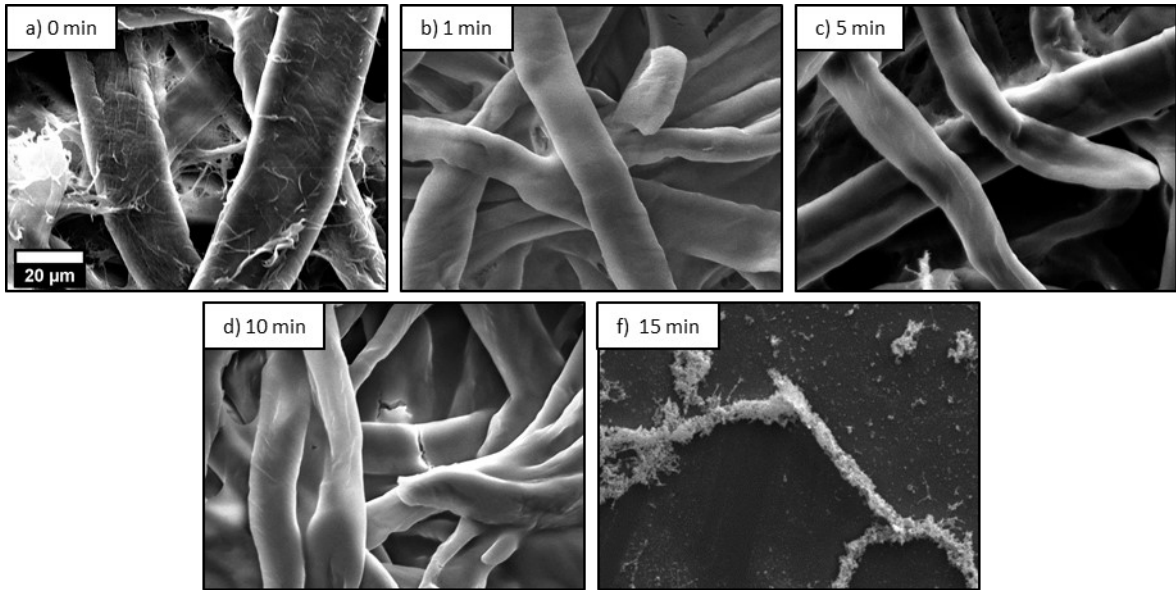


Abbildung 4-38: REM-Mikrographen bei 1000-facher Vergrößerung von CN-Papieren nach dem Einlegen für 16 h in Aceton. Die dargestellten Zeiten entsprechen den Reaktionszeiten bei der Umsetzung der Baumwoll-Linters-Papiere mit der Säurelösung mit 8% (w/w) Wassergehalt. Der Skalierungsbalken ist gültig für alle dargestellten Aufnahmen.

Um die Änderung der Faserbreiten bei den Löseversuchen in Aceton quantifizieren zu können, wurden pro Probe zwischen 300 – 600 Faserbreiten gemessen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 4-39 dargestellt.

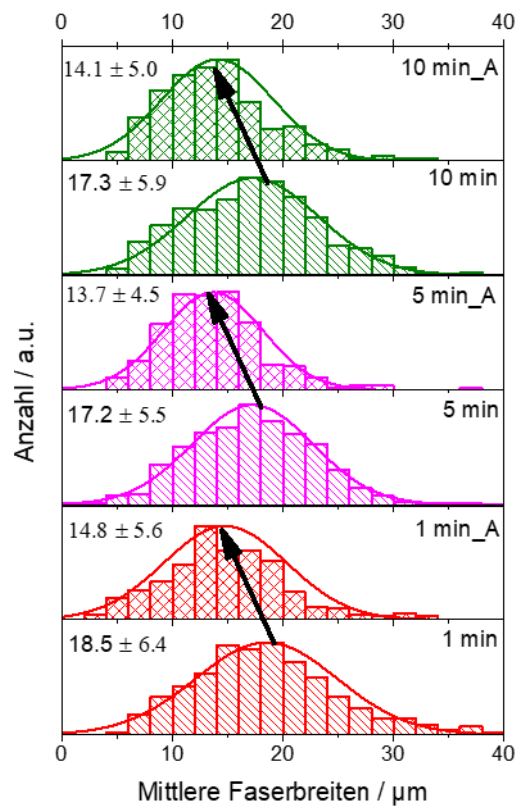


Abbildung 4-39: Faserbreitenverteilungen von CN-Papieren vor der Acetonbehandlung (1 min, 5 min, 10 min) und nach der Acetonbehandlung (1 min_A, 5 min_A, 10 min_A). Pro Probe wurden 300 – 600 Faserbreiten bestimmt.

Die Bestimmung der Faserbreiten in Abbildung 4-39 zeigt, dass unabhängig des Nitriergrades im Schnitt die Faserbreiten um $\sim 4 \mu\text{m}$ im Vergleich zu vor dem Löseversuch mit Aceton abnehmen. Dies bestätigt die subjektiven Beobachtungen aus den REM-Mikrographen. Die äußeren Bereiche der Fasern werden durch die Acetonbehandlung abgelöst. Es bleiben die Bereiche der nitrierten Fasern zurück, welche aufgrund unzureichendem Stickstoffgehalts nicht in Aceton löslich sind. Eine vollständige Auflösung der CN-Papiere mit einer Reaktionszeit von 15 min zeigt, dass nach spätestens 15 min auch das Innere der Fasern ausreichend umgesetzt ist, und damit der Stickstoffgehalt hoch genug ist, um eine Acetonlöslichkeit zu gewährleisten.

In den IR-Untersuchungen der CN-Papieren (Abschnitt 4.4.3) konnte beobachtet werden, dass bereits nach 3 min Reaktionszeit bei der Herstellung der Papiere, keine oberflächlichen OH-Schwingungsbanden mehr detektierbar sind. Um die Hypothese zu bestätigen, dass eine vollständige Umsetzung bis ins Innere der Fasern erst nach längeren Reaktionszeiten realisiert wird, wurden von den mit Aceton behandelten Papieren IR-Spektren aufgenommen. Diese sind in Abbildung 4-40 dargestellt.

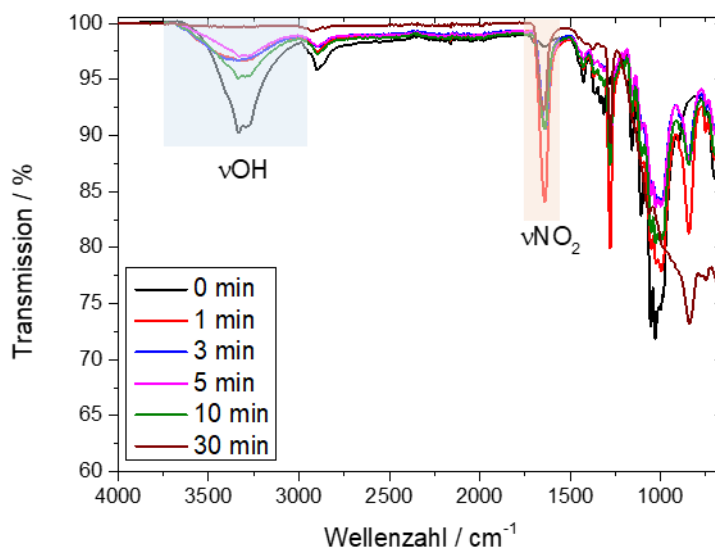


Abbildung 4-40: IR-Spektren der mit Aceton behandelten CN-Papieren (1 min – 10 min) und dem Fällungsprodukt aus dem vollständig gelöstem Papier (15 min), sowie dem nicht nitriertem Papier nach Acetonbehandlung (0 min).

Die in Abbildung 4-40 dargestellten IR-Spektren, zeigen das nicht behandelte Baumwoll-Linters-Papier nach Acetonbehandlung (0 min) und die behandelten CN-Papiere (1 min – 10 min). Wie in den REM-Bildern (Abbildung 4-37) zu sehen ist, gehen die CN-Papiere mit Herstellungszeiten von 15 min und mehr beim Löseversuch vollständig in Lösung. Die gelösten Papiere wurden deshalb in Wasser gefällt, filtriert, getrocknet und anschließend für die IR-Messungen verwendet.

Das IR-Spektrum des reinen Baumwoll-Linters-Papiers zeigt in den typischen Bereichen der NO_2 -Schwingungen (1632 cm^{-1} , 1270 cm^{-1} und 822 cm^{-1}) keine Schwingungsbanden. Dafür sind ausgeprägte OH-Valenzschwingungen bei 3330 cm^{-1} sichtbar. Das Spektrum gleicht dem reinen Papieren in Abbildung 4-31. Die Spektren der CN-Papiere (1 min – 10 min) weisen im Vergleich zu Abbildung 4-34 wieder OH-Schwingungsbanden auf. Dies bestätigt die Hypothese,

dass die Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papieren oberflächlich nach kurzen Reaktionszeiten abgeschlossen ist, aber eine vollständige Umsetzung ins Faserinnere erst nach längeren Reaktionszeiten stattfindet. Dies lässt sich auch anhand der steigenden Stickstoffgehalte in Abschnitt 4.4.4 mit zunehmenden Reaktionszeiten erklären. Das Fällungsprodukt des 15 min CN-Papiers weist in Abbildung 4-40 keine OH-Schwingungsbanden auf. Dies spricht dafür, dass die Cellulosefasern vollständig zu hoch substituiertem Cellulosenitrat umgesetzt wurden. Von Atsuki und Ishiwara^[106] wurde dies ebenfalls beobachtet. Es wird beschrieben, dass Cellulosenitrat mit einem Stickstoffgehalt von 6% löslich in siedender Natriumsulfidlösung ist. Ab einem Stickstoffgehalt von 10% ist eine Acetonlöslichkeit des Cellulosenitrats gegeben. Die löslichen Anteile in Natriumsulfid und Aceton wurden in Abhängigkeit der Nitrierzeit untersucht.^[106] Es konnte beobachtet werden, dass bei niedrigen Reaktionszeiten bis zu 5 min eine Mischung aus hoch substituiertem Cellulosenitrat (>10% Stickstoffgehalt) und niedrig substituiertem Cellulosenitrat von den Fasern gelöst werden kann. Bei Reaktionszeiten oberhalb von 15 min wird nur noch Cellulosenitrat mit mehr als 10% Stickstoff gelöst, wobei ab 25 min das vollständige Eindringen der Nitrierlösung in das Faserinnere beschrieben wird. Eine komplette Nitrierung der Fasern wird von Atsuki und Ishiwara^[106] bei 100 min Reaktionszeit beschrieben. Bei den in dieser Arbeit hergestellten CN-Papieren ist wie in den REM-Bildern (Abbildung 4-37 und Abbildung 4-38) zu erkennen, ab 15 min Reaktionszeit eine vollständige Auflösung der Fasern zu beobachten. Dies spricht für einen Stickstoffgehalt von >10% bis ins Innere der Faser. Dies lässt sich anhand der durchgeführten Elementaranalysen (Abbildung 4-35) bestätigen.

Für die Anwendung von CN-Papieren als Membranmaterial für diagnostische Assays gilt es im späteren Verlauf zu überprüfen, welche Stickstoffgehalte und Reaktionszeiten bei der Herstellung von CN-Papieren positive Auswirkungen auf die Leistungsfähigkeit des Materials für Schnelltest haben. Dies wird in den Abschnitten 5.5 und 6.4 untersucht.

4.4.6 Untersuchung des Festigkeitsverhaltens von CN-Papieren

Für die Verwendung von CN-Papieren in diagnostischen Assays, kommt es immer zu einem Kontakt zwischen dem Testfluid und dem Membranmaterial. Ist das Membranmaterial eingehaust, wie in den meisten gängigen Tests (vgl. Abschnitt 1.1) muss das Membranmaterial keine hohe Festigkeit im nassen Zustand aufweisen, da ein äußerliches Manipulieren am Membranmaterial verhindert wird. Um diagnostische Assays im „paper only“-Format bzw. einhausungsfrei verwenden zu können, müssen Membranmaterialien in Kontakt mit Wasser eine erhöhte Stabilität aufweisen. Zur Überprüfung des Festigkeitsverhalten von CN-Papieren wurden Zugfestigkeitsmessungen gemäß DIN-ISO 1924-2^[155] wie in Abschnitt 8.12.1 beschrieben durchgeführt. Die CN-Papiere wurden vor der Zugfestigkeitsmessung mit Detergens beschichtet (Abschnitt 8.5), um ein vollständiges Eindringen des Wasser zu ermöglichen. Die Ergebnisse der Zugfestigkeitsmessungen ist in Abbildung 4-41 dargestellt.

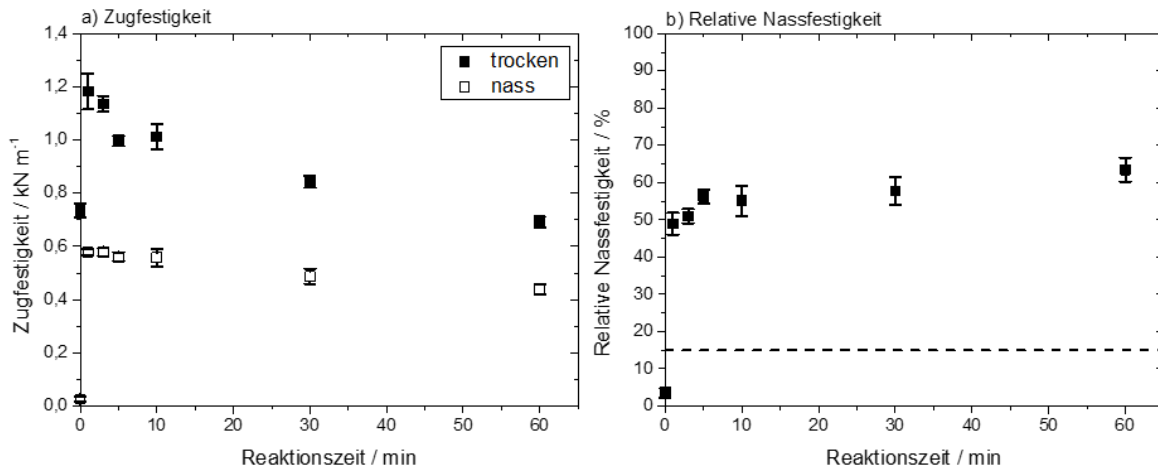


Abbildung 4-41: a) Zugfestigkeit von CN-Papieren (1 - 60 min) und Baumwoll-Linters-Papier (0 min). Die Messungen der trockenen Proben sind mit gefüllten Datenpunkten und die Messungen der nassen Proben mit ungefüllten Datenpunkten dargestellt. b) Errechnete relative Nassfestigkeiten verschiedener CN-Papiere in Abhängigkeit zur Reaktionszeit.

Die mittlere Zugfestigkeit (Abbildung 4-41 a) des Baumwoll-Linters-Papiers (0 min Reaktionszeit) liegt bei $0,74 \text{ kNm}^{-1}$ für Papiere mit 75 g/m^2 . Bereits nach 1 min Reaktionszeit ist eine deutliche Zunahme der mittleren Zugfestigkeit zu beobachten. Diese steigt bis auf $1,18 \pm 0,06 \text{ kN/m}^2$ an. Dieser rapide Anstieg ist auf Vernetzungsreaktionen bei der Veresterung zwischen den Papierfasern zurückzuführen.^[156] Im sauren Milieu kann es zur Spaltung von glykosidischen Bindungen kommen, welche im weiteren Verlauf zu Kondensationsreaktionen zwischen verschiedenen Cellulosefasern und Fibrillen führen können.^[157]

Bei fortschreitenden Reaktionszeiten ist eine Abnahme der Zugfestigkeit der CN-Papiere zu beobachten. Dies könnte auf die Denitrierungsreaktion zurückzuführen sein.^[107,153] Zudem kommt es wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben zu einer Rissbildung in den Fasern. Diese könnte ebenfalls zur Schwächung des Gesamtgefüges führen. Die Rissbildung ist in mehreren Arbeiten beobachtet worden.^[107,149]

Abbildung 4-41 b) zeigt die anhand Gleichung (9) ermittelten relativen Nassfestigkeiten. Ab einem Wert von 15% zählen die gemessenen Proben als Nassfest.^[158,159] Es lässt sich deutlich erkennen, dass unbehandelte Baumwoll-Linters-Papiere keine Nassfestigkeit aufweisen und ohne großen Kraftaufwand ihre Festigkeit und Integrität verlieren. Durch die Umsetzung mit Nitriersäure kann bereits nach 1 min Reaktionszeit ein hoch nassfestes Gefüge (rel. Nassfestigkeit 30 – 50%) erreicht werden. Im Verlauf der Reaktionszeit nimmt die Nassfestigkeit gegenüber dem Zeitpunkt von 1 min leicht zu, trotz auftretender Rissbildung in den Fasern.

Die ermittelten Nassfestigkeiten zeigen, dass CN-Papiere aufgrund der hohen Nassfestigkeit nicht nur für diagnostische Assays in einer eingehausten Bauform geeignet sein könnten, sondern auch für „paper-only“-Assays verwendet werden könnten. Diese Art der Bauform würde es

ermöglichen die Materialkosten zu senken. Es ließe sich Papier als Biogener Rohstoff verwenden und Plastik einsparen. Das Konzept des *paper-only-Assays* ist in Abschnitt 7 beschrieben.

4.4.7 Thermogravimetrische-Beurteilung von CN-Papieren

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Anwendbarkeit von CN-Papieren ist neben der Festigkeit im durchnässten Zustand auch die thermische Stabilität der Materialien. Vor allem in der Herstellung von diagnostischen Assays kann es zu einer erhöhten thermischen Beaufschlagung der Materialien z.B. beim Autoklavieren kommen. Des Weiteren kann die thermische Stabilität bei der Herstellung dieser Materialien im großtechnischen Maßstab von Bedeutung sein, da nach den Reaktions- und Waschrufen eine Trocknung der CN-Papiere erfolgen muss.

Die thermische Sterilisation von Produkten und Verpackungen ist die älteste und weltweit am häufigste Form der Sterilisation. Sie lässt sich in Trocken- und Dampfsterilisation unterscheiden.^[160] Trockensterilisationen werden typischerweise bei Temperaturen von 180 °C für 30 min, oder 170 °C für 1 h oder 160 °C für 3 h durchgeführt.^[161] Dampfsterilisationen hingegen werden aufgrund eines höheren Drucks bei niedrigeren Temperaturen durchgeführt. Die Temperaturen liegen dabei in einem Bereich von 121 °C (2 bar, 10 min) oder bis zu 134 - 138 °C (3 bar, 5 min).^[161] Die thermischen Eigenschaften von CN-Papieren sind in Abbildung 4-42 dargestellt.

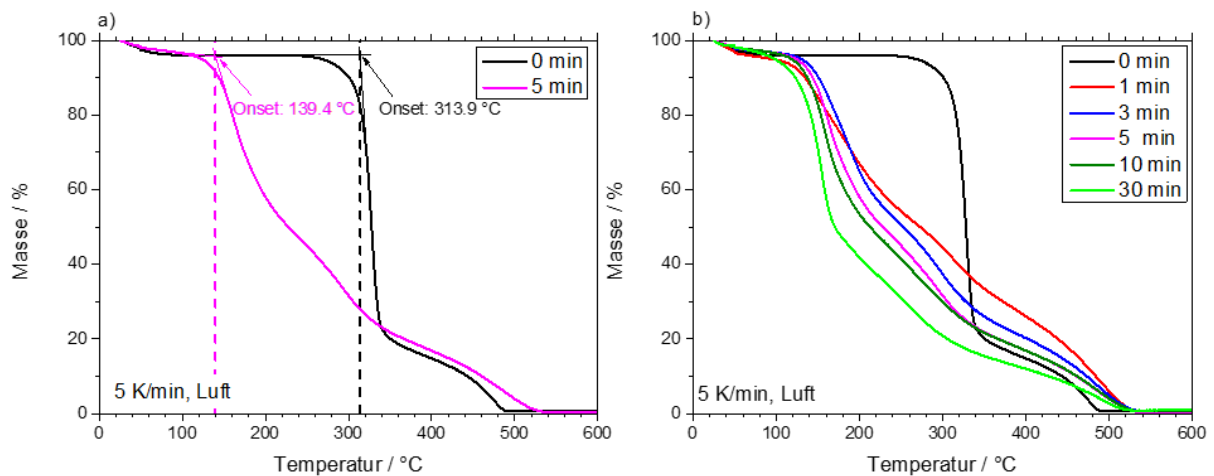


Abbildung 4-42: Thermogravimetrische Untersuchung von CN-Papieren bei Heizraten von 5 K/min an Luft. a) Exemplarische Ermittlung der *Onset*-Temperaturen, b) Relative Massenverluste aller CN-Papiere.

Abbildung 4-42 a) zeigt die Ergebnisse der Thermogravimetrischen Analyse (TGA) von reinem Baumwoll-Linters-Papier (0 min) und einem CN-Papier (5 min). Dargestellt ist der relative Masseverlust der Proben gegen die Temperatur. Die Messungen wurden wie in Abschnitt 8.12 beschrieben durchgeführt. Nach der Haltezeit von 10 min bei 50 °C ist eine Abnahme aller Massegehalte auf ca. 98% - 92%. In diesem Massenabfall ist entweichende Restfeuchtigkeit zu erwarten. Das reine Papier bleibt bis zu einer Temperatur von 240 °C massenkonstant, bis der Massenverlust einsetzt. Die ermittelte *Onset*-Temperatur liegt bei 313 °C. Der größte Massenverlust von ca. 80% findet bis 340 °C statt. Bei einer Temperatur von 490 °C ist keine Probe

mehr vorhanden. Das CN-Papier (5 min) zeigt bei 116 °C den ersten Massenverlust. Die ermittelte *Onset*-Temperatur liegt bei 139 °C. Im Vergleich zum Baumwoll-Linters-Papier erstreckt sich der Massenverlust über einen Temperaturbereich von 120 °C – 365 °C bis 80% der Masse verloren sind. Die vollständige Zersetzung wird bei 530°C erhalten.

Die vollständigen TGA-Kurven aller Proben ist in Abbildung 4-42 b) dargestellt. Aus diesen wurden die *Onset*-Temperaturen und die resultierenden Temperaturen nach 80% Massenverlust ermittelt. Diese sind in Tabelle 4-4 aufgelistet.

Tabelle 4-4: *Onset*-Temperaturen und Temperaturen nach 80% Massenverlust der CN-Papiere.

Reaktionszeit	<i>Onset</i> -Temperatur / °C	Temperatur nach 80% Massenverlust / °C
0 min	313	350
1 min	125	438
3 min	142	402
5 min	139	368
10 min	135	366
30 min	139	304

Die Zersetzung aller CN-Papiere setzt bei wesentlich niedrigeren Temperaturen als beim reinen Baumwoll-Linters-Papier ein. Der Massenverlust der CN-Papiere geht langsamer von statten, als bei dem reinen Cellulosepapier. Die *Onset*-Temperaturen der CN-Papiere liegen in einem Bereich von 125 °C – 142 °C dicht beieinander. Die unterschiedlichen *Onset*-Temperaturen stehen in keinem direkten Zusammenhang mit den Stickstoffgehalte (Abschnitt 4.4.4), da das CN-Papier mit der niedrigste Reaktionszeit sich zuerst zu zersetzen beginnt. Die höher substituierten Papiere setzen erst ca. 10 °C später mit der Zersetzung ein. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten unterschiedliche Vernetzungsgrade innerhalb der CN-Papieren sein. Bei niedrigen Reaktionszeiten sind die Fasern nur wenig miteinander vernetzt, zeitgleich besitzt die Faser Oberfläche einen hohen Substitutionsgrad, welcher zu einem schnellen Einsetzen der Zersetzung führt. Die weitere thermische Zersetzung verläuft langsamer, da im inneren der Fasern die Substitutionsgrade geringer sind als an der Oberfläche. Dies würde die Temperaturverläufe bei 80% Massenverlust erklären. Bei höheren Substitutionsgraden, z.B. nach 30 min Reaktionszeit, ist die Vernetzung unter den Fasern höher als bei 1 min. Aus diesem Grund halten die Fasern länger einer Zersetzung stand, wobei diese erst bei 139 °C einsetzt. Die nachfolgende Zersetzung schreitet schneller voran als bei Probe mit 1 min Reaktionszeit, da der Stickstoffgehalt bis zum Faserinneren höher ist, sodass ein Massenverlust von 80% bereits bei 304 °C erreicht wird.

Anhand der TGA Messungen kann festgehalten werden, dass die *Onset*-Temperaturen nicht direkt mit den Stickstoffgehalten korrelieren, was auf unterschiedliche Vernetzungen in den Fasern hindeuten könnte. Die Temperaturen bei 80% Massenverlust scheinen im direkten Zusammenhang zu den Stickstoffgehalten zu stehen.

Es ist festzuhalten, dass CN-Papiere im Vergleich zu reinen Baumwoll-Linters-Papieren thermisch labiler sind. Die zuvor genannten Sterilisationsmethoden sind für diese Materialien nicht geeignet, da die *Onset*-Temperaturen zu nahe an den Sterilisationstemperaturen liegen. Wird eine Sterilisation der Materialien nötig, so müssen andere Verfahren wie z.B. Gamma-Bestrahlung oder Ethylenoxidbegasung in Betracht gezogen werden.^[160,162] Bei der großtechnischen Herstellung dieser Materialien ist ein besonderes Augenmerk auf die Trocknungsparameter zu legen.

4.5 Zusammenfassung und Bewertung der verschiedenen Herstellungsmethoden für NCPHM und CN-Papieren

Neben NCPHM wurden CN-Papiere im Zuge einer reaktiven Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papieren hergestellt. Hierbei wurden Papiere für unterschiedliche Zeiten in Nitriersäure eingelegt, was eine Veresterung der Cellulose mit Salpetersäure zur Folge hat. Die Umsetzungsreaktion konnte unter Erhalt der Faserstruktur durchgeführt werden. Durch Elementaranalysen wurde gezeigt, dass der erhaltene Stickstoffgehalt über die Reaktionszeit eingestellt werden konnte und dieser ähnlich hoch war wie der Stickstoffgehalt der für die Herstellung der NCPHM verwendeten NC. Strukturell ähnelten die CN-Papiere den zur Herstellung eingesetzten Baumwoll-Linters-Papieren. Die Faserstruktur konnte bei allen Reaktionszeiten erhalten werden, wobei bei niedrigen Reaktionszeiten eine Glättung der Faseroberfläche zu beobachten war. Bei längeren Reaktionszeiten trat ein Aufdrehen der Fasern ein, welches zu einer Erhöhung der fibrillären Anteile in den CN-Papieren führte. Neben der Betrachtung der Oberflächenstruktur wurde die Stabilität des neuartigen Materials in Kontakt mit Wasser untersucht. Die erhaltenen Materialien waren bereits nach 1 min Reaktionszeit nassfest. Mittels TGA wurde die thermische Stabilität dieser überprüft, wobei aufgrund der niedrigen Zersetzungstemperaturen eine thermische Sterilisation der Membranmaterialien vermieden werden sollte. Gegenüber den NCPHM war zur Herstellung der CN-Papiere keine Verwendung von NC nötig. Aufgrund dessen, spielte eine gezielte Kontrolle der Luftfeuchtigkeit bei der Herstellung dieser Materialien keine Rolle. Dies reduzierte die Komplexität des Herstellungsprozesses erheblich und machte diesen bei Kontrolle der Reaktionstemperatur und Säurezusammensetzung zu einem sehr reproduzierbaren Prozess. Gegenüber den NCPHM konnte die erforderliche Detergensbeschichtung direkt mit den Wasch- und Pufferschritten kombiniert werden, was energie- und zeitaufwändige Trocknungsschritte einsparte. Bei der späteren Anwendung von CN-Papieren als alternatives Membranmaterial musste kein besonderes Augenmerk auf die genaue Platzierung von Antikörperlinien bei der Herstellung von diagnostischen *Assays* gelegt werden, da die Papiere gleichmäßig zu Cellulosenitrat umgesetzt wurden.

4.6 Fazit zu verschiedenen Herstellungsmethoden für NCPHM und CN-Papieren

Die Herstellung neuartiger Membranmaterialien konnte durch beschichtende und reaktive Herstellungsmethoden realisiert werden. Durch Verwendung von *NC-Lacquern* und Baumwoll-Linters-Papieren wurden vollflächige und ortsdefinierte NCPHM hergestellt und charakterisiert. Die mittels Tauchbeschichtung hergestellten vollflächig beschichteten NCPHM wiesen eine gleichmäßige NC-Verteilung innerhalb des Hybridmaterials und auf der Oberfläche auf. Das Tauchbeschichtungsverfahren zeigte sich im Rahmen der durchgeführten Experimente als besonders reproduzierbar und kontrollierbar. Die Variation von Herstellungsparametern lieferte

wichtige Erkenntnisse zur Einstellung der Oberflächenstruktur und den Beschichtungsgewichten. Letztere lagen deutlich unterhalb der benötigten NC-Masse bei der Herstellung von konventionellen NC-Membranen. Die Tauchbeschichtung stellt das Verfahren dar, welches vermutlich die geringsten Anpassungen im derzeitigen verwendeten Herstellungsprozess für konventionelle NC-Membranen benötigen würde. Durch Ersetzen von PET-Trägerfolien durch geeignete Papierbahnen ließen sich etablierte NC-Lacquer verwenden, mit denen die Papierbahn vollflächig beschichtet würden. Für Hersteller diagnostische Assays ließen sich NC-Membranen durch vollflächige NCPHM ersetzen, da die Materialverteilung auf dem gesamten Hybridmaterial gleichmäßig ist.

Durch Verwendung des Liniendruckverfahrens ließen sich ortsdefinierte NCPHM herstellen. Der NC-Lacquer wurde gezielt über eine Kanüle oder einen Dosierpinsel auf Baumwoll-Linters-Papiere aufgebracht. Dabei wurden verschiedene NC-Anteile im Lacquer bei verschiedenen Dosierungen und Auftragungsbreiten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein breitflächiger Auftrag des Lacquers auf die Papiere durch Verwendung eines Dosierpinsels eine höhere Anzahl an homogen beschichteten Materialien hervorbringt. Durch Variation der Dosiervolumina ließen sich verschiedene Linienbreiten einstellen, wobei eine Dosierung von mindestens $8 \mu\text{L}/\text{cm}$ benötigt wurde um Linienbreiten $>5 \text{ mm}$ zu erhalten. Die Betrachtung der Morphologie der ortsdefinierten NCPHM zeigte, dass beim Aufdrucken des Lacquers dieser die komplette Papierdicken durchdrang. Orthogonal zur Auftragsrichtung konnten unterschiedlich ausgebildete Strukturen erkannt werden. Die Randbereiche am Übergang von Papier zum NC beschichteten Bereich wies keine porösen Strukturen auf, die NC überzog gleichmäßig die Papierfasern. In der Mitte des bedruckten Bereiches konnten poröse Strukturen erkannt werden. Materialien bei denen makroskopisch eine homogene NC-Verteilung zu beobachten war, wurden nicht vollständig von poröser NC überzogen. Die Faserstruktur des Basispapiers war nach wie vor deutlich zu erkennen. Durch die ortsdefinierte Auftragung des Lacquers, konnte die benötigte Menge NC gegenüber der vollflächigen Beschichtung und der Beschichtungsmasse von konventionellen NC-Membranen weiter reduziert werden. Der Papieranteil der ortsdefinierten Hybridmaterialien ist höher als bei vollflächigen Materialien, sodass der Rohstoffbedarf an NC deutlich geringer ist. Bei der späteren Anwendung der ortsdefinierten NCPHM ist auf eine genaue Platzierung von Antikörperlinien bei der Herstellung von diagnostischen Assays zu achten, damit diese auf der NC appliziert werden und nicht außerhalb des beschichteten Bereichs.

Ungeachtet der Herstellungsweise von NCPHM, ist eine Kontrolle der klimatischen Herstellungsparameter wichtig. Diese haben einen unmittelbaren Einfluss auf die ausgebildeten Porenstrukturen und würden damit die mikrofluidischen Eigenschaften und die Eignung der Materialien als alternative Membranmaterialien beeinflussen. Allgemein ist anzunehmen, dass die Skalierbarkeit der untersuchten Herstellungsmethoden gegeben ist und potentiell zu ähnlich leistungsfähigen, günstigeren und nachhaltigeren Membranmaterialien als konventionelle NC-Membranen führt.

Durch reaktive Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papieren in einer Mischung aus Schwefelsäure und Salpetersäure, ließen sich CN-Papiere erhalten. Die Umsetzung konnte unter Erhalt der Faserstruktur der Papiere durchgeführt werden. Über die Reaktionszeit ließ sich der Stickstoffgehalt der CN-Papiere einstellen. Da im Vergleich zu NCPHM keine NC eingesetzt wurde, bei der die Porenbildung durch kontrollierte Verdunstung der Lacquer-Bestandteile gesteuert werden muss, konnte auf eine aufwändige Kontrolle der Temperatur und Luftfeuchtigkeit ver-

zichtet werden. Dies machte die Herstellung einfacher und reproduzierbarer. Die benötigte Detergensbeschichtung dieser Materialien ließ sich mit Wasch- und Pufferschritten kombinieren und benötigte keine zeit- und energieaufwändigen Trocknungsschritte. Es konnte gezeigt werden, dass die reaktive Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papieren zu CN-Papieren bereits nach 1 min Reaktionszeit zu nassfesten Materialien führt, was vor allem für eine mögliche Anwendung der Materialien als „paper-only-LFT“ vorteilhaft sein sollte. Für Hersteller diagnostische Assays ließen sich NC-Membranen einfach durch CN-Papiere ersetzen, da das Material auf der gesamten Fläche gleichmäßig und einheitlich ist.

Eine Übersicht der in dieser Arbeit hergestellten Materialien und die zugehörigen Herstellungsparameter, sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst.

Tabelle 4-5: Übersicht der in dieser Arbeit hergestellten und charakterisierten alternativen Membranmaterialien. Angegeben sind die Bereiche in denen die Herstellungsparameter variiert wurden und die resultierenden Eigenschaften welche für die Anwendbarkeit der Materialien in diagnostischen Assays wichtig sind. Verglichen wurden die vollflächigen- und ortsdefinierten NCPHM, CN-Papiere mit unbehandelten Baumwoll-Linters-Papieren und konventionellen NC-Membranen.

	NCPHM		Reaktive Umsetzung CN-Papiere	Referenzen	
	vollflächig	ortsdefiniert		Linters-Papier	NC-Membranen
Papier Grammatur / g/m ²	50, 75, (100)	50, 75	50, 75	50, 75	-
NC Anteil Lacquer / w%	3,5 - 7,0	3,5 - 7,0	-	-	-
Temperatur / °C	15 - 45	25	25	-	-
rel. Luftfeuchtigkeit / %RH	25, 50, 75	50	-	-	-
Ziehgeschwindigkeit / mm/min	120 - 1000	-	-	-	-
Dosierung / µL/cm	-	2 - 20	-	-	-
Reaktionszeit / min	-	-	1 - 60	-	-
Beschichtungsgewicht / g/m ²	4,4 - 32,9	2,4 - 11,8	-	-	35,0 - 40,0
CFT / s/4cm	100 - 620	110 - 520	70 - 180	55 - 63	66 - 170
min. hCG-Konzentration / mIU/mL	25	25	250, (25)	25	25
min. HBsAg-Konzentration	20	20	20	60	8

5. Mikrofluidische Charakterisierung von NCPHM und CN-Papieren

5.1 Detergensbeschichtung von NCPHM und CN-Papieren

Zur Anwendbarkeit von NCPHM und CN-Papieren in diagnostischen und analytischen Assays, spielen die Benetzungseigenschaften der Materialien eine entscheidende Rolle. Die Benetzbarkeit der hergestellten Materialien werden in Abschnitt 5.1.1 betrachtet. Bei einer nicht vorhandenen Benetzbarkeit, muss diese durch die Verwendung von Detergenzien erzeugt werden.

5.1.1 Benetzbarkeit von NCPHM und CN-Papieren

Zur Untersuchung der Benetzbarkeit verschiedener Materialien, wurden Kontaktwinkelmessungen wie in Abschnitt 8.12 beschrieben durchgeführt. In Abbildung 5-1 sind die Kontaktwinkel und die zugehörigen Bilder des aufgetragenen Wassertropfens auf der Materialoberfläche dargestellt. Zusätzlich sind die Strukturen der untersuchten Materialien durch REM-Bilder illustriert.

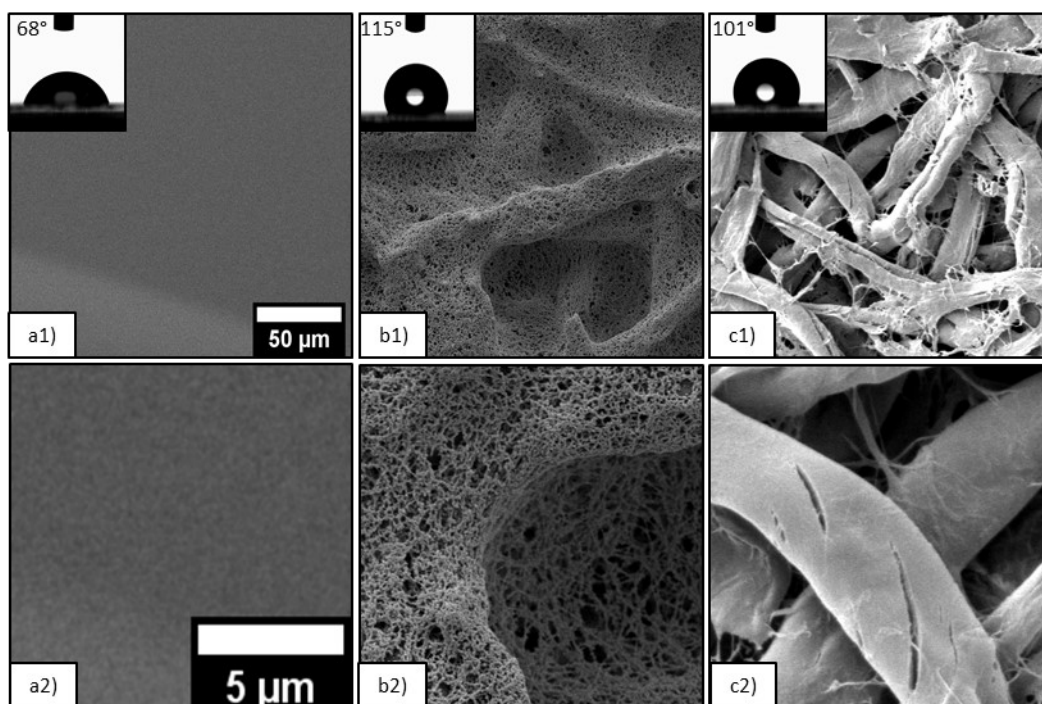


Abbildung 5-1: Exemplarische Darstellung eines a) planaren Glassubstrats mit homogener, nicht poröser NC-Beschichtung, b) NC-Lacquer auf Baumwoll-Linters-Papier und c) CN-Papier. Der Skalierungsbalken in a1 ist gültig für a1-c1 und besitzt eine Länge von 50 µm, der Skalierungsbalken in a2 ist gültig für a2-c2 und besitzt eine Länge von 5 µm. Die Bilder der Kontaktwinkelmessungen sind repräsentativ für die verschiedenen Substrate, die mittleren zugehörigen Wasser-Kontaktwinkel sind angegeben.

Abbildung 5-1 zeigt die Kontaktwinkel und Oberflächenstrukturen eines homogen mit NC beschichteten Glasobjektträgers (a1, a2), einem exemplarischen NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung (b1, b2) und eines CN-Papiers nach 3 min Reaktionszeit (c1, c2). Die kleinen Bildausschnitte zeigen die Wassertropfen der Kontaktwinkelmessung mit den zugehörigen, gemessenen Kontaktwinkeln.

Der Kontaktwinkel des homogen mit NC beschichteten Glasobjektträgers weist einen Kontaktwinkel von 68° auf und ist vergleichbar mit dem in der Literatur beschriebenen Kontaktwinkel von nichtporösen NC-Substraten^[163,164]. Dieser Objektträger wurde durch Tauchbeschichtung in eine NC-Lösung in Aceton (50 mg/mL) hergestellt. Der aufgebrauchte Wassertropfen zeigt eine deutliche Benetzung der Oberfläche ($\theta < 90^\circ$). Die zugehörige Oberfläche weist keine Strukturen auf (Abbildung 5-1 a).

Das NCPHM weist keine homogene und ebene Oberfläche auf (Abbildung 5-1 b1, b2). Die Faseroberfläche ist mit poröser NC überzogen. Der gemessene Kontaktwinkel auf diesen Materialien ist mit 115° deutlich hydrophob ($\theta > 90^\circ$). Eine Erhöhung der Kontaktwinkel mit zunehmender Porosität bzw. Oberflächenstruktur konnte unter anderem bei Chen et al.^[165] beobachtet werden. Auf diesem Weg erhaltene Materialien sind nicht ohne Detergensbeschichtung für die Verwendung in diagnostischen Assays geeignet. Bei kommerziell erhältlichen NC-Membranen mit ähnlicher Morphologie werden in der Literatur^[166] Kontaktwinkel unterhalb von 20° beschrieben, welche nur mit Detergensbeschichtungen zu erklären sind.

Die inhärente Benetzbarkeit von Baumwoll-Linters-Papieren mit Wasser geht trotz Erhalt der Faserstruktur (Abbildung 5-1 c1, c2) bei der Umsetzung mit Nitriersäure verloren. Der gemessene Kontaktwinkel an diesen Materialien beträgt 101° und ist damit ebenfalls hydrophob, sodass ein Eindringen von Wasser in das Fasergefüge stark erschwert wird. Trotz einer vollständig stattgefundenen Umsetzung der Faseroberfläche zu Cellulosenitrat (Abschnitt 4.4.3) ist der Kontaktwinkel deutlich erhöht. Dies kann möglicherweise durch eine Verminderung der Quellfähigkeit der Fasern aufgrund der Nitrierung- und Vernetzung der Fasern kommen^[167,168]. CN-Papiere sind ebenfalls wie NCPHM nur in Kombination mit einer Detergensbeschichtung für die Anwendung in diagnostischen Assays geeignet.

Die Notwendigkeit einer Detergensbeschichtung bei ortsdefinierten NCPHM wurde nicht gezielt untersucht. Bei einem initialen Versuch die Fließeigenschaften in diesen Materialien zu untersuchen (gemäß Abschnitt 8.6), konnte ein Stoppen des Fluidflusses an der aufgebrauchten NC-Linie beobachtet werden (vgl. Abschnitt 5.4.1). Dies lässt sich anhand der zuvor in diesem Abschnitt beschriebenen Benetzungseigenschaften der flächig beschichteten NCPHM erklären.

Bei allen alternativen Membranmaterialien ist wie bei den kommerziell erhältlichen NC-Membranen eine Beschichtung mit Detergens zum Erhalt einer besseren Benetzbarkeit notwendig. Dies stellt für die spätere Anwendbarkeit keine eklatanten Nachteile dar, da aktuelle diagnostische Verfahren auf mit Detergens beschichteten Membranmaterialien etabliert sind.

5.1.2 Einfluss von Detergensbeschichtung auf die Morphologie verschiedener NCPHM und CN-Papieren

Eine Notwendigkeit für eine Detergensbeschichtung von NCPHM und CN-Papieren konnte durch Kontaktwinkelmessungen in Abschnitt 5.1.1 begründet werden. Welchen Einfluss eine Detergensbeschichtung auf die Morphologie von NCPHM und CN-Papieren hat, wird in diesem Abschnitt thematisiert. Anhand von REM-Mikrographen (Abbildung 5-2 und Abbildung 5-3) wurden die auftretenden strukturellen Änderungen betrachtet.

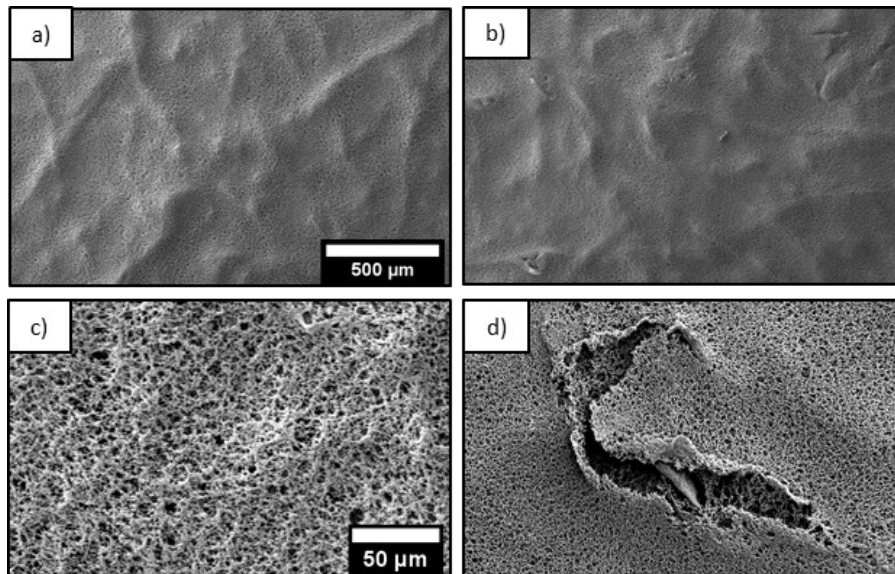


Abbildung 5-2: REM-Mikrographen eines exemplarischen vollflächig beschichteten NCPHMs a), c) vor und b), c) nach Detergensbehandlung.

Abbildung 5-2 zeigt REM-Mikrographen eines beispielhaften, vollflächig beschichteten NCPHMs vor (Abbildung 5-2 a, c) und nach (Abbildung 5-2 b, d) Detergensbehandlung. In der Übersichtsvergrößerung (Abbildung 5-2 b) sind Defektstellen der Oberfläche des Hybridmaterials zu erkennen. Diese äußern sich bei genauer Betrachtung (Abbildung 5-2 d) in einem Aufreißen der beschichteten Oberfläche und teilweisem Freilegen von Papierfasern. Dies ist bei der Probe ohne Detergensbehandlung (Abbildung 5-2 c) nicht zu sehen. Unterhalb der aufgerissenen Oberfläche ist eine intakte poröse NC-Struktur erkennbar. Es kann vermutet werden, dass die beobachteten Defektstellen durch Eindringen von Detergenslösung in das Fasernetzwerk verursacht werden, da dies eine Quellung der Papierfasern zu Folge haben sollte. Die poröse NC-Struktur ist weniger flexibel als Cellulosefasern, was dann zum aufreißen dieser Struktur führt. Bei diesem exemplarischen NCPHM liegt der Anteil an sichtbaren Defektstellen knapp unterhalb von 1% der Materialoberfläche. Die Anzahl an Defekten war bei anderen NCPHM geringer. Es kann angenommen werden, dass sich diese Defekte nicht negativ auf die Eigenschaften des Fluidtransports im Material (Abschnitt 5.3) und die Eignung als Membranmaterial für diagnostische Assays (Abschnitt 6.2) auswirken.

Der morphologische Einfluss der Detergensbehandlung auf ortsdefinierte NCPHM wurde nicht untersucht, da dieser vergleichbar zu den vollflächig beschichteten Materialien sein sollte, da die Struktur der abgeschiedenen NC den vollflächigen Materialien ähnelt (vgl. Abschnitt 4.3.4). Nachfolgend wird in Abbildung 5-3 der morphologische Einfluss der Detergensbehandlung auf CN-Papiere dargestellt.

