

# Chip-basierte Freiflusselektrophorese mit integrierter Nanospray-Massenspektrometrie-Kopplung\*\*

Christian Benz, Michael Boomhoff, Johannes Appun, Christoph Schneider und Detlev Belder\*

**Abstract:** Die Freiflusselektrophorese ist ein ideales Hilfsmittel zur mikropräparativen Trennung im kontinuierlichen Durchfluss. Mit unserem Ansatz zur Kopplung von Freiflusselektrophorese und Massenspektrometrie können nun auch nicht-fluoreszierende Stoffe erfasst und massenspektrometrisch identifiziert werden. Die Funktionalität der Methode und das Potential als integrierte Trenneinheit im kontinuierlichen Mikrodurchfluss wurden am Beispiel einer Mehrkomponenten-[3+2]-Cycloaddition demonstriert.

Chiplaboratorien sind vielversprechende Hilfsmittel in der modernen Chemie<sup>[1]</sup> mit dem Potential, unterschiedliche Prozesse wie die chemische Synthese<sup>[2]</sup> und die analytische Überwachung<sup>[3]</sup> auf einem einzigen Substrat zu vereinen.<sup>[4]</sup> Dies eröffnet ganz neue Möglichkeiten zum Studium chemischer Prozesse in geringsten Größen- und Zeitskalen, wobei wegen des naturgemäß kleinen Durchsatzes eher die Information als das isolierte chemische Produkt im Vordergrund steht.<sup>[5]</sup> Der minimale Ressourcenverbrauch und die stark erhöhte Geschwindigkeit diffusionskontrollierter Prozesse<sup>[6]</sup> ermöglichen eine rasche Optimierung und Erforschung chemischer Synthesen,<sup>[7]</sup> beispielsweise zum Screening von Katalysatoren.<sup>[8]</sup> Eine Voraussetzung, um auch komplexere chemische Synthesen realisieren zu können, ist die Integration von Prozessen zur Aufarbeitung von