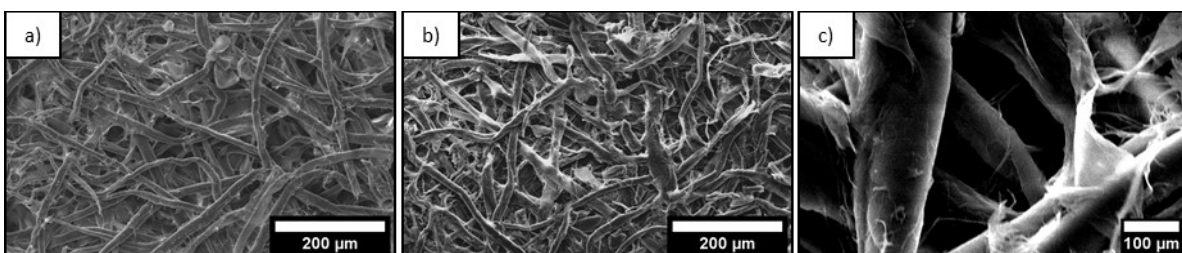


Abbildung 5-3: REM-Mikrographen eines exemplarischen CN-Papiers a) vor und b), c) nach Detergensbehandlung.

Die Übersichtsaufnahme des mit Detergens behandelten CN-Papiers (Abbildung 5-3 b) unterscheidet sich kaum vom nicht behandelten Material (Abbildung 5-3 a). Es sind keine Faserbrüche oder Risse zu beobachten. Lediglich ist zu erkennen, dass Fibrillen der Fasern und Feinstoffe nach der Detergensbehandlung leicht reduziert sind. Dies ist auch bei der Detailaufnahme (Abbildung 5-3 c) erkennbar. Die beobachteten Änderungen sollten keine negative Beeinflussung der mikrofluidischen Eigenschaften (Abschnitt 5.5) oder der Verwendung in diagnostischen Assays (Abschnitt 6.4) haben.

5.2 Mikrofluidische Charakterisierung von Baumwoll-Linters-Papieren und kommerziell erhältlichen NC-Membranen

Baumwoll-Linters-Papiere und konventionelle NC-Membranen werden für die Charakterisierung mikrofluidischer Eigenschaften von vollflächigen und ortsdefinierten NCPHM und CN-Papieren als Referenzmaterialien verwendet. Die kapillaren Fließzeiten wurden wie in Abschnitt 8.6 beschrieben ermittelt und sind in Abbildung 5-4 dargestellt.

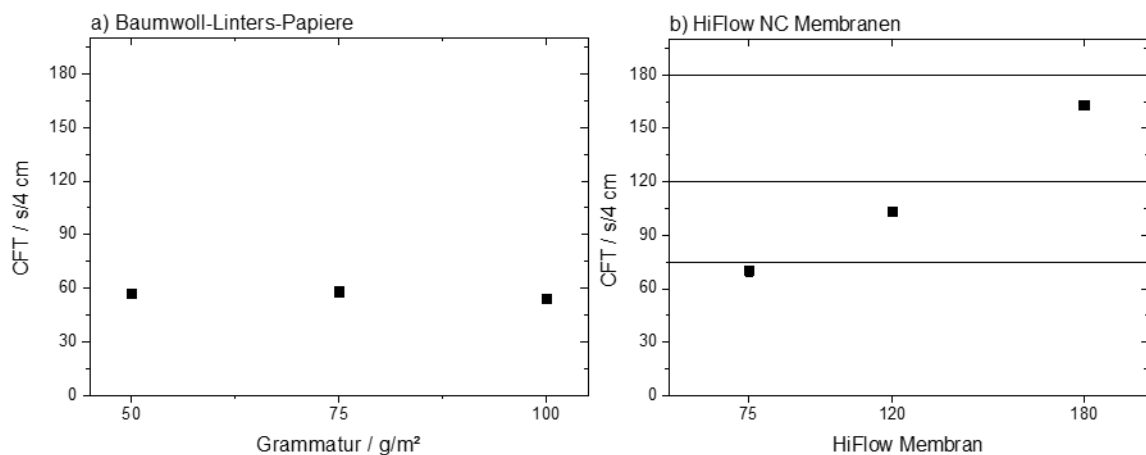


Abbildung 5-4: Kapillare Fließzeiten von a) Baumwoll-Linters-Papieren mit unterschiedlichen Grammaturen ohne Detergensbeschichtung. b) kapillare Fließzeiten verschiedener konventioneller HiFlow Membranen (Merck Millipore).

Die kapillaren Fließzeiten von unbehandelten Baumwoll-Linters-Papieren (Abbildung 5-4 a) liegen in einem Bereich von 56 s/4 cm – 60 s/4 cm und zeigen keine Abhängigkeit zur verwendeten Grammatur. Dies deutet darauf hin, dass die Porengrößenverteilung kaum durch die Grammatur beeinflusst wird. Die Standardabweichungen der Messungen (± 2 s/4 cm) ist gering, dies spricht für eine hohe Reproduzierbarkeit bei der Herstellung der Papiere. Die beobachtete Fließfront war zu jeder Zeit gleichmäßig. Das Fließverhalten von Wasser in unbehandelten Papieren ist Literaturbekannt und kann anhand der Lucas-Washburn-Gleichung beschrieben werden (vgl. Abschnitt 1.4).^[71,103]

Die kapillaren Fließzeiten der konventionellen NC-Membranen (Abbildung 5-4 b), steigen mit zunehmender Bezifferung der Membran an. Laut Herstellerangaben beschreibt die Bezifferung

der Membranen die kapillare Fließzeit des Materials. Dies bedeutet, dass eine HiFlow 75 Membran eine kapillare Fließzeit von 75 s/4 cm aufweisen soll. Die ermittelten Fließzeiten liegen 7% - 15% unterhalb der spezifizierten Fließzeiten. Die geringen Standardabweichungen der Fließzeiten sprechen für eine reproduzierbare Messmethode und konstanten Membraneigenschaften.

5.3 Flächig beschichtete NCPHM

Die kapillaren Fließzeiten von vollflächig beschichteten NCPHM wurden identisch zu den Referenzmaterialien ermittelt. Es wird erwartet, dass der Fluidfluss eine homogene Fließfront entlang der gesamten Länge der Teststreifen aufweisen. Da wie in Abschnitt 4.2.1 gezeigt, die unterschiedlichen Herstellungsparameter einen direkten Einfluss auf die Morphologie und Porenstruktur der NCPHM haben, ist zu erwarten, dass die kapillaren Fließzeiten deshalb stark variieren können. Bei Hybridmaterialien mit geringen Porengrößen werden gemäß der Lucas-Washburn-Gleichung (vgl. Abschnitt 1.4) höhere kapillare Fließzeiten erwartet (langsamer Fluidfluss). Bei größeren Poren sollten niedrigere kapillare Fließzeiten (schneller Fluidfluss) erhalten werden. Diese Zusammenhänge sollen nachfolgend anhand der kapillaren Fließzeiten für unterschiedliche NCPHM, welche mit variierenden NC-Anteilen im *Lacquer* hergestellt wurden (Abbildung 5-5, Abbildung 5-6 a) und konventionellen NC-Membranen (Abbildung 5-6 b) überprüft werden.

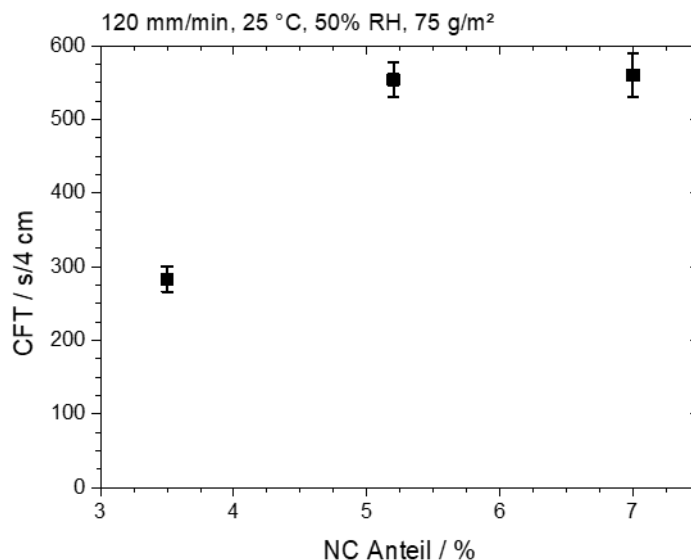


Abbildung 5-5: Kapillare Fließzeiten von vollflächigen NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung von 75 g/m² Papieren. Variiert wurden die NC-Anteile im *Lacquer*. Die Ziehgeschwindigkeit war 120 mm/min bei 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% RH. Die NCPHM wurden zuvor mit Detergens beschichtet.

Bei der Messung der kapillaren Fließzeiten von vollflächig beschichteten NCPHM, welche mit unterschiedlichen NC-Anteilen im *Lacquer* hergestellt wurden, war zu jeder Zeit eine homogene Fließfront zu beobachten. Dies spricht, wie auch anhand der REM-Mikrographen (Abbildung 4-2) zu erkennen, für eine homogene Materialverteilung und gleichmäßiger Detergensbeschichtung. Bei Verwendung eines NC-Anteils von 3,5% wird die niedrigste Fließzeit von 283 s/4 cm

± 17 s/4 cm erhalten. Mit zunehmendem NC-Anteil steigt diese auf bis zu 590 s/4 cm an. Anhand der CFT dieser Materialien ist zu erwarten, dass die Porengröße des NCPHM mit 3,5% NC-Anteil größer ist, als die der beiden höheren NC-Anteile. Um dies zu überprüfen wurden aus den REM-Mikrographen (Abbildung 4-2, Abbildung 4-3) die Partikelgrößen der porösen NC-Strukturen ermittelt und diese mit denen von konventionellen NC-Membranen (Abbildung 4-1) verglichen. Die ermittelten Partikelgrößen sind in Abbildung 5-8 dargestellt.

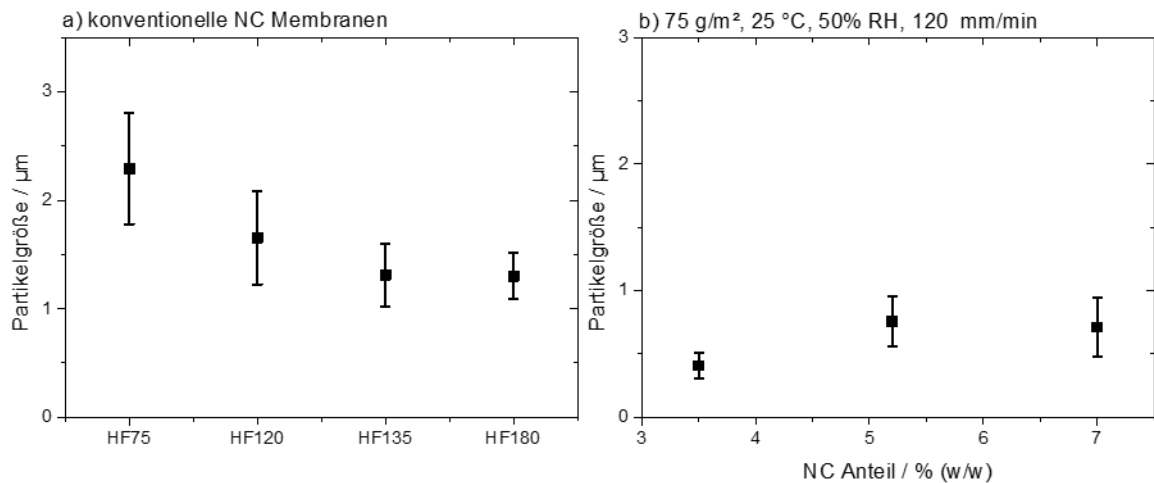


Abbildung 5-6: Mittels REM-Aufnahmen ermittelte Partikelgrößen von a) konventionellen NC-Membranen und b) von vollflächig beschichteten NCPHM, hergestellt durch Tauchbeschichtung auf 75 g/m² Papieren bei 25 °C, 50% RH und einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min unter Verwendung verschiedener NC-Anteile im *Lacquer*.

Abbildung 5-6 a) zeigt die Partikelgrößen verschiedener NC-Membranen. Diese nehmen mit steigender Ziffer der NC-Membranen ab. So können bei einer HiFlow 75 Membran größere Partikel und Porenradien beobachtet werden als bei einer HiFlow 180 Membran. Dies deckt sich mit der Annahme und der Herstellerangaben zur CFT der Materialien. Die größeren Partikelgrößen bei der HiFlow 75 Membran führen zu größeren Porenradien, welche einen schnelleren Fluidfluss und damit niedrigere CFT zur Folge haben. Mit abnehmender Partikelgröße werden sukzessive kleinere Porenradien erhalten und die CFT der Materialien steigt an. Der Vergleich zu flächig beschichteten NCPHM zeigt, dass diese deutlich kleinere Partikel- und Porengrößen aufweisen als die NC-Membranen (Abbildung 5-6 b). Dies spiegelt sich ebenfalls in den CFT der Materialien wieder (Abbildung 5-5). Der Zusammenhang der Partikel- und Porengrößen ist schematisch in Abbildung 5-7 dargestellt.

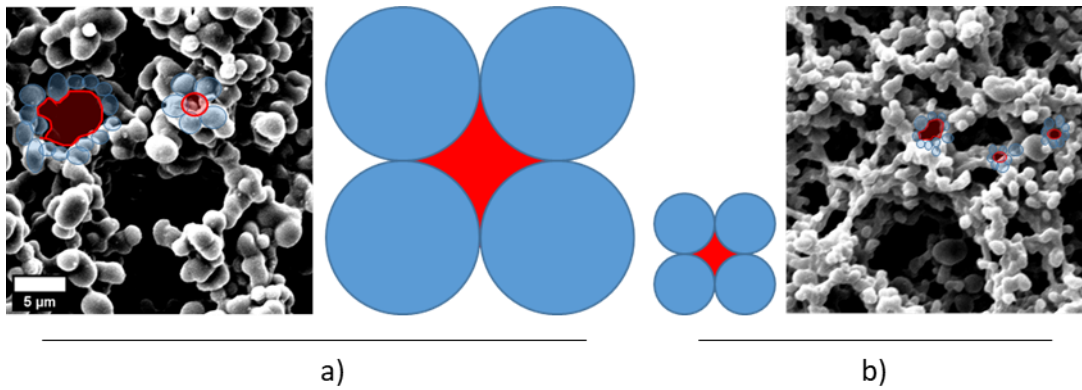


Abbildung 5-7: Darstellung der unterschiedlichen Porengrößen in Abhängigkeit der Partikelgröße der porösen NC. a) Exemplarische Darstellung großer Partikel (Blau) welche zu größeren Poren (Rot) führen. b) kleinere Partikel und kleinere Porenradien.

Bei der Zusammenkunft großer Partikel wird ein deutlich größerer Porenradius a) erhalten, als bei kleineren Partikelgrößen (b). Dies ist exemplarisch in den REM-Mikrographen illustriert. Neben der reinen Partikelgröße beeinflusst scheinbar ein weiterer Aspekt die CFT der Materialien. In Abbildung 5-6 b) ist zu sehen, dass das NCPHM mit einem NC-Anteil von 3,5% eine deutlich geringere Porengröße aufweist, aber eine niedrigere CFT besitzt (Abbildung 5-5 b) im Vergleich zu den höheren NC-Anteilen. Dies lässt sich anhand der REM-Mikrographen in Abbildung 4-3 erklären. Die aufgebrachte NC im NCPHM mit einem 3,5% NC-Anteil füllen die Makroporen des Papiers aufgrund eines niedrigen Beschichtungsgewichtes (Abbildung 4-11) nicht vollständig mit einer porösen Struktur aus. Dies führt dazu, dass zwischen porösen NC-Strukturen und der Faseroberflächen Porenradien entstehen, welche größer sind als bei höheren NC-Anteilen. Dies führt vermutlich zu der niedrigeren CFT.

Neben dem NC-Anteilen im *Lacquer*, wurde ebenfalls der Einfluss der Beschichtungsgeschwindigkeiten auf die CFT der Materialien untersucht. Dieser Einfluss ist in Abbildung 5-8 dargestellt.

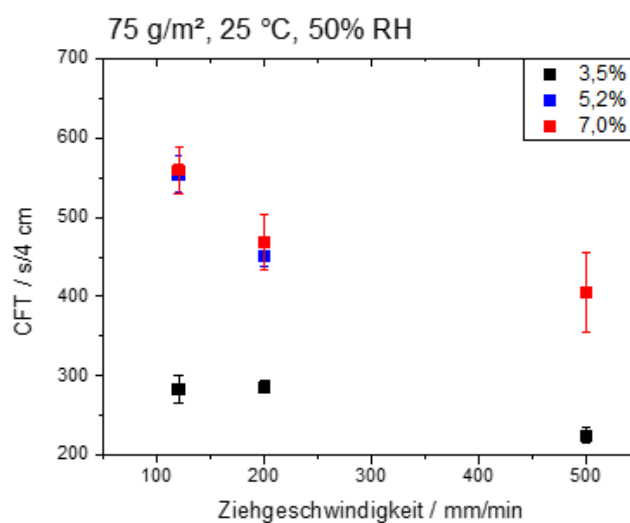


Abbildung 5-8: Kapillare Fließzeiten von vollflächigen NCPHM in Abhängigkeit zur Beschichtungsgeschwindigkeit. Verwendet wurden 75 g/m² Papiere unter Variation der NC-Anteile im *Lacquer* von 3,5% (Schwarz), 5,2% (Blau) und 7,0% (Rot).

In Abhängigkeit der Ziehgeschwindigkeiten ist zu erkennen, dass mit zunehmender Geschwindigkeit die CFT der NCPHM abnimmt. Dieser Effekt lässt sich besonders bei der Verwendung von höheren NC-Anteilen von 5,2% und 7,0% beobachten. In Abschnitt 4.2.1 konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Ziehgeschwindigkeit die Porengrößen der NCPHM größer sind als bei niedrigeren Geschwindigkeiten. Dieser Effekt scheint maßgeblich zu einer Reduzierung der CFT bei höheren Ziehgeschwindigkeiten beizutragen. Zudem ist bei höheren Ziehgeschwindigkeiten eine höhere Beschichtungsmasse des Materials mit NC zu beobachten gewesen (Abbildung 4-12). Die höhere Beschichtungsmasse scheint zu einer homogeneren Porenbildung und Verteilung der NC auf dem NCPHM zu führen, was einen gleichmäßigen Fluidfluss ermöglicht. Bei NCPHM mit einem NC-Anteil von 3,5% ist erst bei einer Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min ein Abfall der CFT zu beobachten. Eine Betrachtung der Morphologie dieser Materialien kann zur Erklärung der niedrigeren CFT herangezogen werden. In Abbildung 4-6 konnte gezeigt werden, dass bei niedrigen Ziehgeschwindigkeiten keine vollständige Bedeckung der Faseroberflächen mit poröser NC erhalten werden konnte. Erst bei einer Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min wird eine mit NC bedeckte Papieroberfläche erhalten. Durch ein erhöhtes Beschichtungsgewicht durch höhere Ziehgeschwindigkeiten (Abbildung 4-12) wird eine ausreichende Menge NC in das Material eingebracht, um die Makroporen zu füllen. Dies sorgt dafür, dass größere Poren erhalten werden und die CFT dadurch niedriger wird.

Die klimatischen Parameter bei der Herstellung und Trocknung und deren Einfluss auf die CFT von NCPHM sind in Abbildung 5-9 dargestellt.

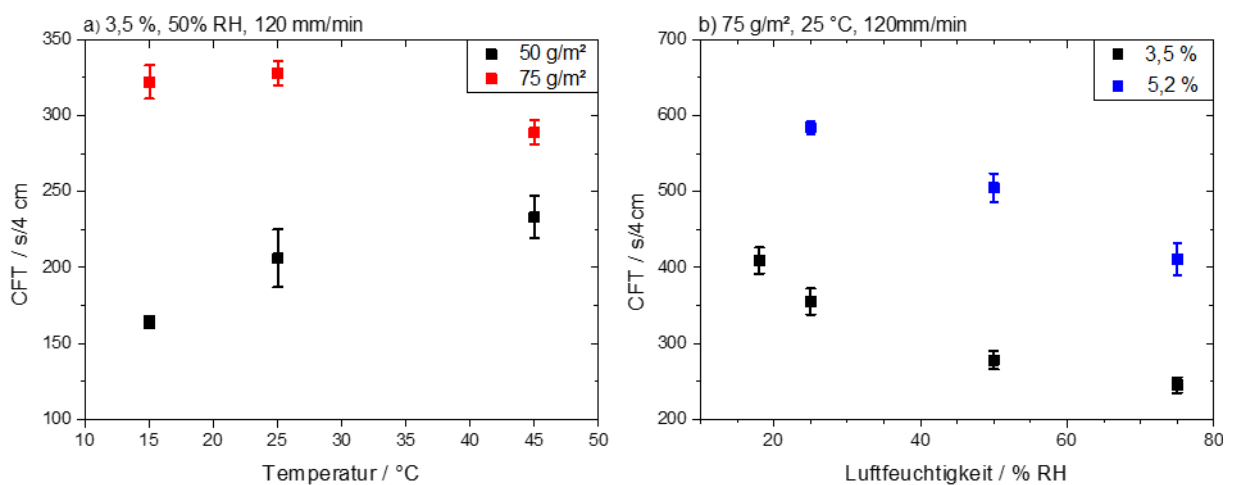


Abbildung 5-9: Kapillare Fließzeiten von vollflächig beschichteten NCPHM. Die Beschichtung wurde bei einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min durchgeführt. a) Variation der Temperatur bei einer konstanten Luftfeuchtigkeit und einem NC-Anteil von 3,5% im *Lacquer* auf 50 g/m² (Schwarz) und 75 g/m² (Rot) Baumwoll-Linters-Papieren. b) Variation der Luftfeuchtigkeit bei einer konstanten Temperatur von 25 °C auf 75 g/m² Papieren unter Verwendung eines NC-Anteils von 3,5% (Schwarz) und 5,2% (Blau).

Bei der Verwendung von Papieren mit 75 g/m² ist der Temperatureinfluss deutlich geringer als bei niedrigeren Grammaturen. Lediglich bei einer Temperatur von 45 °C ist ein Abfall der CFT auf ca. 290 s/4 cm zu beobachten. Bei zunehmenden Temperaturen konnte beobachtet werden,

dass die Beschichtungsgewichte auf dem Material abnehmen. Durch eine Reduktion der Beschichtungsmasse, kombiniert mit einer schnelleren Trocknung und damit verbunden einer schnelleren Verdunstung von Lösemittel, scheint sich eine Porenstruktur zu bilden, die einen schnelleren Fluidfluss ermöglicht. Werden 50 g/m² Papiere für die Herstellung verwendet, so verhält sich der Trend bei den CFT antiproportional zu den erzielten Beschichtungsgewichten (Abbildung 4-12 b). Bei einer niedrigeren Temperatur nimmt die Viskosität des *Lacquers* zu, wodurch mehr davon bei der Tauchbeschichtung auf das Papier übertragen werden kann. Bei der Untersuchung der Ziehgeschwindigkeiten (Abbildung 5-8) konnte ein Zusammenhang zwischen höherer Beschichtungsmasse und sinkender CFT beobachtet werden. Die applizierte Masse bewirkte eine ausreichende Füllung der Makroporen des Papiers und begünstigte die Ausbildung von größeren Poren. Dieser Zusammenhang würde ebenfalls den Verlauf der CFT in Abhängigkeit zur Temperatur erklären. Des Weiteren kommt hinzu, dass bei niedrigeren Temperaturen die Ausbildung der Poren aufgrund geringerer Trocknungsgeschwindigkeiten und Verdunstung der *Lacquer* Komponenten eine gleichmäßigere Porenbildung begünstigt wird. Dies könnte die niedrige CFT bei einer Beschichtungstemperatur von 15 °C erklären.

Die Betrachtung der Abhängigkeit der Luftfeuchtigkeit auf die CFT (Abbildung 4-12 b) zeigt, dass die CFT mit steigender Luftfeuchtigkeit abnimmt. Dies ist sowohl für die Beschichtung mit einem NC-Anteil von 3,5%, sowie für 5,2% NC zu beobachten. Die Luftfeuchtigkeit hat einen direkten Einfluss auf die Verdunstung der Bestandteile des *Lacquers* und wirkt damit auf die Porenbildung ein. Bei einer geringen Luftfeuchtigkeit kommt es zu einer schnelleren Trocknung und Verdunstung des *Lacquers*. Dabei sinkt der Nichtlösemittelanteil durch eine schnellere Verdunstung des Wasseranteils, wodurch die Ausbildung von kleineren Poren begünstigt wird. Bei einer hohen Luftfeuchtigkeit hingegen ist die Verdunstungsrate geringer, was zu größeren Poren führt. Größere Poren begünstigen einen schnelleren Fluidfluss und sorgen damit für eine niedrigere CFT. Dies steht im Einklang mit der Washburn-Gleichung (vgl. Abschnitt 1.4)

Da die kapillaren Fließzeiten eine wichtige Kenngröße für die Anwendung von Membranmaterialien in diagnostischen *Assays* darstellen, wurde in einem kombinierten Ansatz versucht, NCPHM mit CFT von unterhalb 200 s/4 cm herzustellen. Bei diagnostischen *Assays* wird Wert daraufgelegt, dass das gewünschte, diagnostische Ergebnis innerhalb einer kurzen Zeit erhalten wird. Anhand der vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei hohen Ziehgeschwindigkeiten niedrigere CFT erreicht werden können und dass hohe Luftfeuchten sich scheinbar positiv auf die Ausbildung von größeren Poren auswirken, welche ebenfalls niedrigere CFT zur Folge haben. Aus diesem Grund wurde als kombinierter Ansatz eine hohe Luftfeuchtigkeit und hohe Ziehgeschwindigkeit für die Tauchbeschichtung gewählt. Die CFTs zum kombinierten Ansatz sind in Abbildung 5-10 dargestellt.

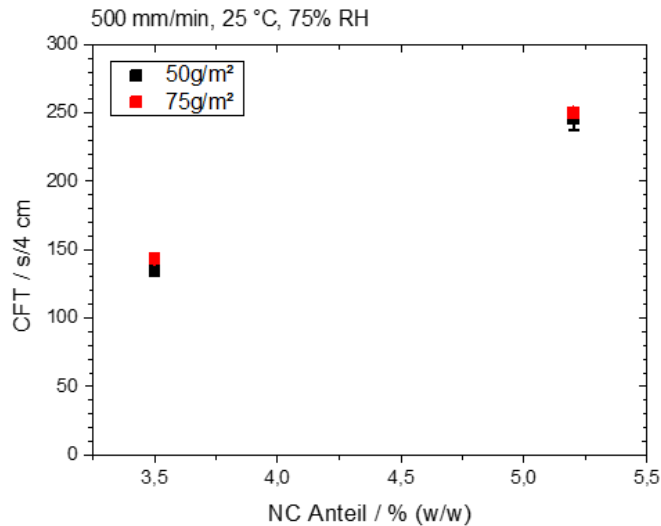


Abbildung 5-10: Kapillare Fließzeiten des kombinierten Ansatzes aus Ziehgeschwindigkeit, Luftfeuchtigkeit und Temperatur von vollflächig beschichteten NCPHM, hergestellt durch Tauchbeschichtung. Zur Beschichtung wurden 50 g/m² Papiere (Schwarz) und 75 g/m² Papiere (Rot) verwendet. Die Tauchbeschichtung wurde bei 25 °C, 75% RH mit NC-Anteilen von 3,5% und 7,0% durchgeführt.

Durch Kombination einer schnelleren Ziehgeschwindigkeit und einer höheren Luftfeuchtigkeit bei der Tauchbeschichtung, können die CFT im Vergleich zu vorherigen Ansätzen deutlich reduziert werden. Bei der Verwendung von NC-Lacquer mit einem Anteil von 5,2% lässt sich eine CFT von 260 s/4 cm ± 5 s/4 cm erhalten. Diese ist somit um fast 350 s/4 cm geringer als bei der höchsten gemessenen CFT mit diesem Lacquer (Abbildung 5-9 b). Bei der Verwendung eines NC-Anteils von 3,5%, lassen sich kapillare Fließzeiten von unterhalb 200 s/4 cm erhalten. Diese liegt bei 145 s/4 cm ± 7 s/4 cm. Dies entspricht einer Reduktion der CFT um mehr als 50% im Vergleich zur höchsten gemessenen CFT aus allen Ansätzen (Abbildung 5-9 b).

Die gezielte Auswahl von Herstellungsparametern bei der Tauchbeschichtung von Baumwoll-Linters-Papieren in NC-Lacquer ermöglicht es die kapillaren Fließzeiten einzustellen. Durch Kontrolle der Trocknungsparameter und Ziehgeschwindigkeit, sowie Auswahl des passenden NC-Lacquers, wird die Morphologie der Membranmaterialien beeinflusst, welche im direkten Zusammenhang zur CFT stehen. Somit können CFT erzielt werden, welche in der Größenordnung von konventionellen NC-Membranen (75 s/4 cm – 180 s/4 cm) liegen.

Die erzielten CFT der verschiedenen Beschichtungsansätze sind in Abbildung 5-11 zusammengestellt.

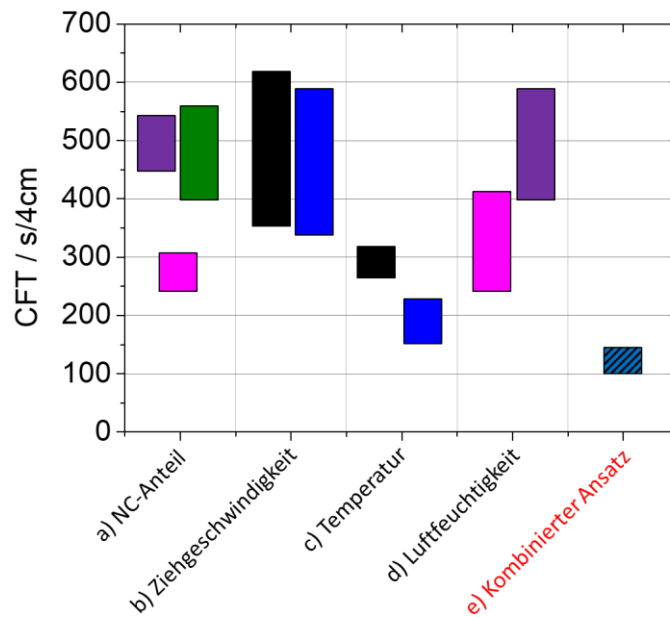


Abbildung 5-11: Übersicht der erzielten kapillaren Fließzeiten verschiedener vollflächiger NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung. Die detaillierten Werte können den einzelnen Abbildungen entnommen werden. Variiert wurde der NC-Anteil im *Lacquer* (Abbildung 5-5), die Ziehgeschwindigkeiten (Abbildung 5-8), die Temperatur und Luftfeuchtigkeit (Abbildung 5-9). Durch Kombination der einzelnen Variationen wird der kombinierte Ansatz (Abbildung 5-10) erhalten. Blau: 50 g/m² Papier, Schwarz: 75 g/m² Papiere, Magenta: 3,5% NC, Violett: 5,2% NC, Grün: 7,0% NC.

Anhand der Übersicht der durchgeführten Beschichtungsansätze können allgemeine Trends abgeleitet werden, wie die kapillaren Fließzeiten in vollflächig beschichteten NCPHM eingestellt werden können. Aus der Variation der NC-Anteile im *Lacquer* (Abbildung 5-11 a) geht hervor, dass die CFT mit steigendem NC-Gehalt zunimmt. Die niedrigsten CFT wurden dabei mit NC-Anteilen von 3,5% erhalten, diese lagen in einem Bereich von 250 s/4 cm – 310 s/4 cm. Durch Variation der Ziehgeschwindigkeiten konnte gezeigt werden, dass schnelle Ziehgeschwindigkeiten die Beschichtungsmasse auf den Hybridmaterialien erhöhen und zu einer niedrigeren CFT führen. Durch die Anpassung der Ziehgeschwindigkeiten konnten die CFT Werte um ca. 200 s/4 cm auf Werte von 350 s/4 cm reduziert werden. Niedrige Temperaturen bei der Herstellung, sowie eine hohe Luftfeuchtigkeit sorgen ebenfalls für eine Reduktion der CFT. Im kombinierten Ansatz konnte gezeigt werden, dass CFT im Bereich von konventionellen NC-Membranen auf NCPHM erreicht werden können. Bei einer Luftfeuchtigkeit von 75% RH, 25 °C, 500 mm/min Ziehgeschwindigkeit und einem NC-Anteil von 3,5% wurde die niedrigste CFT für vollflächige NCPHM erreicht.

Durch die Anpassung der Fließzeiten an die von konventionellen NC-Membranen wird eine bessere Vergleichbarkeit der Materialien in der Anwendung als Membranmaterial für diagnostische Assays erzielt. Die Betrachtung von vollflächigen NCPHM als alternative Membranmaterialien wird in Abschnitt 6.2 diskutiert.

5.4 Fließeigenschaften von ortsdefinierten NCPHM

Ortsdefinierte NCPHM wurden wie in Abschnitt 8.2.2 hergestellt und hinsichtlich der Morphologie der Materialien in Abschnitt 4.3 charakterisiert. Da eine spätere Anwendung der Materialien als alternatives Membranmaterial in diagnostischen Assays angestrebt wird, muss eine Charakterisierung der Fließeigenschaften der Materialien erfolgen. In Abschnitt 5.4.1 werden die allgemeinen Fließeigenschaften und deren Charakteristika beschrieben. Der Einfluss der Herstellungsparameter wie das dosierte Volumen des *Lacquers*, dessen NC-Anteile und der Grammatratur des Basispapiers werden in Abschnitt 5.4.2 behandelt. Ein Vergleich zwischen Fließeigenschaften von konventionellen NC-Membranen mit den ortsdefinierten NCPHM wird in Abschnitt 5.4.3 gezogen. Eine finale Beurteilung der Anwendbarkeit dieser Materialien als alternative Membranmaterialien für diagnostische Assays wird in Abschnitt 6.3 getroffen.

5.4.1 Bestimmung der Fließeigenschaften von ortsdefinierten NCPHM

Zur Bestimmung der allgemeinen mikrofluidischen Eigenschaften der ortsdefinierten NCPHM wurden Fließtests gemäß Abschnitt 8.6 durchgeführt. Hierfür wurde der Fluidfluss für unbehandeltes Papier, einem ortsdefiniertem NCPHM ohne Detergensbeschichtung und einem Hybridmaterial mit Detergensbeschichtung durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 5-12 dargestellt.

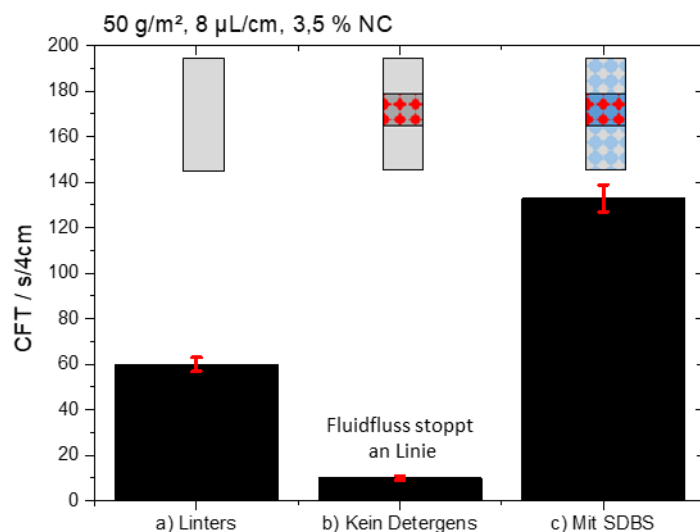


Abbildung 5-12: Kapillare Fließzeiten von a) Baumwoll-Linters-Papier (50 g/m²), b) unbehandeltes ortsdefiniertes NCPHM und c) mit SDBS beschichtetes NCPHM. Das Hybridmaterial wurde hergestellt durch Aufdrucken eines NC-*Lacquers* mit 3,5% (w/w) NC-Anteil bei einer Dosierung von 8 μ L/cm auf Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatratur von 50 g/m². Der *Lacquer* wurde über einen Dosierpinsel appliziert.

Die kapillare Fließzeit von unbehandeltem Baumwoll-Linters-Papier (Abbildung 5-12 a) liegt wie bereits zuvor in Abschnitt 5.2 (Abbildung 5-4 a) diskutiert im Bereich von 60 s/4 cm \pm 3 s/4 cm. Die beobachtete Fließfront war über die gesamte Zeit der Beobachtung gleichmäßig.

Beim ortsdefinierten NCPHM ohne Detergensbeschichtung (Abbildung 5-12 b) wird ein Fluidfluss nur innerhalb der ersten 10 s beobachtet. Nach 10 s erreicht die Fließfront die aufgebrauchte NC-Linie, an dieser kommt der Fluidfluss zum Erliegen. Auch nach einer Beobachtungszeit von weiteren 20 min ist kein Voranschreiten des Flusses zu beobachten. Als Begründung können hierfür zwei verschiedene Mechanismen herangezogen werden. Die Beschichtung der Papierfasern mit NC sorgt für eine Verminderung bzw. Unterbindung der Faserquellung im Kontakt mit Wasser. Dies führt zu keiner weiteren Flüssigkeitsaufnahme und der kapillargetriebene Fluidfluss kommt zum Erliegen.^[169] Des Weiteren besteht wie auch in Abschnitt 5.5 (CN-Papiere) die Möglichkeit, dass eine Änderung der Oberflächenenergie von Cellulose zur NC trotz eines hydrophilen Kontaktwinkels der NC zu einem *Pinning-Effekt* an der Dreiphasen-Kontaktlinie führt.^[168] Da für die Anwendung der Hybridmaterialien als Membranmaterial in diagnostischen Assays ein Fluidfluss benötigt wird, ist eine Detergensbeschichtung wie in Abschnitt 8.5 beschrieben unabdingbar. Nach erfolgter Detergensbeschichtung c) kommt der Fluidfluss nicht mehr an der aufgebrauchten Linie zum Erliegen. Die Fließfront ist beim Passieren des Streifens die komplette Zeit über gleichmäßig. Beim Erreichen der NC-Linie ist zu beobachten, dass der Fluidfluss sich verlangsamt. Die reduzierte Geschwindigkeit nimmt nach dem mit NC bedruckten Bereich nicht wieder zu. Die kapillare Fließzeit des ortsdefinierten NCPHMs auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papier mit einer Dosierung über einen Dosierpinsel von 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ und einem NC-Anteil von 3,5% (w/w) liegt bei 133 s/4 cm \pm 6 s/4 cm. Dies liegt im Bereich von konventionellen NC-Membranen wie beispielsweise der HiFlow 135 Membran. Im nachfolgenden Abschnitt, werden die kapillaren Fließgeschwindigkeiten der einzelnen ortsdefinierten Hybridmaterialien diskutiert.

5.4.2 Einfluss des Dosiervolumens und des NC-Gehalts auf die mikrofluidischen Eigenschaften

Anhand der ersten Messungen der kapillaren Fließzeit in Abbildung 5-12 konnte festgestellt werden, dass ortsdefinierte NCPHM einer Detergensbehandlung unterzogen werden müssen, damit ein Fluidfluss durch den mit NC beschichteten Streifen möglich ist. Die zu beobachtende Fließfront war zu jeder Zeit homogen und es kam zu einer Verlangsamung des Fluidflusses beim Erreichen des NC-Streifens, ohne eine spätere Beschleunigung des Flusses beim Verlassen des NC-Streifens. Um den Einfluss der verschiedenen Herstellungsparameter auf die mikrofluidischen Eigenschaften zu betrachten, werden nachfolgend die kapillaren Fließzeiten der Hybridmaterialien, welche mittels Liniendruckverfahren unter Verwendung eines Dosierpinsels hergestellt wurden diskutiert. In Abschnitt 4.3.2 konnte gezeigt werden, dass die Verwendung einer Kanüle zur Applikation des *Lacquers* zu einer höheren Anzahl an inhomogenen Hybridmaterialien führt. Aus diesem Grund werden diese nicht für die Untersuchung der kapillaren Fließzeit herangezogen. Die Hybridmaterialien, welche durch den *Lacquer*-Auftrag mittels eines Dosierpinsels hergestellt wurden weisen ähnliche Linienbreiten wie bei der Applikation über eine Kanüle auf (Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14) und sind Gegenstand der kapillaren Fließzeitmessungen in Abbildung 5-13.

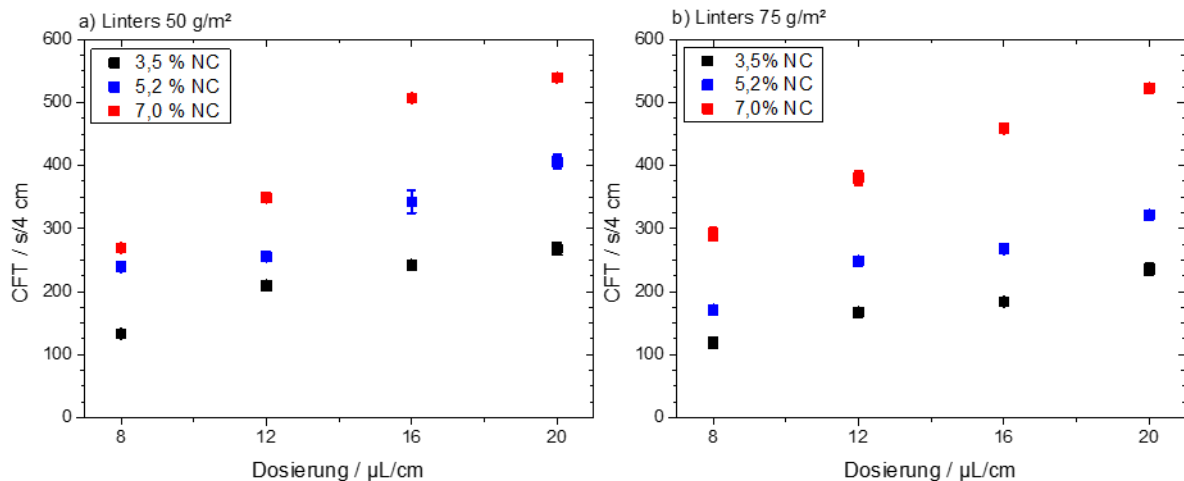


Abbildung 5-13: CFT von ortsdefinierten NCPHM hergestellt durch Liniendruckverfahren unter Verwendung eines Dosierpinsels in Abhängigkeit des Dosiervolumens. Aufgetragen wurde NC-Lacquer mit 3,5% NC (Schwarz), 5,2% NC (Blau) und 7,0% NC (Rot). Die Materialien wurden auf Baumwoll-Linters-Papieren mit a) 50 g/m² und b) 75 g/m² hergestellt.

Die kapillaren Fließzeiten der ortsdefinierten NCPHM auf Baumwoll-Linters-Papieren mit einer Grammatur von 50 g/m² sind in Abbildung 5-13 a) dargestellt. Mit steigender Dosierung kann eine Zunahme der kapillaren Fließzeiten beobachtet werden. Dies gilt sowohl für die niedrigeren NC-Anteile im *Lacquer* (3,5%) als auch für höhere Anteile (5,2%, 7,0%). Neben der steigenden Dosierung, sorgt auch ein höherer NC-Anteil im *Lacquer* für einen Anstieg der kapillaren Fließzeiten. Die niedrigsten Fließzeiten werden auf Hybridmaterialien erzielt, welche mit einem NC-Anteil von 3,5% im *Lacquer* hergestellt wurden. Diese liegen im Bereich von 133 s/4 cm ± 6 s/4 cm (bei 8 µL/cm) bis 268 s/4 cm ± 10 s/4 cm (bei 20 µL/cm). Bei Verwendung von höheren NC-Anteilen im *Lacquer* decken die Fließzeiten einen Bereich von 239 s/4 cm ± 7 s/4 cm (8 µL/cm, 5,2% NC) bis 539 s/4 cm ± 3 s/4 cm (16 µL/cm, 7,0% NC) ab. Im direkten Vergleich zu konventionellen NC-Membranen ist die Fließzeit deutlich höher als beispielsweise bei einer HiFlow 180 Membran (163 s/4 cm ± 3 s/4 cm). Lediglich das Hybridmaterial welches aus einem *Lacquer* mit 7,0% (w/w) NC und einer Dosierung von 8 µL/cm hergestellt wurde, liefert auf dem 50 g/m² Papier ausreichend niedrige Fließzeiten im vergleichbaren Bereich. Knapp oberhalb von gängigen NC-Membranen liegt die Fließzeit des Hybridmaterials welches bei einer Dosierung von 12 µL/cm aus einem *Lacquer* mit 3,5% NC-Anteil hergestellt wurde.

In Abbildung 5-13 b) sind die kapillaren Fließzeiten der ortsdefinierten NCPHM auf 75 g/m² Papieren dargestellt. Diese sind im Vergleich zu den Hybridmaterialien auf 50 g/m² Papieren niedriger. Die zuvor beschriebenen Trends sind identisch. Mit steigender Dosierung werden höhere Fließzeiten erhalten. Dies ist ebenfalls bei einem höheren NC-Anteil im *Lacquer* der Fall. Die Fließzeiten der Hybridmaterialien des 3,5% NC-Anteils bei 8 µL/cm, 12 µL/cm und 16 µL/cm weisen Fließzeiten von 119 s/4 cm ± 9 s/4 cm bis 183 s/4 cm ± 5 s/4 cm auf. Damit liegen sie im Bereich von konventionellen NC-Membranen wie HiFlow 120 (103 s/4 cm ± 1 s/4 cm), HiFlow 135 und HiFlow 180 (163 s/4 cm ± 3 s/4 cm). Auf 75 g/m² Papieren kann zudem bei einer Dosierung von 8 µL/cm und einem NC-Anteil von 5,2% (w/w) Materialien hergestellt werden, die eine Fließzeit von 171 s/4 cm ± 6 s/4 cm aufweisen.

Bei allen Messungen der kapillaren Fließzeit der ortsdefinierten NCPHM kann beobachtet werden, dass die Abweichungen zwischen den Messungen sehr gering sind. Dies deutet auf eine gute Reproduzierbarkeit der CFT Messungen und der Herstellung der Hybridmaterialien hin.

Die kapillaren Fließzeiten korrelieren mit den ermittelten Linienbreiten (Abbildung 4-18) und Beschichtungsgewichten (Abbildung 4-19). Bei einer zunehmenden Dosierung des *Lacquers* kommt es zu einem Zunehmen der Linienbreiten und der Beschichtungsgewichte. Die Linienhomogenität wie in Abschnitt 4.3.2 diskutiert, scheint keinen negativen Einfluss auf die kapillaren Fließzeiten zu haben. Hybridmaterialien mit einer inkonsistenten Linienbreite, als auch inhomogener Materialverteilung stellen keine Ausreißer bei der kapillaren Fließzeitmessung dar.

Betrachtet man die Morphologie der Materialien, so lassen sich zwischen den verschiedenen Hybriden im Randbereich der aufgetragenen Linie keine unterschiedlichen Strukturen feststellen. Die Randbereiche sind wie beispielsweise in Abbildung 4-22 dargestellt homogen mit NC umgeben und es liegen keine porösen Strukturen vor. Die Strukturen innerhalb der Linie können für die Beschreibung des Fluidflusses außer Acht gelassen werden, da die Verlangsamung der Fließfront in allen Fällen unmittelbar bei Erreichen der aufgedruckten Linie einsetzt. Eine spätere Änderung der Fließgeschwindigkeit konnte innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht festgestellt werden.

Eine mögliche Erklärung für die starke Reduktion der Fließgeschwindigkeit kann in der Quellfähigkeit der Papierfasern nach der NC-Beschichtung liegen. Üblicherweise läuft der Fluidfluss in Papieren in mehreren Schritten ab. Zuerst erfolgt eine oberflächliche Benetzung der Papierfasern, welche zu einer Faserquellung führt was zum Eindringen des Fluides ins Faserlumen führt. Dieser Prozess führt zur Ausbildung einer ersten vorausseilenden Fließfront. Im weiteren Verlauf folgt auf die vorausseilende Front ein Auffüllen der Makroporen des Papiers.^[169] Der Fluidfluss verhält sich im Papier dann gemäß der Lucas-Washburn-Gleichung (Abschnitt 1.4). Im Bereich der aufgedruckten NC ist eine drastische Verlangsamung des Fluidflusses zu beobachten. Dies könnte wie folgt zu erklären sein. Die vorausseilende Fließfront auf dem unbeschichteten Papier trifft auf die mit NC ummantelten Fasern. An diesen findet zum einen eine Änderung der Oberflächenenergie statt^[167,168] und möglicherweise eine Verminderung oder gar Unterbindung der Faserquellung durch die applizierte NC.^[169] Dies führt zu einer starken Verlangsamung des Fluidflusses, da ein Voranschreiten der Fließfront erst durch ein sukzessives Auffüllen der Makroporen wieder ermöglicht wird. Um diese zu füllen, wird ein deutlich höheres Fluidvolumen benötigt, als bei der vorausseilenden Flüssigkeitsfront bei der Faserquellung. Im weiteren Verlauf des Fluidflusses ändert sich dieses Verhalten im späteren Verlauf nicht mehr.

Eine Hydrophobierung von Papieren durch Reduktion der Quellfähigkeit von Papieren konnte bei Mikolei et al.^[169] beobachtet werden. Hier wurden Papiere mit dichtem Silica und mesoporösem Silica beschichtet und dessen Fluidfluss mikroskopisch im Vergleich zu unbehandelten Papieren untersucht. Bei unbehandelten Papieren konnte beobachtet werden, dass der Fluidfluss bei Baumwoll-Linters-Papieren primär an der Faseroberfläche und im Faserlumen durch Quellung dieser stattfindet. Bei der Beschichtung mit dichtem Silica konnte beobachtet werden, dass eine Änderung des Fließverhaltens im Vergleich zu unbehandelten Papieren stattfindet. Bei der Beschichtung mit dichtem Silica auf den Papieren wird eine glatte Faseroberfläche erhalten, auf der sich keine Fibrillen mehr befinden. Die Faserquellung wurde durch die Beschichtung unterbunden, was zu einem Fluidfluss in den Makroporen des Papiers führt. Die

Füllung dieser geht wesentlich langsamer von Statten, da erst wenn die Poren gefüllt sind, die Fließfront voranschreiten kann. Das Verhalten des Fluidflusses von ortsdefinierten NCPHM lässt sich anhand der Mechanismen und Szenarien aus der Veröffentlichung von Mikolei et al.^[169] erklären.

5.4.3 Vergleich ortsdefinierter NCPHM mit konventionellen NC-Membranen

Eine Betrachtung der Fließeigenschaften von ortsdefinierten NCPHM (Abschnitt 5.4) und konventionellen NC-Membranen (Abschnitt 5.2) zeigt, dass bei bestimmten Herstellungsparametern eine vergleichbare kapillare Fließzeit erreicht werden kann. Dies kann vor allem bei der Verwendung von NC-Lacquern mit einem geringen NC-Anteil und einer geringen Dosierung erreicht werden. Die Verwendung von Papieren mit einer höheren Grammaturn ermöglicht höhere Fließgeschwindigkeiten bzw. geringere kapillare Fließzeiten. Der wohl größte Unterschied zwischen ortsdefinierten NCPHM und konventionellen NC-Membranen liegt im Aufbau der Materialien. Konventionelle NC-Membranen bestehen aus gleichmäßig verteilter und poröser NC über die komplette Membranfläche. Bei ortsdefinierten NCPHM kommen unterschiedliche Materialien und Fließeigenschaften zusammen. Der initiale Fluidfluss wird von den Benetzungseigenschaften des Basispapiers definiert. Die kapillare Fließzeit dessen ist wie in Abbildung 5-4 zu sehen mit einem Wert von ca. 60 s/4 cm gering. Im Bereich der aufgetragenen NC-Linie ist ein drastischer Rückgang der Fließgeschwindigkeit zu beobachten. Eine Hypothese zu dieser Beobachtung ist in Abschnitt 5.4.2 diskutiert worden. Je breiter der aufgetragene NC-Streifen auf dem Papier ist, desto früher setzt die Verlangsamung des Fluidflusses ein. Um die kapillaren Fließzeiten weiter zu reduzieren könnte in Erwägung gezogen werden, dass nur unterhalb der später aufzubringenden Antikörperlinien NC aufgetragen wird. Hierbei wäre es vorteilhaft, geringe NC-Dosierungen zu verwenden, damit die Linienbreiten gering bleiben. Da mit dem Aufdrucken des *Lacquers* bei geringeren Dosierungen schmalere Linien erhalten werden (vgl. Abschnitt 4.3.2), ist das Aufbringen einer einzigen Linie nicht mehr ausreichend. Für diesen Ansatz wären pro Antikörperlinie eine NC-Linie nötig. Dies würde dazu führen, dass der unbeschichtete Bereich des alternativen Membranmaterials sich vergrößert, was zu einer Reduzierung der kapillaren Fließzeit auf dem gesamten Material führen würde. Diese Vorgehensweise hat allerdings im Vergleich zu dem vorherigen Herstellungsweg und dem Aufbringen einer einzigen breiten NC-Linie deutliche Nachteile in der Handhabung für Hersteller von diagnostischen Schnelltests. Durch das Aufdrucken einer breiten NC-Linie können die Antikörperlinien einfacher aufgebracht werden, da die Positionsgenauigkeit dieser ungenauer sein kann. Hersteller von Schnelltests müssten vermutlich ihre Produktionsabläufe bei der Verwendung von breiten aufgedruckten Linien bei ortsdefinierten NCPHM nicht anpassen. Bei der Applikation von zwei sehr schmalen NC-Linien auf den Papieren spielt die Positionsgenauigkeit bei der Antikörper Applikation eine entscheidende Rolle. Diese sollten im Idealfall exakt auf der NC-Linie appliziert werden, und nicht außerhalb derselben. Dies erfordert eine Anpassung der Produktionsabläufe bei der Herstellung von diagnostischen Assays. Die geschätzte Akzeptanz von Herstellern der Assays für alternative Membranmaterialien für die größere Anpassungen vorgenommen werden müssen ist vermutlich sehr gering, außer das neue Membranmaterial ist besser in der Performance oder zumindest vergleichbar zu konventionellen NC-Membranen, bei einem gleichbleibenden oder geringeren Einkaufspreis der Membranmaterialien. Theoretisch betrachtet sollte es möglich sein mit der Etablierung des Liniendruckverfahrens zur Herstellung von ortsdefinierten NCPHM kostengünstigere und nachhaltigere Membranmaterialien herzustellen, da Papiere

bereits eine ausreichende Stützfunktion für die poröse NC bietet und somit auf PET-Trägermaterialien verzichtet werden kann. Zudem ist der benötigte Anteil an NC für die Herstellung der Materialien um ein vielfaches geringer ist, als bei konventionellen NC-Membranen, was zu weiteren Materialeinsparungen führt.

5.5 Charakterisierung der benetzungs- und mikrofluidischen Eigenschaften von CN-Papieren

Die Kontaktwinkel von CN-Papieren ohne Detergensbeschichtung und deren Struktur sind in Abbildung 5-14 gezeigt.

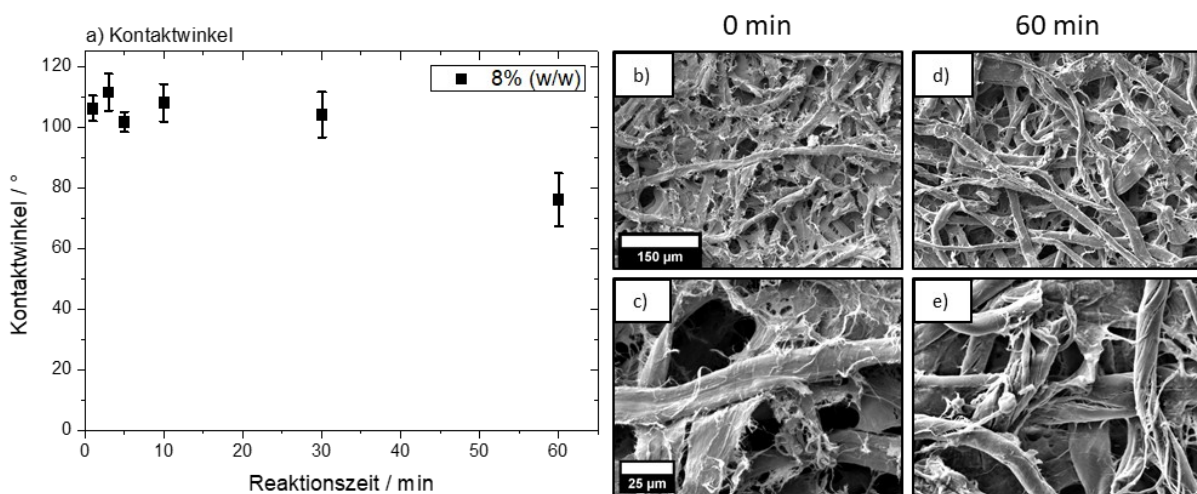


Abbildung 5-14: a) Kontaktwinkel von CN-Papieren ohne Detergensbeschichtung hergestellt durch verschiedene Einlegzeiten in eine Säuremischung mit 8% (w/w) Wassergehalt. REM-Mikrographen von unbehandeltem Baumwoll-Linters-Papier b), c) und CN-Papier nach 60 min Reaktionszeit bei d), e).

Wie in Abschnitt 5.1.1 beschrieben, kann ohne eine Detergensbeschichtung der CN-Papiere keine Benetzbarkeit ($\theta > 90^\circ$) mit Wasser bei niedrigen Reaktionszeiten beobachtet werden. Die gemessenen Kontaktwinkel sind im Vergleich zum Ausgangsmaterial stark gestiegen, obwohl der Kontaktwinkel reines Cellulosenitrats mit $\theta = 68^\circ$ deutlich hydrophil ist (vgl. Abschnitt 5.1.1). Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Beschichtung von Cellulosepapieren mit hydrophilen Siliziumdioxid von Herzog et al.^[167] gemacht. Bei einer Abnahme der Materialoberfläche war dennoch eine Zunahme der Kontaktwinkel zu beobachten, was auf ein *Pinning* an der Dreiphasen-Kontaktlinie auf der Papieroberfläche zurückgeführt werden könnte. Dieser *Pinning*-effekt wurde ausführlich von Hensel et al.^[168] beschrieben. Die dort aufgestellte These konnte durch eine Abnahme der Oberflächenenergie von Cellulose ($63,8 \text{ mN m}^{-1}$)^[167] zu Siliziumdioxid ($59,2 \text{ mN m}^{-1}$)^[167] unterstützt werden. Ähnliche Effekte sollten ebenfalls bei der Veresterung von Baumwoll-Linters-Papieren mit Nitriersäure zum Tragen kommen. Anhand REM-Mikrographen (Abschnitt 4.4.2) ist keine deutliche Zunahme der Porosität und Oberfläche der Materialien durch die Veresterungsreaktion bei niedrigen Reaktionszeiten zu beobachten. Ebenfalls sinkt durch die Veresterungsreaktion die Oberflächenenergie der Baumwollinters-Fasern von $41,18 \text{ mN m}^{-1}$ ^[170,171] auf die des Cellulosenitrats von 38 mN m^{-1} ^[164].

Erst bei längeren Reaktionszeiten (~ 60 min) sinkt der Kontaktwinkel hinreichend ab, um die Benetzung der nicht mit Detergens beschichteten CN-Papieren zu ermöglichen (Abbildung 5-14 a). Bereits bei kurzen Reaktionszeiten beginnen die Fasern aufzureißen (Abschnitt 4.4.2, Abbildung 4-29), allerdings nicht im ausreichenden Maße die Benetzbarkeit zu beeinflussen. Nach 60 min Reaktionszeit ist eine deutliche Zerstörung der Fasern erkennbar (Abbildung 5-14 d,e), welche durch die Rissbildung und das Abstehen von Faserbestandteilen die Benetzbarkeit erhöht. Durch das Abstehen der Faserbestandteile in den Porenraum wird eine ähnliche Morphologie erhalten, wie die von unbehandelte Baumwoll-Linters-Papier (Abbildung 5-14 b,c). Bei den unbehandelten Papieren ist der Anteil der Fibrillen höher und diese sind feiner. In den Faserzwischenräumen ist bei unbehandelten Papieren mehr Feinstoff zu erkennen, welcher bei den langen Reaktionszeiten vollständig fehlt. Die Kombination aus einer niedrigeren Oberflächenenergie des Cellulosenitrats und das Fehlen von Feinstoff ist vermutlich die Ursache dafür, dass keine identisch niedrigen Kontaktwinkel und damit eine identisch gute Benetzbarkeit der CN-Papieren wie bei den Baumwoll-Linters-Papieren erzielt werden können.

Um die Benetzbarkeit der CN-Papiere zu verbessern, wurden diese mit Detergens beschichtet (vgl. Abschnitt 8.5). Für die Anwendbarkeit in diagnostischen Schnelltests ist wie in Abschnitt 1.3 beschrieben die kapillare Fließzeit eine zentrale Kenngröße für Membranmaterialien. Da es sich bei CN-Papieren um homogene Membranmaterialien handelt, kann wie in Abschnitt 5.2 beschrieben von einem Fluidfluss ausgegangen werden, der sich gemäß der Lucas-Washburn-Gleichung (Abschnitt 1.4) proportional zu $\frac{1}{\sqrt{t}}$ verhält. Die Endpunktbestimmungen der kapillaren Fließzeitmessungen sind in Abbildung 5-15 dargestellt.

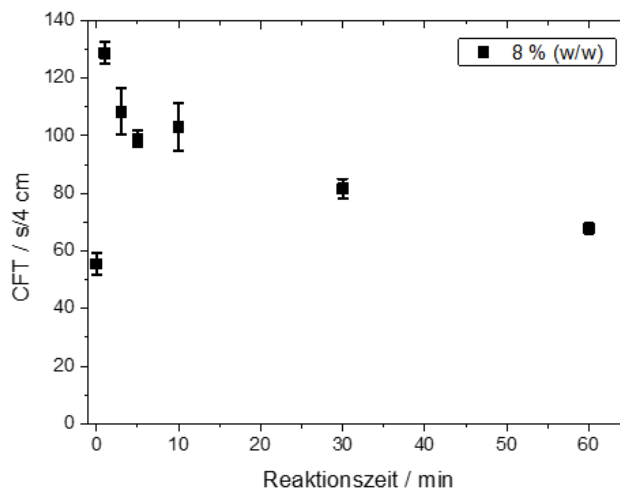


Abbildung 5-15: Kapillare Fließzeiten von Milli-Q® Wasser in CN-Papieren mit Detergensbeschichtung, hergestellt durch verschieden lange Reaktionszeiten in eine Säuremischung mit 8% (w/w) Wasseranteil.

Die kapillaren Fließzeiten von Baumwoll-Linters-Papier (Abbildung 5-15, 0 min) und CN-Papieren zeigen einen deutlichen Anstieg der kapillaren Fließzeit bereits nach kurzen Reaktionszeiten von $55,5 \text{ s/4 cm} \pm 3,7 \text{ s/4 cm}$ auf $128,7 \text{ s/4 cm} \pm 3,8 \text{ s/4 cm}$. Dies könnte auf die Verletzung der Fasern und einer möglichen Änderung der Oberflächenenergie wie in Abschnitt

5.1.1 beschrieben zurückzuführen sein. Mit fortschreitender Reaktionszeit ist eine kontinuierliche Abnahme der kapillaren Fließzeiten zu beobachten. Durch die Detergensbeschichtung der CN-Papiere wird dieses von der Testflüssigkeit gelöst und aufgenommen, was eine Verminderung der Oberflächenspannung des Wassers zur Folge hat^[172]. Aufgrund der niedrigeren Oberflächenspannung kann das Wasser besser in das Membranmaterial eindringen. Mit zunehmender Reaktionszeit nimmt die Rissbildung auf den Fasern (vgl. Abbildung 4-29) zu. Da diese bereits nach wenigen Minuten bis ins Faserinnere bei der Herstellung der Materialien vollständig umgesetzt wurden (vgl. Abschnitt 4.4.3), ist anzunehmen, dass die sinkenden Fließzeiten (zunehmende Fließgeschwindigkeit) im Zusammenhang mit der steigenden Anzahl an Rissen und neuen Poren stehen.

Der Verlauf der kapillaren Fließzeiten zeigt zudem, dass diese sehr gut über die Reaktionszeiten bei der Herstellung von CN-Papieren eingestellt werden können. Gängige kapillare Fließzeiten für kommerziell erhältliche NC-Membranen sind wie in Abschnitt 5.2 thematisiert, Fließzeiten von beispielsweise 90 s/4 cm, 120 s/4 cm, 135 s/4 cm und 180 s/4 cm. Die hergestellten Materialien liegen in diesem Fließzeitenbereich und sind hinsichtlich der Herstellungsparameter einfacher herzustellen als NCPHM oder konventionelle NC-Membranen.

Die in dieser Arbeit hergestellten alternativen Membranmaterialien wurden hinsichtlich ihrer mikrofluidischen Eigenschaften charakterisiert. Als wichtigste Kenngröße wurden die CFT ermittelt. Diese spielen bei der Klassifizierung und Einordnung von Membranmaterialien eine entscheidende Rolle. Je nach CFT und Fließgeschwindigkeit werden die Materialien für verschiedene Assays eingesetzt. Die CFT der NC-Membranen wurden als Referenzwerte bestimmt. Die CFT der Membranen lag zwischen 70 s/4 cm (HiFlow 75) und 165 s/4 cm (HiFlow 180). Als weitere Referenzen wurden die CFT von Baumwoll-Linters-Papieren ermittelt. Unabhängig der Grammaturlagen lagen die CFT der Papiere bei ca. 60 s/4 cm. Des Weiteren wurden CFT von vollflächig beschichteten NCPHM bestimmt und miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die CFT durch Wahl der Herstellungsparameter eingestellt werden kann. Die Herstellungsparameter wirken auf die Porenstruktur der Materialien ein, welche im direkten Zusammenhang zur CFT stehen. Im Rahmen aller Parametervariationen konnten CFT in einer weiten Spanne von 100 s/4 cm bis zu 610 s/4 cm erzielt werden. Für eine Anwendung in diagnostischen Assays fordern Schnelltesthersteller häufig Werte unterhalb von 200 s/4 cm. Anhand der durchgeführten Variationen ließen sich einige Trends ermitteln, wie die CFT beeinflusst werden kann. Bei der Variation des NC-Anteils im *Lacquer* konnte gezeigt werden, dass höhere NC-Anteile zu einer höheren CFT führen, als niedrige Anteile. Zudem konnten höhere CFT erhalten werden, bei Verwendung von höheren Grammaturlagen des Basispapiers. Bei Anwendung hoher Ziehgeschwindigkeiten bei der Tauchbeschichtung ließen sich niedrigere CFT erhalten, als bei niedrigen Geschwindigkeiten. Der Temperatureinfluss bei der Beschichtung hat gezeigt, dass niedrige Temperaturen förderlich für niedrige CFT sind. Bei der Variation der relativen Luftfeuchtigkeit konnte gezeigt werden, dass eine hohe Luftfeuchtigkeit eine niedrige CFT fördert. Anhand der zuvor beschriebenen Einflüsse auf die CFT wurde gezielt ein kombinierter Ansatz gewählt, um vollflächig beschichtete NCPHM zu erzielen deren CFT unterhalb von 200 s/4 cm liegen. Die Verwendung von hohen Ziehgeschwindigkeiten, einer hohen Luftfeuchtigkeit und die Verwendung eines niedrigen NC-Anteils im *Lacquer* ermöglichten die Herstellung von vollflächig beschichteten NCPHM mit CFTs zwischen 100 s/4 cm – 150 s/4 cm, was im Bereich von konventionellen NC-Membranen liegt.

Bei der Herstellung von ortsdefinierten NCPHM lassen sich die zuvor gewonnenen Erkenntnisse ebenfalls auf die Auswirkung auf die CFT übertragen. Hinzu kommt bei der ortsdefinierten Beschichtung die dosierte *Lacquer* Menge, welche sich auf die CFT auswirkt. Mit steigender Dosierung und damit zunehmender NC-Masse auf dem Hybridmaterial steigen die CFTs an. Diese lassen sich sehr genau über die applizierte NC-Menge einstellen. Die CFT Werte variieren je nach Auftragsmenge zwischen 110 s/4 cm – 530 s/4 cm und lassen sich an die Fließzeiten von konventionellen NC-Membranen anpassen. Bei der Betrachtung des Fluidflusses konnte festgestellt werden, dass bis zum mit NC beschichteten Bereich die Fließgeschwindigkeit hoch ist. Der Beschichtete Bereich wird nach ca. 5 s – 10 s erreicht. Nach Erreichen der Beschichtung setzt sich der Fluidfluss mit niedrigerer Geschwindigkeit fort.

Neben den durch Beschichtung hergestellten NCPHM, wurden die CFT der reaktiv hergestellten CN-Papiere betrachtet. Diese wiesen deutlich geringere CFT auf, als NCPHM und lagen in einem Bereich von 130 s/4 cm – 75 s/4 cm. Mit steigender Reaktionszeit war eine Abnahme der CFT zu erkennen. Im Vergleich zu NCPHM kann die Anpassung der kapillaren Fließzeit der CN-Papiere über einen einzigen Parameter eingestellt werden. Dieser stellt die Reaktionszeit dar. Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass die Herstellung dieser Art von alternativen Membranmaterialien im Vergleich zu konventionellen NC-Membranen und NCPHM weniger aufwändig ist. Dies spiegelt sich auch in den CFTs wieder da ein komplett aus Cellulosenitrat bestehendes Material erhalten wird, und kein mehrkomponentiges und komplexes Material wie bei NCPHM oder NC-Membranen.

6. Diagnostische Schnelltests auf Basis von NCPHM und CN-Papieren

Neben der allgemeinen Charakterisierung und der Charakterisierung mikrofluidischer Eigenschaften verschiedenen NCPHM und CN-Papieren spielt die Anwendbarkeit dieser in diagnostischen und analytischen Schnelltests eine entscheidende Rolle. In diesem Abschnitt soll die Leistungsfähigkeit der alternativen Membranmaterialien in diagnostischen, zusammengesetzten Assays untersucht und beschrieben werden. Hierfür können wie in Abschnitt 3.3 thematisiert verschiedene Assays verwendet werden. Qualitativ wird die Proteinbindung eines Modellproteins an vollflächige und ortsdefinierte NCPHM betrachtet (Abschnitt 6.1). Die Eignung der alternativen Membranmaterialien für diagnostische hCG- und HBsAg-Assays wird in den Abschnitten 6.2 - 6.4 untersucht und diskutiert.

6.1 Qualitative Betrachtung der Proteinbindung an vollflächigen und ortsdefinierten NCPHM

Anhand einfachen mikrofluidischen Experimenten an vollflächigen und ortsdefinierten NCPHM werden die proteinbindenden Eigenschaften qualitativ untersucht. Die Durchführung der Experimente ist in Abschnitt 8.7 beschrieben. Eine qualitative Betrachtung der Proteinretention an vollflächigen NCPHM ist in Abbildung 6-1 dargestellt.

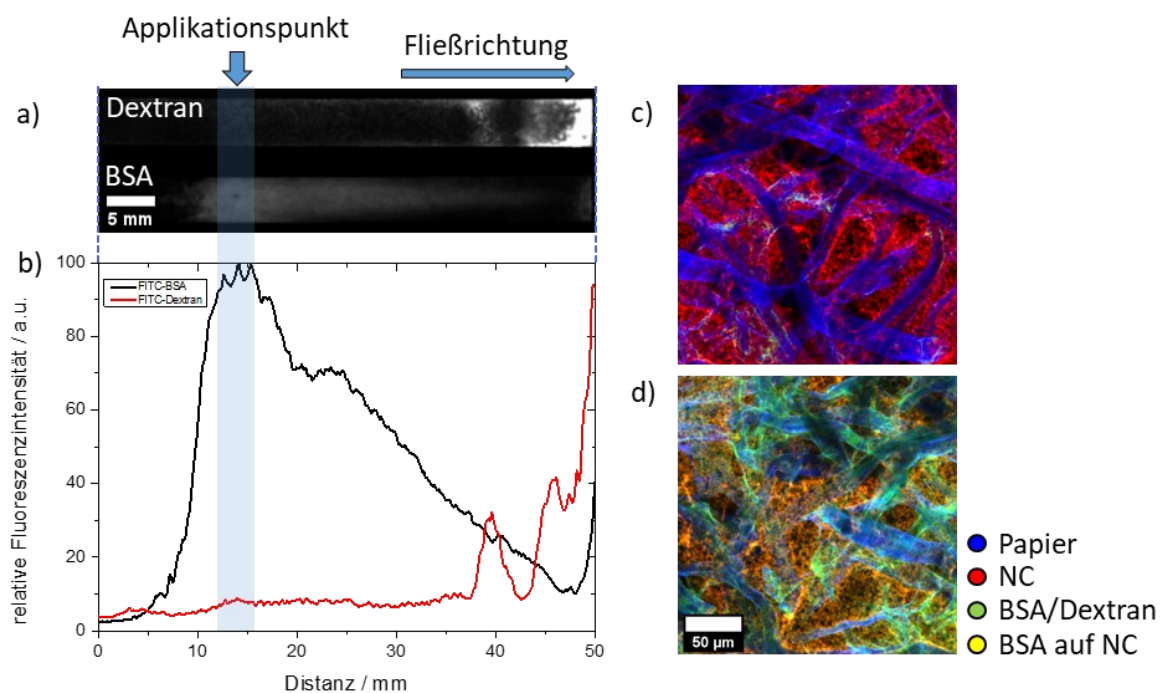


Abbildung 6-1: Qualitative Beurteilung der Proteinretention auf vollflächigen NCPHM. a) Bildaufnahme mittels Fluoreszenzimager. Der Auftrag von FITC-Dextran (oben) und FITC-BSA (unten) wurde im vorgehobenen Bereich mit der Fließfront aufgetragen. Der Fluidfluss erfolgte gemäß der Pfeilrichtung von links nach rechts. b) Relative Fluoreszenzintensitäten der in a) dargestellten Proben. Die Fluoreszenzintensitäten wurden entlang des Materials mit einem Linienprofil in ImageJ bestimmt. Die Fluoreszenzintensitäten des FITC-BSA sind in Schwarz dargestellt, die des FITC-Dextran (Referenz) in rot. CLSM-Detaillaufnahmen als Maximalprojektionen im Bereich des Probenauftrags von c) FITC-Dextran und d) FITC-BSA. Auf den CLSM-Aufnahmen sind die Papierfasern in Blau (Calcofluor White M2R), NC in Rot (Rhodamin B), BSA/Dextran in Grün (FITC) und die Kollokalisierung von BSA auf NC in Gelb dargestellt. Der Skalierungsbalken in d) ist gültig für beide Detailaufnahmen und beträgt 50 µm.

Aufgrund der bekannten Proteinbindeigenschaften der NC^[19] ist zu erwarten, dass die Retention von Proteinen an vollflächigen NCPHM ausreichend hoch ist, sodass sich die Proteine entlang des Hybridmaterials auf diesem so abscheiden, dass sie beim Durchfluss der Analytlösung nicht wieder abgelöst werden. Als Modellprotein wurde das günstige und verfügbare mit FITC markierte BSA verwendet. Als Referenz dazu wurde FITC markiertes Dextran gewählt, welches keine Retention am Hybridmaterial aufweisen sollte. Der hydrodynamische Radius des Dextrans ($7,09 \pm 0,18$ nm, 79,57 kDa)^[173] ist bei identischer Konzentration größer als der des BSA ($3,98 \pm 0,17$, 64,06 kDa)^[173], was möglicherweise zu Größenausschlusseffekten führen könnte.

Anhand der Aufnahmen mittels des Fluoreszenzimagings (Abbildung 6-1 a) ist zu erkennen, dass FITC-Dextran und FITC-BSA ein unterschiedliches Retentionsverhalten auf vollflächigen NCPHM aufweisen. Bei der Applikation von Dextran ist zu erkennen, dass dieses keine Retention entlang des Materials erfährt und sich lediglich am Ende des beheizten Teststreifens aufgrund von Verdunstung des Fluids ansammelt. Bei Verwendung von BSA ist im Bereich des Probenauftrags deutlich eine Proteinabscheidung zu erkennen, welche sich geringfügig entgegen der Fließrichtung ausgebreitet hat. Entlang der Teststreifen wurden in (Abbildung 6-1 b) die relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die zurückgelegte Distanz auf dem Streifen aufgetragen. Die Beobachtungen aus (Abbildung 6-1 a) lassen sich darin bestätigen. Die relative Fluoreszenzintensität der FITC-BSA Probe (Schwarz) zeigt einen deutlichen Anstieg im Bereich der Probenapplikation, im weiteren Verlauf des Teststreifens fällt diese ab. Ein Teil des FITC-BSAs konzentriert sich am Ende des Streifens auf allerdings wesentlich weniger als bei der Referenzprobe. Die Interaktion des BSAs mit dem NCPHM ist hinreichend stark genug, sodass nur wenig BSA mit dem Fluidfluss transportiert werden kann. Bei der Betrachtung des Fluoreszenzverlaufs ist anzunehmen, dass die Adsorption an das Hybridmaterial der Dissoziation von diesem hinweg überwiegt. Bei FITC-Dextran (Rot) ist keine starke Adsorption im Bereich des Probenauftrags zu beobachten. Das Dextran wird, trotz des größeren hydrodynamischen Radius primär mit dem Fluid entlang des Streifens transportiert. Am Ende des Streifens wird dieses aufgrund der Verdunstung des Fluids aufkonzentriert, was ein Ansteigen der Fluoreszenzintensität zu Folge hat. Größenausschlusseffekte können anhand des Kurvenverlaufs beim Dextran ausgeschlossen werden. Anhand der Detailaufnahmen im Bereich der Probenapplikation (Abbildung 6-1 c) kann gezeigt werden, dass das FITC-Dextran (Grün) keine Interaktion mit der NC (Rot) zeigt. Lediglich geringe Mengen Dextran sind mittig im Bildausschnitt zu erkennen, welche vermutlich aufgrund der Größe des Moleküls zurückgehalten werden, ohne jedoch an die NC zu adsorbieren. Anhand der Detailaufnahme des FITC-BSA Streifens (Abbildung 6-1 d) kann deutlich eine Kolo-kalisation (Gelb) von FITC-BSA (Grün) mit der NC (Rot) gezeigt werden. Das Protein adsorbiert an der NC und wird dort zu einem Großteil festgehalten. Neben der Kolo-kalisation kann zudem freies FITC-BSA an den Fasern gesehen werden, welches möglicherweise durch Dissoziation freigesetztes BSA darstellt.

Anhand dieses Versuchs kann gezeigt werden, dass erwartungsgemäß BSA an der NC auf dem NCPHM zurückgehalten wird. Das Protein wird nicht zusammen mit dem Fluid entlang des Streifens transportiert. Die erhöhte Proteinbindung an der NC sollte sich vorteilhaft auf die Retention von Antikörpern der Test- und Kontrolllinie auf diagnostischen Assays auswirken. Dadurch sollten diese Linien beim Aufbringen der Antikörper auf geringe Linienbreiten abgeschieden werden und im späteren Verlauf innerhalb des Assays nicht zu einem Ausbluten durch Abdissoziieren neigen.

Neben der Proteinretention an vollflächigen NCPHM wurde zudem die Retention von BSA und Dextran an ortsdefinierten NCPHM betrachtet. Anhand der zuvor geschilderten Ergebnisse ist zu erwarten, dass es im Bereich der aufgetragenen NC zu einer deutlichen Retention des Proteins kommen wird. Bei einer ausreichend geringen BSA Menge, könnte es zudem zu einer vollständigen Retention des BSA im mit NC beschichteten Bereich kommen. Bei Verwendung von Dextran ist zu erwarten, dass dieses nicht vom NC beschichteten Bereich zurückgehalten wird und es höchstens zu geringen Abscheidungen aufgrund der Molekülgröße kommen kann. Eine vollständige Retention aufgrund von Größenausschlusseffekten ist nicht zu erwarten. Die CLSM-Aufnahmen der qualitativen Proteinretentionsversuche sind in Abbildung 6-2 gezeigt.

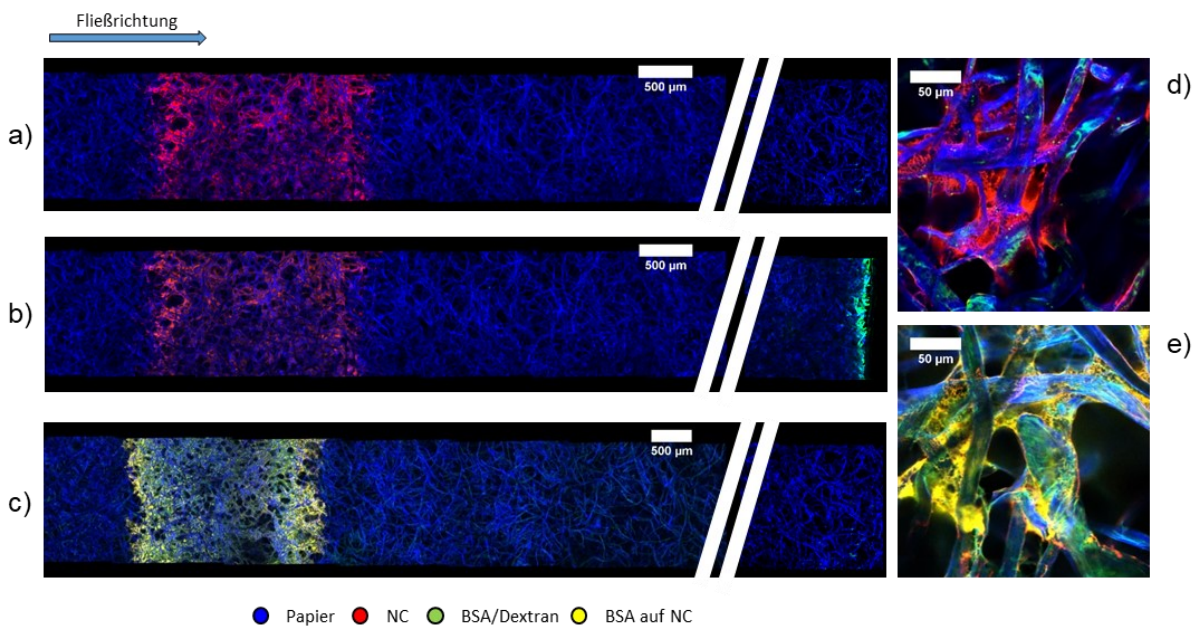


Abbildung 6-2: Untersuchung der Proteinbindung an ortsdefinierten NCPHM ($4\mu\text{L}/\text{cm}^2$, 5,2% NC, 25°C , 50% RH, $50\text{g}/\text{m}^2$) mittels FITC-BSA und FITC-Dextran. Die Richtung des Fluidflusses erfolgte in Pfeilrichtung. Alle Abbildungen sind CLSM-Aufnahmen, dargestellt als Maximalprojektionen. a) ortsdefiniertes NCPHM vor der Durchführung des Experimentes, NCPHM nach dem Fluidfluss mit b) FITC-Dextran als Referenz und c) mit FITC-BSA als Protein. Detailaufnahme des mit NC bedruckten Bereichs der d) FITC-Dextran Probe und e) der FITC-BSA Probe.

Die Beurteilung der Proteinretention an ortsdefinierten NCPHM erfolgt mittels CLSM-Aufnahmen. Der Bereich der Protein und Dextran Applikation ist nicht auf den Aufnahmen dargestellt. Dieser befindet sich links, außerhalb des dargestellten Bereichs. Abbildung 6-2 a) zeigt das ortsdefinierte NCPHM vor den Experimenten. Die Papierfasern sind in Blau dargestellt und der mit NC beschichtete Bereich in Rot. Aufgrund der Länge der Teststreifen wurde je ein Teil aus den Abbildungen entfernt und nur die Enden der Streifen nach der Unterbrechung (weißer Doppelstreifen) dargestellt. Der Teststreifen mit FITC-Dextran als Referenz ist in Abbildung 6-2 b) dargestellt. Wie auch bei den vollflächigen NCPHM (Abbildung 6-1) ist keine Retention des Dextrans an der NC zu beobachten. Im Bereich der aufgetragenen NC Abbildung 6-2 d) ist eine geringfügige Retention des Dextrans zu beobachten, allerdings findet diese überwiegend an den Fasern statt und nicht an der NC. Der größte Teil des Dextrans konzentriert sich am beheizten Ende des Teststreifens auf. Bei der Verwendung von FITC-BSA (Abbildung 6-2 c) ist zu erkennen, dass dieses aus dem Fluidfluss vollständig entfernt werden kann und im NC beschichteten

Bereich vollständig zurückgehalten wird. Weder vor, noch nach dem NC-Bereich ist BSA zu erkennen. Dies spricht zudem für eine – relativ zur Bindung an NC – geringe Wechselwirkung des Proteins mit den Papierfasern. In der Detailaufnahme (Abbildung 6-2 e) des mit NC beschichteten Bereichs ist deutlich zu erkennen, dass BSA an der NC bindet. Dies wird durch die gelbe Kolokalisationsfarbe angezeigt.

Die Versuche zur Proteinretention an ortsdefinierten NCPHM zeigen, dass BSA aus einem Fluidfluss an NC zurückgehalten werden kann. Die hier verwendete Menge an BSA (12,5 ng) konnte vollständig aus dem Fluidfluss entfernt werden. Es konnte keine Retention des Proteins vor dem Erreichen des mit NC beschichteten Bereichs festgestellt werden. Anhand qualitativen Betrachtung der Proteinretention an ortsdefinierten NCPHM wird deutlich, dass durch NC-Beschichtung eine bessere Proteinretention auf den Hybridmaterialien erzielt werden kann. Dies ist vor allem im Bereich der Test- und Kontrolllinie wichtig, da an diesen Stellen die Antikörper für die Detektion des Antigens aufgebracht werden und auch bei einem vorhandenen Fluidfluss festgehalten werden sollen. Ein Abdissoziieren von Antikörper würde zu einer deutlichen Linienverbreiterung führen und damit zu weniger sensitiven Schnelltests.

6.2 Vollflächige NCPHM für diagnostische Assays

Die Eignung von vollflächig beschichteten NCPHM wird exemplarisch anhand ausgewählter Hybridmaterialien untersucht. Hierfür werden anti-hCG- und anti-HBsAg-Assays wie in Abschnitt 8.8 beschrieben durchgeführt. Es kann erwartet werden, dass die Verwendung der NCPHM vergleichbare Sensitivitäten der Assays aufweisen, wie bei konventionellen NC-Membranen. Die Oberfläche der Hybride ähnelt wie in Abschnitt 4.3 gezeigt den NC-Membranen. Im Vergleich zu unbehandeltem Papier als Membranmaterial kann erwartet werden, dass Linienbreiten auf den Hybridmaterialien aufgrund einer besseren Proteinbindung an NC gegenüber dem Papier (vgl. Abschnitt 6.1) schmaler ausfallen. Dies sollte zu einem besseren Linienkontrast führen. Da die CFT der Hybridmaterialien größer sind als die von unbehandelten Papieren und teilweise größer sind als von konventionellen NC-Membranen, kann eine höhere Sensitivität erwartet werden, da die langsamere Fließgeschwindigkeit zu einer erhöhten Antikörper-Antigen-Interaktion auf der Test- und Kontrolllinie führen könnte. Die anti-hCG-Assays der NCPHM sind in Abbildung 6-3 und Abbildung 6-4 dargestellt.

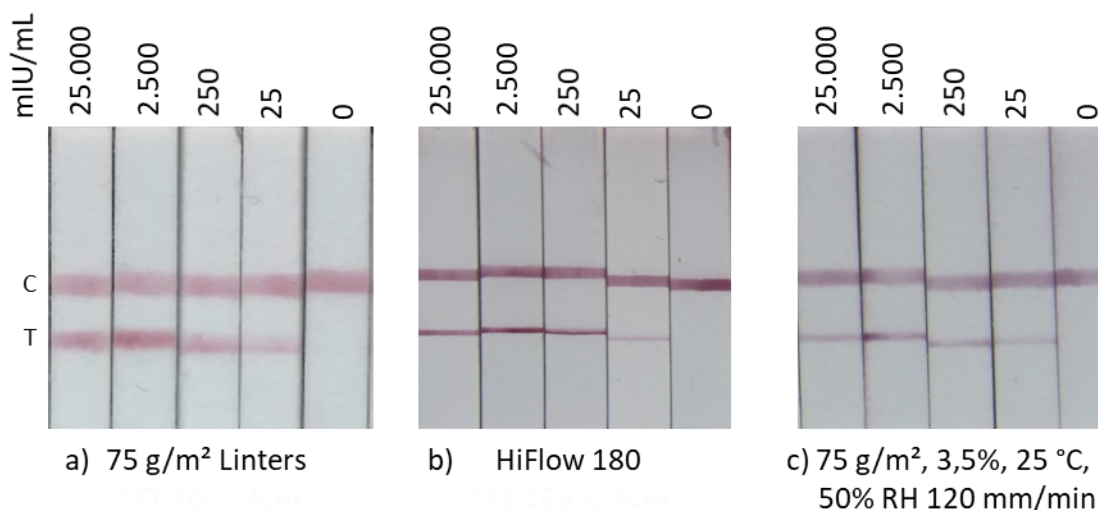


Abbildung 6-3: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen anti-*hCG*-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. Als Referenzmaterialien wurde a) unbehandeltes Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammaturn von 75 g/m² und b) eine HiFlow 180 NC-Membran (Merck Millipore) verwendet. c) Vollflächiges NCPHM hergestellt aus 75 g/m² Papieren mit einem NC-Anteil im *Lacquer* von 3,5% bei 25 °C, 50% RH und einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min. Die *hCG* Konzentrationen betragen 0, 25, 250, 2.500 und 25.000 mIU/mL. Die Kontrolllinie (*goat anti-mouse antiserum*) ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie (anti-*hCG* alpha mAb) mit T. Die anti-*hCG* beta Antikörper sind auf Goldpartikel (40 nm) konjugiert.

Die anti-*hCG*-Assays auf Baumwoll-Linters-Papier (Abbildung 6-3 a) zeigen, dass alle verwendeten *hCG*-Konzentrationen detektiert werden und somit das unbehandelte Papiere eine ausreichende Sensitivität aufweist. Die zu erkennenden Linien sind im Vergleich zur konventionellen NC-Membran (Abbildung 6-3 b) sehr breit. Bei der Verwendung einer HiFlow 180 Membran werden die schmalsten Linienbreiten erhalten. Alle Konzentrationen können mit bloßem Auge erkannt werden. Bei der Verwendung von vollflächig beschichteten NCPHM (Abbildung 6-3 c) ist eine schmalere Linienbreite im Vergleich zu unbehandeltem Papier zu beobachten. Dies zeigt sich vor allem an der Testlinie. Die Kontrolllinie ist geringfügig schmaler als auf Baumwoll-Linters-Papier, aber deutlich breiter als bei der Referenz NC-Membran. Die verringerten Linienbreiten auf dem Hybridmaterial lassen sich zum einen anhand der höheren CFT erklären. Diese führt dazu, dass beim Aufdrucken der Test- und Kontrolllinie, diese sich nicht schnell auf dem Membranmaterial ausbreiten können, so wie dies bei unbehandelten 75 g/m² Papieren der Fall ist. Zudem ist auf dem mit NC beschichteten Papier eine größere Proteinbindeaffinität (vgl. Abschnitt 6.1) zu erwarten, was zu einer schnelleren Adsorption der Antikörper auf dem Membranmaterial sorgt als bei unbehandelten Papieren.

Neben den *hCG*-Assays mit Goldkonjugaten, wurden *hCG*-Assays mit Konjugaten auf Latexpartikeln hergestellt und getestet. Diese sind in Abbildung 6-4 dargestellt.

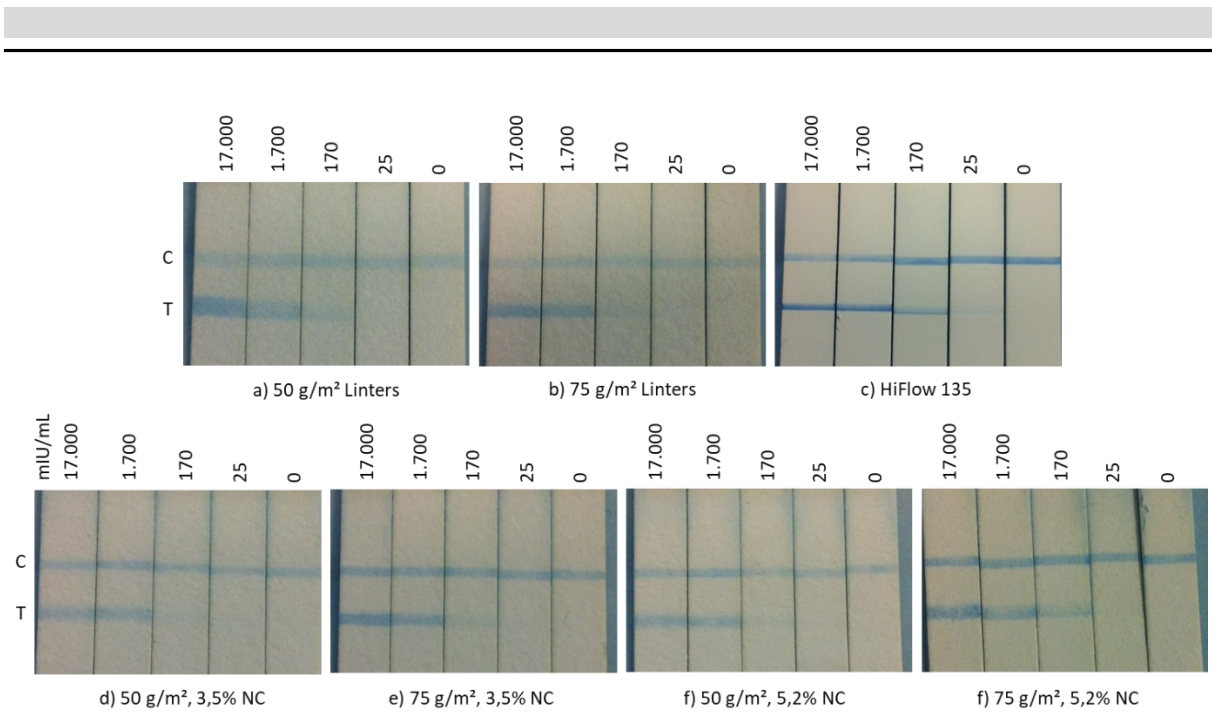


Abbildung 6-4: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen anti-hCG-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. Als Referenzmaterialien wurde unbehandeltes Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von a) 50 g/m², b) 75 g/m² und c) eine HiFlow 135 NC-Membran (Merck Millipore) verwendet. Vollflächige NCPHM hergestellt bei 25 °C, 50% RH und einer Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min auf d) 50 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 3,5%, e) 75 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 3,5%, f) 50 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 5,2% und g) 75 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 5,2%. Die hCG Konzentrationen betragen 0, 25, 170, 1.700 und 17.000 mIU/mL. Die Kontrolllinie (*goat anti-mouse antiserum*) ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie (*anti-hCG alpha mAb*) mit T. Die anti-hCG beta Antikörper sind auf Latexpartikel (400 nm) konjugiert.

Die Verwendung von unbehandeltem Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von 50 g/m² (Abbildung 6-4 a) führt zu Assays mit breiten Linien. Die Kontrolllinie weist eine geringe Intensität und Kontrast zum Papier auf. Die Sensitivität des Tests ist im Vergleich zur Referenz NC-Membran (Abbildung 6-4 c) deutlich geringer. Die niedrigste erkennbare Konzentration liegt bei 170 mIU/mL. Bei der Verwendung von 75 g/m² Papieren sind ebenfalls breite Linien zu beobachten. Diese sind geringfügig schmäler als beim 50 g/m² Papier. Dies liegt daran, dass bei einer höheren Grammatur mehr Volumen unterhalb der Applikationsfläche vorhanden ist in dem die Antikörperlösung der Test- und Kontrolllinie eindringen können. Eine hCG-Konzentration von 1.700 mIU/mL ist auf den 75 g/m² Papieren deutlich zu erkennen. Die niedrigere Konzentration von 170 mIU/mL ist ebenfalls zu sehen, allerdings mit einem unzureichenden Kontrast, sodass nur schwach eine blaue Linie erkannt werden kann. Bei der Betrachtung der HiFlow 135 Membran sind schmalere und kontrastreichere Linien erkennbar. Die niedrigste hCG-Konzentration von 25 mIU/mL ist nur schwer mit dem bloßen Auge zu erkennen, aber vorhanden. Die niedrigste auf den unbehandelten Papieren erkennbare Konzentration von 170 mIU/mL ist auf der NC-Membran deutlich zu sehen.

Eine Betrachtung der vollflächigen NCPHM zeigt, dass im Vergleich zu unbehandelten Baumwoll-Linters-Papieren schmalere und kontrastreichere Linien erhalten werden können. Die reduzierte Linienbreite lässt sich zu hoher Wahrscheinlichkeit auf eine höhere Proteinbindung des Hybridmaterials zurückführen. Die aufgetragenen Antikörper bei der Herstellung der Assays werden dadurch schneller an das Hybridmaterial adsorbiert, wodurch die Linienbreite schmaler ausfällt. Auch ein späteres Ausbluten der Linie durch einen Fluidfluss wird dadurch reduziert. Des Weiteren hat die kapillare Fließzeit der Hybridmaterialien einen direkten Einfluss auf die

Linienbreiten. Durch höhere CFT im Vergleich zu unbehandelten Papieren ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit der aufgetragenen Antikörperlinien geringer, was sich durch schmalere Linien äußert. Die Sensitivität der NCPHM (Abbildung 6-4 d - g) ist trotz der schmalen Linienbreiten vergleichbar mit den unbehandelten Papieren (Abbildung 6-4 a, b). Die niedrigste mit bloßem Auge erkennbare hCG-Konzentration liegt bei 170 mIU/mL und ist nur deutlich beim NCPHM (Abbildung 6-4 g) zu erkennen, welches auf 75 g/m² Papieren mit einem NC-Anteil von 5,2% im *Lacquer* hergestellt wurde. Dieses Hybridmaterial besitzt im Vergleich zu den Materialien (Abbildung 6-4 d - f) die höchste kapillare Fließzeit, was die höhere Sensitivität aufgrund niedriger Fließgeschwindigkeit und somit erhöhter Interaktionsfähigkeit zwischen Antigen und Test-/Kontrolllinie erklären könnte. Die Struktur des Materials g) ähnelt zudem sehr der Struktur von konventionellen NC-Membranen, wie Abbildung 4-10 aus Abschnitt 4.2 zeigt.

An einem HBsAg-Assay wurde die Eignung der NCPHM als alternative Membranmaterialien untersucht. Die Ergebnisse der Tests sind in Abbildung 6-5 dargestellt.

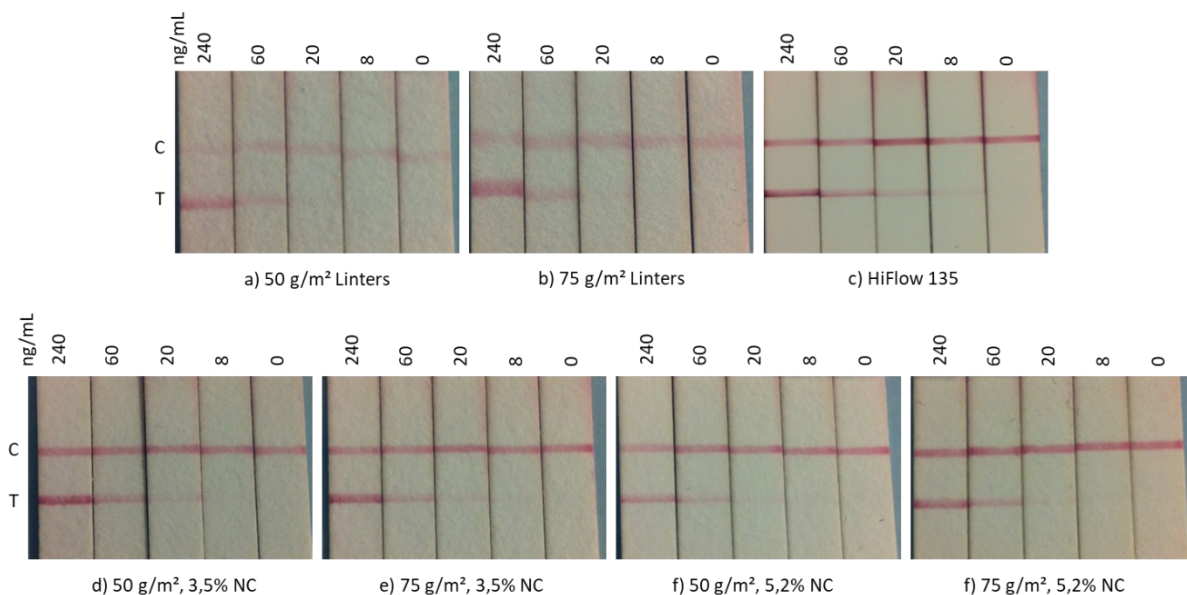


Abbildung 6-5: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen HBsAg-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. Als Referenzmaterialien wurde unbehandeltes Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von a) 50 g/m², b) 75 g/m² und c) eine HiFlow 135 Membran (Merck Millipore) verwendet. Vollflächige NCPHM hergestellt bei 25 °C, 50% RH und einer Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min auf d) 50 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 3,5%, e) 75 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 3,5%, f) 50 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 5,2% und g) 75 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 5,2%. Pro Membranmaterial werden 4 verschiedene HBsAg- Konzentrationen in 150 µL Probenvolumen getestet. Die Konzentrationen betragen 0, 8, 20, 60 und 240 ng/mL. Die Kontrolllinie ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie mit T. Die HBsAg-Antikörper sind auf Goldpartikel (40 nm) konjugiert.

Die anti-HBsAg-Assays auf unbehandelten Baumwoll-Linters-Papieren (Abbildung 6-5 a, b) zeigen breite Linien und schwache Kontraste gegenüber dem Membranmaterial. Bei beiden Grammaturen kann maximal eine HBsAg-Konzentration von 20 ng/mL detektiert werden. Niedrigere Konzentrationen sind mit dem bloßen Auge nicht erkennbar. Die Linienbreiten sind bei der Verwendung von 50 g/m² Papieren größer, als bei 75 g/m² Papieren. Dieser Zusammenhang wurde zuvor bei den anti-hCG-Assays diskutiert (vgl. Abbildung 6-4). Die Linienbreiten

der HiFlow 135 Membran sind schmal und kontrastreich. Die niedrigste HBsAg-Konzentration kann mit bloßem Auge erkannt werden. Die Verwendung von vollflächigen NCPHM in anti-HBsAg-Assays (Abbildung 6-5 d, g) zeigt, dass die Linienbreiten auf diesem neuartigen Membranmaterial vergleichbar zu konventionellen NC-Membranen sind. Die Intensität der Kontrolllinien ist hoch und der Kontrast zum Membranmaterial deutlich gegeben. Die höchste, mit bloßem Auge detektierbare HBsAg-Konzentration liegt bei 20 ng/mL. Die minimale Konzentration von 8 ng/mL kann auf keinem der NCPHM nachgewiesen werden.

Die prinzipielle Eignung von vollflächig beschichteten NCPHM konnte anhand von anti-hCG- und anti-HBsAg-Assays gezeigt werden. Die Fotoaufnahmen der verschiedenen Assays zeigten, dass erwartungsgemäß breite und kontrastarme Linien bei der Verwendung von unbehandelten Baumwoll-Linters-Papieren als Membranmaterialien erhalten wurden. Dabei waren die Test- und Kontrolllinien auf 75 g/m² Papieren schmaler als auf 50 g/m² Papieren. Durch die vollflächige Beschichtung mit NC, konnten die Linienbreiten weiter reduziert werden, sodass diese eine ähnliche Breite aufwiesen wie konventionelle NC-Membranen. Dies stand im Zusammenhang mit einer erhöhten Proteinbindung an der NC und höheren kapillaren Fließzeiten der NCPHM gegenüber den unbehandelten Papieren. Die Betrachtung der anti-HBsAg-Assays zeigte, dass trotz identischer Linienbreiten die niedrigste Konzentration von 8 ng/mL nicht zu detektieren war. Ebenfalls bei anti-hCG-Assays mit Latexkonjugaten konnte keine eindeutige Detektion der geringsten Konzentration von 25 mIU/mL erkannt werden. Lediglich der in Abbildung 6-3 gezeigte anti-hCG-Assay auf einem vollflächig beschichteten NCPHM (75 g/m², 3,5% NC, 25 °C, 50% RH, 120 mm/min) war geeignet um 25 mIU/mL hCG zu detektieren. Im Vergleich zu den anderen getesteten NCPHM hatte dieses Material ein höheres Beschichtungsgewicht (~12 g/m²). Dies könnte der Grund dafür sein, dass eine ausreichende Sensitivität des Materials aufgrund einer ausreichend hohen Oberfläche durch die porösen NC-Strukturen erhalten wurde. Diese hohe Oberfläche sollte dazu geführt haben, dass ein hoher Anteil der aufgedruckten Antikörper oberflächennah an das Hybridmaterial gebunden werden konnte und nicht in der Tiefe dessen verschwand. Es konnte angenommen werden, dass tief im NCPHM eingedrungene Antikörper zwar mit den Antigen-Antikörper-Konjugaten interagierten, aber diese für das bloße Auge auf der Linie nicht mehr sichtbar waren.

6.3 Ortsdefinierte NCPHM in Lateral Flow Assays

Die ortsdefinierten NCPHM wurden wie in Abschnitt 8.2.2 beschrieben hergestellt und in den Abschnitten 4.3 und 5.4 hinsichtlich ihrer Morphologie, Linienbreiten und mikrofluidischen Eigenschaften charakterisiert. Nachfolgend wird exemplarisch an anti-hCG-Assays (Abbildung 6-6) und anti-HBsAg-Assays (Abbildung 6-7) die Eignung der Materialien für diagnostische Schnelltests untersucht.

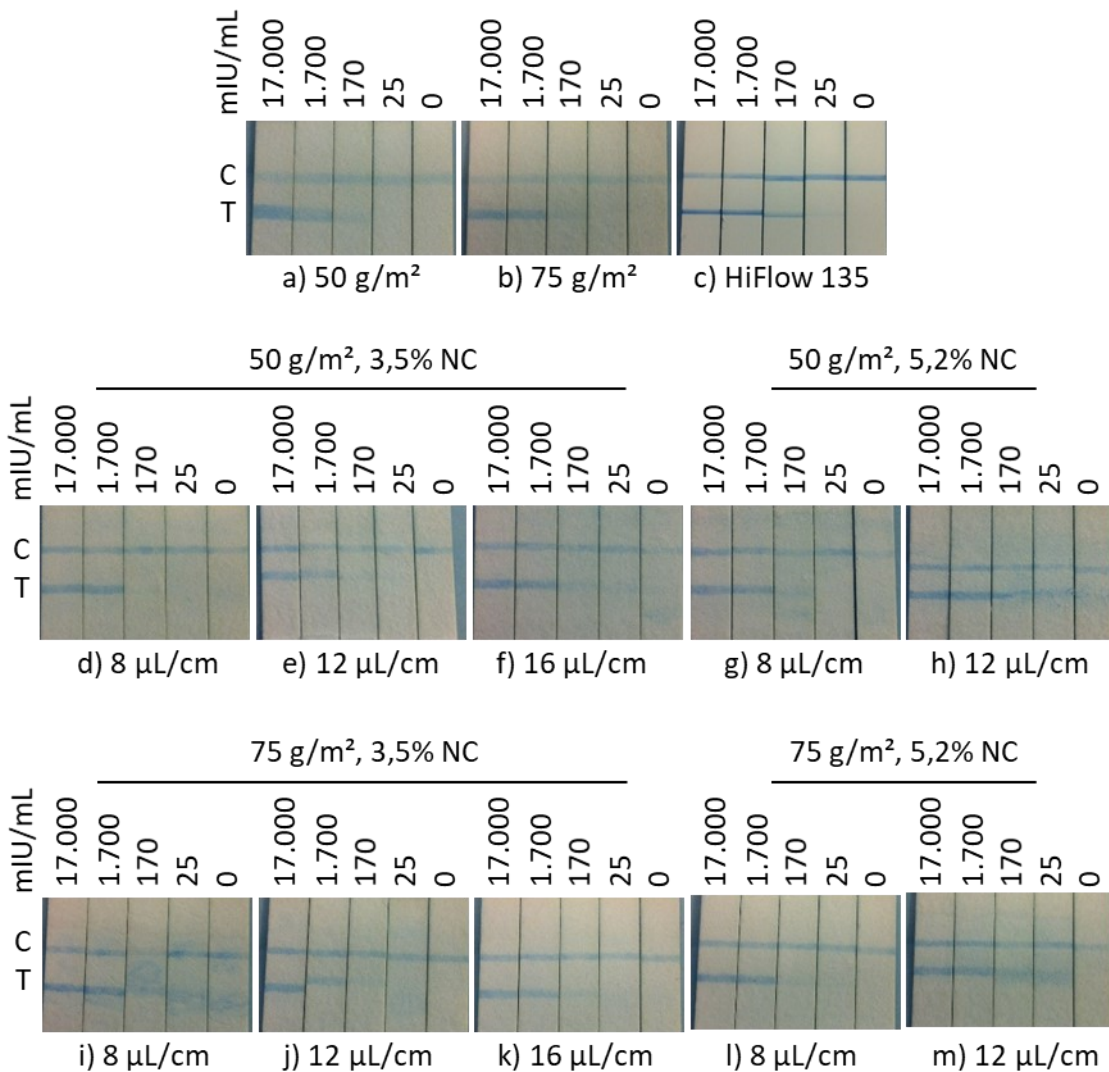


Abbildung 6-6: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen anti-*hCG*-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. Als Referenzmaterialien wurden Baumwoll-Linters-Papiere mit a) 50 g/m², b) 75 g/m² und c) konventionelle HiFlow 135 Membranen (Merck Millipore) verwendet. Ortsdefinierte NCPHM auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papier mit einem NC-Anteil im *Lacquer* von 3,5% (w/w) und Dosierungen von d) 8 μ L/cm, e) 12 μ L/cm und f) 16 μ L/cm. Ortsdefinierte NCPHM auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren mit einem NC-Anteil von 5,2% (w/w) und Dosierungen von g) 8 μ L/cm und h) 12 μ L/cm. Ortsdefinierte NCPHM auf 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papier mit einem NC-Anteil im *Lacquer* von 3,5% (w/w) und Dosierungen von i) 8 μ L/cm, j) 12 μ L/cm und k) 16 μ L/cm. Ortsdefinierte NCPHM auf 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren mit einem NC-Anteil von 5,2% (w/w) und Dosierungen von l) 8 μ L/cm und m) 12 μ L/cm. Der NC-*Lacquer* wurde mit einem Dosierpinsel aufgebracht. Die *hCG* Konzentrationen betragen 0, 25, 170, 1.700 und 17.000 mIU/mL. Die Kontrolllinie (*goat anti-mouse antiserum*) ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie (anti-*hCG* alpha mAb) mit T. Die α -*hCG* beta Antikörper sind auf Latexpartikel (400 nm) konjugiert.

In Abbildung 6-6 sind anti-*hCG*-Assays auf ortsdefinierten NCPHM und Referenzmaterialien dargestellt. Als Referenzmembran wurde eine HiFlow 135 Membran gewählt, da die ortsdefinierten NCPHM wie in Abschnitt 5.4 beschrieben von den kapillaren Fließzeit dieser Membran am nächsten kommen. Auf der HiFlow 135 Membran (Abbildung 6-6 c) sind die Test- und Kontrolllinien schmal und kontrastreich. Die niedrigste *hCG*-Konzentration von 25 mIU/mL ist auf der HiFlow Membran nur äußerst schwach per Auge zu erkennen. Auf unbehandeltem Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von 50 g/m² (Abbildung 6-6 a) werden stark

verbreiterte Test- und Kontrolllinien erhalten, welche einen geringeren Kontrast zum Papier aufweisen, als die HiFlow Membran. Dies ist auf eine stärkere Ausbreitung der Antikörper beim Aufdrucken und einer geringeren Proteinretention des Papiers zurückzuführen. Die Linienbreite auf Baumwoll-Linters-Papieren ist geringer, wenn ein Papier mit einer 75 g/m² Grammatik verwendet wird. Bei der höheren Grammatik ist das Papier dicker und die aufgebrauchte Flüssigkeit kann sich neben der lateralen Ausbreitung auch axial ausbreiten. Dies ist vergleichbar mit den erhaltenen Linienbreiten beim Aufdrucken des NC-Lacquers zur Herstellung der ortsdefinierten NCPHM (Abschnitt 4.3.2). Die niedrigste hCG-Konzentration ist bei beiden unbehandelten Papieren nicht zu erkennen.

Bei der Verwendung von ortsdefinierten NCPHM auf 50 g/m² Papieren mit einem NC-Anteil von 3,5% (w/w) lassen sich wie in Abbildung 6-6 d)-f) eine schmalere Linienbreite der Test- und Kontrolllinie im Vergleich zu unbehandelten Baumwoll-Linters-Papieren a) erkennen. Dies ist auf eine geringere Benetzbarkeit der Materialien auf dem mit NC beschichteten Bereich zurückzuführen. Zusätzlich ist die Retention der Proteine auf NC höher, als bei unbehandelten Papieren, was ebenfalls die Linienbreite reduziert. Bei allen drei Materialien (Abbildung 6-6 d) - f) ist der Kontrast der Linie zum Basismaterial geringer, als bei der konventionellen HiFlow 135 Membran. Die niedrigste detektierbare hCG-Konzentration liegt mit einem Wert von 1.700 mIU/mL oberhalb der Minimalkonzentration. Zudem ist bei der höheren Dosierung ein großer Anteil unspezifischer Bindung von Latexpartikeln am Material erkennbar. Die unspezifische Bindung der Partikel kann durch die relativ kleinen Porenradien im Material erklärt werden. Möglicherweise werden die relativ großen Partikel aus sterischen Gründen zurückgehalten. Die verminderte Sensitivität gegenüber der HiFlow Membran, als auch gegenüber dem Referenzpapier lässt sich aus den Eigenschaften des Fluidflusses durch die Hybridmaterialien erklären. Anhand der in Abschnitt 5.4 aufgestellten Hypothese, dass der Fluidfluss in ortsdefinierten NCPHM ab dem mit NC beschichteten Bereich überwiegend in den Makroporen und nicht entlang der Faser bzw. NC-Strukturen stattfindet, ist davon auszugehen, dass ein Großteil der Latexpartikel die Test- und Kontrolllinie passieren, ohne dass es zu einer Interaktion zwischen den *Capture*-Antikörpern auf der Membran und dem Latexpartikel-Antigen-Konjugat kommt. Dies erklärt die niedrige Sensitivität auf der Testlinie, als auch die geringere Intensität der Kontrolllinie. Mit steigender Dosierung des NC-Lacquers nimmt die Intensität auf den Linien zu, dies ist anhand einer größeren Füllung der Makroporen durch poröse NC zu erklären. Mehr NC im inneren der Makroporen sorgt für eine höhere Interaktionswahrscheinlichkeit zwischen *Capture*-Antikörper und Antikörper-Antigen-Konjugat.

Bei der Verwendung eines Lacquers mit einem NC-Anteil von 5,2% (w/w) (Abbildung 6-6 g, h) auf 50 g/m² Papieren lässt sich eine Kontraststeigerung der Linien im Vergleich zu den Materialien mit einem geringeren NC-Gehalt feststellen. Die Membranmaterialien weisen allerdings ebenfalls eine erhöhte unspezifische Bindung der Latexpartikel auf, und die geringste hCG Konzentration ist für eine Dosierung des Lacquers von 8 µL/cm nicht zu erkennen. Bei einer Dosierung von 12 µL/cm ist zu beobachten, dass die Kontrolllinien unregelmäßig ausgeprägt sind und dass es zu einem falsch-positiven Ergebnis des Tests kommt. Dies liegt vermutlich an der höheren kapillaren Fließzeit im Vergleich zu den anderen Materialien. Bei einer höheren Fließzeit ist die Fließgeschwindigkeit im Membranmaterial geringer, was zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Interaktion zwischen *Capture*-Antikörper und Antikörper-Antigen-Konjugat erhöht. Hierbei kann es zu einer höheren unspezifischen Bindung kommen. Dies wird zudem begünstigt durch eine sehr dichte NC-Struktur auf dem Material (Abschnitt 4.3.4, Abbildung 4-27).

Bei der Verwendung von 75 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 3,5% (w/w) werden vergleichbar breite Linien erhalten (Abbildung 6-6 i - k) wie bei der Verwendung von 50 g/m² Papieren. Bei einer Dosierung von 8 µL/cm sind deutlich inhomogene Linien zu erkennen. Dieses Linienbild lässt sich nicht anhand Fließzeiten oder Hybridmorphologie erklären. Möglicherweise ist es beim Bedrucken des Hybridmaterials mit der Test- und Kontrolllinie zu einer ungenauen Ausrichtung gekommen, wobei die Testlinie außerhalb des mit NC beschichteten Bereichs aufgebracht wurde. Dies könnte die unregelmäßige Linienform vor allem bei der Testlinie erklären. Bei der Dosierung von 12 µL/cm (Abbildung 6-6 j) und 16 µL/cm (Abbildung 6-6 k) ist die linienbreite homogen und schmäler als auf unbehandelten Referenzpapieren. Die Linien sind kontrastreicher und es ist weniger unspezifische Bindung zu beobachten. Die niedrigste erkennbare hCG Konzentration liegt bei 170 mIU/mL. Ein Wechsel zu einem höheren NC-Anteil im *Lacquer* zeigt, dass die Intensität der Linien gesteigert werden kann. Im Fall einer Dosierung von 12 µL/cm (Abbildung 6-6 m) kann die niedrigste hCG-Konzentration von 25 mIU/cm detektiert werden. Die Testlinie ist allerdings erneut stark verbreitert, was sich wie zuvor diskutiert höchst wahrscheinlich auf eine ungenaue Ausrichtung des Membranmaterials beim Aufbringen von Test- und Kontrolllinie zurückführen lässt.

Neben den in Abbildung 6-6 gezeigten anti-*hCG*-Assays wurden zusätzlich anti-*HBsAg*-Assays auf ortsdefinierten NCPHM aufgesetzt und getestet. Die Ergebnisse dieser Assays sind in Abbildung 6-7 dargestellt.

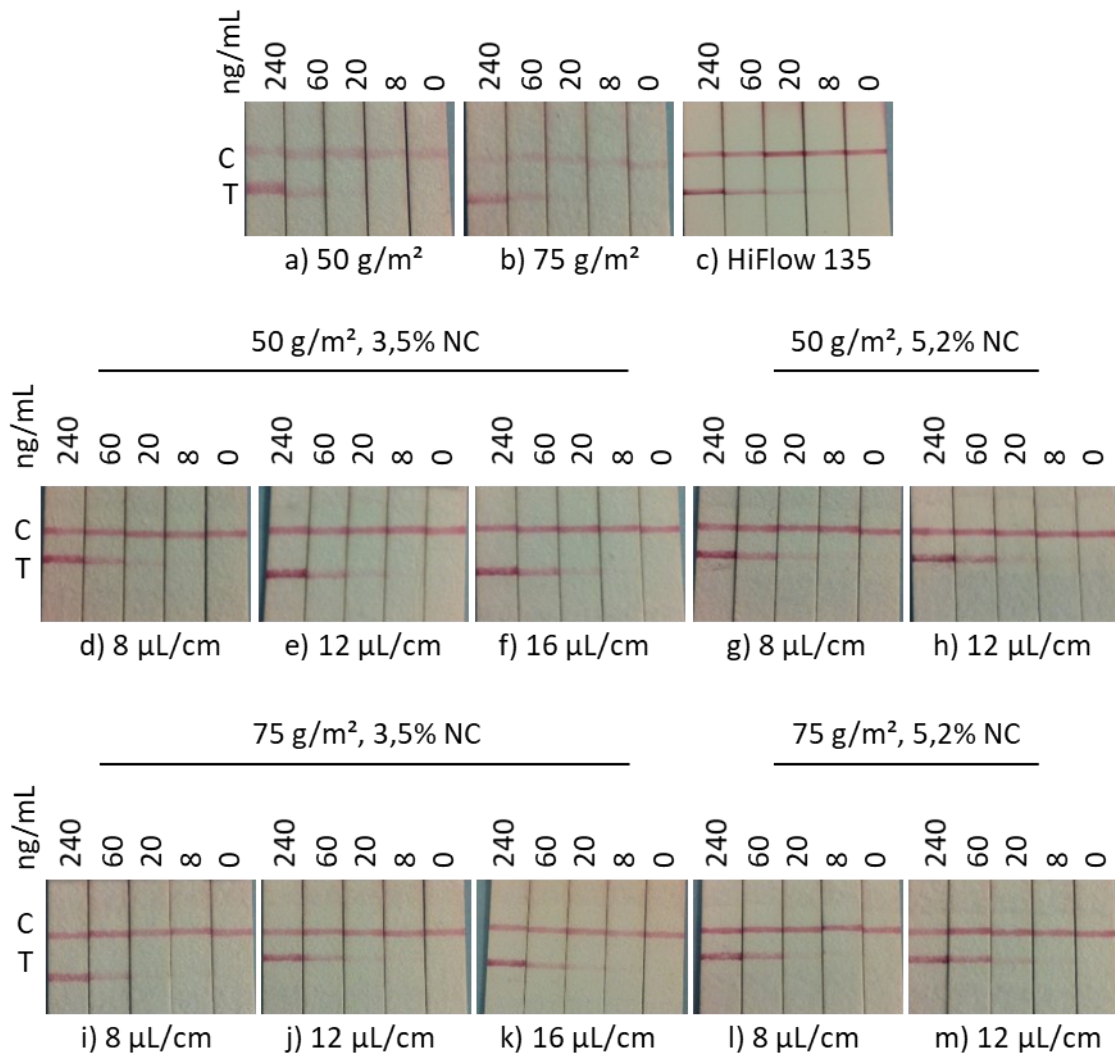


Abbildung 6-7: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen HBsAg-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. Als Referenzmaterialien wurden a) Baumwoll-Linters-Papier (50 g/m²), b) Baumwoll-Linters-Papier (75 g/m²) und c) konventionelle HiFlow 135 NC-Membran (Merck Millipore) verwendet. Ortsdefinierte NCPHM auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papier mit einem NC-Anteil im *Lacquer* von 3,5% (w/w) und Dosierungen von d) 8 µL/cm, e) 12 µL/cm und f) 16 µL/cm. Ortsdefinierte NCPHM auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren mit einem NC-Anteil von 5,2% (w/w) und Dosierungen von g) 8 µL/cm und h) 12 µL/cm. Ortsdefinierte NCPHM auf 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papier mit einem NC-Anteil im *Lacquer* von 3,5% (w/w) und Dosierungen von i) 8 µL/cm, j) 12 µL/cm und k) 16 µL/cm. Ortsdefinierte NCPHM auf 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren mit einem NC-Anteil von 5,2% (w/w) und Dosierungen von l) 8 µL/cm und m) 12 µL/cm. Der NC-*Lacquer* wurde mit einem Dosierpinsel aufgebracht. Pro Membranmaterial werden 4 verschiedene HsAg-Konzentrationen in 150 µL Probenvolumen getestet. Die Konzentrationen betragen 0, 8, 20, 60 und 240 ng/mL. Die Kontrolllinie ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie mit T. Die HBsAg-Antikörper sind auf Goldpartikel (40 nm) konjugiert.

Als Referenzen wurden Baumwoll-Linters-Papiere mit 50 g/m² (Abbildung 6-7 a), 75 g/m² (Abbildung 6-7 b) und eine HiFlow 135 Membran (Abbildung 6-7 c) gewählt. Die HiFlow 135 wurde gewählt, da die ortsdefinierten NCPHM ähnliche CFT aufweisen wie diese Membran.

Auf der HiFlow 135 Membran (Abbildung 6-7 c) werden schmale und kontrastreiche Test- und Kontrolllinien erhalten. Die niedrigste Konzentration von 8 ng/mL ist mit bloßem Auge noch erkennbar. Die Linienbreiten bei der Verwendung von Baumwoll-Linters-Papieren (Abbildung 6-7 a, b) sind wie bereits zuvor thematisiert deutlich breiter und weniger kontrastreich. Dies

liegt zum einen an der geringeren Proteinbindeaffinität und zum anderen an der besseren Benetzbarkeit des Papiers was sich in einem breiteren Verlaufen der Antikörperlinien beim Aufdrucken äußert. Auf den unbehandelten Baumwoll-Linters-Papieren lassen sich 60 ng/mL sehr deutlich mit bloßem Auge erkennen, eine sehr schwache und fast unkenntliche Linie kann noch bei 20 ng/mL beobachtet werden.

Eine Reduktion der Linienbreite und Steigerung des Kontrastes ist bei den ortsdefinierten NCPHM auf 50 g/m² Papieren unter Verwendung eines *Lacquers* mit einem NC-Anteil von 3,5% (w/w) zu sehen. Bereits bei einer Dosierung von 8 µL/cm (Abbildung 6-7 d) ist dieser Effekt zu beobachten. Ebenfalls kann eine Steigerung der Sensitivität beobachtet werden. Eine HBsAg-Konzentration von 20 ng/mL ist mit bloßem Auge noch gut zu erkennen. Dies ist ebenfalls bei den Hybriden mit 12 µL/cm (Abbildung 6-7 e) und 16 µL/cm (Abbildung 6-7 f) zu beobachten. Eine sichere Detektion der niedrigsten HBsAg-Konzentration ist bei keinen der drei Hybride (Abbildung 6-7 d - f) möglich, allerdings kann bei 16 µL/cm (Abbildung 6-7 f) eine sehr schwache Testlinie gesehen werden.

Eine Erhöhung des NC-Anteils im *Lacquer* (Abbildung 6-7 g ,h) führt zu keiner sichtlichen Steigerung der Sensitivität, dennoch ist eine geringe Steigerung der Kontraste der Test- und Kontrolllinie sichtbar.

Bei Verwendung von 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren (Abbildung 6-7 i -k) kann keine Sensitivitätssteigerung oder Steigerung der Kontraste im Vergleich zu 50 g/m² Papieren (Abbildung 6-7 d - f) beobachtet werden. Eine Erhöhung der NC-Anteile bewirkt, ebenfalls wie auf dem 50 g/m² Papieren, lediglich eine Intensitätssteigerung der Test- und Kontrolllinie (Abbildung 6-7 l, m), aber keine Steigerung der Sensitivität. Bei einer Dosierung von 12 µL/cm bei einem NC-Anteil von 5,2% (w/w) auf den 75 g/m² Papier ist eine HBsAg-Konzentration von 20 ng/mL deutlich zu erkennen. Die niedrigste Konzentration ist allerdings nur sehr schwach zu erkennen.

Im Gegensatz zu den *hCG-Assays* in Abbildung 6-7 ist bei den *HBsAg-Assays* keine unspezifische Bindung der (Antigen-)Antikörper-Gold-Konjugate zu beobachten. Dies ist vermutlich über die Größe der Gold-Konjugate erklärbar, welche einen um Faktor 10 geringeren Durchmesser als die Latexpartikel haben. Dies führt dazu, dass diese besser durch das Hybridmaterial transportiert werden können und wesentlich weniger durch sterische Effekte im Hybridmaterial zurückgehalten werden.

Die Verwendung von ortsdefinierten NCPHM in *hCG* und *HBsAg-Assays* zeigt, dass diese prinzipiell als alternative Membranmaterialien für die Anwendung in diagnostischen *Assays* in Frage kommen. Die Linienbreiten können im Vergleich zu unbehandelten Papieren durch das ortsdefinierte Auftragen von NC verringert werden. Die Intensitäten der Test- und Kontrolllinien ist für einige Materialien vergleichbar mit HiFlow Membranen. Die niedrigste *hCG*-Konzentration kann bei den ortsdefinierten NCPHM nur im Falle eines einzelnen Membranmaterials detektiert werden. Selbst auf der Referenzmembran ist diese niedrige Konzentration schwierig zu erkennen. Im *HBsAg-Assay* kann die niedrigste Antigenkonzentration nur bei einem einzigen Hybridmaterial detektiert werden, diese Konzentration ist allerdings ebenfalls beim Referenzmaterial nur sehr schwach zu erkennen. Weitere Optimierungsschritte sind bei der Herstellung von NCPHM notwendig, um diese zu einem vergleichbar leistungsfähigen Membranmaterial zu entwickeln, wie konventionelle NC-Membranen. Das Potential dieser Materialien liegt vor allem in der signifikant geringeren benötigten Menge an NC im Vergleich zu konventionellen NC-Membranen. Zudem kann auf PET-Trägerfolien verzichtet werden, da die verwendeten Papiere eine

intrinsische Stabilität mit sich bringen und den porösen NC-Strukturen ein gutes Trägermaterial bieten. Eine Reduktion des NC-Anteils, die Möglichkeit auf PET-Folien zu verzichten und der Einsatz eines Trägermaterials aus nachwachsenden Rohstoffen ist in Hinblick auf die Nachhaltigkeit der neuartigen Membranmaterialien und dem damit verbundenen ökologischen Fußabdruck ein attraktiver wissenschaftlicher und industriell relevanter Ansatz.

6.4 CN-Papiere als Membranmaterial für diagnostische Assays

Die in Abschnitt 8.3 hergestellten CN-Papiere werden nachfolgend als Membranmaterial für diagnostische Assays verwendet, diese sind wie in Abschnitt 8.8 beschrieben aufgebaut. CN-Papiere bieten neben NCPHM und NC-Membranen eine potentiell einfach herzustellende und stark kunststoffreduzierte Alternative zu konventionellen Membranmaterialien. Aufgrund des Herstellungsprozesses und der Verwendung von hochkonzentrierten Mineralsäuren, wurden die Oberflächen-pH-Werte der CN-Papieren ermittelt und mit Baumwoll-Linters-Papier und NC-Membranen verglichen. Diese pH-Werte sind in Abbildung 6-8 dargestellt.

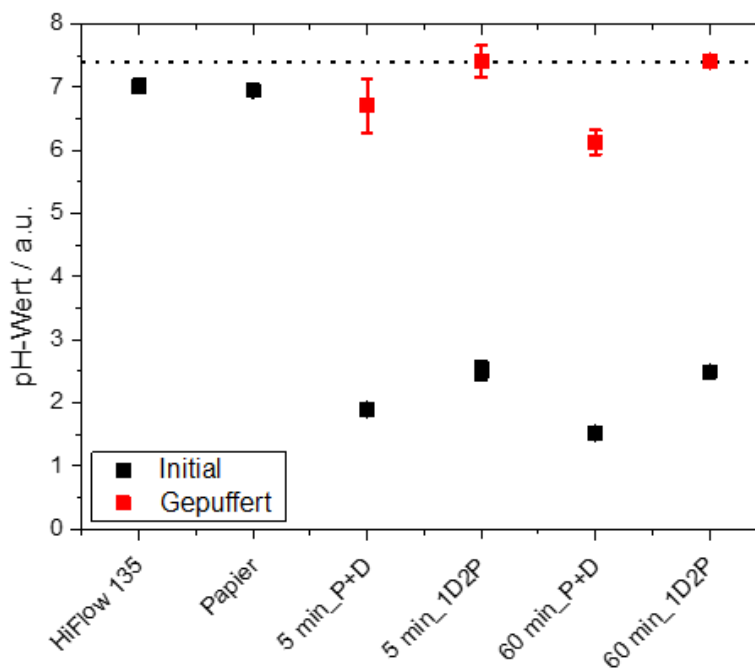


Abbildung 6-8: Oberflächen-pH-Werte einer konventionellen NC-Membran (HiFlow 135), Papier (Baumwoll-Linters, 75 g/m²) und CN-Papieren nach 5 min und 60 min Reaktionszeit. Messungen ohne Pufferbehandlung sind in Schwarz dargestellt, Messungen mit Pufferbehandlung in Rot, Suffix P+D: Detergens und Puffer gemeinsam aufgetragen (gepufferte SDBS Lösung), Suffix 1D2P: Detergensbeschichtung mit SDBS, gefolgt von Trocknung und anschließender Pufferbehandlung. Die gestrichelte Linie illustriert den pH-Wert der verwendeten PBS-Puffer-Lösung (pH 7,4).

Die Oberflächen-pH-Werte der verschiedenen Materialien wurden wie in Abschnitt 8.5 beschrieben gemessen. Die Oberflächen-pH-Werte von den Referenzmaterialien wie der konventioneller HiFlow 135 Membran und Baumwoll-Linters-Papier liegen bei einem neutralen pH-Wert von 7,

wohingegen die pH-Werte aller CN-Papiere im sauren Bereich zwischen 1,5 – 2,5 liegen. Dieser stark saure pH-Wert lässt sich auf die Herstellungsweise der Materialien zurückführen. Trotz mehrmaligem Waschen und pH-Wert Kontrolle der Waschlösung scheint dennoch ein hoher Anteil an Säure auf der Oberfläche anzuhaften. Ebenfalls könnten nach der Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papier zu CN-Papier noch gebundene Schwefelsäureester^[174] verseift werden, was zu einem niedrigen pH-Wert auf der Oberfläche führt. Die niedrigsten pH-Werte der CN-Papiere werden bei den Proben gemessen, die ungepuffert ohne vorherige Detergensbeschichtung gemessen wurden (Suffix P+D). Die Proben, welche vor der Pufferbehandlung bereits mit Detergens beschichtet wurden (Suffix 1D2P), weisen leicht höhere pH-Werte auf. Dies ist auf die zuvor durchgeführte Detergensbeschichtung zurückzuführen, da diese wie ein zusätzlicher Waschschrift fungiert. Der niedrige Oberflächen-pH-Wert dieser Proben, kann sich bei der Anwendung als Membranmaterial für diagnostische Schnelltests als problematisch erweisen. Häufig sind die verwendeten Antikörper in diesen Assays empfindlich gegenüber zu hohen oder niedrigen pH-Werten. Meistens ist die höchste Stabilität von Antikörper im Bereich von physiologischen pH-Werten gegeben. Zudem kann das zu detektierende Antigen bei zu hohen oder niedrigen pH-Werten Schaden nehmen. Aus diesem Grund ist eine Anhebung des pH-Wertes durch Pufferbehandlung notwendig.

Durch die Pufferbehandlung (Abbildung 6-8, rote Datenpunkte), kann eine Anhebung der Oberflächen-pH-Werte auf 6,1 – 7,4 erzielt werden. Ebenfalls liegen hier die pH-Werte der bereits im Vorfeld mit Detergens beschichteten Materialien höher, als die pH-Werte der komplett unbehandelten CN-Papiere. Durch die Anhebung der pH-Werte liegen diese Materialien im Bereich von konventionellen NC-Membranen oder Referenzpapieren. Aus diesem Grund ist keine negative Beeinflussung auf die Sensitivität bzw. Funktionalität der diagnostischen Assays mit diesen Materialien zu erwarten, diese sind in Abbildung 6-9 dargestellt. Die Herstellung der Assays ist in Abschnitt 8.8 beschrieben.

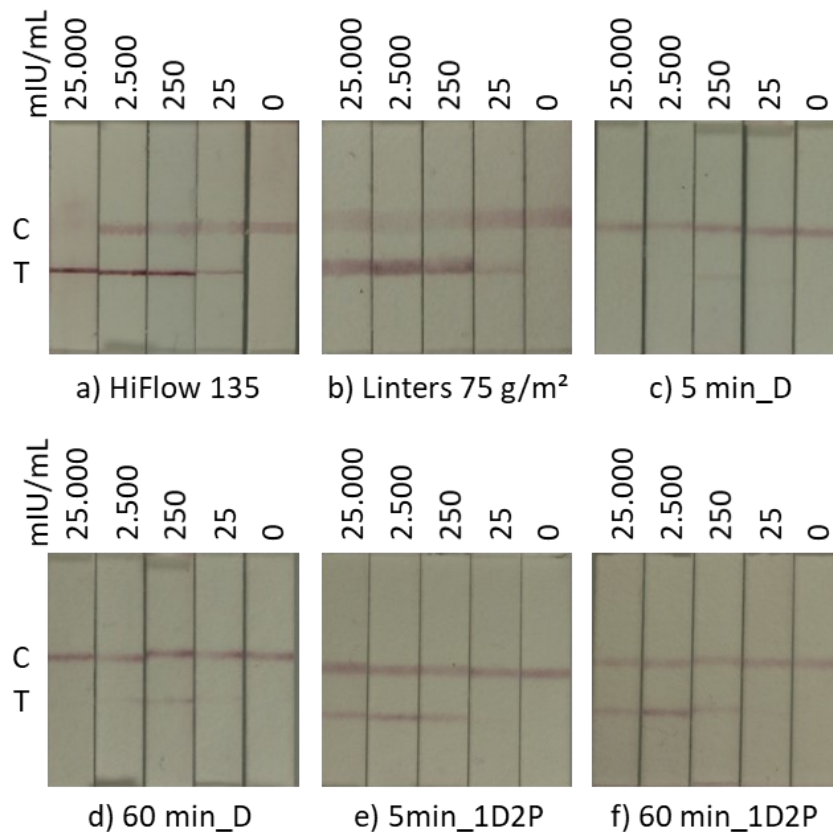


Abbildung 6-9: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen anti-hCG-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. a) konventionelle HiFlow 135 NC-Membran (Merck Millipore), b) Baumwoll-Linters-Papier (75 g/m²), c) CN-Papier nach 5 min Reaktionszeit mit Detergensbeschichtung ohne Puffer, d) CN-Papier nach 60 min Reaktionszeit mit Detergensbeschichtung ohne Puffer, e) CN-Papier nach 5 min Reaktionszeit mit aufeinanderfolgender Detergens- und Pufferbeschichtung und f) CN-Papier nach 60 min Reaktionszeit mit aufeinanderfolgender Detergens- und Pufferbeschichtung. Pro Membranmaterial werden 5 verschiedene hCG Konzentrationen in 150 μ L Probenvolumen getestet. Die hCG Konzentrationen betragen 0, 25, 250, 2.500 und 25.000 mIU/mL. Die Kontrolllinie (*goat anti-mouse antiserum*) ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie (anti-hCG α mAb) mit T. Die α -hCG beta Antikörper sind auf Goldnanopartikel (40 nm) konjugiert.

Die Eignung der CN-Papiere als Membranmaterialien wurde anhand des anti-hCG-Assays untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-9 dargestellt. Als Referenz wurde eine HiFlow 135 NC-Membran verwendet (Abbildung 6-9 a). Die kapillare Fließzeit dieser Membran liegt bei 135 s/4 cm (vgl. Abschnitt 5.2). Die Linienbreiten der Test- und Kontrolllinie sind schmal und kontrastreich. Die Negativkontrolle (0 mIU/mL) zeigt wie zu erwarten keine Testlinie. Die niedrigste zu detektierende hCG-Konzentration (25 mIU/mL) ist deutlich zu erkennen. Die Intensität der Testlinien steigt mit zunehmender hCG-Konzentration. Die Kontrolllinie der höchsten Konzentration (25.000 mIU/mL) ist im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen geringer. Dies ist auf eine Verknappung freier Gold-anti-hCG-Nanopartikel zurückzuführen, da diese durch die Testlinie aus dem Fluidfluss entfernt werden und nur noch eine reduzierte Menge die Kontrolllinie passiert. Neben der NC-Membran wird reines Baumwoll-Linters-Papier (75 g/m²) untersucht, welches eine kapillare Fließzeit von 60 s/4 cm hat (vgl. Abschnitt 5.2). Im Vergleich zur NC-Membran sind die Bandenbreiten wesentlich breiter und somit weniger intensiv. Dies ist zum einen auf eine höhere Fließgeschwindigkeit gegenüber der Membran zu begründen, als auch auf eine geringere Proteinbindeaffinität des Papiers. Dennoch kann auf Baumwoll-Linters-Papier die niedrigste hCG-Konzentration von 25 mIU/mL detektiert werden.

Die CN-Papiere nach 5 min und 60 min Reaktionszeit ohne Pufferbehandlung (Abbildung 6-9 c, d) zeigen auf den Kontrolllinien deutlich schmalere Banden als die Assays auf Baumwoll-Linters-Papier. Die Linienbreiten und Kontraste sind vergleichbar bzw. etwas schmaler und intensiver als die Linien auf den HiFlow 135 Membranen. Dies spricht für eine höhere Proteinbindeaffinität der CN-Papiere im Vergleich zum reinen Papier. Allerdings sind bei beiden Membranmaterialien (Abbildung 6-9 c, d) die Testlinien kaum erkennbar. Dies ist auf den niedrigen Oberflächen-pH-Wert (Vgl. Abbildung 6-8) zurückzuführen. Es kann davon ausgegangen werden, dass dieser zur Denaturierung der Antikörper führt, welche dann kein hCG mehr binden können. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass hCG bei niedrigen pH-Werten inaktiviert wird. Solch eine Inaktivierung konnte bei Schlumberger^[175] beobachtet werden, wobei hCG welches bei pH 2,5 inkubiert wurde nur noch 5-10% der ursprünglichen Aktivität aufwies. Als Ursache dafür wurden Änderungen der Proteinstruktur und Form postuliert. Dies würde für einen diagnostischen Schnelltest bedeuten, dass selbst wenn die Antikörper der Testlinie intakt bleiben würden, sich die Epitope des Antigens derart verändert haben könnten, dass diese nicht mehr von den Antikörpern detektiert werden könnten. Die Ergebnisse der ungepufferten CN-Papiere als Membranmaterial bestätigen, dass eine neutraler Oberflächen-pH-Wert für die Funktionstüchtigkeit von Schnelltests benötigt wird. Die Assays mit gepufferten CN-Papieren sind in Abbildung 6-9 e) und f) dargestellt. Das CN-Papier nach 5 min Reaktionszeit und anschließender Pufferbehandlung wurde mit einer kapillaren Fließzeit von $98 \text{ s}/4 \text{ cm} \pm 2 \text{ s}/4 \text{ cm}$ charakterisiert und liegt damit eher im Bereich der HiFlow 90 Membranen. Die Kontrolllinie auf diesen Materialien ist von der Breite und Intensität sehr gut mit der Referenz NC-Membran vergleichbar. Die Testlinie hingegen weist zwar eine schmale Linienbreite auf, allerdings ist die Intensität der Linien schwächer. Dies führt dazu, dass die Testlinie bei 25 mIU/mL kaum erkennbar ist und eine klare Ablesbarkeit des Schnelltests nicht gegeben ist. Selbiges ist bei dem CN-Papier nach 60 min Reaktionszeit und Pufferbehandlung zu erkennen. Die Linienbreiten der Kontrolllinien ist vergleichbar zur Referenzmembran. Die Intensität ist ebenfalls geringer, was wie beim 5 min CN-Papier dazu führt, dass die niedrigste Konzentration kaum ablesbar ist. Die Signalintensität kann zudem aufgrund einer höheren Fließgeschwindigkeit ($\text{CFT } 67 \text{ s}/4 \text{ cm} \pm 2 \text{ s}/4 \text{ cm}$) geringer sein als beim CN-Papier mit 5 min Reaktionszeit (Abbildung 6-9 e).

Nach Optimierung des Oberflächen-pH-Wertes von CN-Papieren als alternatives Membranmaterial für diagnostische Schnelltests, zeigen diese Materialien gute Kontraste und gute Sensitivität im Vergleich zu konventionellen NC-Membranen. Die Linienbreiten sind im Allgemeinen vergleichbar schmal und kontrastreich, lediglich die niedrigsten hCG-Konzentrationen von 25 mIU/mL können noch nicht vollständig und zuverlässig detektiert werden. Da die Oberflächen-pH-Werte der gepufferten Papiere im selben Bereich wie die Referenzmaterialien liegen, könnte eine geringere Membranoberfläche ein Grund für die verminderte Signalintensität sein. Wie in den REM-Mikrographen (Abbildung 4-37) zu erkennen, weisen die CN-Papiere keine porösen Strukturen auf, weshalb die spezifische Oberfläche im Vergleich zu NC-Membranen und auch unbehandelten Papieren geringer ist. Eine geringere Oberfläche könnte zur Folge haben, dass weniger Gold-Nanopartikel an den Linien gebunden werden, was zu einer schwächer gefärbten und somit weniger intensiven Bande führt.

Zur weiteren Charakterisierung der CN-Papiere als alternative Membranmaterialien wurden hCG-Assays mit blauen 400 nm Latexpartikeln durchgeführt, diese sind in Abbildung 6-10 gezeigt. Die Herstellung und Durchführung dieser Assays ist in Abschnitt 8.8 beschrieben.

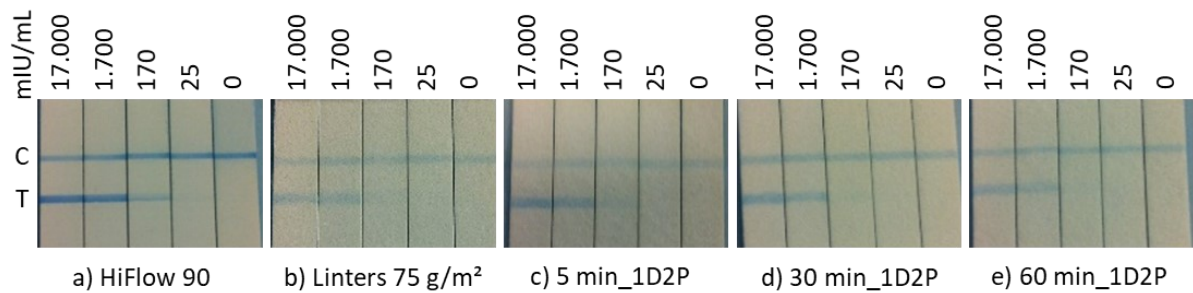


Abbildung 6-10: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen α -hCG-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. a) konventionelle HiFlow 90 NC-Membran (Merck Millipore), b) Baumwoll-Linters-Papier (75 g/m²), c) CN-Papier nach 5 min, d) 30 min und e) 60 min Reaktionszeit mit jeweils aufeinanderfolgender Detergens- und Pufferbeschichtung. Pro Membranmaterial werden 4 verschiedene hCG Konzentrationen in 150 μ L Probenvolumen getestet. Die hCG Konzentrationen betragen 0, 25, 170, 1.700 und 17.000 mIU/mL. Die Kontrolllinie (*goat anti-mouse antiserum*) ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie (anti-hCG alpha mAb) mit T. Die α -hCG beta Antikörper sind auf Latexpartikel (400 nm) konjugiert.

Im Wesentlichen sind diese vergleichbar mit den hCG-Assays mit Goldpartikeln aus Abbildung 6-9. Als Referenzmembran wurde eine HiFlow 90 Membran (Merck Millipore) verwendet, da diese von den kapillaren Fließzeiten (a, 90 s/4 cm) näher an den CN-Papieren liegt. Diese liegen bei 98 s/4 cm \pm 2 s/4 cm (Abbildung 6-10 c), 82 s/4 cm \pm 3 s/4 cm (Abbildung 6-10 d) und 67 s/4 cm \pm 2 s/4 cm (Abbildung 6-10 e). Wie zu erwarten sind die erhaltenen Banden auf der HiFlow Membran intensiv und schmal. Die niedrigste, deutlich zu erkennende hCG-Konzentration ist 170 mIU/mL. Die niedrigste Konzentration von 25 mIU/mL ist nicht eindeutig mit dem bloßen Auge erkennbar. Bei der Verwendung von Papier (Abbildung 6-10 b) als Membranmaterial werden breitere Banden erhalten. Die Intensität dieser ist schwächer als bei der NC-Membran, ebenfalls ist die niedrigste detektierbare Konzentration 170 mIU/mL. Die Assays mit CN-Papieren als Membranmaterial (Abbildung 6-10 c - e) zeigen im Vergleich zu Papier etwas schmalere und intensivere Banden. Die niedrigste detektierbare Konzentration liegt ebenfalls wie auch bei der Referenzmembran bei 170 mIU/mL (Abbildung 6-10 c, d), allerdings mit verminderter Intensität.

Die verwendeten Latexpartikel sind 10-mal größer, als die zuvor verwendeten Goldpartikel. Die Membranen selbst weisen keine Blaufärbung fernab der Test- und Kontrolllinie auf, sodass davon ausgegangen werden kann, dass keine unspezifische Bindung der Latexpartikel an den CN-Papieren stattfindet. Die reduzierten Intensitäten im Vergleich zu den Assays mit Goldpartikeln könnte auf eine mögliche elektrostatische Repulsion zwischen den Latexpartikeln und der Fasern der CN-Papieren zurückzuführen sein.^[176] Trotz identischer Umhüllung der Partikel mit Antikörpern, könnte die negative Oberflächenladung der Partikel nicht vollständig abgeschirmt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten die Oberflächenladungen und Potentiale der Partikel und der CN-Papiere bestimmt werden. Alternativ könnte zur Überprüfung auch eine „Umpolung“ der Faseroberfläche, z.B. durch abscheiden positiver Polymere in Erwägung gezogen werden. Eine Abscheidung positiv geladener Proteine/Antikörper auf den Latexpartikeln wäre ebenfalls eine denkbare Vorgehensweise. Grundsätzlich können CN-Papiere als alternatives Membranmaterial für diagnostische Schnelltests verwendet werden. Allerdings ist eine weitere Optimierung des Materials nötig, um auch die niedrigsten hCG-Konzentrationen deutlich detektieren zu können.

Zur weiteren Charakterisierung der CN-Papiere als alternative Membranmaterialien wurden anti-HBsAg-Assays durchgeführt. Bei diesem Assay eine gute Sensitivität zu erreichen, ist schwieriger als beim hCG-Assay. Hierbei spielt vor allem die Fließgeschwindigkeit und die damit verbundene Interaktionszeit zwischen den Antikörpern der Kontrolllinie und dem Antigen eine Rolle. Niedrige Fließgeschwindigkeiten, also hohe kapillare Fließzeiten, wirken sich positiv auf die Sensitivität der Assays aus. Abbildung 6-11 zeigt die Leistungsfähigkeit der CN-Papiere in HBsAg-Assays.

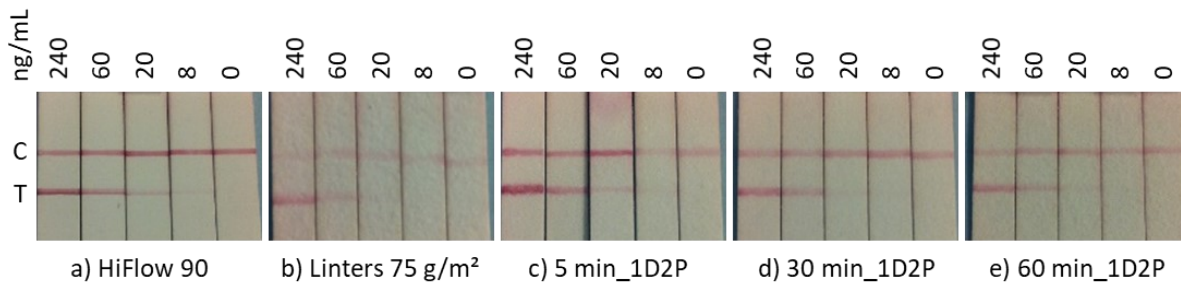


Abbildung 6-11: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen HBsAg-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. a) konventionelle HiFlow 90 NC-Membran (Merck Millipore), b) Baumwoll-Linters-Papier (75 g/m²), c) CN-Papier nach 5 min, d) 30 min und e) 60 min Reaktionszeit mit jeweils aufeinanderfolgender Detergens- und Pufferbeschichtung. Pro Membranmaterial werden 4 verschiedene HsAg- Konzentrationen in 150 μ L Probenvolumen getestet. Die Konzentrationen betragen 0, 8, 20, 60 und 240 ng/mL. Die Kontrolllinie ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie mit T. Die HBsAg-Antikörper sind auf Goldpartikel (40 nm) konjugiert.

Als Referenzmembran wurde eine HiFlow 90 Membran (Merck Millipore) verwendet, da die CN-Papiere eine ähnliche kapillare Fließzeit zu dieser aufweisen. Auf der Referenzmembran (a) werden schmale Linien erhalten, wobei die niedrigste mit dem Auge eindeutig zu erkennende Konzentration 20 ng/mL ist. Die Konzentration von 8 ng/mL ist äußerst schwach erkennbar. Bei der Verwendung von Baumwoll-Linters-Papier als Membranmaterial (b) sind die Linien im Vergleich zur NC-Membran leicht verbreitert. Die Intensität dieser ist stark vermindert, dies führt dazu, dass die niedrigste detektierbare HBsAg-Konzentration bei 60 ng/mL liegt. Dies könnte auf die erhöhte Fließgeschwindigkeit (60 s/4 cm) im Vergleich zur Referenzmembran zurückzuführen sein. Die alternativen Membranmaterialien aus CN-Papieren (c-e) weisen erneut eine höhere Intensität der Linien auf, als die Baumwoll-Linters-Papiere. Die Linienbreiten sind geringer, jedoch leicht verbreitert im Vergleich zur NC-Membran. Die höchste Sensitivität kann bei den CN-Papieren nach 5 min Reaktionszeit beobachtet werden, welche bei 20 ng/mL liegt. Diese lässt sich durch die niedrigste Fließgeschwindigkeit (98 s/4 cm \pm 2 s/4 cm) der drei alternativen Membranen erklären. Die niedrige Geschwindigkeit wirkt sich positiv auf die Interaktion der Antikörper (Test- und Kontrolllinie) auf das vorbeitransportierte Antigen (HBsAg) aus. Eine Konzentration von 20 ng/mL ist mit dem bloßen Auge deutlich erkennbar, wohingegen die niedrigste Konzentration von 8 ng/mL wie bei der NC-Membran nur äußerst schwach erkennbar ist. Die HBsAg-Assays zeigen, dass CN-Papiere eine vergleichbare Intensität wie die Referenz-NC-Membran aufweisen und dies bei einer vergleichbaren Sensitivität. Eine unspezifische Bindung der Goldkonjugate kann auf den Materialien nicht beobachtet werden.

Die Durchführung der unterschiedlichen diagnostischen Schnelltests zeigt, dass CN-Papiere eine mögliche und leistungsfähige alternative zu konventionellen Membranmaterialien darstellen. Die Anpassung der Fließgeschwindigkeiten kann verhältnismäßig einfach durch Kontrolle der Reaktionszeiten beim Herstellungsprozess erfolgen. Die erhaltenen Materialien weisen eine gute Stabilität und Flexibilität auf, was die Materialien einfach in der Handhabung macht. Durch eine geeignete Nachbehandlung der Materialien durch Puffer und Detergens erhalten diese guten Membraneigenschaften, welche sich u.a. in der Intensität der Test- und Kontrolllinien und deren Breite widerspiegelt.

Die Herstellung und Verwendung von CN-Papieren ist neben den in dieser Arbeit charakterisierten Eigenschaften auch im Sinne der Nachhaltigkeit besonders interessant. Für konventionelle NC-Membranen wird NC verwendet, welche zuvor durch eine vollständige Nitrierung von Cellulose erhalten wird. Hierbei kann es zu großen Qualitätsunterschieden der hergestellten NC kommen, da es natürliche Schwankungen bei der verwendeten Cellulose im Rohmaterial kommt. Die auf diesem Weg gewonnene NC muss, wie auch bei der Herstellung von NCPHM, in organischen Lösemitteln zu einem *Lacquer* verarbeitet werden. Dieser *Lacquer* muss anschließend unter aufwändiger Kontrolle der klimatischen Bedingungen (Temperatur, Luftfeuchte) und anderen Prozessparametern (sehr langsame Bahngeschwindigkeit) auf eine Kunststoffolie aufgebracht und getrocknet werden. Erst nach einer ausreichenden Trocknung und Membranausbildung kann die Detergensbeschichtung durchgeführt werden, bevor nach einem erneuten Trocknungsschritt das Membranmaterial aufgerollt werden kann. CN-Papiere benötigen zur Herstellung weniger Reaktionsschritte. Durch Einlegen der Papiere in Nitriersäuren kann direkt aus Papieren das alternative Membranmaterial hergestellt werden. Eine anschließende Nachbehandlung mit Detergens und Puffer kann in einem einzigen Schritt durchgeführt werden und sogar direkt mit den Waschsritten nach der Nitrierungsreaktion kombiniert werden, wobei ein zwischenzeitlicher Trocknungsschritt entfällt. Da die Herstellung durch vollständiges Einlegen in die Nitriersäure geschieht, entfällt dabei die Kontrolle der Luftfeuchte bei der Herstellung. Eine Verwendung von organischen Lösemitteln ist für diese Materialien nicht notwendig, ebenfalls muss keine Kunststoffolie als stabiles Fundament für die Membran genutzt werden, da das Fasernetzwerk von Papieren und CN-Papieren selbsttragend und flexibel ist. Für die Anwendbarkeit in diagnostischen Assays ist die Homogenität bzw. vollflächige Funktionalisierung der Papiere vorteilhaft. Dies war für die CN-Papiere gegeben, wie mittels IR-Spektroskopie (Abschnitt 4.4.2) und Elementaranalysen (Abschnitt 4.4.3) gezeigt werden konnte. Hersteller von diagnostischen Assays können dadurch ihre etablierten Herstellungsverfahren direkt anwenden und müssen diese nicht an das Material anpassen. CN-Papiere bilden demnach eine gute, kostengünstige und vor allem nachhaltige Alternative zu konventionellen NC-Membranen.

6.5 Zusammenfassung diagnostischer Schnelltests auf alternativen Membranmaterialien im Vergleich zu NC-Membranen

In den Abschnitten 6.1 - 6.4 wurden NCPHM und CN-Papiere auf ihre Eignung als alternative Membranmaterialien untersucht und mit unbehandelten Baumwoll-Linters-Papieren und konventionellen NC-Membranen verglichen. Als diagnostische Modell-Assays wurde der anti-*hCG*-Assay („Schwangerschaftstest“) und anti-*HBsAg*-Assay („Hepatitis-B Test“) verwendet. Bei den

Untersuchungen wurde lediglich das Membranmaterial ausgetauscht, alle anderen Komponenten wurden unverändert gelassen. Die Herstellung und Durchführung der Assays ist in Abschnitt 8.8 beschrieben.

Die diagnostischen Assays auf konventionellen NC-Membranen zeigen in allen Fällen, unabhängig des Assays, schmale Linienbreiten und hohe Kontraste der Test- und Kontrolllinien. Für die meisten durchgeführten Tests, war die höchste Sensitivität bei diesen Materialien zu beobachten, sodass in fast allen Fällen die niedrigsten Konzentrationen detektiert und mit bloßem Auge erkannt werden konnten.

Bei Verwendung von unbehandelten Baumwoll-Linters-Papieren als Membranmaterialien konnte eine deutliche Verschlechterung der Sensitivität der Assays beobachtet werden. Bei Verwendung einer Grammaturn von 50 g/m² konnte in allen Fällen eine deutliche Zunahme der Linienbreiten beobachtet werden, was mit einem reduzierten Kontrast der Linien einher geht. Dies führt unweigerlich zu einer geringeren Sensitivität, sodass die niedrigste zu detektierenden Konzentrationen nur selten zu erkennen waren. Durch Verwendung von 75 g/m² Papieren ließ sich eine verringerte Linienbreite beobachten, welche allerdings vergleichbare Sensitivitäten wie die 50 g/m² Papiere aufwies. Dies zeigt deutlich, dass reine Baumwoll-Linters-Papiere als Membranmaterialien in einem klassischen Assay-Aufbau nicht als alternative Membranmaterialien geeignet sind und modifiziert werden müssen.

Durch Tauchbeschichtung der Papiere mit NC-Lacquer, konnte eine Vielzahl verschiedener NCPHM hergestellt werden. Einige dieser Materialien wurden hinsichtlich ihrer Eignung als alternative Membranmaterialien untersucht. Dabei ließ sich erkennen, dass die Linienbreiten der Test- und Kontrolllinie durch die Beschichtung deutlich reduziert werden können, sodass diese denen von konventionellen NC-Membranen sehr ähneln. Die NCPHM weisen gegenüber unbehandelten Papieren eine etwas höhere Sensitivität auf. Dies kann auf eine bessere Proteinbindung auf den Linien erklärt werden, zudem ist die kapillare Fließzeit größer, was die Interaktionszeiten der Linien mit den vorbeifließenden Antikörper-Antigen-Konjugaten erhöht. Im Vergleich zu konventionellen NC-Membranen ist die Sensitivität geringer. Lediglich bei einer Parameterkombination ließ sich die geringste hCG-Konzentration detektieren. Für die Herstellung der Assays musste aufgrund der gleichmäßigen NC-Beschichtung kein Augenmerk auf eine exakte Positionierung des Materials beim Aufdrucken der Test- und Kontrolllinien gelegt werden. Im Allgemeinen konnte gezeigt werden, dass diagnostische Assays auf vollflächig beschichteten NCPHM durchgeführt werden können, es allerdings noch Optimierungsbedarf hinsichtlich der Sensitivität auf den neuartigen Membranmaterialien vorliegt.

Neben vollflächig beschichteten Materialien erfolgten konzeptionelle Tests von ortsdefinierten NCPHM als alternative Membranmaterialien für diagnostische Assays. Die zu beobachtenden Linienbreiten und Kontraste der Linien sind vergleichbar zu vollflächig beschichteten Materialien. Die Sensitivität der ortsdefinierten NCPHM ist geringer als bei konventionellen NC-Membranen. Es konnte lediglich bei zwei getesteten Material die geringste hCG- und HBsAg-Konzentration beobachtet werden. Bei der Verwendung von ortsdefinierten NCPHM ist sowohl bei der Herstellung der Membranmaterialien, als auch beim Auftrag der Antikörperlinien auf eine korrekte Orientierung des Materials und Platzierung der Linien zu achten, da sonst die Linien außerhalb des beschichteten Bereichs appliziert werden. Dies hat einen starken negativen Einfluss auf die Ergebnisse der Assays. Anhand der Durchführung der Assays kann eine grundsätzliche

Eignung dieser neuartigen Membranmaterialien für die Anwendung in diagnostischen Schnelltests bestätigt werden. Um die Sensitivität in Einklang mit konventionellen NC-Membranen zu bringen sind weitere Anpassungen des Materials nötig.

Neben beschichteten alternativen Membranmaterialien wurden reaktiv hergestellte CN-Papiere aus Baumwoll-Linters-Papieren in diagnostischen *Assays* getestet. Es ließ sich zeigen, dass trotz identischer Oberflächenstruktur der CN-Papiere im Vergleich zum Ausgangsmaterial schmalere Linienbreiten erzielt werden konnten. Dies führt zu einer Erhöhung der Kontraste auf den Linien. Bei den durchgeführten *Assays* konnten die niedrigsten zu detektierenden Konzentrationen weder bei hCG, noch bei HBsAg beobachtet werden. Allerdings war die Sensitivität bei der Verwendung der CN-Papiere identisch zur verwendeten HiFow 90 Membran, da auf dieser ebenfalls die niedrigsten Konzentrationen nicht erkennbar gewesen sind. Bei der Herstellung der *Assays* spielte eine exakte Positionierung der Linien keine besondere Rolle, da die CN-Papiere in allen Dimensionen gleichmäßig hinsichtlich der Materialzusammensetzung und Stickstoffgehalte waren. Im Allgemeinen konnte gezeigt werden, dass diese völlig neuartigen alternativen Membranmaterialien aus CN-Papieren grundsätzlich für die Anwendung in diagnostischen *Assays* verwendet werden können. Durch weitere Anpassungen des Materials sollte eine identische Sensitivität wie bei konventionellen NC-Membranen erzielt werden können.

7. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, durch Kombination der positiven und inhärenten Eigenschaften von Papier und Nitrocellulose neuartige Membranmaterialien herzustellen, welche Anwendung in diagnostischen Assays finden können. Die Herstellung der Materialien sollte dabei durch Anwendung etablierter Herstellungs- und Beschichtungsverfahren geschehen und die Materialeigenschaften charakterisiert werden. Eine Reduktion der benötigten Menge an NC für die Membranherstellung, sowie ein möglicher Verzicht auf eine PET-Trägerfolie wurde angestrebt. Aufgrund dessen wurde erwartet, dass die daraus resultierenden Materialien eine nachhaltigere Alternative zu konventionellen NC-Membranen darstellen könnten.

Strategisch sollten die Ziele entweder durch eine Beschichtung von Baumwoll-Linters-Papieren mit NC oder durch eine reaktive Umsetzung der Papiere erhalten werden. Bei der Beschichtung von Papieren mit NC sollten die positiven Materialeigenschaften der Ausgangsmaterialien miteinander kombiniert werden. Das eingesetzte Papier sollte dabei zudem als Trägermaterial fungieren um auf PET-Trägerfolien verzichten zu können. Bei der reaktiven Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papieren zu Cellulosenitrat-Papieren wurde angestrebt, dass die Papieroberfläche vollständig funktionalisiert und in Cellulosenitrat umgewandelt wird, aber die offenporige Papierstruktur erhalten bleibt. Auf diesem Wege sollten die proteinbindenden Eigenschaften des Cellulosenitrats mit der Stabilität und Struktur von Papieren kombiniert werden.

Durch Anwendung des Tauchbeschichtungsverfahrens und Variation verschiedener Herstellungsparameter konnten vollflächige und gleichmäßig beschichtete NC-Papier-Hybridmaterialien erhalten werden. Diese Materialien zeigten eine gleichmäßige NC-Verteilung auf der Papieroberfläche und im Inneren der Papiere. Bei der Handhabung von vollflächigen NCPHM konnte schnell beobachtet werden, dass kein zusätzliches Trägermaterial zur Stabilisierung benötigt wird. Die Porenstruktur auf den so hergestellten NCPHM ähnelte der von konventionellen NC-Membranen, wohingegen die neuartigen Materialien geringere Porengrößen aufwiesen. Eine Betrachtung der aufgetragenen NC-Menge konnte zeigen, dass die neuartigen Membranmaterialien deutlich weniger NC enthielten, als konventionelle Membranen. Durch die Tauchbeschichtung war es möglich die benötigte NC-Menge im Vergleich zu konventionellen NC-Membranen um bis zu 89% zu reduzieren.

Neben der vollflächigen Beschichtung der Papiere mit NC-Lacquer wurden mittels Liniendruckverfahren ortsdefinierte NCPHM hergestellt. Durch die ortsdefinierte Applikation des Lacquers auf Papieren wurden nur in einem geringen Bereich des Hybridmaterials die Eigenschaften beider Materialien kombiniert. Entlang der Beschichtung konnten bei diesem Material verschiedene Oberflächenstrukturen beobachtet werden. Diese äußerten sich in den Randbereichen als annähernd homogene Beschichtung der Faserflächen und im Zentrum der Lacquer-Applikation als poröse Strukturen, wie sie auch bei den vollflächigen NCPHM beobachtet werden konnten. Vor und nach dem mit NC beschichteten Teil des Hybridmaterials bestand dieses nur aus unbehandeltem Papier. Homogene Linien konnten dabei vor allem durch die Kombination aus geringem NC-Anteil im Lacquer, einer geringen Dosierung, höherer Papiergrammatur und einer breitflächigeren Applikation durch einen Dosierpinsel erhalten werden. Die ortsdefinierte Applikation ermöglichte es den NC-Anteil auf den NCPHM weiter zu reduzieren, sodass im Vergleich zu konventionellen NC Membranen bis zu 91% NC eingespart werden konnten.

Gänzlich ohne eine Beschichtung mit NC ließen sich CN-Papiere durch eine reaktive Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papieren mit Säuremischungen aus Schwefelsäure und Salpetersäure

herstellen. Bei der Herstellung musste keine Kontrolle der Luftfeuchtigkeit erfolgen. Einzig die Reaktionszeit und Temperatur der Säuremischung mussten kontrolliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenstruktur der Ausgangspapiere weitestgehend erhalten blieb. Die resultierenden CN-Papiere vereinten die Oberflächenchemie von Nitrocellulose mit der Porenstruktur von Papieren. Die erhaltenen Materialien wiesen eine deutlich höhere Stabilität in Kontakt mit Wasser auf als nicht umgesetzte Papiere, was für eine Anwendung in diagnostischen Assays von Vorteil ist.

Ein Vergleich der verschiedenen Herstellungsverfahren zeigte, dass die Tauchbeschichtung der industriellen Herstellungsmethode für NC-Membranen am nächsten kam. Bei der Tauchbeschichtung war eine Kontrolle der relativen Luftfeuchtigkeit, der Temperatur und der Ziehgeschwindigkeit notwendig, um reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können. Da die Beschichtung dieser Materialien gleichmäßig war, ähnelte dieses Material den konventionellen Membranen am meisten. Die Applikation von NC-Lacquer auf Papieren durch das Liniendruckverfahren führt zur ortsdefinierte Beschichtung von Papieren mit NC. Dies ermöglicht die Erstellung von komplexen Systemen, welche sehr genau aufgetragen werden können. Zudem ließ sich auf diesem Wege Rohstoffe einsparen, da weniger NC bei der Herstellung benötigt wurde. Bei der Anwendung ortsdefinierter NCPHM in diagnostischen Assays muss sichergestellt werden, dass die für den Assay wichtigen Antikörper gezielt auf den mit NC beschichteten Bereich aufgebracht werden. Ein einfacher Austausch von konventionellen NC-Membranen gegen ortsdefinierte NCPHM ist aus diesem Grund nicht ohne weiteres möglich. Eine weitere Reduktion des eingesetzten NC Anteils konnte durch die reaktive Umsetzung der Papiere zu CN-Papieren erzielt werden. Diese Materialien konnten direkt aus Papier unter Erhalt der Faserstruktur hergestellt werden und wiesen eine besondere Stabilität in wässriger Umgebung im Vergleich zu unbehandelten Papieren auf. Aufgrund der homogenen Funktionalisierung der Papiere, könnten diese ohne weitere Anpassungen als alternative Membranmaterialien für diagnostische Assays eingesetzt werden.

Neben der Herstellung und strukturellen Charakterisierung wurden die mikrofluidischen Eigenschaften der NCPHM und CN-Papiere untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl NCPHM als auch CN-Papiere ohne eine Detergensbeschichtung nicht in der Lage sind einen Fluidfluss im Material zu etablieren. Dies ließ sich auf die Oberflächenstruktur der Materialien zurückführen. Um einen Fluidfluss zu ermöglichen wurden NCPHM und CN-Papiere nachträglich mit Detergens beschichtete. Bei CN-Papieren konnte zudem gezeigt werden, dass die Detergensbeschichtung mit dem Herstellungsprozess kombiniert werden kann, ohne dass das Material zwischenzeitlich getrocknet werden musste. Dies vereinfachte den Herstellungsprozess und reduzierte die benötigten Trocknungsschritte. Die Betrachtung von kapillaren Fließzeiten zeigte, dass diese je nach gewählten Herstellungsparametern denen von konventionellen NC-Membranen ähnelten. Die ideale Kombination der Herstellungsparameter war eine Papier Grammaturn von 50 g/m², ein NC-Anteil von 3,5%, eine Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min bei einer Temperatur von 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75% RH. Bei ortsdefinierten NCPHM wurde deutlich, dass der initiale Fluidfluss nur durch die mikrofluidischen Eigenschaften des gewählten Basispapiers abhingen. Erst ab Erreichen des mit NC beschichteten Bereichs kam es zu einer Verlangsamung des Fluidflusses, sodass die gesamte CFT der Materialien der CFT von konventionellen NC-Membranen ähnelte. Niedrige CFT konnten dabei durch eine Kombination aus geringer Lacquer-Dosierung und niedrigem NC-Anteil erzielt werden. Bei den reaktiv hergestellten CN-Papieren wurden die niedrigsten CFT gemessen, welche sich durch

Kontrolle der Reaktionszeit einstellen ließen. Die Charakterisierung der mikrofluidischen Eigenschaften konnte zeigen, dass die neuartigen alternativen Membranmaterialien für die Anwendung in diagnostischen Assays geeignet sein könnten.

Die verschiedenen Membranmaterialien wurden abschließend in diagnostischen Assays getestet. Als Modell-Assays diente der Schwangerschaftstest (hCG-Assay) und der Hepatits-B-Assay (HBsAg-Assay). Anstelle von konventionellen NC-Membranen wurden die Assays mit den alternativen Materialien zusammengesetzt. Als Referenz dienten NC-Membranen mit unterschiedlichen CFTs und Baumwoll-Linters-Papiere. Die Baumwoll-Linters-Papiere zeigten in allen Fällen blasse und breite Linien und konnten die niedrigsten hCG- und HBsAg-Konzentrationen nicht nachweisen. Die NC-Membranen lieferten wie erwartet in allen Tests die schmalsten und intensivsten Linien und lieferten die sensitivsten Resultate. Der direkte Vergleich mit Vollflächigen NCPHM zeigte, dass diese neuen Materialien etwas breitere Linien aufwiesen als NC-Membranen, aber dennoch die geringsten hCG-Konzentrationen detektiert werden konnten. Im HBsAg-Assay wurde die zweitniedrigste Konzentration sicher detektiert. Bei den ortsdefinierten NCPHM wurden vergleichbar breite Linien, Intensitäten und Sensitivität wie bei vollflächigen NCPHM für beide Assays beobachtet. Die durch reaktive Umsetzung hergestellten CN-Papiere zeigten im Vergleich zu unbehandelten Papieren trotz identischer Materialstruktur deutlich schmalere Linienbreiten, was zu höheren Kontrasten und Intensitäten auf der Linie führte. Die Materialien wiesen gegenüber unbehandelten Papieren eine höhere Sensitivität auf. Im direkten Vergleich zu NCPHM und NC-Membranen konnten allerdings nicht die niedrigsten hCG- und HBsAg-Konzentrationen detektiert werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass vollflächig beschichtete NCPHM, ortsdefinierte NCPHM und CN-Papiere als alternative Membranmaterialien eingesetzt werden können und sich die Kombination der Eigenschaften aus Papier und Nitrocellulose positiv auf die erhaltenen Materialeigenschaften im Vergleich zu unbehandelten Papieren auswirken.

Zieht man zum Schluss einen Vergleich der einzelnen in dieser Arbeit entwickelten und charakterisierten Systeme, so ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- Durch die Verwendung von Papieren als Basismaterial können neuartige Membranmaterialien hergestellt werden, die ohne die Verwendung einer PET-Trägerfolie auskommen. Dies kann unabhängig vom umgesetzten Herstellungskonzept erreicht werden.
- Durch eine vollflächige Beschichtung von Papieren mit NC lässt sich der benötigte NC-Anteil um 89% im Vergleich zu konventionellen NC-Membranen reduzieren. Wird ein ortsdefiniertes Beschichtungsverfahren für die Herstellung verwendet, so reduziert sich der benötigte NC-Anteil weiter auf 91% des bei NC-Membranen benötigten NC-Anteils.
- Als vollflächige Beschichtungsmethoden sind im allgemeinen keine Einschränkungen zu erwarten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erfolgreich das Tauchbeschichtungsverfahren angewendet und etabliert. Zur ortsdefinierten Applikation der NC-Lösung ließ sich das Flüssigkeits-Dispenserdruck-Verfahren bzw. Liniendruckverfahren etablieren. Besonders der Auftrag der NC-Lösungen über einen breiten Dosierpinsel lieferte homogene und reproduzierbare Beschichtungen.
- Anhand der Kombination verschiedener Herstellungsparameter ließen sich bei NCPHM die kapillaren Fließzeiten anpassen und in einen vergleichbaren Rahmen bringen, wie bei konventionellen NC-Membranen. Bei CN-Papieren kann die Einstellung der Fließzeiten über die Reaktionszeit gesteuert werden.

- Durch eine reaktive Umsetzung von Baumwoll-Linters-Papieren in Säuremischungen aus Salpetersäure und Schwefelsäure konnten Cellulosenitrat Papiere hergestellt werden. Diese neuartigen Membranmaterialien kommen ohne eine Beschichtung mit NC aus.
- Die prinzipielle Eignung der Materialien in diagnostischen Schnelltests konnte anhand des hCG-Assays (Schwangerschaftstest) und des HBsAg-Assays (Hepatitis-B Test) überprüft werden. Die Materialien sind im Allgemeinen für die Anwendung in LFTs geeignet. Die Sensitivität der Assays auf neuartigen Membranmaterialien ist im Falle des hCG-Assays mit konventionellen Membranen vergleichbar. Beim HBsAg-Assay hingegen ist eine geringere Sensitivität auf den neuartigen Membranmaterialien zu beobachten.

Abschließend lässt sich festhalten, dass es neben konventionellen NC-Membranen weitere, spannende Konzepte gibt, um alternative Membranmaterialien auf Basis nachwachsender Rohstoffe herzustellen und somit nachhaltigere Materialien erhalten werden können. Ebenfalls wird klar, dass weitere Optimierungen der Materialien notwendig sein werden um diese auf dasselbe Sensitivitätsniveau in diagnostischen Assays zu heben, wie es bei konventionellen NC-Membranen der Fall ist.

In dieser Arbeit wurden essentielle Parameter zur Herstellung neuartiger Materialien identifiziert und diskutiert. Der mögliche Parameterraum zur Herstellung der neuartigen Materialien wurde teilweise untersucht. Es wurden lediglich Baumwoll-Linters-Papiere für die Herstellung der Materialien verwendet. Diese sind im Vergleich zu Papieren aus anderen Zellstoffen teurer, da sie nicht im großen Maßstab aus Hölzern hergestellt werden. Bei der Herstellung der Materialien könnten in nachfolgenden Arbeiten auch Zellstoffe aus Buche, Kiefer, Eukalyptus und anderen Zellstoffen sowie Mischungen daraus eingesetzt werden. Auch eine weitere Reduktion der Grammatur der eingesetzten Papiere ist denkbar. Zudem wurde der Zellstoff für die Papierherstellung in dieser Arbeit unbehandelt eingesetzt. Durch weitere Bearbeitung des Zellstoffs durch verschiedene Mahlungen, Kalandrieren oder *Refinen* der Fasern könnten in weiteren Arbeiten die Eigenschaften der Ausgangspapiere eingestellt werden, bevor diese mit NC beschichtet oder reaktiv umgesetzt werden. So lässt sich beispielsweise die Dichte der Papiere und die Porosität einstellen, was sich auf kapillare Fließzeiten der Basispapiere auswirkt.^[177,178]

Des Weiteren kann in Erwägung gezogen werden, dass gänzlich auf eine NC-Beschichtung oder reaktive Umsetzung verzichtet wird. Dabei könnten wie zuvor erwähnt die Papiereigenschaften der Basispapiere angepasst werden, um sensitive Assays zu erhalten. Ebenfalls denkbar wäre, durch eine Anpassung des *Assay-Designs* auf ein aus mehreren Materialien bestehenden Assay zu verzichten (*assembly*) und die Assays auf einem langen Papierstreifen zu übertragen. Das Resultat dieses Ansatzes wäre ein *Paper-only-LFT*, welcher bis dato nicht existiert. Dieses Konzept ist in Abbildung 7-1 dargestellt.

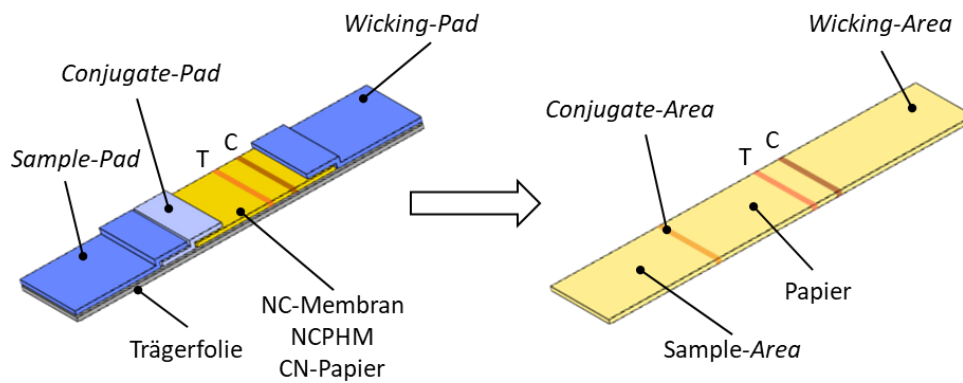


Abbildung 7-1: a) Klassischer *Lateral-Flow-Assay*, bestehend aus verschiedenen Komponenten. b) *Paper-only-LFT*, bestehend aus einem einzigen, langen Papierstreifen mit verschiedenen Funktionsbereichen.

Wie in Abschnitt 8.8 beschrieben, bestehen konventionelle diagnostische *Assays* aus mehreren verschiedenen Bestandteilen wie *Sample-Pad*, *Conjugate-Pad*, Membranmaterial und *Wicking-Pad*. Diese einzelnen Bestandteile machen die Herstellung und den Zusammenbau der *Assays* recht komplex. Durch die Verwendung von längeren Papierstreifen und gezieltes ortsdefiniertes Aufbringen von Pufferlösungen, Konjugaten und Test- und Kontrolllinien sollten sich die Funktionalitäten vom zusammengesetzten *Assay* auf den Papierstreifen übertragen lassen. Die Herstellung dieser *Paper-only-LFT* könnte durch mehrere parallel verlaufende Liniendruckverfahren realisiert werden und kommt sehr wahrscheinlich ohne eine aufwändige Kontrolle extrinsischer Klimaparameter aus.

7.1 Summary

The aim of this work was to combine the positive and inherent properties of paper and nitrocellulose to produce novel membrane materials that can be used in diagnostic assays. The materials should be produced using established manufacturing and coating processes and the material properties should be characterized. The intention was to reduce the amount of NC required for membrane production and possibly eliminate the need for a PET carrier foil. It was therefore expected that the resulting materials could represent a more sustainable alternative to conventional NC membranes.

Strategically, the targets should be achieved either by coating cotton linters papers with NC or by reactive conversion of the papers. When coating papers with NC, the positive material properties of the base materials should be combined with each other. The paper used should also function as a carrier material so that PET carrier foils can be eliminated. In the reactive conversion of cotton linters paper to cellulose nitrate paper, the aim was to completely functionalize the paper surface and convert it into cellulose nitrate while retaining the open-pored paper structure. In this way, the protein-binding properties of cellulose nitrate were to be combined with the stability and structure of paper.

By using the dip-coating process and varying the production parameters, full-area and uniformly coated NC paper hybrid materials were obtained. These materials showed a homogeneous NC distribution on the paper surface and inside the papers. When handling full-area

NCPHM, it was quickly observed that no additional carrier material was required for stabilization. The pore structure on the NCPHMs produced in this way was similar to that of conventional NC membranes, whereas the novel materials had smaller pore sizes. An examination of the amount of NC applied showed that the novel membrane materials contained significantly less NC than conventional membranes. The dip coating made it possible to reduce the amount of NC required by up to 89% compared to conventional NC membranes.

In addition to the full-area coating of the papers with NC-Lacquer, a line-printing process was used to produce spatially defined NCPHM. Due to the spatially defined application of the lacquer on papers, the properties of the two materials were only combined in a small area of the hybrid material. Different surface structures could be observed along the coating of this material. These manifested themselves in the edge areas as an almost homogeneous coating of the fiber surfaces and in the center of the lacquer application as porous structures, as could also be observed with the full-area NCPHM. Before and after the section of the hybrid material coated with NC, it consisted only of untreated paper. Homogeneous lines were achieved primarily through the combination of a low content of NC in the lacquer, a low dosage, higher paper grammage and a broader area of application using a dosing brush. The spatially defined application made it possible to further reduce the NC content on the NCPHM, so that up to 91% NC could be saved compared to conventional NC membranes.

It was possible to produce CN papers entirely without coating them with NC by reacting cotton linters papers with acid mixtures of sulphuric acid and nitric acid. It was not necessary to control the humidity during production. Only the reaction time and temperature of the acid mixture had to be controlled. It was shown that the surface structure of the starting papers was largely retained. The resulting CN papers combined the surface chemistry of nitrocellulose with the paper structure. The resulting materials exhibited significantly higher stability in contact with water than non-reacted papers, which is advantageous for use in diagnostic assays.

A comparison of the different manufacturing processes showed that dip coating came closest to the industrial manufacturing method for NC membranes. With dip coating, it was necessary to control the relative humidity, temperature and withdrawal speed in order to achieve reproducible results. As the coating of these materials was even, this material was the most similar to conventional membranes. The application of NC-Lacquer on papers by the line printing process leads to spatially defined coating of papers with NC. This enables the creation of complex systems that can be applied very precisely. In addition, raw materials can be saved in this way, as less NC is required during production. When using spatially defined NCPHM in diagnostic assays, it must be ensured that the antibodies important for the assay are precisely applied to the area coated with NC. For this reason, it is not possible to simply replace conventional NC membranes with spatially defined NCPHM. A further reduction in the NC content used was achieved by reactive conversion of the papers to CN papers. These materials could be produced directly from paper while retaining the fiber structure and exhibited outstanding stability in an aqueous environment compared to untreated papers. Due to the homogeneous functionalization of the papers, they could be used as alternative membrane materials for diagnostic assays without further adaptations.

In addition to the production and structural characterization, the microfluidic properties of the NCPHM and CN papers were investigated. It was found that both NCPHM and CN papers are not able to establish a fluid flow in the material without a detergent coating. This could be attributed to the surface structure of the materials. In order to enable fluid flow, NCPHM and

CN papers were subsequently coated with detergent. In the case of CN papers, it was also shown that the detergent coating can be combined with the manufacturing process without the need to dry the material in between. This simplified the manufacturing process and reduced the required drying steps. The observation of capillary flow times showed that these were comparable to those of conventional NC membranes, depending on the selected manufacturing parameters. The ideal combination of manufacturing parameters was a paper grammage of 50 g/m², a NC content of 3.5%, a withdrawing speed of 500 mm/min at a temperature of 25 °C and a relative humidity of 75% RH. With spatially defined NCPHM, it was found that the initial fluid flow depended only on the microfluidic properties of the selected base paper. Only after reaching the area coated with NC the fluid flow slowed down, so that the overall CFT of the materials was similar to the CFT of conventional NC membranes. Low CFTs were achieved through a combination of low lacquer dosage and low NC content. The lowest CFTs were measured for the reactive CN papers, which could be adjusted by controlling the reaction time. The characterization of the microfluidic properties showed that the novel alternative membrane materials potentially could be suitable for use in diagnostic assays.

The various membrane materials were finally tested in diagnostic assays. The pregnancy test (hCG assay) and the hepatitis B assay (HBsAg assay) were used as model assays. Instead of conventional NC membranes, the assays were composed with the alternative materials. NC membranes with different CFTs and cotton linters papers were used as reference. The cotton linters papers showed pale and broad lines in all cases and were unable to detect the lowest hCG and HBsAg concentrations. As expected, the NC membranes provided the narrowest and most intense lines in all tests and gave the most sensitive results. The direct comparison with full-area NCPHM showed that these new materials had slightly broader lines than NC membranes, but still detected the lowest hCG concentrations. The second lowest concentration was reliably detected in the HBsAg assay. For the spatially defined NCPHM, comparably broad lines, intensities and sensitivities were observed for both assays as for full-area NCPHM. The CN papers produced by reactive conversion showed significantly narrower line widths compared to untreated papers although the material structure was identical, resulting in higher contrasts and intensities on the line. The materials showed a higher sensitivity compared to untreated papers. However, in direct comparison to NCPHM and NC membranes, the lowest hCG and HBsAg concentrations could not be detected. In summary, it can be stated that full-area coated NCPHM, spatially defined NCPHM and CN papers can be used as alternative membrane materials and that the combination of the properties of paper and nitrocellulose has a positive effect on the material properties obtained in comparison to untreated papers.

Finally, a comparison of the individual systems developed and characterized in this work leads to the following conclusions:

- By using paper as the base material, new types of membrane materials can be produced that do not require the use of a PET carrier film. This can be achieved regardless of the manufacturing concept implemented.
- The full-area coating of papers with NC can reduce the required NC content by 89% compared to conventional NC membranes. If a spatially defined coating process is used for production, the required NC content is further reduced to 91% of the NC content required for NC membranes.

-
- As full-area coating methods, no restrictions are generally to be expected. The dip coating process was successfully applied and established as part of this work. The liquid dispenser printing process or line printing process was established for spatially defined application of the NC solution. In particular, the application of the NC solutions using a wide dispensing brush provided homogeneous and reproducible coatings.
 - By combining various manufacturing parameters, the capillary flow times of NCPHM could be adjusted and brought within a comparable range to that of conventional NC membranes. With CN papers, the setting of the flow times can be tailored via the reaction time.
 - Cellulose nitrate papers could be produced by reactive conversion of cotton linters papers in acid mixtures of nitric acid and sulphuric acid. These novel membrane materials do not require a coating with NC.
 - The fundamental suitability of the materials in diagnostic rapid tests was verified using the hCG assay (pregnancy test) and the HBsAg assay (hepatitis B test). The materials are generally suitable for use in LFTs. The sensitivity of the assays on novel membrane materials is comparable to conventional membranes in the case of the hCG assay. In contrast, the HBsAg assay shows a lower sensitivity on the novel membrane materials.

In conclusion, it can be said that, in addition to conventional NC membranes, there are other exciting concepts for producing alternative membrane materials based on renewable raw materials and thus more sustainable materials can be obtained. It is also clear that further optimization of the materials will be necessary to raise them to the same level of sensitivity in diagnostic assays as is the case with conventional NC membranes.

In this work, essential parameters for the production of novel materials were identified and discussed. The possible parameter space for the production of the novel materials was partially investigated. Only cotton linters papers were used for the production of the materials. These are more expensive than papers made from other cellulose materials, as they are not produced from wood on a large scale. In subsequent work, pulps made from beech, pine, eucalypt and other pulps as well as mixtures of these could also be used in the production of the materials. A further reduction in the grammage of the paper used is also conceivable. In addition, the pulp used for paper production in this work was untreated. By further processing the pulp through various grinding processes, calendaring or refining the fibers, the properties of the base papers could be adjusted in further work before they are coated with NC or reactively converted. For example, the density of the papers and the porosity can be adjusted, which has an effect on the capillary flow times of the base papers.^[177,178]

Furthermore, it can be considered to completely omit NC coating or reactive conversion. As previously mentioned, the paper properties of the base papers could be adapted in order to obtain sensitive assays. It would also be an option to do entirely without an assay consisting of several materials (assembly) by adapting the assay design and to transfer the assays to a

long paper strip. The result of this approach would be a paper-only LFT, which does not yet exist. This concept is illustrated in Figure 7-2.

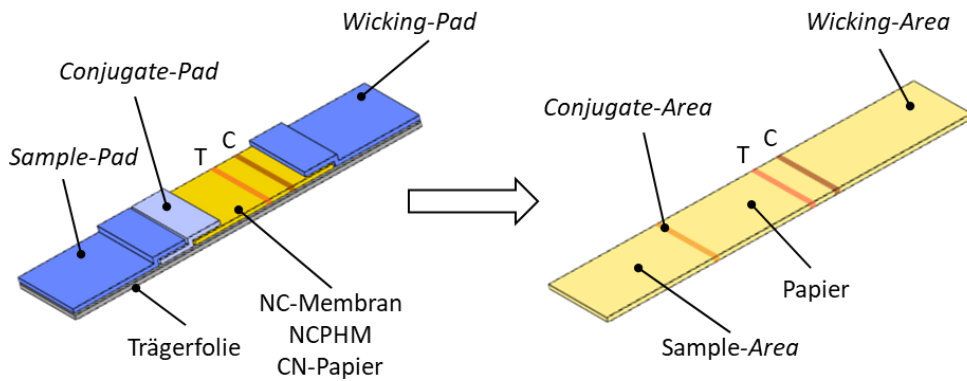


Figure 7-2: a) classical Lateral-Flow-Assay, consisting of different components (assembly). b) Paper-only-LFT, consisting of a single paper strip with various functional regions.

As described in section 8.8 , conventional diagnostic assays consist of several different components such as sample pad, conjugate pad, membrane material and wicking pad. These individual components make the production and assembly of the assays quite complex. By using longer paper strips and spatially defined application of buffer solutions, conjugates and test and control lines, it should be possible to transfer the functionalities from the assembled assay to the paper strip. The production of this paper-only LFT could be realized by several parallel line printing processes and most likely does not require complex control of extrinsic climate parameters.

8. Experimenteller Teil

8.1 Reagenzien, Lösungsmittel, Gemische und Verbindungen

Ausgangsmaterialien

NC (NC)	Synthesia
Cellulose Acetat (CA)	Eastman
Aceton, p.a.	VWR, ≥99.8%
Ethanol (EtOH), denat.	Carl-Roth, ≥99.8%
Isopropanol (IPA)	Carl-Roth, ≥99.5%
Butanol (n-BuOH)	Alfa-Aesar, 99.0%
Milli-Q® Wasser	Wasseraufbereitungsanlage Merck Millipore
Natriumdodecylbenzylsulfonat (SDBS)	Sigma-Aldrich, technical grade
Triton™ X-100, puriss.	Carl-Roth, 99.0%
Glycerin	Sigma-Aldrich, ≥99.0%
Tween® 20	Carl-Roth
Baumwoll-Linters-Zellstoff	Buckeye Technologies, Grade 225 HSR-M, Lot.# K45060636
Eukalyptus-Sulfat-Zellstoff	Cmpc, Eucalypt BHKP, G2056786
Calcofluor White M2R, Fluorescence brightener 28 (CFW)	MP Biomedicals
Natriumchlorid (NaCl)	Carl-Roth, 99.8%
Kaliumchlorid (KCl), p.a.	Carl-Roth, 99.5%
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl-Roth, 98.0%
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl-Roth, 99.0%
NaOH 0.1 M	VWR
HCl 0.1 M	VWR
Rhodamin B	Sigma-Aldrich, >95.0%
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	VWR, ≥98.0%
Salpetersäure (HNO ₃)	VWR, 69%
FITC-BSA	Sigma Aldrich
FITC-Dextran	TdB Labs

Albodour 956

Alberdingk Boley

Desmodur N3200

Covestro

TIB Kat 318

TIB Chemicals

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, wie erhalten verwendet.

Detergenzlösung

Eine 0,0625%-ige (w/w) SDBS Lösung wird in Milli-Q® Wasser hergestellt.

CFW Färbelösung

Zum Erhalt einer 100 μM *Calcofluor White M2R* Lösung werden 48 mg in 500 mL Milli-Q® Wasser gelöst. Die erhaltene Lösung wird in einer Braunglasflasche mit Schraubverschluss gelagert um ein Ausbleichen der Fluorophore zu verhindern.

Phosphatgepufferte Salzlösung (pH 7.4)

Zum Erhalt einer 10-fach konzentrierten Stammlösung einer wässrigen Phosphatpufferlösung (PBS) werden 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,2 g Na₂HPO₄ und 2,7 g KH₂PO₄ in 1 L Milli-Q® Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird auf pH 7,4 eingestellt. Hierfür wird bei einem initialen pH-Wert <7,4 eine 0,1 M Natronlauge zugegeben. Ist der initiale pH-Wert >7,4 wird 0,1 M Salzsäure zugegeben.

Um eine 5-fach und 1-fach konzentrierte PBS Pufferlösung zu erhalten, wird die Stammlösung (10-fach konzentriert) im Faktor 1:1 (für 5-fach) und 1:10 (für 1-fach) mit Milli-Q® Wasser verdünnt.

Verwendeter Zellstoff und Papier

Baumwoll-Linters-Zellstoff wurde von *Buckeye Technologies* und Eukalyptus-Sulfat-Zellstoff von *cmfc* bezogen.

Die Zellulose-Zellstoffplatten werden in kleine Stücke (ca. 3 cm x 3 cm) gerissen und für 16 h in Leitungswasser eingeweicht. Um die Fasern voneinander zu trennen, werden maximal 25 g des eingeweichten Zellstoffs in ein Aufschlaggerät (Typ AG 04, HAAGE, Mülheim an der Ruhr, Deutschland) überführt und das Füllvolumen mit Leitungswasser auf 2 L aufgefüllt. Die Zerfaserung wird mit insgesamt 75.000 Umdrehungen durchgeführt. Die Zerfaserung des Zellstoffs erfüllt die Zellcheming Merkblätter V/4/61^[179], und ISO 5263:1995^[180].

Die erhaltene Fasersuspension wird gemäß der Zellcheming Merkblätter V/6/61^[181] in einen Verteiler gegeben und weiter mit Leitungswasser verdünnt, bis die Zellstoffkonzentration bei 0,2% - 1,0%(w/v) liegt. Die Fasersuspension wird kontinuierlich gerührt und bei jeder Entnahme

der Zellstoffsuspension 3 x 1 L entnommen und zurückgegeben um den Auslassstutzen zu spülen. Zur Blattbildung wird ein definiertes Volumen in Abhängigkeit der Zellstoffkonzentration und gewünschten Grammaturs des zu bildenden Blattes aus dem Verteiler entnommen. Die entnommene Menge wird bis zu tatsächlicher Blattbildung kontinuierlich bewegt.

Die Blattbildung wird mit Hilfe eines manuellen Rapid-Köthen Blattbildners^[182] (BB3, HAAGE, Mülheim an der Ruhr, Deutschland) für Standardlaborpapiere durchgeführt. Die zuvor entnommene und permanent agitierte Fasersuspension wird im Füllvorgang des Blattbildners bei einem Füllvolumen von 2 L hinzugegeben und der Blattbildungszylinder bis auf 7 L mit Frischwasser gefüllt. Anschließend wird die verdünnte Fasersuspension für 5 s mit Luft durchwirbelt. Nach einer Ruhephase von 5 s wird die Fasersuspension durch ein Sieb entwässert und mittels Gautschkartons, Deckblättern und Gautschrolle entnommen. Das nasse Faservlies wird im Vakuum bei 93 °C für 10 min getrocknet. Anschließend wird das Gewicht des erhaltenen Blattes zur Bestimmung der Grammaturs gewogen und das Papier unter kontrolliert normklimatischen Bedingungen (23,5 °C, 50% RH) gelagert.

8.2 Herstellung von NC-Lösungen

NC-Lösungen, auch NC-Lacke oder auch *Lacquer* genannt, werden für die Herstellung von NCPHM verwendet. Diese bestehen aus einer Mischung von Polymeren (NC, Celluloseacetat), Lösemittel (Aceton), Nicht-Lösemitteln (EtOH, n-BuOH, IPA, H₂O) und Additiven (Glycerin, Triton™ X-100). Die Reihenfolge der Zugabe dieser Bestandteile ist entscheidend dafür, dass ein homogener *Lacquer* erhalten wird.

Um während der Herstellung des *Lacquers* ein Verdampfen des Lösemittels zu minimieren, wird dieser in einer Schraubglasflasche angerührt. Da beim Lösen der Polymeranteile die Viskosität der Lösung zunimmt, wird ein Magnetrührstab mit einem Kern aus seltenen Erden verwendet.

Die Herstellung der NC-Lösungen erfolgt bei Raumtemperatur. Zu Beginn wird das Lösemittel in der Schraubglasflasche vorgelegt und der gewünschte Anteil an NC und Celluloseacetat unter intensivem Rühren gelöst. Anschließend werden alle organischen Nicht-Lösemittel hinzugegeben. Nach Zugabe dieser, werden die Glycerin und Triton™ X-100 zugegeben und die Lösung für mindestens 30 min weiter gerührt. Abschließend wird die benötigte Menge Wasser als Nicht-Lösemittel zugegeben. Hierbei kann es zur vorübergehenden Fällung der Polymeren Bestandteile kommen, welche nach weiteren 30 min rühren wieder in Lösung gehen. Nach weiteren 60 min rühren sind die hergestellten Lösungen gebrauchsfertig.

Die Zusammensetzung der verwendeten NC-*Lacquer* sind in Tabelle 8-1 aufgelistet.

Tabelle 8-1: Zusammensetzung der verschiedenen verwendeten NC-Lacquer für die Herstellung verschiedener NCPHM.

	7% (w/w)	5,2% (w/w)	3,5% (w/w)
	Masse / g		
NC	25,91	20,73	13,82
Celluloseacetat	1,35	1,08	0,72
Aceton	142,80	155,29	158,28
Ethanol	99,79	108,51	110,66
Butanol	63,26	68,8	70,12
Triton X-100	0,60	0,65	0,67
Glycerin	2,33	2,53	2,58
Milli-Q® Wasser	39,00	42,41	43,23
Summe	375,04	400,00	400,02
Massenanteil NC	6,91	5,18	3,45

Beschichtungsmethoden zur Herstellung von NCPHM

Für die Herstellung von NCPHM können verschiedene Beschichtungsmethoden zum Einsatz kommen. Durch eine Tauchbeschichtung lassen sich vollflächig beschichtete NCPHM erhalten. Durch die Anwendung des Liniendrucks wird ortsdefiniert NC abgeschieden. Eine Übersicht der verschiedenen Beschichtungsmethoden und der verwendeten Parameter ist in

Tabelle 8-2 dargestellt.

Tabelle 8-2: Übersicht über verschiedene Beschichtungsmethoden und deren verwendeten Parameter für die Herstellung von NCPHM.

	Tauchbeschichtung	Liniendruck
Papier Grammat / g/m ²	50, 75, (100)	50, 75
NC Anteil Lacquer / w%	3,5 - 7,0	3,5 - 7,0
Temperatur / °C	15 - 45	25
rel. Luftfeuchtigkeit / % RH	25, 50, 75	50
Ziehgeschwindigkeit / mm/min	120 - 1000	-
Dosierung / µL/cm	-	2 - 20

8.2.1 Tauchbeschichtung

Die Tauchbeschichtung, ist eine Methode zur vollflächigen Beschichtung von Papieren und Substraten aller Art. Sie zeichnet sich durch definierte Immersions-, Verweil- und Herausziehschritte eines Substrats in/aus der Beschichtungslösung aus. Dabei dringt die NC-Lösung vollständig in die porösen Substrate (z.B. Cellulosepapiere) ein und führt zu einer Abscheidung der NC in den Poren des Papiers oder auf der Faseroberfläche. Bei der Trocknung der Materialien bildet sich die poröse Struktur durch Mikrophasenseparation der NC aus.^[29]

Zur Beschichtung werden Cellulosepapiere in Stücke von 5,0 cm x 10,0 cm geschnitten und für mindestens 2 h in einem Klimaschrank (Binder SN 14-06929) zum Equilibrieren bei definierter Luftfeuchtigkeit und Temperatur gehängt. Zur Tauchbeschichtung werden die Papierstücke an der kurzen Seite an einer horizontalen Traverse des *Dipcoaters* festgeklammert. Unterhalb der Traverse werden Gefäße mit der NC-Lösung gestellt und der Beschichtungsprozess gestartet. Die Substrate werden vollständig in die Lösungen getaucht und nach einer kurzen Immersionszeit von 5 s werden diese bei verschiedenen Zuggeschwindigkeiten aus den NC-Lösungen herausgezogen. Anschließend verweilen die frisch beschichteten Papiere für 2 h im Klimaschrank, bevor sie unter Normklima für die weiteren Verwendungen gelagert werden.

8.2.2 Liniendruckverfahren

Das Liniendruckverfahren ist eine Methode zur ortsdefinierten Deposition von NC-Lösung auf Papiersubstraten. Im Vergleich zur vollflächigen Applikation werden bei diesem Verfahren nur geringe Mengen der NC-Lösung aufgebracht.

Das Liniendruckverfahren wird mit einem *Hyrel System 30M* 3D-Drucker mit einer Druckkopfaufnahme für Spritzen durchgeführt. In den Spritzenhalter wird eine 500 μL Hamilton *GastightTM* Spritze gespannt, welche mit einer flexiblen und im 45° Winkel gebogenen PP Luer-Lock-Kanüle (G18, 0.80 mm, GONANO Dosiertechnik GmbH, Art.-Nr. IPS618100) versehen ist. Um breitere Bereiche mit NC-Lösung zu beschichten, kann alternativ ein 7 mm Dosierpinsel mit harten Nylonborsten (VIEWEG, Dosierpinsel harte Borsten, Art.-Nr. BTC18-STIFF-07) als Spritzenaufsatz verwendet werden.

Das Liniendruckverfahren wird unter Normklima (23 °C, 50% RH) durchgeführt. Die zuvor bei Normklima equilibrierten Papiere werden auf 5,0 cm x 10,0 cm geschnitten und auf einer Vakuum-Keramiksinterplatte fixiert. Die Kanüle wird so positioniert, dass diese nur leicht über die Papieroberfläche kratzt und austretende NC-Lösung direkt Kontakt zum Substrat hat. Die Linien werden bei einer Liniengeschwindigkeit von 600 mm/min und Dosiervolumina von 0,25 $\mu\text{L}/\text{cm}$ – 20 $\mu\text{L}/\text{cm}$ aufgebracht. Im Anschluss an den Liniendruck werden die erhaltenen Materialien für 2 h bei Normklima getrocknet.

Fotos vom Liniendruckverfahren mit Kanüle und Dosierpinsel sind in Abbildung 8-1 gezeigt.

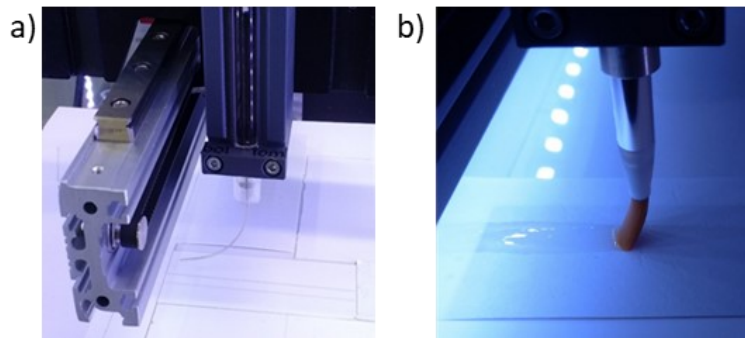


Abbildung 8-1: Liniendruckverfahren, durchgeführt mit a) einer Kanüle und b) mit einem Dosierpinsel.

8.3 Veresterung von Papiersubstraten mit Nitriersäuren

Für die Veresterung von Papiersubstraten werden zwei verschiedene Nitrierlösungen verwendet. Die Nitrierlösungen werden in einem Eisbad hergestellt, um eine Überhitzung dieser zu vermeiden. Die Zusammensetzungen der Nitrierlösungen ist in Tabelle 8-3 dargestellt.

Tabelle 8-3: Zusammensetzung der angesetzten Nitrierlösungen.

	$V_{\text{Schwefelsäure}} / \text{mL}$	$V_{\text{Salpetersäure}} / \text{mL}$	$V_{\text{Wasser}} / \text{mL}$	Wasseranteil /%(w/w)
Säuremischung 1	30	10	0	8
Säuremischung 2	30	10	8,8	18

Zur Herstellung wurde konzentrierte Schwefelsäure (98%) und konzentrierte Salpetersäure (65%) verwendet.

Zur Veresterung von Papiersubstraten werden diese bei Raumtemperatur für definierte Einwirkzeiten in Nitrierlösungen gelegt. Die Nitrierlösungen werden nicht agitiert. Nach der Einwirkzeit werden die nitrierten Substrate in ein Wasserbad gegeben. Das Wasser wird mehrmals durch Frischwasser ersetzt, bis der pH-Wert des Waschwassers neutral ist. Anschließend werden die Substrate bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

8.4 Bestimmung der Beschichtungsmasse flächig beschichteter NCPHM

Vor der Bestimmung der Beschichtungsmasse werden alle Proben entsprechend ISO 187^[92] klimatisch equilibriert. Aus den Proben und Ausgangspapieren werden mittels eines runden Stanzzeisens und Hammer Stanzlinge mit 1,5 cm Durchmesser entnommen. Die Fläche der Stanzlinge beträgt $7,07 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$. Die Masse der Stanzlinge wird durch wiegen ermittelt und die Beschichtungsmasse anhand Gleichung (8) berechnet.

Die gravimetrische Bestimmung der Beschichtungsgewichte von NC-Membranen wird ebenfalls über das Anfertigen von Stanzlingen durchgeführt. Hierfür wird zunächst die Masse der ausgestanzten Membranen ermittelt, und die NC-Schicht anschließend durch Einlegen in Aceton entfernt. Die dadurch erhaltenen Folien werden ebenfalls gemessen und als Referenzwert in Gleichung (8) eingesetzt.

$$\rho_A(\text{Beschichtung})[g/m^2] = \frac{m_{\text{Beschichtung}}}{A_{\text{Probe}}} = \frac{m_{(\text{Probe})} - m_{(\text{Referenz})}}{A_{\text{Probe}}} \quad (8)$$

8.5 Detergensbeschichtung von NCPHM und CN-Papieren

Zur Erhöhung der Benetzbarkeit von NCPHM und CN-Papieren werden diese nach der Herstellung mit Detergens beschichtet. In dieser Arbeit werden zwei verschiedene beschichtungsarten verwendet.

Für eine vollflächige Detergensbeschichtung werden die NCPHM und CN-Papieren für 10 Minuten bei Raumtemperatur in eine Detergenslösung eingelegt. Anschließend werden die Proben aus der Lösung herausgenommen und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Diese Methode ist für vollflächige und ortsdefinierte NCPHM, sowie CN-Papieren geeignet.

Darüber hinaus kann die Detergenslösung auch mittels Liniendruck appliziert werden. Diese Methode eignet sich nur für ortsdefinierte NCPHM. Die Applikation der Detergenslösung wird in Anlehnung an die Herstellung der Materialien wie in Abschnitt 8.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Detergenslösung wird mit $4 \mu\text{L}/\text{cm}$ aufgebracht. Die beschichteten Proben werden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Pufferbehandlung von CN-Papieren

In Anlehnung an die Detergensbehandlung werden die bereits mit Detergens behandelten CN-Papiere für 10 min in eine 1-fach konzentrierte PBS-Pufferlösung mit pH 7,4 bei Raumtemperatur eingelegt. Anschließend werden die Proben aus der Pufferlösung genommen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Bei Verwendung von nicht mit Detergens behandelten CN-Papieren kann die Pufferbehandlung mit der Detergensbehandlung kombiniert werden. Hierfür wird eine 0,0625%-ige (w/w) SDBS Lösung in 1-fach PBS Puffer hergestellt. Die Einlegezeiten und Trocknungsparameter sind identisch wie zuvor beschrieben.

Bestimmung des Oberflächen pH-Wertes von CN-Papieren

Die Oberflächen-pH-Werte wurden mit einer speziellen Oberflächen-pH-Elektrode (VWR® 662-1805) bestimmt. Die Elektrode wurde zuvor bei pH 4.0, 7.0 und pH 10.0 mit Stammlösungen kalibriert. Zur Bestimmung der Oberflächen-pH-Werte wurden die Proben auf $1,5 \times 3,0 \text{ cm}$ geschnitten und mit $150 - 200 \mu\text{L}$ Milli-Q® Wasser befeuchtet. Die pH-Elektrode wird per Hand

mit der Messfläche aufgedrückt und gewartet, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Mindestens drei Messwerte werden pro Probe genommen und die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messungen berechnet.

8.6 Mikrofluidische Charakterisierung der kapillaren Fließzeit

Vor der Bestimmung der CFT, werden die Proben in Streifen von 4,0 cm x 1,5 cm geschnitten und für mindesten 24 h bei Normklima gelagert. Die Messung erfolgt ebenfalls bei normklimatischen Bedingungen. In einem Ständer für die Messungen, wird das Flüssigkeitsreservoir mit 150 μL Milli-Q[®] Wasser gefüllt und die Proben in das Reservoir gestellt. Sobald die Probe das Wasser berührt, wird eine Zeitmessung mittels Stoppuhr gestartet. Die Messung wird beendet, sobald die Fließfront das Ende der Probe erreicht. Die gemessene kapillare Fließzeit trägt die Einheit s/4 cm. Neben der reinen Fließzeitmessung wird die Homogenität der Fließfront betrachtet und vermerkt. Ein Foto einer laufenden CFT Messung ist in Abbildung 8-2 dargestellt.



Abbildung 8-2: Fotoaufnahme einer laufenden CFT-Messung.

8.7 Qualitative Experimente zur Untersuchung der Interaktion von Proteinen mit NCPHM

Zur Untersuchung der Proteinbindung an ortsdefinierten NCPHM werden Proben verwendet, welche mit dem Liniendruckverfahren in Absatz 8.2.2 hergestellt worden sind. Die verwendeten NCPHM wurden aus Baumwoll-Linters-Papier mit 50 g/m² und einer Dosierung von 4 $\mu\text{L}/\text{cm}$ NC-Lacquer mit einem NC-Anteil von 5,2% bei 25 °C und 50% RH hergestellt. Nach einer anschließenden Beschichtung mit Detergens (vgl. Abschnitt 8.5) werden die Proben in 0,5 cm x 8,0 cm geschnitten.

Um die Abreicherung von Proteinen aus einer Lösung zu untersuchen, wird FITC-markiertes BSA mit 1-fach konzentriertem PBS-Puffer (pH 7,4) verdünnt, um eine Konzentration von 2,5 ng/ μL zu erreichen. Als Referenz wird eine FITC-Dextranlösung in identischer Konzentration in 1-fach konzentriertem PBS-Puffer hergestellt.

Der Versuchsaufbau ist schematisch in Anlehnung an Ritter von Stockert et al.^[183] in Abbildung 8-3 dargestellt. Das NCPHM wird mit einem Überhang von 3 mm – 5 mm auf einen PMMA-Kunststoffobjektträger für die Mikroskopie gelegt, welcher auf einer Laborhebebühne liegt und

bündig mit der Kante abschließt. Unter das gegenüberliegende Ende des Hybridmaterials wird eine Kapton®-Heizfolie gelegt. Der vertikale Fluidfluss wird durch ein Hochdrehen einer weiteren Laborhebebühne gestartet, indem das Ende des Hybridmaterials das maximalst gefüllte Flüssigkeitsreservoir berührt. Sobald die Fließfront eine Distanz von 1,5 cm zurückgelegt hat, werden 5 µL (entspricht 12,5 ng) der BSA- oder Dextranlösung an der Fließfront appliziert („with the front“)^[183]. Der Flüssigkeitsfluss wird durch konstantes Erwärmen des Streifenendes bei ~40 °C für 15 min aufrechterhalten, bevor die Probe bei Raumtemperatur für mindestens 16 h getrocknet wird. Die Charakterisierung der Proteinbindung an der abgeschiedenen NC erfolgt mittels Konfokalmikroskopie.

Die Untersuchung der Proteinretention auf vollflächigen NCPHM wird identisch zur oben beschriebenen Durchführung für ortsdefinierte NCPHM durchgeführt. Als Hybridmaterial wurde ein mittels Tauchbeschichtung hergestelltes, vollflächig beschichtetes NCPHM verwendet. Die Herstellung wurde mit einem NC-Anteil von 5,2% durchgeführt. Baumwoll-Linters-Papiere mit 50 g/m² wurden mit einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min bei 25 °C und 50% RH beschichtet.

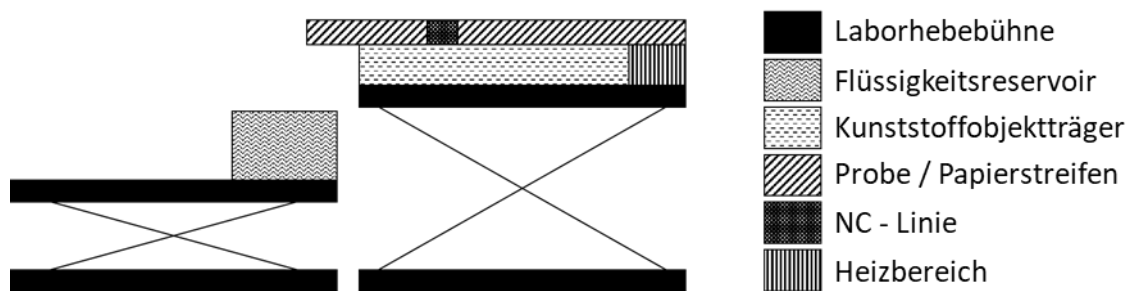


Abbildung 8-3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Proteinbindung an ortsdefinierten NCPHM.

8.8 Herstellung von diagnostischen Assays auf verschiedenen Membranmaterialien

Verschiedene Materialien werden auf ihre Eignung als alternative Membranmaterialien für diagnostische Schnelltests hin untersucht. Als Standard-Assay wird der anti-hCG (humanes Choriongonadotropin) Assay, umgangssprachlich als „Schwangerschaftstest“ bezeichnet, verwendet. Als zusätzlicher Assay kann der anti-HBsAg (Oberflächenprotein in der Virushülle des Hepatitis-B-Virus) Assay verwendet werden. Die Auswahlkriterien für die diagnostischen Schnelltests sind in Abschnitt 3.3 skizziert. Als alternative Membranmaterialien werden vollflächige und ortsdefinierte NCPHM und CN-Papiere verwendet. Als Referenzmembranen werden konventionelle NC-Membranen (HiFlow, Merck Millipore) und nach Abschnitt 8.2 hergestellte Baumwoll-Linters-Papiere (50 g/m², 75 g/m², 100 g/m²) verwendet.

Herstellung der einzelnen Assay-Bestandteile

Für die Testlinien werden Lösungen mit 1 mg/mL anti-hCG oder anti-HBsAg spezifische *capture* Antikörper in 10 mM MES (pH 6,5) gelöst. Als Lösung für die Kontrolllinien werden 1 mg/mL *goat anti-mouse capture antiserum* (Merck Millipore) verwendet. Zur Applikation dieser Lösungen auf die verschiedenen Membranmaterialien werden diese in 5,0 cm x 3,0 cm große Stücke geschnitten und die Lösungen mittels eines modifizierten 3D-Drucker (HYREL 3D System 30M) aufgebracht. Die Testlinie wird dabei 1 cm und die Kontrolllinie bei 1,5 cm vom unteren Ende der breiten Seite aufgebracht (vgl. Abbildung 8-4). Zur Applikation der Antikörperlösungen werden 100 μ L Hamilton *Gastight*TM Spritzen mit zementierter Nadel verwendet. Die Druckgeschwindigkeit der Lösungen beträgt 1 cm/s bei einer Dosierung von 0,1 μ L/mm um eine Masse von 0,5 μ g *capture* Protein auf den Linien zu erhalten. Nach dem Drucken werden die Membranmaterialien für 2 h bei 37 °C getrocknet.

Für die hCG-Assays werden Glasfaser *Conjugate-Pads* (Merck Millipore) auf 30 cm x 3,5 cm zugeschnitten und vollständig in 8,4 mL Konjugatlösung getränkt. Die Konjugatlösung wird aus 4,2 mL 10% (w/v) Trehalose (Sigma Aldrich), 1,68 mL anti-hCG beta mAb Goldkonjugat (40 nm, OD 10, Fitzgerald) und 2,52 mL Milli-Q® Wasser hergestellt. Das getränkte Glasfaserpad wird über Nacht bei 23°C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit getrocknet. Nach der Trocknung werden die Glasfaserpads auf die passenden Maße von 0,5 cm x 5 cm zurechtgeschnitten.

Die zurechtgeschnittenen Konjugatpads (30 cm x 3,5 cm) für die anti-HBsAg-Assays werden vollständig in 7,5 mL Konjugatlösung getränkt. Diese wird aus 3,6 mL 10% (w/v) Trehalose (Sigma Aldrich), 1,44 mL anti-HBsAg mAb Goldkonjugat (BBI) und 2,16 mL Milli-Q® Wasser hergestellt. Die getränkten Konjugatpads werden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend auf 5,0 cm x 0,5 cm zurechtgeschnitten.

Die Herstellung der *Sample Pads* für beide Assay-Arten ist identisch. Hierfür werden die Sample Pads (Merck Millipore) auf 3,0 cm x 2,5 cm geschnitten und mit einer Lösung aus 10 mM Tris-HCl pH 8,2 (Sigma Aldrich), 1% (w/v) Tween® 20 (Carl Roth) und 0,75% (w/v) BSA (Sigma Aldrich) behandelt.

Alle zuvor beschriebenen Materialien werden bis zur Verwendung im diagnostischen Schnelltest zusammen mit einem Silica-Trockenbeutel in einem evakuierten und verschweißten Aluminiumbeutel gelagert.

Aufbau/Zusammenbau der Schnelltests

Aus den zuvor beschriebenen Einzelteilen (Abbildung 8-4 a), werden diagnostische Schnelltests durch Aufkleben auf eine „*Backingcard*“ aus Kunststoff zusammengesetzt. Die Maße der einzelnen Bestandteile können Abbildung 8-4 a) entnommen werden.

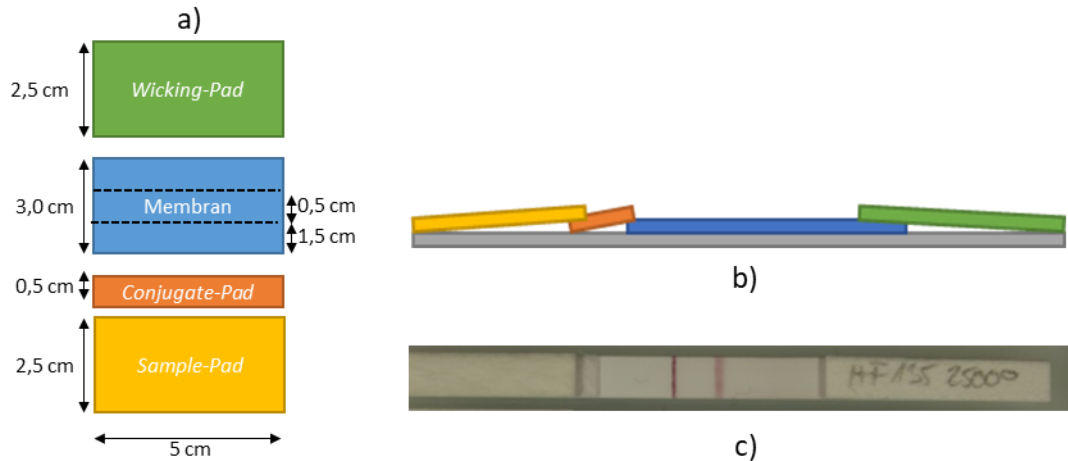


Abbildung 8-4: Klassischer Aufbau von diagnostischen Assays. a) Maße und einzelne Bestandteile der Schnelltests, b) schematische Seitenansicht eines Assays mit überlappenden Bestandteilen, aufgeklebt auf einer "Backingcard" (Grau), c) Draufsicht auf einen zusammengebauten und bereits durchgeführten hCG-Schnelltest.

Die *Backingcard* (Abbildung 8-4 b, Grau) dient beim Schnelltest als Trägermaterial und ist mit einem Klebstoff beschichtet. Auf diesen werden die einzelnen Bestandteile nacheinander aufgeklebt. Zuerst wird zentral das Membranmaterial (5,0 cm x 2,5 cm, Blau) aufgebracht, hierbei ist auf die Reihenfolge der Test- und Kontrolllinie zu achten. Die Testlinie muss in Richtung des *Samplepads* zeigen, die Kontrolllinie in Richtung des *Wicking-Pads*. Im zweiten Schritt, wird das *Conjugate-Pad* (5,0 cm x 0,5 cm, Orange) mit einem leichten Überlapp auf das untere Ende des Membranmaterials geklebt. Das *Samplepad* (5,0 cm x 2,5 cm, gelb) bildet das Ende, auf dem die Probe aufgetragen wird, dieses wird mit einem leichten Überlapp auf das *Conjugate-Pad* geklebt. Das gegenüberliegende Ende des Schnelltests wird durch das *Wicking-Pad* (5 cm x 2,5 cm, Grün) komplettiert. Dieses dient dazu, überschüssige Testflüssigkeit aufzunehmen und zu binden. Ein vollständiger und bereits durchgeführter Schnelltest ist in Abbildung 8-4 c) dargestellt.

Durchführung der Schnelltests

Zur Durchführung der Schnelltests werden negative Testlösungen und positive Testlösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Substrat benötigt.

Im anti-hCG-Assay wird als Testflüssigkeit synthetischer Urin (Sigma Aldrich, Dynatek) genutzt. Dieser wird als Negativkontrolle verwendet, oder mit hCG (Fitzgerald) versetzt um eine Verdünnungsreihe an Positivkonzentrationen zu erhalten. Die hergestellten Verdünnungen sind 25, 250, 2.500 und 25.000 mIU/mL. Für die Durchführung der Schnelltests werden 150 μ L der Negativkontrolle oder der Positivkonzentrationen auf das untere Ende des *Samplepads* gegeben und den Assay laufen gelassen. Die Ergebnisse werden nach frühestens nach 10 min, spätestens nach 20 min abgelesen. Um das Ableseergebnis konstant zu halten, werden die Tests nach 15 min ausgewertet.

Für anti-HBsAg-Assays wird als Negativkontrolle eine 1:1 (v/v) Mischung aus Humanserum (Sigma Aldrich) und 1x-PBS-Puffer verwendet. Die Positivkonzentrationen werden durch Zugabe von HBsAg-*adr* Analyt (Prospec) hergestellt. Die Konzentrationen betragen 8, 20, 60, 240 und 2.000 ng/mL. Für die Durchführung der Schnelltests werden 150 μ L der Negativkontrolle oder der Positivkonzentrationen auf das untere Ende des *Samplepads* gegeben und den *Assay* laufen gelassen. Die Ergebnisse werden nach 30 min abgelesen und ausgewertet.

8.9 Probenpräparation für die Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchung der Oberfläche von hergestellten NCPHM und CN-Papieren werden Ausschnitte der Proben mittels doppelseitigen leitfähigen Kohlenstoffklebepads (Plano GmbH, Wetzlar) auf Stiftprobenteller aus Aluminium geklebt.

Proben ohne zusätzliche Leitfähigkeitsbeschichtung werden im VP/EP-Modus des Zeiss EVO 10 Rasterelektronenmikroskops betrachtet. Zur Leitfähigkeitsbeschichtung werden 10 nm Pt/Pd (80/20, ESG Edelmetallservice Rheinstetten; Charge IN0145660) mit einem *Sputtercoater* (Creasington 208HR, TESCAN GmbH, Dortmund) aufgebracht.

Zur Untersuchung von Proben im Querschnitt, werden diese mit Hilfe einer Mikrotom-Klinge geschnitten. Dafür wird ein Stapel Papierhandtücher auf einen festen Untergrund gelegt und die Probe darauf platziert. Die Mikrotom-Klinge wird auf die Probe aufgesetzt und diese durch einen kräftigen Schlag auf die Rückseite der Klinge geschnitten. Die erhaltenen Querschnittsproben werden mit der Schnittfläche nach Oben mit leitfähigen Kohlenstoffklebepads auf einen kleinen Aluminiumblock geklebt, welcher ebenfalls auf einen Stiftprobenteller geklebt wird. Die Proben werden entweder mit oder ohne Leitfähigkeitsbeschichtung im Elektronenmikroskop betrachtet.

8.10 Fluoreszenzfärbung für Konfokalmikroskopie und Fluoreszenzimager

Damit eine Betrachtung von Proben mittels Fluoreszenzimager und Konfokalmikroskopie ermöglicht werden kann, müssen diese zunächst mit verschiedenen Fluorophoren angefärbt werden.

Fluoreszenzfärbung von Cellulose mit Calcofluor White M2R

Zur Färbung von Cellulosepapieren mit Calcofluor White M2R (CFW) wird eine 100 μ M Fluorophorlösung hergestellt (vgl. Abschnitt 8.1). Die Färbung muss vor der Beschichtung mit NC-Lösungen erfolgen, da ein nachträgliches Färben der beschichteten Bereiche nicht möglich ist. Die Lösung wird in eine 3D-gedruckte Schale gefüllt und die Papiere auf einem 3D-gedrucktem Gitter in die Lösung gelegt. Die Papiere verweilen für 10 min in der Lösung und werden über Nacht zum Trocknen bei Raumtemperatur auf eine Kunststoffplatte gelegt.

Das Fluoreszenzspektrum von CFW ist im Anhang (Seite 184) dargestellt.

Fluoreszenzfärbung von NC-Lacquer mit Rhodamin B

Zur Fluoreszenzfärbung von NC-Lacquer wird dieser mit Rhodamin B versetzt. Hierfür wird eine kleine Menge des zu verwendenden Lacquers aus der Stammlösung in ein Schnappdeckelglas gefüllt und eine Spatelspitze Rhodamin B hinzugefügt. Die Lösung wird so lange gerührt, bis der Fluorophor vollständig in Lösung gegangen ist.

Für die Herstellung von gefärbten NCPHM wird jeweils vor der Herstellung eine geringe Menge der Fluorophorlösung zu Lacquer zugegeben, bis eine blass rosa Färbung dessen zu beobachten ist. Auf eine definierte Einwaage der Fluorophore wurde verzichtet, da das Ziel der Anfärbung lediglich die Lokalisation der NC auf den NCPHM ist und nicht die Quantifizierung derer.

Das Fluoreszenzspektrum von Rhodamin B ist im Anhang (Seite 185) dargestellt.

8.11 Probenpräparation für die Untersuchung von Querschnittsproben mittels Konfokalmikroskopie

Bevor die Proben eingebettet werden, müssen alle Färbeschritte abgeschlossen sein. Ein nachträgliches Einfärben nach dem Einbetten ist nicht möglich. Die Einbettlösung wird in einem Speedmixerbecher hergestellt, dessen Deckel zuvor mit zwei Löchern versehen wird, um eine Be- und Entlüftung dessen zu gewährleisten.

In einem Speedmixer Becher werden 10 g Albodour 956 (Alberdingk Boley) vorgelegt und 5 mg TIB Kat 318 (TIB Chemicals) hinzugegeben. Anschließend werden 10 g Desmodur N3200 (Covestro) zugegeben und der Becher verschlossen. Die Mischung wird für 3 min bei 1300 rpm bei 30 mbar im Speedmixer (DAC 400.2 VAC-P, Hauschild, Hamm, Deutschland) gemischt.

Nach dem Mischen wird eine dünne Schicht des Einbettmediums in eine kleine Kunststoffpetrischale gegossen und anschließend die Probe aufgelegt. Eine weitere dünne Schicht Einbettmedium wird über die Probe gegossen und die Petrischale in einem Vakuumofen für 5 Minuten entgast. Die Aushärtung des Einbettmediums erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend kann die eingebettete Probe für 3 h bei 70 °C nachgehärtet werden. Die ausgehärteten Proben werden mit Hilfe eines scharfen Messers grob zurechtgeschnitten. Für die Mikroskopie werden die Zuschnitte zwischen zwei Mikroskopiedeckgläser in Typ F Immersionsmedium (Leica) gelegt.

Der Feinschnitt der Probe erfolgt mit Hilfe eines manuellen Schlittenmikrotoms. Die Dicke der angefertigten Schnitte beträgt $\sim 30 \mu\text{m}$.

8.12 Geräte und Software

Kontaktwinkelmessungen

Die Messung der statischen Kontaktwinkel wurden mit der *sessile-drop-Methode* auf einem DataPhysics OCA35 Kontaktwinkelmessgerät mit der Messsoftware SCA 4.5.2 Build 1052 durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei einem Normklima von 23 °C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit. Als Messmedium wurden 4 μL Tropfen von destilliertem Wasser verwendet. Die Kontaktwinkelmessung wurde unmittelbar nach Aufbringen der Tropfen durchgeführt. Pro Substrat wurden mindestens an drei Positionen der Kontaktwinkel bestimmt.

Infrarotspektroskopie

Zur Messung von IR-Spektren wurde ein IR-Spektrometer mit einem MIR TGS Detektor von Perkin Elmer verwendet. Die Spektren wurden bei einem Anpressdruck von 20 in einem Wellenzahlenbereich von $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} . Pro Spektrum wurden 10 Scans akkumuliert.

Thermogravimetrische Analyse – TGA

Für TGA Messungen wurde eine TGA von Mettler Toledo eingesetzt (TGA1, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland). Die Messungen wurden an Umgebungsluft durchgeführt. Die Aufheizrate betrug 10 K/min bis zu einer Temperatur von 50 °C , diese wurde für 10 min gehalten. Anschließend erfolgte die Messung bei einer Heizrate von 5 K/min bis zu einer Temperatur von 600 °C . Als Messsoftware wurde Star SW 16.00 verwendet.

CLSM

CLSM-Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP8 der Firma Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland gemacht. Für die Bildgebung wurde ein 20x-Luftobjektiv oder ein 63x-Ölobjektiv verwendet. Die Anregung der Fluorophore wurde bei 405 nm (Calcofluor White), 488 nm (FITC) und 552 nm (Rhodamin) durchgeführt. Als Aufnahmesoftware wurde die Leica Application Suite X (LASX) verwendet.

Rasterelektronenmikroskopie

REM-Aufnahmen wurden an einem ZEISS EVO 10 (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Deutschland) Rasterelektronenmikroskop gemacht. Als Elektronenquelle wurde ein Wolfram-Filament verwendet. Die Beschleunigungsspannung wurde in Abhängigkeit der Abbildungsmethode zwischen $5 \text{ kV} - 20 \text{ kV}$ gewählt. Nicht leitfähige Proben wurden entweder mit 10 nm Pt/Pd (80/20, ESG Edelmetallservice Rheinstetten; Charge IN0145660) mit einem *Sputtercoater* (Cressington 208HR, TESCAN GmbH, Dortmund) beschichtet, oder im Variablen Druckmodus (VP-Modus, Stickstoff) zur Ladungsneutralisierung gearbeitet. Alle Aufnahmen wurden bei einem Arbeitsabstand von $8,5 \text{ mm}$ angefertigt. Die Vergrößerungen verstehen sich im Verhältnis zum Polaroid 4×5 “-Format. Die Bildaufnahme wurde mittels SmartSEM V6.06 SP8 oder SmartSEM Touch V2.01 SP4 durchgeführt.

8.12.1 Zugfestigkeitsmessungen von verschiedenen Substraten

Die Messung der Zugfestigkeit der verschiedenen Materialien wurde auf einer Prüfmaschine Zwick Z1.0 (ZwickRoell GmbH & Co. Kg, Ulm, Deutschland) mit einer 1 kN Kraftprüfdose bei Normklima durchgeführt. Hierfür wird nach DIN ISO 1924–2^[155] gearbeitet. Die Messungen wurden mit der Software testXpert II V3.71 (ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) durchgeführt. Pro Probe werden mindestens 5 Prüfungen durchgeführt, dafür werden die Materialien in $1,5 \text{ cm} \times >15 \text{ cm}$ geschnitten und im Vorfeld der Prüfung bei Normklima gelagert. Die Materialien werden mittels Pressbacken in die Prüfmaschine gespannt und bei konstanter Geschwindigkeit bis zum Riss des Materials auseinandergezogen. Dabei wird die auf die Probe

einwirkende Kraft gemessen. Für die Bestimmung der Zugfestigkeiten der nassen Proben, werden diese zuvor für 5 min in destilliertes Wasser gelegt und kurz vor der Messung das überschüssige Wasser mit einem Papiertuch entfernt.

Anhand der ermittelten Zugfestigkeiten lässt sich mittels Gleichung (9) die relative Nassfestigkeit der Proben errechnen. Ab einer relativen Nassfestigkeit von >15%, wird von Nassfesten Papieren/Materialien gesprochen.

$$\text{rel. Nassfestigkeit \%} = \frac{\text{Zugfestigkeit nass} \left[\frac{\text{Nm}}{\text{g}} \right]}{\text{Zugfestigkeit trocken} \left[\frac{\text{Nm}}{\text{g}} \right]} \times 100 \quad (9)$$

Dabei ist die Zugfestigkeit wie folgt definiert.

$$\text{Zugfestigkeit} \left[\frac{\text{Nm}}{\text{g}} \right] = \frac{F_{\max} [\text{N}]}{b [\text{m}] \cdot \text{Grammatur} \left[\frac{\text{g}}{\text{m}^2} \right]} \times 100 \quad (10)$$

Mit F_{\max} als maximale Kraft bis zum Brechen/Reißen der Probe, b als breite der Probe in m und der Grammatur der Probe gegeben in g/m².

Literaturverzeichnis

- [1] B. Ngom, Y. Guo, X. Wang, D. Bi, *Anal Bioanal Chem* **2010**, 397, 1113-1135.
- [2] H. R. Boehringer, B. J. O'Farrell, *Clinical chemistry* **2021**, 68, 52-58.
- [3] H. Sohrabi, M. R. Majidi, P. Khaki, A. Jahanban-Esfahlan, M. de La Guardia, A. Mokhtarzadeh, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2022**, 21, 1868-1912.
- [4] P. Sadeghi, H. Sohrabi, M. Hejazi, A. Jahanban-Esfahlan, B. Baradaran, M. Tohidast, M. R. Majidi, A. Mokhtarzadeh, S. M. Tavangar, M. de La Guardia, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2021**, 145, 116460.
- [5] G. Xing, X. Sun, N. Li, X. Li, T. Wu, F. Wang, *Molecules* **2022**, 27, 6596.
- [6] G. Kim, J. Lim, C. Mo, *Journal of Biosystems Engineering* **2015**, 40, 277.
- [7] F. Di Nardo, M. Chiarello, S. Cavallera, C. Baggiani, L. Anfossi, *Sensors* **2021**, 21, 5185.
- [8] T. Lacara, C. Domagtoy, D. Lickliter, K. Quattrocchi, L. Snipes, J. Kuszaj, M. Prasnikar, *Am J Crit Care* **2007**, 16, 336.
- [9] P. B. Luppa, C. Müller, A. Schlichtiger, H. Schlebusch, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, 30, 887.
- [10] N. Kuschinski, J. A. Christe, A. Monroy, *Bayesian statistical models to explore the use glucometer measurements of capillary blood sugar for OGTT Tests* **2023**.
- [11] A. M. Gómez, G. E. Umpierrez, O. M. Muñoz, F. Herrera, C. Rubio, P. Aschner, R. Buendia, *Journal of diabetes science and technology* **2015**, 10, 325.
- [12] R. Boyd, B. Leigh, P. Stuart, *Emergency Medicine Journal* **2005**, 22, 177.
- [13] M. E. Loveland, S. D. Carley, N. Cranfield, V. F. Hillier, K. Mackway-Jones, *Lancet (London, England)* **1999**, 354, 921.
- [14] L. M. Hillscher, V. J. Liebich, O. Avrutina, M. Biesalski, H. Kolmar, *Chemtexts* **2021**, 7, 14.
- [15] W. L. J. M. Devillé, J. C. Yzermans, N. P. van Duijn, P. D. Bezemer, D. A. W. M. van der Windt, L. M. Bouter, *BMC Urol* **2004**, 4, 4.
- [16] S. Chaturvedi, N. Jain, A. Bhatia, *Indian journal of pathology & microbiology* **2001**, 44, 399.
- [17] E. Kohler, *Diabetes care* **1978**, 1, 64.
- [18] A. B. Halim, *Biomarkers, diagnostics and precision medicine in the drug industry: Critical challenges, limitations, and roadmaps for the best practices*, Academic Press, London, United Kingdom **2019**.
- [19] B. O'Farrel, in *Lateral Flow Immunoassay* (Eds.: R. Wong, H. Tse), Humana Press. Totowa, NJ **2009**, 1-34.
- [20] R. Wong, H. Tse (Eds.), *Lateral Flow Immunoassay*, Humana Press, Totowa, NJ **2009**.
- [21] A. M. Ravagnan, E. Grossi, *The oldest pregnancy test of human history invented by ancient egyptians has a precise scientific basis*, Lissabon.
- [22] Y.-I. Kwon, *Korean J Clin Lab Sci* **2018**, 50, 382.
- [23] H. BRODY, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **1949**, 57, 581.
- [24] D. F. Miller, W. A. Little, *Some peculiarities of the male frog test for early pregnancy* **1948**.
- [25] M. L. Giltz, D. F. Miller, *The Ohio Journal of Science* **1950**, 5, 205-209.
- [26] L. van Sittert, G. J. Measey, *Transactions of the Royal Society of South Africa* **2016**, 71, 157-166.
- [27] N. R. Garden, Miller, H. Durant, J. A., *British Medical Journal* **1963**.
- [28] J. M. Singer, C. M. Plotz, *The American Journal of Medicine* **1956**, 21, 888.
- [29] M. A. Mansfield, in *Lateral Flow Immunoassay* (Eds.: R. Wong, H. Tse), Humana Press. Totowa, NJ **2009**, 95-114.
- [30] R. Zsigmondy, W. Bachmann, E. de Haën, *Z. Anal. Chem.* **1919**, 58, 116.

- [31] W. Lee, S. Straube, R. Sincic, J. A. Noble, J. C. Montoy, A. E. Kornblith, A. Prakash, R. Wang, R. Bainton, P. Kurien, *medRxiv the preprint server for health sciences* **2020**.
- [32] S. Rink, A. J. Baeumner, *Analytical Chemistry* **2023**, *95*, 1758-1793.
- [33] C. S. Kosack, A.-L. Page, P. R. Klatser, *Bulletin of the World Health Organization* **2017**, *95*, 639.
- [34] A. Elter, T. Bock, D. Spiehl, G. Russo, S. C. Hinz, S. Bitsch, E. Baum, M. Langhans, T. Meckel, E. Dörsam, H. Kolmar, G. Schwall, *Sci Rep* **2021**, *11*, 7880.
- [35] T. Teerinen, T. Lappalainen, T. Erho, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2014**, *406*, 5955.
- [36] Lia Diagnostics, www.meetlia.com abgerufen 05.03.2019.
- [37] Stijn Janssen, <https://www.trendwatching.com/innovation-of-the-day/hoopsy-introduces-paper-pregnancy-tests-to-reduce-single-use-plastics> - abgerufen 02.04.2023.
- [38] Hoopsy Ltd, www.hoopsy.com - abgerufen am 01.07.2023.
- [39] Connecting East, *The zero waste lifestyle* **2019**, <https://medium.com/@connectingeast/the-zero-waste-lifestyle-fe7aaff04a92#:~:text=But%20as%20zero%20waste%20chef,of%20people%20doing%20it%20imperfectly%E2%80%9D>. - abgerufen 01.07.2023.
- [40] D. Gasperino, T. Baughman, H. V. Hsieh, D. Bell, B. H. Weigl, *Annual review of analytical chemistry* **2018**, *11*, 219.
- [41] H. V. Hsieh, J. L. Dantzler, B. H. Weigl, *Diagnostics* **2017**, *7*, 29.
- [42] E. B. Bahadır, M. K. Sezgintürk, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *82*, 286.
- [43] T. Mahmoudi, M. de La Guardia, B. Baradaran, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2020**, *125*, 115842.
- [44] T. Tominaga, M. Ishii, *Methods in Microbiology* **2020**, *47*, 351.
- [45] L. Anfossi, C. Baggiani, C. Giovannoli, G. D'Arco, G. Giraudi, *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405*, 467.
- [46] J. Liang, H. Liu, C. Lan, Q. Fu, C. Huang, Z. Luo, T. Jiang, Y. Tang, *Nanotechnology* **2014**, *25*, 495501.
- [47] C.-H. Chao, C.-S. Wu, C.-C. Huang, J.-C. Liang, H.-T. Wang, P.-T. Tang, L.-Y. Lin, F.-H. Ko, *Microelectronic Engineering* **2012**, *97*, 294.
- [48] A. Haleem, I. Haleem, R. Abass, *DJPS* **2021**, *17*, 1.
- [49] A. van Amerongen, *Rapid methods: For biological and chemical contaminants in food and feed*, Academic Publishers, Wageningen **2005**.
- [50] M. D. F. Ltd, *Pregnancy Testing Market Size, Growth Analysis Report | 2023 to 2028* **2014**, <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/pregnancy-testing-market> - abgerufen 18.07.2023.
- [51] K. Meng, W. Sun, P. Zhao, L. Zhang, D. Cai, Z. Cheng, H. Guo, J. Liu, D. Yang, S. Wang, T. Chai, *Biosensors & bioelectronics* **2014**, *55*, 396.
- [52] S. Rong-Hwa, T. Shiao-Shek, C. Der-Jiang, H. Yao-Wen, *Food Chemistry* **2010**, *118*, 462.
- [53] J. H. Soh, H.-M. Chan, J. Y. Ying, *Nano Today* **2020**, *30*, 100831.
- [54] Y. Zhang, J. Bai, J. Y. Ying, *Lab on a chip* **2015**, *15*, 1465.
- [55] Q. Fu, J. Liang, C. Lan, K. Zhou, C. Shi, Y. Tang, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *203*, 683.
- [56] J. Singh, S. Sharma, S. Nara, *Food Chemistry* **2015**, *170*, 470.
- [57] D.-J. Chiao, R.-H. Shyu, C.-S. Hu, H.-Y. Chiang, S.-S. Tang, *Journal of Chromatography B* **2004**, *809*, 37.

- [58] P. Chun, in *Lateral Flow Immunoassay* (Eds.: R. Wong, H. Tse), Humana Press. Totowa, NJ **2009**, 75-94.
- [59] X. Mao, W. Wang, T. E. Du, *Talanta* **2013**, *114*, 248.
- [60] L. A. Cole, *Asian Pacific Journal of Reproduction* **2012**, *1*, 287.
- [61] L. A. Cole, *Clinical chemistry* **1997**, *43*, 2233.
- [62] Michael C. Brown, in *Lateral Flow Immunoassay* (Eds.: R. Wong, H. Tse), Humana Press. Totowa, NJ **2009**, 59-74.
- [63] W. W.-W. Hsiao, T.-N. Le, D. M. Pham, H.-H. Ko, H.-C. Chang, C.-C. Lee, N. Sharma, C.-K. Lee, W.-H. Chiang, *Biosensors* **2021**, *11*.
- [64] K. D. Jones, *Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes, Part 1: Principles* **1999**.
- [65] K. D. Jones, *Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes. Part 2: common problems* **1999**.
- [66] J. Hu, S. Wang, L. Wang, F. Li, B. Pingguan-Murphy, T. J. Lu, F. Xu, *Biosensors & bioelectronics* **2014**, *54*, 585.
- [67] B. O'Farrel, J. Bauer, *Developing highly sensitive, more-reproducible lateral-flow assays. Part 1: New approaches to old problems* **2006**.
- [68] Millipore Corporation, *Rapid Lateral Flow Test Strips: Considerations for Product Development*, Lit. No. TB500EN00, Bedford, MA **2002**.
- [69] H. H. Beer, E. Jallerat, K. Pflanz, T. M. Klewitz, *IVD Technology* **2002**, *8 (1)*, 35-42.
- [70] M. A. Mansfield, in *Drugs of Abuse*, Humana Press **2005**, p. 71.
- [71] W. L. Then, G. Garnier, *Reviews in Analytical Chemistry* **2013**, *32*.
- [72] E. Fu, T. Liang, J. Houghtaling, S. Ramachandran, S. A. Ramsey, B. Lutz, P. Yager, *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 7941.
- [73] Y. Zhang, X. Liu, L. Wang, H. Yang, X. Zhang, C. Zhu, W. Wang, L. Yan, B. Li, *Sci Rep* **2020**, *10*, 9604.
- [74] A. N. Danthararayanan, E. Finley, B. Vu, K. Kourentzi, R. C. Willson, J. Brgoch, *Analytical methods advancing methods and applications* **2020**, *12*, 272.
- [75] X. Wang, C.-H. Xue, D. Yang, S.-T. Jia, Y.-R. Ding, L. Lei, K.-Y. Gao, T.-T. Jia, *RSC Advances* **2021**, *11*, 26493.
- [76] M. J. Jacinto, J. R. C. Trabuco, B. V. Vu, G. Garvey, M. Khodadady, A. M. Azevedo, M. R. Aires-Barros, L. Chang, K. Kourentzi, D. Litvinov, R. C. Willson, *PLOS ONE* **2018**, *13*.
- [77] S. Wendenburg, M.-L. Nachbar, M. Biesalski, *Macromol. Chem. Phys.* **2017**, *218*, 1600408.
- [78] B. Doyle, *Biochemical Education* **1992**, *20*, 123.
- [79] H. Staudinger, *Ber. dtsh. Chem. Ges. A/B* **1920**, *53*, 1073.
- [80] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, A. Bohn, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2005**, *44*, 3358.
- [81] R. Mülhaupt, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2004**, *43*, 1054.
- [82] J. W. S. Hearle, *J. Polym. Sci.* **1958**, *28*, 432.
- [83] J. Schurz, *Lenzinger Berichte* **1980**.
- [84] H.-P. Fink, B. Philipp, *J. Appl. Polym. Sci.* **1985**, *30*, 3779.
- [85] H. Bansa, *Vorträge des 4. Internationalen Graphischen Restauratorenkongresses* **1980**, *31:1*.
- [86] D. Klemm, *Comprehensive cellulose chemistry. Volume 1: fundamentals and analytical methods: Klemm D, Philipp B, Heinze T et al (1998) Comprehensive cellulose chemistry. Volume 1: fundamentals and analytical methods. Wiley* **1998**.
- [87] G. Chinga-Carrasco, *Nanoscale Research Letters* **2011**, *6*, 417.
- [88] H. Meier, *Pure and Applied Chemistry* **1962**, *5*, 37.

- [89] G Chinga-Carrasco, *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. Microscopy Book Series: Chinga-Carrasco G: Microscopy and computerised image analysis of cellulose fibres multiscale structures*. In *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. Microscopy Book Series*. Edited by: Méndez-Vilas A, Díaz J. Badajoz: Formatex Research Center, Badajoz, Spain; 2011:2182–2189 **2011**.
- [90] H. Sixta, *Handbook of pulp*, Wiley-VCH-Verl., Weinheim **2006**.
- [91] D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, W. Wagenknecht, P. Bertram, H. Friedrich-Schiller, T. Heinze, *Comprehensive Cellulose Chemistry: Vol. 1: Fundamentals and Analytical Methods. Vol. 1*, John Wiley & Sons Incorporated, [Place of publication not identified] **1998**.
- [92] DIN 6730:2017-09, *Paper, board and pulps; standard atmosphere for conditioning and testing and procedure for monitoring the atmosphere and conditioning of samples* **1990**.
- [93] Bos JH, Staberock M (2006) *Das Papierbuch: Handbuch der Papierherstellung*. ECA Pulp & Paper b.v., ISBN: 90-11-06038-5 **2006**.
- [94] J. Blechschmidt, *Taschenbuch der Papiertechnik*, Carl Hanser Verlag GmbH & Co KG **2013**.
- [95] H. Holik, *Handbook of paper and board*, WILEY-VCH, Weinheim **2008**.
- [96] D Hunter, *Papermaking: Hunter D (1947) Papermaking*. Pleiades, London **1947**.
- [97] Statista, *Production volume of paper and paperboard worldwide from 2010 to 2021*, <https://www.statista.com/statistics/270317/production-volume-of-paper-by-type/> - abgerufen 03.07.2023.
- [98] *Verband deutscher Papierfabriken e.V. Papier 2019: Ein Leistungsbericht* **2019**.
- [99] A. Böhm, M. Biesalski, *MRS Bull.* **2017**, 42, 356.
- [100] K. Yamada, T. G. Henares, K. Suzuki, D. Citterio, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2015**, 54, 5294.
- [101] H. Modaresi, G. Garnier, *Langmuir* **2002**, 18, 642.
- [102] R. Masoodi, K. M. Pillai (Eds.), *Wicking in porous materials: Traditional and modern modeling approaches*, CRS Press, Boca Raton, London, New York **2017**.
- [103] E. W. Washburn, *Phys. Rev.* **1921**, 17, 273.
- [104] M. M. Gong, D. Sinton, *Chemical reviews* **2017**, 117, 8447.
- [105] Y. Peng, P. Wu, A. T. Schartup, Y. Zhang, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2021**, 118.
- [106] K. ATSUKI, M. ISHIWARA, *Proceedings of the Imperial Academy* **1928**, 4, 382.
- [107] H. S. Munro, R. D. Short, *J. Appl. Polym. Sci.* **1990**, 39, 539.
- [108] Europäisches Parlament, *Richtlinie (EU) 2019/904 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 5. Juni 2019 über die Verringerung der Auswirkungen bestimmter Kunststoffprodukte auf die Umwelt: Einwegkunststoffrichtlinie* **2019**.
- [109] G.-R. Han, H. J. Koo, H. Ki, M.-G. Kim, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2020**, 12, 34564.
- [110] M. Jauset-Rubio, M. Svobodová, T. Mairal, C. McNeil, N. Keegan, A. Saeed, M. N. Abbas, M. S. El-Shahawi, A. S. Bashammakh, A. O. Alyoubi, C. K. O Sullivan, *Sci Rep* **2016**, 6, 37732.
- [111] D. Lin, B. Li, L. Fu, J. Qi, C. Xia, Y. Zhang, J. Chen, J. Choo, L. Chen, *Microsyst Nanoeng* **2022**, 8, 53.
- [112] V. Shirshahi, G. Liu, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2021**, 136, 116200.
- [113] B. V. R. Tata, B. Raj, *Bull Mater Sci* **1998**, 21, 263.

- [114] Dietzel65, Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0 Unported, upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/25/ConfocalPrinciple.svg, <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/25/ConfocalPrinciple.svg> - abgerufen 07.06.2023.
- [115] J. Hughes, M. E. McCully, *Stain technology* **1975**, 50, 319.
- [116] C. Wischke, H. H. Borchert, *Die Pharmazie* **2006**, 61, 770.
- [117] myscope.training - CC BY-SA 4.0, *Structure of an SEM* **2023**, https://myscope.training/#/SEMlevel_2_3 - abgerufen 21.05.2023.
- [118] myscope.training - CC BY-SA 4.0, *Electron sources* **2023**, https://myscope.training/#/SEMlevel_3_5 - abgerufen 21.05.2023.
- [119] N. Abu, N. Mohd Bakhori, R. H. Shueb, *Micromachines* **2023**, 14, 1239.
- [120] WHO, *WHO reference number PQDx 0219-012-00* **2020**.
- [121] WHO, *Reference Number PQDx 0451-0136-00*, 2020.
- [122] World Health Organization, *WHO List of Prequalified Diagnostic Products* **2023**.
- [123] D. Programme, I. Virus, R. Test, W. Blood **2013**.
- [124] P. Lepoutre, *Progress in Organic Coatings* **1989**, 17, 89.
- [125] C. Andersson, *Packag. Technol. Sci.* **2008**, 21, 339.
- [126] E.-L. Hult, J. Ropponen, K. Poppius-Levlin, T. Ohra-Aho, T. Tamminen, *Industrial Crops and Products* **2013**, 50, 694.
- [127] T. Schuman, M. Wikström, M. Rigdahl, *Surface and Coatings Technology* **2004**, 183, 96.
- [128] P. Vernhes, J.-F. Bloch, A. Blayo, B. Pineaux, *Journal of Materials Processing Technology* **2009**, 209, 5204.
- [129] R. Bollström, R. Nyqvist, J. Preston, P. Salminen, M. T. J. Toivakka, *Barrier properties created by dispersion coating* **2013**.
- [130] K. Miyamoto, Y. Katagiri, in *Liquid Film Coating*, Springer, Dordrecht **1997**, p. 463.
- [131] J. Vartiainen, M. Vähä-Nissi, A. Harlin, *MSA* **2014**, 05, 708.
- [132] A. Böhm, M. Gattermayer, C. Trieb, S. Schabel, D. Fiedler, F. Miletzky, M. Biesalski, *Cellulose* **2013**, 20, 467.
- [133] S. Bump, A. Böhm, L. Babel, S. Wendenburg, F. Carstens, S. Schabel, M. Biesalski, T. Meckel, *Cellulose* **2015**, 22, 73.
- [134] A. Berni, M. Mennig, H. Schmidt, in *Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users*, Springer, Boston, MA **2004**, p. 89.
- [135] U. Forsström, E. Saharinen, R. J. Dickson, K. Fagerholm, *J-FOR* **2003**, 29, 159.
- [136] D. Grosso, *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 17033.
- [137] L. Landau, B. Levich, *Dynamics of Curved Fronts* **1988**.
- [138] NIIR Board Author, *The Complete Book on Printing Technology: Application of Screen Printing, best small and cottage scale industries, Business consultancy, Business consultant, Business Plan for a Startup Business, Business start-up, Flexible Packaging Printing Processes Overview, flexographic printing business plan, flexographic printing process pdf, Flexographic Printing: Technical Process, Flexography Printing Process, gravure printing process, gravure printing technology*, ASIA PACIFIC BUSINESS PRESS Inc **2003**.
- [139] D. Botta, I. Magos, C. Balan, in *2021 10th International Conference on ENERGY and ENVIRONMENT (CIEM)*, IEEE **2021**.
- [140] D. Botta, I. Magos, C. Balan, in *2021 12th International Symposium - 25-03-2021*, p. 1.
- [141] M. H. Mattar, A. S. A. Shalaby, A. Azzazy, I. Ismail, *Wat.Ener.Food.Env.J* **2020**.
- [142] M. Á. La Fernández de Ossa, M. López-López, M. Torre, C. García-Ruiz, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, 30, 1740.
- [143] C. W. Saunders, L. T. Taylor, *Journal of Energetic Materials* **1990**, 8, 149.

- [144] Fernandez de la Ossa, A., M. Torre, C. Garcia-Ruiz, *NITROCELLULOSE IN PROPELLANTS: CHARACTERISTICS AND THERMAL PROPERTIES: Volume 7*, Nova Science Publishers, New York **2012**.
- [145] J. P. Agrawal, *High energy materials: Propellants, explosives and pyrotechnics*, WILEY-VCH, [Place of publication not identified] **2015**.
- [146] J. Szejtli, *Starch / Stärke* **1967**, *19*, 145.
- [147] E. Husemann, R. Wernder, *Institut für makromolekulare Chemie der Universität Freiburg/Brsg.* **1963**.
- [148] S. V. Stovbun, S. N. Nikol'skii, V. P. Mel'nikov, M. G. Mikhaleva, Y. A. Litvin, A. N. Shchegolikhin, D. V. Zlenko, V. A. Tverdislov, D. S. Gerasimov, A. D. Rogozin, *Russ. J. Phys. Chem. B* **2016**, *10*, 245.
- [149] S. N. Nikolsky, D. V. Zlenko, V. P. Melnikov, S. V. Stovbun, *Carbohydrate Polymers* **2019**, *204*, 232.
- [150] G. Kasbekar, S. Neale, *Transactions of the Faraday Society*, **1947**.
- [151] S. Neale, *Transactions of Faraday Society* **1933**.
- [152] V. I. Kovalenko, R. M. Mukhamadeeva, Maklakova, L. N., Gustova, N. G., *Kazan Chemical Engineering Institute* **4**.
- [153] R. D. Short, H. S. Munro, *J. Appl. Polym. Sci.* **1990**, *39*, 1973.
- [154] J. Oelichmann, *Z. Anal. Chem.* **1989**, *333*, 353.
- [155] Deutsches Institut für Normung (DIN), *Papier und Pappe - Bestimmung von Eigenschaften bei Zugbeanspruchung - Teil 2: Verfahren mit konstanter Dehngeschwindigkeit (20 mm/min)*.
- [156] H. Sihtola, B. Anthoni, N.-E. Virkola, *J. Polym. Sci.* **1958**, *30*, 1.
- [157] E. E. Treiber, *Die Chemie der Pflanzenzellwand: Ein Beitrag zur Morphologie, Physik, Chemie und Technologie der Cellulose und ihrer Begleiter*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin **2013**.
- [158] L. Neimo (Ed.), *Papermaking chemistry*, Fapet Oy, Helsinki **op. 1999**.
- [159] U. Hamm (Ed.), *Preparing for the next millennium: TAPPI 99 1999 TAPPI Papermakers Conference 1999 TAPPI Recycling Symposium 1999 TAPPI Process Control, Electrical and Information Conference March 1-4, 1999, Atlanta, Georgia proceedings*, TAPPI Press, Atlanta, GA, USA **1999**.
- [160] Z. B. Jildeh, P. H. Wagner, M. J. Schöning, *Physica Status Solidi (a)* **2021**, *218*, 2000732.
- [161] W. H. Organization, *WHO global report on traditional and complementary medicine 2019*, World Health Organization, Geneva **op. 2019**.
- [162] I. A. Ansari, A. K. Datta, *Food and Bioproducts Processing* **2003**, *81*, 57.
- [163] V. M. Starov, M. G. Velarde, C. J. Radke, *Wetting and Spreading Dynamics*, CRC Press **2007**.
- [164] C. J. van Oss, R. J. Good, M. K. Chaudhury, *Journal of chromatography* **1987**, *391*, 53.
- [165] S. Chen, G.-S. Liu, H.-W. He, C.-F. Zhou, X. Yan, J.-C. Zhang, *Advances in Condensed Matter Physics* **2019**, *2019*, 1.
- [166] J. Abreu-Silva, S. Ribeirinho-Soares, I. Oliveira-Inocêncio, M. Pedrosa, A. M. Silva, O. C. Nunes, C. M. Manaia, *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2023**, *11*, 109132.
- [167] M. Nau, N. Herzog, J. Schmidt, T. Meckel, A. Andrieu-Brunsen, M. Biesalski, *Adv Materials Inter* **2019**, *6*, 1900892.
- [168] R. Hensel, R. Helbig, S. Aland, H.-G. Braun, A. Voigt, C. Neinhuis, C. Werner, *Langmuir* **2013**, *29*, 1100.
- [169] J. J. Mikolei, L. Neuenfeld, S. Paech, M. Langhans, M. Biesalski, T. Meckel, A. Andrieu-Brunsen, *Adv Materials Inter* **2022**, *9*, 2200064.

-
- [170] Q. Shen, D.-S. Liu, Y. Gao, Y. Chen, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2004**, 35, 193.
- [171] J. Y. Y. Heng, D. F. Pearse, F. Thielmann, T. Lampke, A. Bismarck, *Composite Interfaces* **2007**, 14, 581.
- [172] W. C. PRESTON, *J. Phys. Chem.* **1948**, 52, 84.
- [173] S. Panda, *Department of Physics, National Institute of Technology, Rourkela-769008, Odisha, India* **2012**.
- [174] J. Houben, T. Weyl, E. Müller, *Methoden der organischen Chemie: Band 14/2, Makromolekulare Stoffe. Teil 2*, Thieme, Stuttgart **1963**.
- [175] H. D. Schlumberger, *Zeitschrift für Naturforschung* **1968**.
- [176] K. Jones, in *Lateral Flow Immunoassay* (Eds.: R. Wong, H. Tse), Humana Press. Totowa, NJ **2009**, 115-130.
- [177] A. Böhm, F. Carstens, C. Trieb, S. Schabel, M. Biesalski, *Microfluidics and Nanofluidics* **2014**, 16, 789.
- [178] F. Carstens, J. A. F. Gamelas, S. Schabel, *Cellulose* **2017**, 24, 295.
- [179] *Zellcheming Merkblätter, Verein der Zellstoff- und Papier-Chemiker und -Ingenieure, Darmstadt. Merkblätter V/4/61 (1961)* **1961**.
- [180] *Halbstoffe - Naßaufschlagen im Laboratorium (ISO 5263:1995); Deutsche Fassung EN ISO 5263:1997* **1997**.
- [181] *Zellcheming Merkblätter, Verein der Zellstoff- und Papier-Chemiker und -Ingenieure, Darmstadt. Merkblätter V/6/61 (1961)* **1961**.
- [182] *Faserstoffe - Laborblattbildung für physikalische Prüfungen - Teil 2: Rapid-Köthen-Verfahren (ISO 5269-2:2004); Deutsche Fassung EN ISO 5269-2:2004 Ausgabe 2005-03* **2005**.
- [183] A. R. von Stockert, A. Luongo, M. Langhans, T. Brandstetter, J. Rühle, T. Meckel, M. Biesalski, *Sensors (Basel, Switzerland)* **2021**, 21.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: a) Positiver LFT, b) negativer LFT, c) ungültige LFTs.....	5
Abbildung 1-2: Strukturformel von a) der Anhydroglucose Einheit (AGU) und b) Cellobiose Einheit bestehend aus zwei β -(1,4)-verknüpften AGUs. ^[14]	8
Abbildung 1-3: a) Ausschnitt der Cellulose Überstruktur, welche durch intramolekulare (Rot) und intermolekulare (Blau) Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. ^[14] b) Fransen-Fibrillen-Modell der Celluloseüberstruktur mit kristallinen Bereich (Grün) und amorphen Bereich (Gelb).	9
Abbildung 1-4: Überstrukturen von Cellulose ausgehend vom Polymer bis hin zur Faser und REM-Mikrographen verschiedener Cellulosestrukturen. ^[14]	10
Abbildung 2-1: Zu erwartende neuartige Membranmaterialien b) und c) im Vergleich zu a) konventionellen NC-Membranen und d) Baumwoll-Linters-Papieren. Die zu erwartenden NC-Anteile der verschiedenen Materialien nimmt von den konventionellen NC-Membranen a) hin zum unbehandelten Baumwoll-Linters-Papier d) ab.	15
Abbildung 3-1: Lichtweg eines Konfokalmikroskops bestehend aus dem Anregungsstrahlengang (Grün), dem Emissionsstrahlengang (Rot) und des Lichtwegs von Fluoreszenzsignalen außerhalb der Fokusebene (Magenta). ^[114]	18
Abbildung 3-2: CLSM Aufnahmen von vollflächigen NCPHM. Die Papierfasern sind mit Calcofluor White M2R gefärbt (Cyan) und die NC mit Rhodamin B (Magenta). a) Aufnahme einer einzelnen Fokusebene in je einem Kanal, b) Maximalprojektionen in je einem Kanal, c) überlagerte Maximalprojektionen beider Fluoreszenzkanäle.....	19
Abbildung 3-3: a) Vereinfachter Querschnitt durch ein Rasterelektronenmikroskop. b) Querschnitt durch einen Wehnelt-Zylinder (Elektronenquelle). ^[117,118]	20
Abbildung 3-4: REM-Mikrographen von Baumwoll-Linters-Papier (75 g/m ²) und einer NC-Membran (HiFlow 75) bei unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Aufnahmen wurden mittels SE-Detektor aufgenommen.	22
Abbildung 3-5: a) Dimensionen der getesteten Membranmaterialien. b) Ständer zur parallelen Durchführung zweier Messungen der kapillaren Fließzeiten.	25
Abbildung 4-1: REM-Mikrographen von konventionellen NC-Membranen bei 500-facher und 6000-facher Vergrößerung. Der Skalierungsbalken für 500x entspricht 50 μ m und ist gültig für die obere Reihe, die Skalierung der 6000-fachen Vergrößerung beträgt 5 μ m. Dargestellt sind die Mikrographen der HiFlow 75, 120, 135 und 180 Membranen.....	30
Abbildung 4-2: REM-Mikrographen von vollflächig beschichteten NCPHM, hergestellt auf 75 g/m ² Baumwoll-Linters-Papieren bei 25 °C und 50% RH bei einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min. Verwendet wurden <i>Lacquer</i> mit NC-Anteilen von 3,5%, 5,2% und 7,0% (w/w). Der Skalierungsbalken der 500-fachen Vergrößerung beträgt 100 μ m, die Skalierung bei 5000-facher Vergrößerung entspricht 10 μ m.	31
Abbildung 4-3: REM-Querschnittsaufnahmen von vollflächig beschichteten NCPHM hergestellt auf 50 g/m ² Baumwoll-Linters-Papier bei 25 °C und 50% RH bei einer Ziehgeschwindigkeit	

von 120 mm/min. Verwendet wurden <i>Lacquer</i> mit NC-Anteilen von 3,5%, 5,2% und 7,0% (w/w). Die Skalierungen sind jeweils für die dargestellte Reihe gültig.....	32
Abbildung 4-4: CLSM-Querschnittsaufnahmen (Maximalprojektionen) von vollflächigen NCPHM hergestellt mittels Tauchbeschichtung bei 25 °C und 50% RH bei einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min. Verwendet wurde ein <i>Lacquer</i> mit 5,2% (w/w) NC-Gehalt. Es wurden Basispapiere mit a) 50 g/m ² und b) 75 g/m ² verwendet. Der Skalierungsbalken in a) ist gültig für beide Aufnahmen und entspricht 50 μm. Die Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgebrauchte NC- <i>Lacquer</i> in Magenta (Rhodamin B).	33
Abbildung 4-5: REM-Mikrographen zur Untersuchung des Einflusses der Ziehgeschwindigkeit auf die Morphologie mittels Tauchbeschichtung hergestellter vollflächiger NCPHM. Die Hybride wurden auf 75 g/m ² Baumwoll-Linters-Papieren bei 25 °C, 50% RH mit einem NC-Anteil von 7,0% (w/w) im <i>Lacquer</i> hergestellt. Der Skalierungsbalken der 1000-fachen Vergrößerung beträgt 25 μm und der Skalierungsbalken der 8000-fachen Vergrößerung entspricht 5 μm.	34
Abbildung 4-6: REM-Mikrographen von flächig beschichteten NCPHM hergestellt auf 75 g/m ² Papieren mit einem NC-Anteil von 3,5% (w/w) im <i>Lacquer</i> bei 25 °C, 50% RH und variierenden Ziehgeschwindigkeiten von 120 mm/min, 200 mm/min und 500 mm/min. Der Skalierungsbalken der 1000-fachen Vergrößerung beträgt 25 μm und der Skalierungsbalken der 5000-fachen Vergrößerung entspricht 5 μm.	35
Abbildung 4-7: REM-Mikrographen zur Untersuchung des Temperatureinflusses bei der Herstellung von vollflächig beschichteten NCPHM mittels Tauchbeschichtung. Die Materialien wurden auf 50 g/m ² Papieren unter Verwendung eines <i>Lacquers</i> mit 3,5% (w/w) NC-Anteil und einer Luftfeuchtigkeit von 50% RH hergestellt. Die Temperatur bei der Herstellung wurde zwischen 15 °C, 25 °C und 45 °C variiert. Die Skalierung der 500-fachen Vergrößerung beträgt 50 μm, die der 8000-fachen Vergrößerung 5 μm.	36
Abbildung 4-8: REM-Mikrographen von vollflächig beschichteten NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung von 75 g/m ² Papieren mit einem <i>Lacquer</i> mit 3,5% NC-Anteil bei einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min und 25°C. Variiert wurde die Luftfeuchtigkeit im Bereich von 25% RH, 50% RH und 75% RH. Der Skalierungsbalken der 500-fachen Vergrößerung entspricht 50 μm und der Skalierungsbalken der 5000-fachen Vergrößerung entspricht 5 μm.	37
Abbildung 4-9: REM-Mikrographen von vollflächig beschichteten NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung von 75 g/m ² Papieren mit einem <i>Lacquer</i> mit 5,2% NC-Anteil bei einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min und 25°C. Variiert wurde die Luftfeuchtigkeit im Bereich von 25% RH, 50% RH und 75% RH. Der Skalierungsbalken der 500-fachen Vergrößerung entspricht 50 μm und der Skalierungsbalken der 5000-fachen Vergrößerung beträgt 5 μm.....	38
Abbildung 4-10: REM-Mikrographen zur Untersuchung der Morphologie von vollflächig beschichteten NCPHM, hergestellt durch Tauchbeschichtung. Die Hybridmaterialien wurden alle mit einer Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min, einer Temperatur von 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 75% RH hergestellt. Als Papiere wurden a), b) 50 g/m ² und c), d) 75 g/m ² Baumwoll-Linters-Papiere verwendet. Die NC-Anteile im <i>Lacquer</i> waren a),	

c) 3,5% und b), d) 5,2%. Die Skalierungsbalken der niedrigeren Vergrößerung sind 150 μm , die höher vergrößerten Aufnahmen haben einen Skalierungsbalken von 50 μm	39
Abbildung 4-11: Beschichtungsgewichte von vollflächig beschichteten NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung. Verwendet wurden 75 g/m^2 Papiere, welche mit verschiedenen NC-Anteilen im <i>Lacquer</i> bei 25 °C, 50% RH mit einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min hergestellt wurden. Der Rot markierte Bereich entspricht den Beschichtungsgewichten konventioneller NC-Membranen. Dieser liegt in einem Bereich von $37,5 \text{ g}/\text{m}^2 \pm 2,5 \text{ g}/\text{m}^2$	41
Abbildung 4-12: Beschichtungsgewichte von vollflächigen NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung. a) Variation der Ziehgeschwindigkeiten bei 25 °C und 50% RH auf (Schwarz) 50 g/m^2 Papieren mit einem NC-Anteil von 3,5% im <i>Lacquer</i> und (Rot) 75 g/m^2 Papieren mit einem NC-Anteil von 7,0% im <i>Lacquer</i> . b) Variation der Temperatur bei Verwendung von 75 g/m^2 Papieren mit einem NC-Anteil von 3,5% im <i>Lacquer</i> bei 50% RH und einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min.....	42
Abbildung 4-13: Fotoaufnahmen von ortsdefinierten NCPHM, hergestellt aus Baumwoll-Linters-Papieren (50 g/m^2) mit verschiedenen NC-Massenanteilen im <i>Lacquer</i> von 3,5%, 5,2% und 7,0% (w/w), verschiedenen Dosierungen (8 – 20 $\mu\text{L}/\text{cm}$) und Applikationsmethode (Kanüle, Pinsel). Der Skalierungsbalken ist für alle Bilder gültig und beträgt 10 mm. Die rot markierten Aufnahmen zeigen Hybridmaterialien mit Inhomogenitäten innerhalb der Linie, die orange markierten Aufnahmen zeigen eine homogene Materialverteilung innerhalb der Linie bei inkonsistenter Linienbreite. Die grün markierten Aufnahmen zeigen eine homogene Materialverteilung bei konstanter Linienbreite.....	46
Abbildung 4-14: Fotoaufnahmen von ortsdefinierten NCPHM, hergestellt aus Baumwoll-Linters-Papieren (75 g/m^2) mit verschiedenen NC-Massenanteilen im <i>Lacquer</i> (3,5%, 5,2% und 7,0%, je w/w), verschiedenen Dosierungen (8 – 20 $\mu\text{L}/\text{cm}$) und Applikationsmethode (Kanüle, Pinsel). Der Skalierungsbalken ist für alle Bilder gültig und beträgt 10 mm. Die rot markierten Aufnahmen zeigen Hybridmaterialien mit Inhomogenitäten innerhalb der Linie, die orange markierten Aufnahmen zeigen eine homogene Materialverteilung in der Linie bei inkonstanter Linienbreite und die grün markierten Aufnahmen zeigen eine homogene Materialverteilung bei konstanter Linienbreite.	47
Abbildung 4-15: Schematische Darstellung der Applikationsmethoden mit Blick auf deren Dimensionen. Applikation des NC- <i>Lacquers</i> über a) eine Kanüle mit dem Durchmesser $d(\text{Kanüle})$, der Gesamtbreite der resultierenden Linie $d(\text{total})$ und dem Längenunterschied zwischen Kanüledurchmesser und resultierender Linienbreite $\Delta(\text{Kanüle})$ und b) einem Dosierpinsel mit dem Durchmesser $d(\text{Pinsel})$, der Gesamtbreite der resultierenden Linie $d(\text{total})$ und dem Längenunterschied zwischen Pinseldurchmesser und resultierender Linienbreite $\Delta(\text{Pinsel})$	49
Abbildung 4-16: Schematische Zusammenfassung der Parameter, welche sich positiv auf eine homogenen und konstante Linienbreite bei der Herstellung von ortsdefinierten NCPHM auswirken.	50

Abbildung 4-17: Linienbreiten von ortsdefinierten NCPHM in Abhängigkeit zur Dosierung der verschiedenen NC-Lacquer. Der Auftrag des NC-Lacquers erfolgte über eine Kunststoffkanüle. Die NC-Anteile im jeweiligen Lacquer sind 3,5% (Schwarz), 5,2% (Blau) und 7,0% (Rot). Die Materialien wurden auf Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von a) 50 g/m ² und b) 75 g/m ² hergestellt. Die gestrichelte Linie symbolisiert eine Linienbreite von 5 mm.	51
Abbildung 4-18: Linienbreiten von ortsdefinierten NCPHM in Abhängigkeit der Dosierung verschiedener NC-Lacquer. Der Auftrag des NC-Lacquers erfolgte über einen Dosierpinsel aus Kunststoff. Die NC-Anteile im jeweiligen Lacquer sind 3,5% (Schwarz), 5,2% (Blau) und 7,0% (Rot). Die Materialien wurden auf Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von a) 50 g/m ² und b) 75 g/m ² hergestellt.	52
Abbildung 4-19: Errechnete Beschichtungsgewichte auf der beschichteten Fläche von ortsdefinierten NCPHM in Abhängigkeit der Dosierung und der NC-Anteils in den verwendeten Lacquern. Für die Herstellung wurden Baumwoll-Linters-Papiere mit einer Grammatur von a) 50 g/m ² und b) 75 g/m ² verwendet. Die Gewichtsanteile NC-Anteile im Lacquer sind 3,5% (Schwarz), 5,2% (Blau) und 7,0% (Rot). Die Applikation des Lacquers mittels eines Dosierpinsels (P) ist mit gefüllten Datenpunkten dargestellt, die Applikation des Lacquers über eine Kanüle (K) ist über die leeren Datenpunkte illustriert.	54
Abbildung 4-20: Übersicht der Beschichtungsgewichte von NCPHM. Dargestellt sind die Spannen der Beschichtungsgewichte von ortsdefinierten NCPHM, vollflächigen NCPHM und konventionellen NC-Membranen.	56
Abbildung 4-21: CLSM-Aufnahmen (Maximalprojektion) der Probenoberfläche (Draufsicht) von ortsdefinierte NCPHM hergestellt auf 50 g/m ² Baumwoll-Linters-Papieren bei einer Dosierung von 8 µL/cm. Die NC-Gehalte der Lacquer wurden variiert. Diese sind a) 3,5%, b) 5,2% und c) 7,0% (w/w). Die Lacquer wurden mittels einer Kanüle aufgebracht. Die Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgebrachte NC-Lacquer in Magenta (Rhodamin B). Die verschiedenen Ausbreitungsweiten des Lacquers im Papier sind durch die gelben Linien dargestellt. Die Bildausschnitte auf der rechten Seite zeigen die Fotoaufnahmen aus Abbildung 4-13.	59
Abbildung 4-22: CLSM-Aufnahmen (Maximalprojektion) der Probenoberfläche (Draufsicht) von ortsdefinierte NCPHM hergestellt auf 50 g/m ² Baumwoll-Linters-Papieren bei einer Dosierung von 8 µL/cm und einem NC-Anteil von 3,5% (w/w). Die Applikation des Lacquers erfolgte mittels einer Kanüle. Auf der Probenübersicht a) sind drei verschiedene Bereiche hervorgehoben. Von diesen Bereichen sind Detailaufnahmen dargestellt. b) äußerer Rand des Hybridmaterials (gelb), c) innenliegender Randbereich (Orange) und d) mittlerer Bereich des Materials, direkt im Bereich der Lacquer Applikation. Die Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgebrachte NC-Lacquer in Magenta (Rhodamin B). Der Skalierungsbalken für die Übersicht a) ist 500 µm, der Skalierungsbalken in b) ist gültig für b) – d) und beträgt 100 µm.	61
Abbildung 4-23: CLSM-Aufnahmen (Maximalprojektion) der Probenquerschnitte von ortsdefinierten NCPHM hergestellt auf 50 g/m ² Baumwoll-Linters-Papieren bei einer Dosierung von 8 µL/cm. Die NC-Anteile der Lacquer wurden variiert. Diese sind a) 3,5%, b) 5,2% und c) 7,0% (w/w). Die Lacquer wurden mittels einer Kanüle aufgebracht. Die	

Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgebrauchte NC- <i>Lacquer</i> in Magenta (Rhodamine B). Die verschiedenen Ausbreitungsweiten des <i>Lacquers</i> im Papier sind durch die gelben Linien dargestellt.....	63
Abbildung 4-24: CLSM-Aufnahmen (Maximalprojektion) des Probenquerschnitts von ortsdefinierte NCPHM hergestellt auf 50 g/m ² Baumwoll-Linters-Papieren bei einer Dosierung von 8 μL/cm und einem NC-Anteil von 3,5% (w/w). Die Applikation des <i>Lacquers</i> erfolgte mittels einer Kanüle. Auf der Probenübersicht a) sind drei verschiedene Bereiche hervorgehoben. Von diesen Bereichen sind Detailaufnahmen dargestellt. b) Äußerer Rand des Hybridmaterials (Gelb), c) innenliegender Randbereich (Orange) und d) mittlerer Bereich des Materials, direkt im Bereich der <i>Lacquer</i> Applikation. Die Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgebrauchte NC- <i>Lacquer</i> in Magenta (Rhodamin B). Der Skalierungsbalken für die Übersicht a) ist 1000 μm, der Skalierungsbalken in b) ist gültig für b) – d) und beträgt 100 μm.....	63
Abbildung 4-25: Querschnittsaufnahmen (CLSM) von ortsdefinierten NCPHM hergestellt auf 50 g/m ² Papieren mit einer Dosierung von 8 μL/cm und variierenden NC-Anteilen von a) 3,5%, b) 5,2% und c) 7,0%. Die Papierfasern sind in Cyan dargestellt (Calcofluor White M2R), der aufgebrauchte NC- <i>Lacquer</i> in Magenta (Rhodamin B). Der Skalierungsbalken in a) entspricht 100 μm und gültig für alle abgebildeten Aufnahmen.....	64
Abbildung 4-26: REM-Aufnahmen bei 300-facher Vergrößerung von ortsdefinierten NCPHM hergestellt auf 50 g/m ² Baumwoll-Linters-Papieren. Der NC- <i>Lacquer</i> wurde mittels einer Kanüle appliziert. Die NC-Anteile im <i>Lacquer</i> waren 3,5%, 5,2% und 7,0% (w/w) und die Dosierungen 8 μL/cm, 12 μL/cm und 16 μL/cm. Der Skalierungsbalken entspricht 100 μm und ist gültig für alle Abbildungen. Die Farbkodierung der Abbildungen entspricht der Beurteilung der Homogenität der Linien wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben.....	66
Abbildung 4-27: REM-Aufnahmen bei 300-facher Vergrößerung von ortsdefinierten NCPHM hergestellt auf 50 g/m ² Baumwoll-Linters-Papieren. Der NC- <i>Lacquer</i> wurde mittels eines Dosierpinsels appliziert. Die NC-Anteile im <i>Lacquer</i> waren 3,5%, 5,2% und 7,0% (w/w) und die Dosierungen 8 μL/cm, 12 μL/cm und 16 μL/cm. Der Skalierungsbalken entspricht 100 μm und ist gültig für alle Abbildungen. Die Farbkodierung der Abbildungen entspricht der Beurteilung der Homogenität der Linien wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben.....	68
Abbildung 4-28: REM-Mikrographen bei mit 500-facher Vergrößerung von a) unbehandeltem Baumwoll-Linters-Papier und CN-Papieren hergestellt bei unterschiedlichen Einlegezeiten mit einer Säurelösung mit 8% (w/w) Wassergehalt b) – g). Der Skalierungsbalken bei a) ist gültig für alle gezeigten Aufnahmen.	73
Abbildung 4-29: REM-Detailaufnahmen bei 2000-facher Vergrößerung von CN-Papieren nach a) 5 min, b) 10 min und c) 15 min Reaktionszeit. Der Skalierungsbalken ist gültig für alle dargestellten Bilder.	74
Abbildung 4-30: a) Mittlere Faserdurchmesser in Abhängigkeit zur Reaktionszeit. b) Die Faserdurchmesser wurden aus REM-Mikrographen ermittelt und gegen die Reaktionszeit aufgetragen.....	75
Abbildung 4-31: IR Spektren von Baumwoll-Linters-Papier, aufgenommen an drei verschiedenen Stellen der Probe. Die Streckschwingungen werden mit ν abgekürzt. a)	

vollständiges IR Spektrum von Baumwoll-Linters-Papier. b) Spektrenausschnitt im Bereich von 3600 cm ⁻¹ – 3000 cm ⁻¹ im Bereich der OH-Schwingungsbanden.....	76
Abbildung 4-32: Schematische Darstellung der Kristallabdeckung bei IR-Messungen bei porösen Baumwoll-Linters-Papieren. Geringer Anteil a) und hoher Anteil b) an Fasern im Bereich des Detektorkristalls.	77
Abbildung 4-33: IR-Spektrum von Baumwoll-Linters-Papier (Schwarz) und CN-Papier (Rot), welches nach einer zehnmütigen Einwirkzeit in konzentrierter Nitriersäure erhalten wurde. Die Pfeile markieren die charakteristischen NO ₂ -Streckschwingungen.....	77
Abbildung 4-34: a) IR-Spektren von Baumwoll-Linters-Papier (Schwarz) und CN-Papieren hergestellt bei unterschiedlichen Reaktionszeiten in konzentrierter Nitriersäure mit einem Wassergehalt von 8% (w/w). Die Reaktionszeiten waren 1 min (Rot), 3 min (Blau), 5 min (Magenta) und 10 min (Grün). Zusätzlich ist das gemessene IR-Spektrum von NC dargestellt, welche für die Herstellung von NCPHM in den Abschnitten 8.2.1 und 8.2.2 verwendet wurde. b) Vergrößerter Ausschnitt der Spektren im Bereich von 1800 cm ⁻¹ – 800 cm ⁻¹ in dem die NO ₂ -Streckschwingungen auftreten.....	78
Abbildung 4-35: Durch Elementaranalyse ermittelte Stickstoffgehalte verschiedener CN-Papiere a) und die daraus errechneten Substitutionsgrade b) in Abhängigkeit zur Reaktionszeit. Für die Veresterung wurde eine Nitriersäurelösung mit einem Wassergehalt von (Rot) 8% (w/w) und eine Lösung mit (Blau) 19% (w/w) verwendet. In Grau dargestellt sind Stickstoffgehalte und Substitutionsgrade, welche in der Literatur ^[106] mit einem Wassergehalt von 17,8% (w/w) erzielt wurden. Die horizontale Linie entspricht dem gemessenen Stickstoffgehalt (11,89%) und Substitutionsgrad (2,22) der kommerziell erhältlichen NC, welche für die Herstellung der NCPHM verwendet wurde.	79
Abbildung 4-36: Errechnete Eindringtiefen der IR-Spektroskopie in Baumwoll-Linters-Papier in Abhängigkeit der Wellenzahl und des verwendeten Kristalls. Die vertikalen Linien kennzeichnen die Bereiche der OH-Valenzschwingungen (~3330 cm ⁻¹) und der NO ₂ -Banden (1630 cm ⁻¹ und 1270 cm ⁻¹).	81
Abbildung 4-37: REM-Mikrographen bei 200-facher Vergrößerung von CN-Papieren nach dem Einlegen 16h in Aceton. Die dargestellten Zeiten entsprechen den Reaktionszeiten bei der Umsetzung der Baumwoll-Linters-Papiere mit der Säurelösung mit 8% (w/w) Wassergehalt. Der Skalierungsbalken ist gültig für alle dargestellten Aufnahmen.	82
Abbildung 4-38: REM-Mikrographen bei 1000-facher Vergrößerung von CN-Papieren nach dem Einlegen für 16 h in Aceton. Die dargestellten Zeiten entsprechen den Reaktionszeiten bei der Umsetzung der Baumwoll-Linters-Papiere mit der Säurelösung mit 8% (w/w) Wassergehalt. Der Skalierungsbalken ist gültig für alle dargestellten Aufnahmen.	83
Abbildung 4-39: Faserbreitenverteilungen von CN-Papieren vor der Acetonbehandlung (1 min, 5 min, 10 min) und nach der Acetonbehandlung (1 min_A, 5 min_A, 10 min_A). Pro Probe wurden 300 – 600 Faserbreiten bestimmt.....	83
Abbildung 4-40: IR-Spektren der mit Aceton behandelten CN-Papieren (1 min – 10 min) und dem Fällungsprodukt aus dem vollständig gelöstem Papier (15 min), sowie dem nicht nitriertem Papier nach Acetonbehandlung (0 min).	84

Abbildung 4-41: a) Zugfestigkeit von CN-Papieren (1 - 60 min) und Baumwoll-Linters-Papier (0 min). Die Messungen der trockenen Proben sind mit gefüllten Datenpunkten und die Messungen der nassen Proben mit ungefüllten Datenpunkten dargestellt. b) Errechnete relative Nassfestigkeiten verschiedener CN-Papiere in Abhängigkeit zur Reaktionszeit. .	86
Abbildung 4-42: Thermogravimetrische Untersuchung von CN-Papieren bei Heizraten von 5 K/min an Luft. a) Exemplarische Ermittlung der <i>Onset</i> -Temperaturen, b) Relative Massenverluste aller CN-Papiere.....	87
Abbildung 5-1: Exemplarische Darstellung eines a) planaren Glassubstrats mit homogener, nicht poröser NC-Beschichtung. b) NC- <i>Lacquer</i> auf Baumwoll-Linters-Papier und c) CN-Papier. Der Skalierungsbalken in a1 ist gültig für a1-c1 und besitzt eine Länge von 50 μm , der Skalierungsbalken in a2 ist gültig für a2-c2 und besitzt eine Länge von 5 μm . Die Bilder der Kontaktwinkelmessungen sind repräsentativ für die verschiedenen Substrate, die mittleren zugehörigen Wasser-Kontaktwinkel sind angegeben.....	92
Abbildung 5-2: REM-Mikrographen eines exemplarischen vollflächig beschichteten NCPHMs a), c) vor und b), c) nach Detergensbehandlung	94
Abbildung 5-3: REM-Mikrographen eines exemplarischen CN-Papiers a) vor und b), c) nach Detergensbehandlung.....	94
Abbildung 5-4: Kapillare Fließzeiten von a) Baumwoll-Linters-Papieren mit unterschiedlichen Grammaturen ohne Detergensbeschichtung. b) kapillare Fließzeiten verschiedener konventioneller HiFlow Membranen (Merck Millipore).	95
Abbildung 5-5: Kapillare Fließzeiten von vollflächigen NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung von 75 g/m ² Papieren. Variiert wurden die NC-Anteile im <i>Lacquer</i> . Die Ziehgeschwindigkeit war 120 mm/min bei 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% RH. Die NCPHM wurden zuvor mit Detergens beschichtet.....	96
Abbildung 5-6: Mittels REM-Aufnahmen ermittelte Partikelgrößen von a)konventionellen NC-Membranen und b) von vollflächig beschichteten NCPHM, hergestellt durch Tauchbeschichtung auf 75 g/m Papieren bei 25 °C, 50% RH und einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min unter Verwendung verschiedener NC-Anteile im <i>Lacquer</i>	97
Abbildung 5-7: Darstellung der unterschiedlichen Porengrößen in Abhängigkeit der Partikelgröße der porösen NC. a) Exemplarische Darstellung großer Partikel (Blau) welche zu größeren Poren (Rot) führen. b) kleinere Partikel und kleinere Porenradien.....	98
Abbildung 5-8: Kapillare Fließzeiten von vollflächigen NCPHM in Abhängigkeit zur Beschichtungsgeschwindigkeit. Verwendet wurden 75 g/m ² Papiere unter Variation der NC-Anteile im <i>Lacquer</i> von 3,5% (Schwarz), 5,2% (Blau) und 7,0% (Rot).....	98
Abbildung 5-9: Kapillare Fließzeiten von vollflächig beschichteten NCPHM. Die Beschichtung wurde bei einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min durchgeführt. a) Variation der Temperatur bei einer konstanten Luftfeuchtigkeit und einem NC-Anteil von 3,5% im <i>Lacquer</i> auf 50 g/m ² (Schwarz) und 75 g/m ² (Rot) Baumwoll-Linters-Papieren. b) Variation der Luftfeuchtigkeit bei einer konstanten Temperatur von 25 °C auf 75 g/m ² Papieren unter Verwendung eines NC-Anteils von 3,5% (Schwarz) und 5,2% (Blau).....	99

- Abbildung 5-10: Kapillare Fließzeiten des kombinierten Ansatzes aus Ziehgeschwindigkeit, Luftfeuchtigkeit und Temperatur von vollflächig beschichteten NCPHM, hergestellt durch Tauchbeschichtung. Zur Beschichtung wurden 50 g/m² Papiere (Schwarz) und 75 g/m² Papiere (Rot) verwendet. Die Tauchbeschichtung wurde bei 25 °C, 75% RH mit NC-Anteilen von 3,5% und 7,0% durchgeführt. 101
- Abbildung 5-11: Übersicht der erzielten kapillaren Fließzeiten verschiedener vollflächiger NCPHM hergestellt durch Tauchbeschichtung. Die detaillierten Werte können den einzelnen Abbildungen entnommen werden. Variiert wurde der NC-Anteil im *Lacquer* (Abbildung 5-5), die Ziehgeschwindigkeiten (Abbildung 5-8), die Temperatur und Luftfeuchtigkeit (Abbildung 5-9). Durch Kombination der einzelnen Variationen wird der kombinierte Ansatz (Abbildung 5-10) erhalten. Blau: 50 g/m² Papier, Schwarz: 75 g/m² Papiere, Magenta: 3,5% NC, Violett: 5,2% NC, Grün: 7,0% NC. 102
- Abbildung 5-12: Kapillare Fließzeiten von a) Baumwoll-Linters-Papier (50 g/m²), b) unbehandeltes ortsdefiniertes NCPHM und c) mit SDBS beschichtetes NCPHM. Das Hybridmaterial wurde hergestellt durch Aufdrucken eines NC-*Lacquers* mit 3,5% (w/w) NC-Anteil bei einer Dosierung von 8 μL/cm auf Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammaturn von 50 g/m². Der *Lacquer* wurde über einen Dosierpinsel appliziert. 103
- Abbildung 5-13: CFT von ortsdefinierten NCPHM hergestellt durch Liniendruckverfahren unter Verwendung eines Dosierpinsels in Abhängigkeit des Dosiervolumens. Aufgetragen wurde NC-*Lacquer* mit 3,5% NC (Schwarz), 5,2% NC (Blau) und 7,0% NC (Rot). Die Materialien wurden auf Baumwoll-Linters-Papieren mit a) 50 g/m² und b) 75 g/m² hergestellt. 105
- Abbildung 5-14: a) Kontaktwinkel von CN-Papieren ohne Detergensbeschichtung hergestellt durch verschiedene Einlegzeiten in eine Säuremischung mit 8% (w/w) Wassergehalt. REM-Mikrographen von unbehandeltem Baumwoll-Linters-Papier b), c) und CN-Papier nach 60 min Reaktionszeit bei d), e)..... 108
- Abbildung 5-15: Kapillare Fließzeiten von Milli-Q[®] Wasser in CN-Papieren mit Detergensbeschichtung, hergestellt durch verschieden lange Reaktionszeiten in eine Säuremischung mit 8% (w/w) Wasseranteil. 109
- Abbildung 6-1: Qualitative Beurteilung der Proteinretention auf vollflächigen NCPHM. a) Bildaufnahme mittels Fluoreszenzimager. Der Auftrag von FITC-Dextran (oben) und FITC-BSA (unten) wurde im vorgehobenen Bereich mit der Fließfront aufgetragen. Der Fluidfluss erfolgte gemäß der Pfeilrichtung von links nach rechts. b) Relative Fluoreszenzintensitäten der in a) dargestellten Proben. Die Fluoreszenzintensitäten wurden entlang des Materials mit einem Linienprofil in ImageJ bestimmt. Die Fluoreszenzintensitäten des FITC-BSA sind in Schwarz dargestellt, die des FITC-Dextrans (Referenz) in rot. CLSM-Detailaufnahmen als Maximalprojektionen im Bereich des Probenauftrags von c) FITC-Dextran und d) FITC-BSA. Auf den CLSM-Aufnahmen sind die Papierfasern in Blau (Calcofluor White M2R), NC in Rot (Rhodamin B), BSA/Dextran in Grün (FITC) und die Kolo-kalisation von BSA auf NC in Gelb dargestellt. Der Skalierungsbalken in d) ist gültig für beide Detailaufnahmen und beträgt 50 μm. 112
- Abbildung 6-2: Untersuchung der Proteinbindung an ortsdefinierten NCPHM (4μL/cm, 5,2% NC, 25 °C, 50% RH, 50g/m²) mittels FITC-BSA und FITC-Dextran. Die Richtung des Fluidflusses erfolgte in Pfeilrichtung. Alle Abbildungen sind CLSM-Aufnahmen, dargestellt

als Maximalprojektionen. a) ortsdefiniertes NCPHM vor der Durchführung des Experimentes, NCPHM nach dem Fluidfluss mit b) FITC-Dextran als Referenz und c) mit FITC-BSA als Protein. Detailaufnahme des mit NC bedruckten Bereichs der d) FITC-Dextran Probe und e) der FITC-BSA Probe..... 114

Abbildung 6-3: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen anti-hCG-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. Als Referenzmaterialien wurde a) unbehandeltes Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von 75 g/m² und b) eine HiFlow 180 NC-Membran (Merck Millipore) verwendet. c) Vollflächiges NCPHM hergestellt aus 75 g/m² Papieren mit einem NC-Anteil im *Lacquer* von 3,5% bei 25 °C, 50% RH und einer Ziehgeschwindigkeit von 120 mm/min. Die hCG Konzentrationen betragen 0, 25, 250, 2.500 und 25.000 mIU/mL. Die Kontrolllinie (*goat anti-mouse antiserum*) ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie (anti-hCG alpha mAb) mit T. Die anti-hCG beta Antikörper sind auf Goldpartikel (40 nm) konjugiert..... 116

Abbildung 6-4: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen anti-hCG-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. Als Referenzmaterialien wurde unbehandeltes Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von a) 50 g/m², b) 75 g/m² und c) eine HiFlow 135 NC-Membran (Merck Millipore) verwendet. Vollflächige NCPHM hergestellt bei 25 °C, 50% RH und einer Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min auf d) 50 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 3,5%, e) 75 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 3,5%, f) 50 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 5,2% und g) 75 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 5,2%. Die hCG Konzentrationen betragen 0, 25, 170, 1.700 und 17.000 mIU/mL. Die Kontrolllinie (*goat anti-mouse antiserum*) ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie (anti-hCG alpha mAb) mit T. Die anti-hCG beta Antikörper sind auf Latexpartikel (400 nm) konjugiert. 117

Abbildung 6-5: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen HBsAg-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. Als Referenzmaterialien wurde unbehandeltes Baumwoll-Linters-Papier mit einer Grammatur von a) 50 g/m², b) 75 g/m² und c) eine HiFlow 135 Membran (Merck Millipore) verwendet. Vollflächige NCPHM hergestellt bei 25 °C, 50% RH und einer Ziehgeschwindigkeit von 500 mm/min auf d) 50 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 3,5%, e) 75 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 3,5%, f) 50 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 5,2% und g) 75 g/m² Papieren und einem NC-Anteil von 5,2%. Pro Membranmaterial werden 4 verschiedene HBsAg- Konzentrationen in 150 µL Probenvolumen getestet. Die Konzentrationen betragen 0, 8, 20, 60 und 240 ng/mL. Die Kontrolllinie ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie mit T. Die HBsAg-Antikörper sind auf Goldpartikel (40 nm) konjugiert. 118

Abbildung 6-6: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen anti-hCG-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. Als Referenzmaterialien wurden Baumwoll-Linters-Papiere mit a) 50 g/m², b) 75 g/m² und c) konventionelle HiFlow 135 Membranen (Merck Millipore) verwendet. Ortsdefinierte NCPHM auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papier mit einem NC-Anteil im *Lacquer* von 3,5% (w/w) und Dosierungen von d) 8 µL/cm, e) 12 µL/cm und f) 16 µL/cm. Ortsdefinierte NCPHM auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren mit einem NC-Anteil von 5,2% (w/w) und Dosierungen von g) 8 µL/cm und h) 12 µL/cm. Ortsdefinierte NCPHM auf 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papier mit einem NC-Anteil im *Lacquer* von 3,5% (w/w) und Dosierungen von i) 8 µL/cm, j) 12 µL/cm und k) 16 µL/cm. Ortsdefinierte NCPHM auf 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren mit einem

NC-Anteil von 5,2% (w/w) und Dosierungen von l) 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ und m) 12 $\mu\text{L}/\text{cm}$. Der NC-*Lacquer* wurde mit einem Dosierpinsel aufgebracht. Die hCG Konzentrationen betragen 0, 25, 170, 1.700 und 17.000 mIU/mL. Die Kontrolllinie (*goat anti-mouse antiserum*) ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie (anti-hCG alpha mAb) mit T. Die α -hCG beta Antikörper sind auf Latexpartikel (400 nm) konjugiert. 120

Abbildung 6-7: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen HBsAg-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. Als Referenzmaterialien wurden a) Baumwoll-Linters-Papier (50 g/m²), b) Baumwoll-Linters-Papier (75 g/m²) und c) konventionelle HiFlow 135 NC-Membran (Merck Millipore) verwendet. Ortsdefinierte NCPHM auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papier mit einem NC-Anteil im *Lacquer* von 3,5% (w/w) und Dosierungen von d) 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$, e) 12 $\mu\text{L}/\text{cm}$ und f) 16 $\mu\text{L}/\text{cm}$. Ortsdefinierte NCPHM auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren mit einem NC-Anteil von 5,2% (w/w) und Dosierungen von g) 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ und h) 12 $\mu\text{L}/\text{cm}$. Ortsdefinierte NCPHM auf 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papier mit einem NC-Anteil im *Lacquer* von 3,5% (w/w) und Dosierungen von i) 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$, j) 12 $\mu\text{L}/\text{cm}$ und k) 16 $\mu\text{L}/\text{cm}$. Ortsdefinierte NCPHM auf 75 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren mit einem NC-Anteil von 5,2% (w/w) und Dosierungen von l) 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ und m) 12 $\mu\text{L}/\text{cm}$. Der NC-*Lacquer* wurde mit einem Dosierpinsel aufgebracht. Pro Membranmaterial werden 4 verschiedene HsAg-Konzentrationen in 150 μL Probenvolumen getestet. Die Konzentrationen betragen 0, 8, 20, 60 und 240 ng/mL. Die Kontrolllinie ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie mit T. Die HBsAg-Antikörper sind auf Goldpartikel (40 nm) konjugiert..... 123

Abbildung 6-8: Oberflächen-pH-Werte einer konventionellen NC-Membran (HiFlow 135), Papier (Baumwoll-Linters, 75 g/m²) und CN-Papieren nach 5 min und 60 min Reaktionszeit. Messungen ohne Pufferbehandlung sind in Schwarz dargestellt, Messungen mit Pufferbehandlung in Rot, Suffix P+D: Detergens und Puffer gemeinsam aufgetragen (gepufferte SDBS Lösung), Suffix 1D2P: Detergensbeschichtung mit SDBS, gefolgt von Trocknung und anschließender Pufferbehandlung. Die gestrichelte Linie illustriert den pH-Wert der verwendeten PBS-Puffer-Lösung (pH 7,4)..... 125

Abbildung 6-9: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen anti-hCG-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. a) konventionelle HiFlow 135 NC-Membran (Merck Millipore), b) Baumwoll-Linters-Papier (75 g/m²), c) CN-Papier nach 5 min Reaktionszeit mit Detergensbeschichtung ohne Puffer, d) CN-Papier nach 60 min Reaktionszeit mit Detergensbeschichtung ohne Puffer, e) CN-Papier nach 5 min Reaktionszeit mit aufeinanderfolgender Detergens- und Pufferbeschichtung und f) CN-Papier nach 60 min Reaktionszeit mit aufeinanderfolgender Detergens- und Pufferbeschichtung. Pro Membranmaterial werden 5 verschiedene hCG Konzentrationen in 150 μL Probenvolumen getestet. Die hCG Konzentrationen betragen 0, 25, 250, 2.500 und 25.000 mIU/mL. Die Kontrolllinie (*goat anti-mouse antiserum*) ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie (anti-hCG alpha mAb) mit T. Die α -hCG beta Antikörper sind auf Goldnanopartikel (40 nm) konjugiert..... 127

Abbildung 6-10: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen α -hCG-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. a) konventionelle HiFlow 90 NC-Membran (Merck Millipore), b) Baumwoll-Linters-Papier (75 g/m²), c) CN-Papier nach 5 min, d) 30 min und e) 60 min Reaktionszeit mit jeweils aufeinanderfolgender Detergens- und Pufferbeschichtung. Pro Membranmaterial werden 4 verschiedene hCG

Konzentrationen in 150 μL Probenvolumen getestet. Die hCG Konzentrationen betragen 0, 25, 170, 1.700 und 17.000 mIU/mL. Die Kontrolllinie (<i>goat anti-mouse antiserum</i>) ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie (anti-hCG alpha mAb) mit T. Die α -hCG beta Antikörper sind auf Latexpartikel (400 nm) konjugiert.....	129
Abbildung 6-11: Fotoaufnahmen des Membranbereichs von diagnostischen HBsAg-Assays, hergestellt mit verschiedenen Membranmaterialien. a) konventionelle HiFlow 90 NC-Membran (Merck Millipore), b) Baumwoll-Linters-Papier (75 g/m ²), c) CN-Papier nach 5 min, d) 30 min und e) 60 min Reaktionszeit mit jeweils aufeinanderfolgender Detergens- und Pufferbeschichtung. Pro Membranmaterial werden 4 verschiedene HsAg-Konzentrationen in 150 μL Probenvolumen getestet. Die Konzentrationen betragen 0, 8, 20, 60 und 240 ng/mL. Die Kontrolllinie ist mit C gekennzeichnet, die Testlinie mit T. Die HBsAg-Antikörper sind auf Goldpartikel (40 nm) konjugiert.	130
Abbildung 7-1: a) Klassischer <i>Lateral-Flow-Assay</i> , bestehend aus verschiedenen Komponenten. b) <i>Paper-only-LFT</i> , bestehend aus einem einzigen, langen Papierstreifen mit verschiedenen Funktionsbereichen.	138
Abbildung 8-1: Liniendruckverfahren, durchgeführt mit a) einer Kanüle und b) mit einem Dosierpinsel.	148
Abbildung 8-2: Fotoaufnahme einer laufenden CFT-Messung.	150
Abbildung 8-3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Proteinbindung an ortsdefinierten NCPHM.....	151
Abbildung 8-4: Klassischer Aufbau von diagnostischen Assays. a) Maße und einzelne Bestandteile der Schnelltests, b) schematische Seitenansicht eines Assays mit Überlappenden Bestandteilen, aufgeklebt auf einer "Backingcard" (Grau), c) Draufsicht auf einen zusammengebauten und bereits durchgeführten hCG-Schnelltest.	153
Abbildung 0-1: REM-Aufnahmen zur Untersuchung des Einflusses der Ziehgeschwindigkeit auf die Morphologie mittels Tauchbeschichtung hergestellter vollflächiger NCPHM. Die Hybride wurden hergestellt auf 50 g/m ² Baumwoll-Linters-Papieren bei 25 °C, 50% RH mit einem NC-Anteil von 7,0% (w/w) im <i>Lacquer</i> . Der Skalierungsbalken der 1000-fachen Vergrößerung beträgt 20 μm und der Skalierungsbalken der 8000-fachen Vergrößerung ist 5 μm	183
Abbildung 0-2: REM-Mikrographen mit einer 500-fachen Vergrößerung von CN-Papieren hergestellt mit einer Säurelösung mit einem Wassergehalt von 19% (w/w). Der Skalierungsbalken ist gültig für alle dargestellten Aufnahmen.	183
Abbildung 0-3: REM-Mikrographen mit einer 2000-fachen Vergrößerung von CN-Papieren hergestellt mit einer Säurelösung mit einem Wassergehalt von 19% (w/w). Der Skalierungsbalken ist gültig für alle dargestellten Aufnahmen.	184
Abbildung 0-4: Fluoreszenzspektrum einer 10 μM Calcofluor White M2R Lösung in Wasser. Das Anregungsspektrum ist in blau dargestellt, das Emissionsspektrum in rot.	184
Abbildung 0-5: Fluoreszenzspektrum einer 10 μM Rhodamin B Lösung in Wasser. Das Anregungsspektrum ist in blau dargestellt, das Emissionsspektrum in rot.	185

Abbildung 0-6: Fluoreszenzspektrum einer 10 μ M FITC Lösung in 1M NaOH. Das Anregungsspektrum ist in blau dargestellt, das Emissionsspektrum in rot.	185
Schema 1-1: Aufbau eines klassischen LFTs zur Detektion von hCG in Urin. Der LFT besteht aus einer Trägerfolie, <i>Sample-Pad</i> , <i>Conjugate-Pad</i> , Membranmaterial (NC) mit Test- und Kontrolllinie und dem <i>Wicking-Pad</i> . Zur besseren Handhabung werden diese Tests in einem Kunststoffgehäuse verbaut (nicht dargestellt).....	3
Schema 1-2: a) LFT vor dem Aufbringen der Testflüssigkeit. In dieser ist der Analyt (z.B. hCG) gelöst. b) LFT nachdem die Testflüssigkeit mit Analyt den Teststreifen durchlaufen hat. c) Positives Testergebnis durch <i>Sandwich</i> -Komplex auf der Testlinie und gebundenes Antikörper-Gold-Konjugat auf der Kontrolllinie. d) Negatives Testergebnis, durch Abwesenheit des Analyts wird kein <i>Sandwich</i> -Komplex gebildet und nur die Antikörper-Gold-Konjugate an den Sekundär-Antikörper der Kontrolllinie gebunden.	4
Schema 1-3: Mechanismus der Entstehung von porösen Strukturen bei der Herstellung von NC-Membranen.....	7
Schema 1-4: Darstellung der verschiedenen Herstellungsverfahren für konventionelle NC-Membranen (Rot), NCPHM (Orange) und CN-Papiere (Grün).....	12
Schema 3-1: Vorgehensweise zur Auswertung von Linienbreiten von ortsdefinierten NCPHM durch Verwendung eines Fluoreszenzimagers. a) Foto von ortsdefinierte NCPHM mit schwachem Kontrast. b) Fluoreszenzaufnahme von ortsdefinierten NCPHM mit Rhodaminfärbung.	23
Schema 3-2: Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten entlang vollflächig beschichteter NCPHM zur Bestimmung der proteinbindenden Eigenschaften und Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Positionsinformation auf den Proben.....	24
Schema 4-1: Schematischer Ablauf der Herstellung von vollflächigen NCPHM. a) - c) Die Beschichtung der Papiere mit NC- <i>Lacquer</i> kann mit verschiedenen Beschichtungsmethoden (Tauchbeschichtung a), Rakeln b), Leimpresse c) realisiert werden. Die NCPHM werden mit Detergens beschichtet, um das Material für die Anwendung als in diagnostischen Assays einsetzbar zu machen.....	28
Schema 4-2: Herstellungsprozess für ortsdefinierte NCPHM. Liniendruckverfahren unter Verwendung a) einer gebogenen Kanüle und b) eines Dosierpinsels zum Aufbringen des NC- <i>Lacquers</i> . Zur Beschichtung mit Detergens werden die Materialien in eine Detergenslösung eingelegt.....	44
Schema 4-3: Schema zur Einstufung verschiedener Linienqualitäten von ortsdefinierten NCPHM. Das Basispapier ist in Grau dargestellt, der aufgebrauchte NC- <i>Lacquer</i> in Rot. a) Konstante Linienbreite und homogene Verteilung des aufgebrauchten NC- <i>Lacquers</i> innerhalb der Linie. b) Konstante Linienbreite mit inhomogener Materialverteilung innerhalb der Linie. c) Variation in der Linienbreite mit homogener Verteilung des NC- <i>Lacquers</i> . d) Variation in der Linienbreite und inhomogene Verteilung des NC- <i>Lacquers</i> innerhalb der Linie. Die Umrandung der verschiedenen Fälle entspricht den verschiedenen	

Materialverteilungen: Ideal (a, Grün), akzeptabel (c, Orange) und inhomogen/inakzeptabel (b, d, Rot).....	45
Schema 4-4: Schematische Darstellung von vollständigen und geschnittenen Hybridmaterialien. a) stellt ortsdefinierte und b) vollflächig beschichtete NCPHM dar.	56
Schema 4-5: Reaktionsschema zur Umsetzung von Cellulose zu Cellulosenitrat. Abbildung erstellt mit Chemdraw.....	71
Schema 4-6: Darstellung der Herstellung von CN-Papieren durch Einlegen von Baumwoll-Linters-Papier für verschiedene Reaktionszeiten in Nitriersäurelösungen.	71
Schema 4-7: Bindungsspaltung einer Cellobioseeinheit durch Protonenangriff und nachfolgender Hydrolyse.....	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der erhaltenen Linienqualitäten von ortsdefinierten NCPHM auf 50 g/m ³ und 75 g/m ² Papieren. Dargestellt sind die Anzahl der erhaltenen idealen, akzeptablen und inakzeptablen Linienqualitäten in Abhängigkeit der Dosierung, des NC-Anteils im <i>Lacquer</i> und der Applikationsmethode. Die höchsten Werte sind in dunkelblau dargestellt, die niedrigen Werte in dunkelrot.....	48
Tabelle 4-2: Übersicht der ausgewählten ortsdefinierten NCPHM für die Untersuchung als alternatives Membranmaterial in diagnostischen Schnelltests basierend auf den Erkenntnissen aus der Betrachtung der Linienbreite und Homogenität.	53
Tabelle 4-3: Materialeigenschaften der bei Botta et al. ^[140] verwendeten Flüssigkeiten.	62
Tabelle 4-4: <i>Onset</i> -Temperaturen und Temperaturen nach 80% Massenverlust der CN-Papiere.	88
Tabelle 4-5: Übersicht der in dieser Arbeit hergestellten und charakterisierten alternativen Membranmaterialien. Angegeben sind die Bereiche in denen die Herstellungsparameter variiert wurden und die resultierenden Eigenschaften welche für die Anwendbarkeit der Materialien in diagnostischen <i>Assays</i> wichtig sind. Verglichen wurden die vollflächigen- und ortsdefinierten NCPHM, CN-Papiere mit unbehandelten Baumwoll-Linters-Papieren und konventionellen NC-Membranen.	91
Tabelle 8-1: Zusammensetzung der verschiedenen verwendeten <i>NC-Lacquer</i> für die Herstellung verschiedener NCPHM.....	146
Tabelle 8-2: Übersicht über verschiedene Beschichtungsmethoden und deren verwendeten Parameter für die Herstellung von NCPHM.....	146
Tabelle 8-3: Zusammensetzung der angesetzten Nitrierlösungen.	148

Abkürzungsverzeichnis

®	Registrierte Marke
°C	Grad Celsius
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
AGU	<i>Anhydroglucose unit</i> , Anhydroglucose Einheit
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	Backscattered Electrons, Rückstreuungselektronen
CA	Celluloseacetat
ca.	circa
CFW	Calcofluor White
CFT	kapillare Fließzeit
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i> , Konfokalmikroskopie
cm	Zentimeter
cm ⁻¹	reziproke Zentimeter, Wellenzahl
CN-Papiere	Cellulosenitrat-Papiere
COVID	<i>coronavirus disease 2019</i>
d	Durchmesser
denat.	denaturiert
DI Wasser	Deionisiertes Wasser
DIN	Deutsches Institut für Normung
DS	<i>Degree of Substitution</i> , Substitutionsgrad
EDX	Energiedispersive Röntgenanalyse
EP	<i>Extended Pressure</i> , erweiterter Druckbereich
et al.	lateinisch: et alii, et aliae, et alia; deutsch: und andere
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-BSA	Fluoresceinisothiocyanat markiertes Bovines Serumalbumin
g	Gramm

GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HBsAg	<i>Hepatitis-B-surface-Antigen, Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen</i>
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCl	Salzsäure
HF	HiFlow
HNO ₃	Salpetersäure
IPA	Isopropanol
IR	Infrarotspektroskopie
ISO	<i>International Organization for Standardization,</i> Internationale Organisation für Normung
K	Kelvin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton, atomare Masseneinheit
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kv	Kilovolt, Beschleunigungsspannung
L	Liter
LFA	<i>Lateral-Flow-Assay</i>
LFT	<i>Lateral-Flow-Test</i>
M	mol/L, molar
m ²	Quadratmeter
mAb	Monoklonale Antikörper
max.	maximal
mbar	Millibar, Druckeinheit
mg	Milligramm, Masseneinheit
min	Minuten, Zeiteinheit
min.	mindestens, minimal

mIU	Milliunits
mm	Millimeter, Längeneinheit
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
n-BuOH	Butanol
NC	Nitrocellulose
NCPHM	Nitrocellulose-Papier-Hybridmaterial
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i> , analysenrein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Polyethylenterephthalat
PMMA	Polymethylmethacrylat
POCT	<i>Point-of-Care-Test</i>
Pt/Pd	Platin/Palladium-Legierung
puriss.	<i>purissimum</i> , reinst
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RH	relative Luftfeuchtigkeit
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SDBS	Natriumdodecylbenzylsulfonat
SE	Sekundärelektronen
T	Temperatur
t	Zeit
T, C	Testlinie, Kontrolllinie
TGA	Thermogravimetrische Analyse
™	<i>Unregistered Trade Mark</i> , nicht amtlich registrierte Warenmarken

u.a.	unter anderem
USA	<i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
v/v	Volumenanteil
vgl.	vergleiche
VP	<i>Variable Pressure</i> , Variabler Druckbereich
vs.	versus
w/v	Massenkonzentration
w/w	Massenanteil
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
ZnSe	Zinkselenid
η	Viskosität
θ	Kontaktwinkel
v	Valenzschwingungsbande

Anhang

REM-Mikrographen von vollflächigen NCPHM

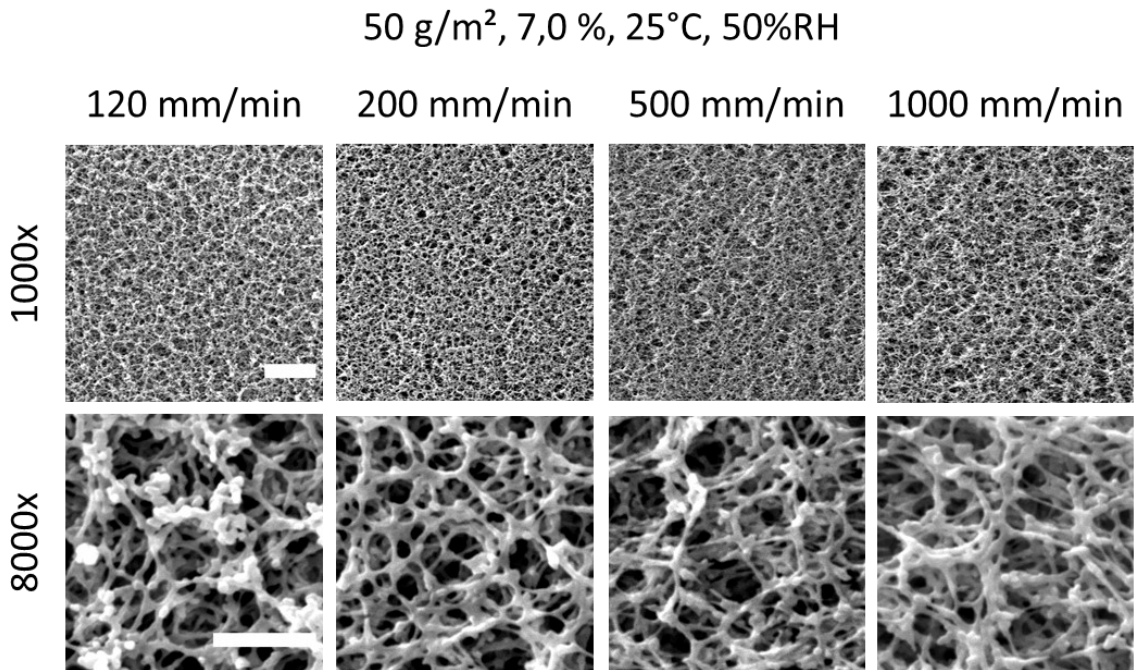


Abbildung 0-1: REM-Aufnahmen zur Untersuchung des Einflusses der Ziehgeschwindigkeit auf die Morphologie mittels Tauchbeschichtung hergestellter vollflächiger NCPHM. Die Hybride wurden hergestellt auf 50 g/m² Baumwoll-Linters-Papieren bei 25 °C, 50% RH mit einem NC-Anteil von 7,0% (w/w) im *Lacquer*. Der Skalierungsbalken der 1000-fachen Vergrößerung beträgt 20 µm und der Skalierungsbalken der 8000-fachen Vergrößerung ist 5 µm.

REM-Mikrographen der CN-Papiere, hergestellt mit 19% (w/w) Wassergehalt in der Säurelösung

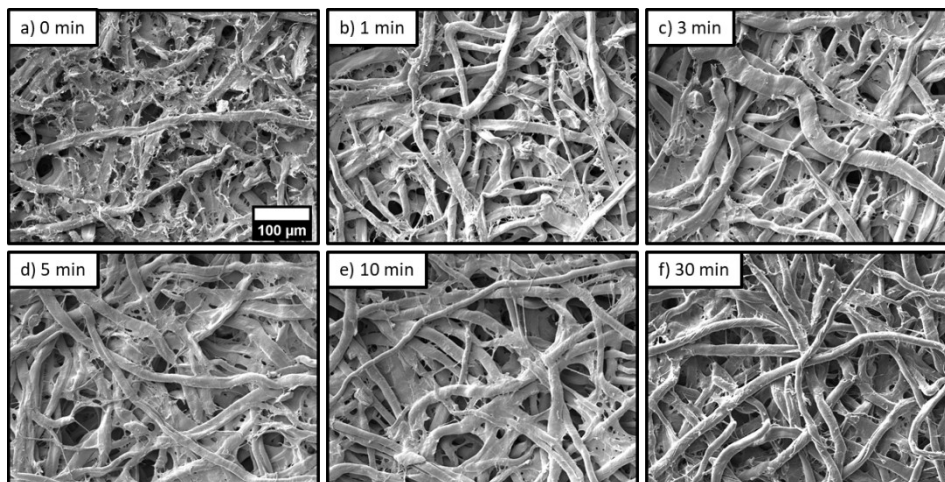


Abbildung 0-2: REM-Mikrographen mit einer 500-fachen Vergrößerung von CN-Papieren hergestellt mit einer Säurelösung mit einem Wassergehalt von 19% (w/w). Der Skalierungsbalken ist gültig für alle dargestellten Aufnahmen.

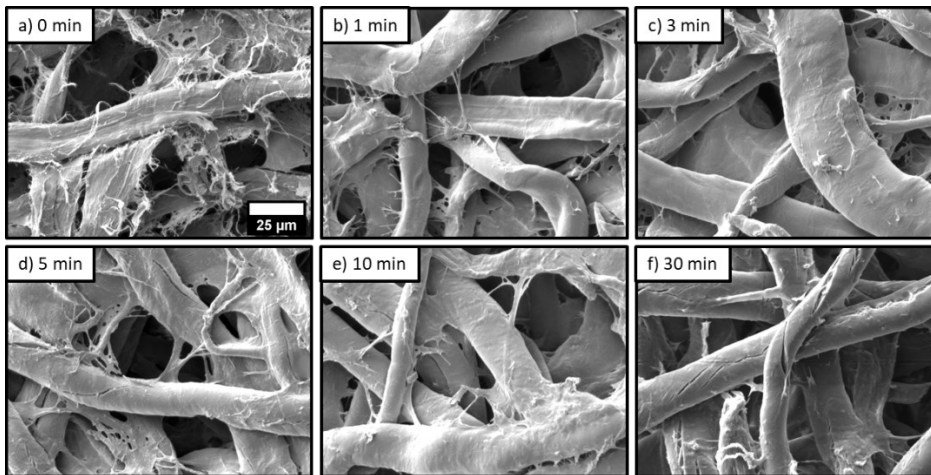


Abbildung 0-3: REM-Mikrographen mit einer 2000-fachen Vergrößerung von CN-Papieren hergestellt mit einer Säurelösung mit einem Wassergehalt von 19% (w/w). Der Skalierungsbalken ist gültig für alle dargestellten Aufnahmen.

Fluoreszenzspektren verwendeter Fluorophore

Fluoreszenzspektrum von Calcofluor White M2R

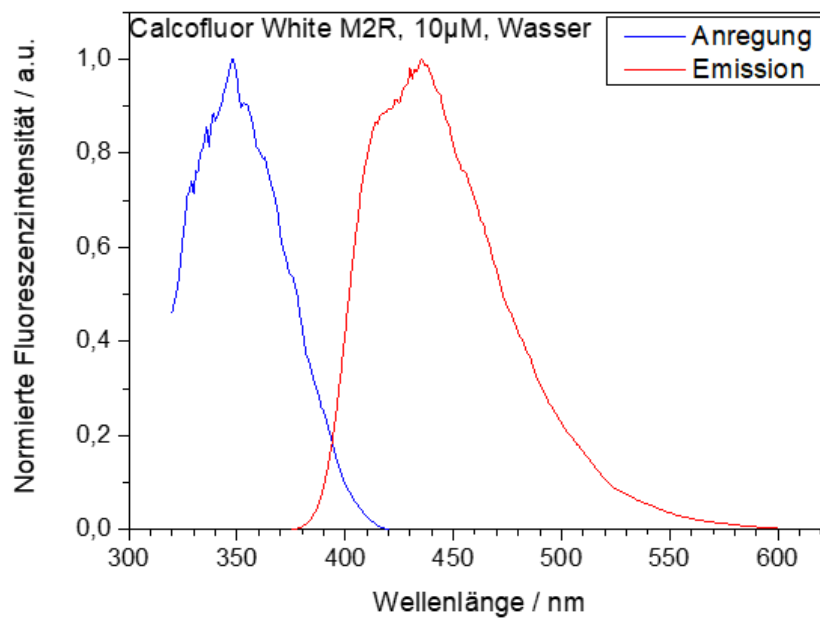


Abbildung 0-4: Fluoreszenzspektrum einer 10 μ M Calcofluor White M2R Lösung in Wasser. Das Anregungsspektrum ist in blau dargestellt, das Emissionsspektrum in rot.

Fluoreszenzspektrum von Rhodamine B

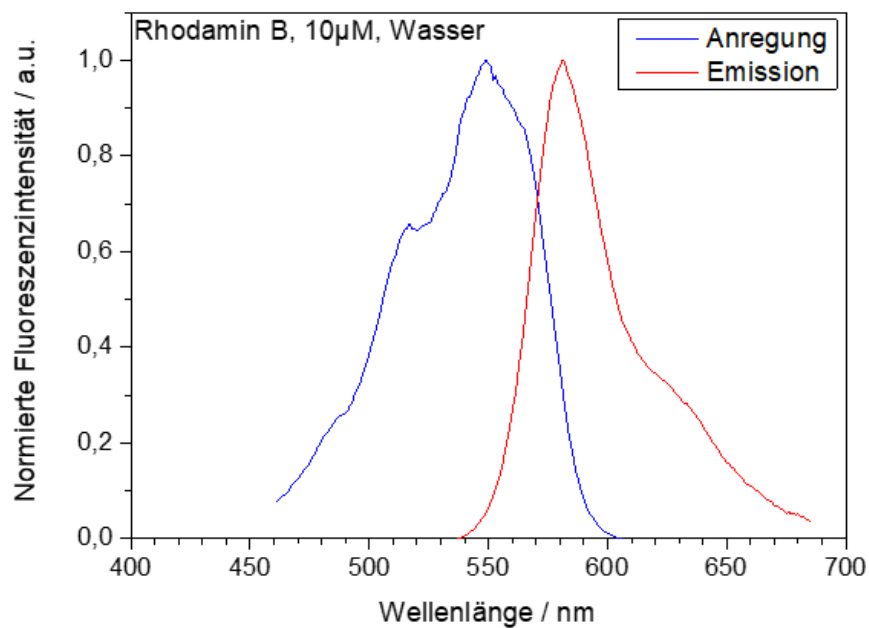


Abbildung 0-5: Fluoreszenzspektrum einer 10 µM Rhodamin B Lösung in Wasser. Das Anregungsspektrum ist in blau dargestellt, das Emissionsspektrum in rot.

Fluoreszenzspektrum von FITC

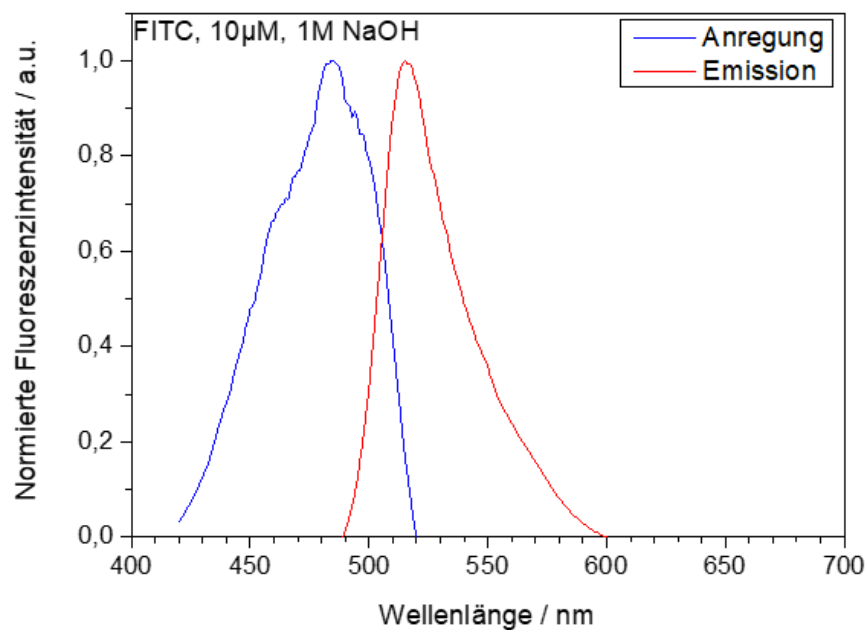


Abbildung 0-6: Fluoreszenzspektrum einer 10 µM FITC Lösung in 1M NaOH. Das Anregungsspektrum ist in blau dargestellt, das Emissionsspektrum in rot.

Erklärungen

§8 Abs. 1 lit. c der Promotionsordnung der TU Darmstadt

Ich versichere hiermit, dass die elektronische Version meiner Dissertation mit der schriftlichen Version übereinstimmt und für die Durchführung des Promotionsverfahrens vorliegt.

§8 Abs. 1 lit. d der Promotionsordnung der TU Darmstadt

Ich versichere hiermit, dass zu einem vorherigen Zeitpunkt noch keine Promotion versucht wurde und zu keinem früheren Zeitpunkt an einer in- oder ausländischen Hochschule eingereicht wurde. In diesem Fall sind nähere Angaben über Zeitpunkt, Hochschule, Dissertationsthema und Ergebnis dieses Versuchs mitzuteilen.

§9 Abs. 1 der Promotionsordnung der TU Darmstadt

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen verfasst wurde.

§9 Abs. 2 der Promotionsordnung der TU Darmstadt

Die Arbeit hat bisher noch nicht zu Prüfungszwecken gedient.

Darmstadt, den 27.07.2023

(Name und Unterschrift)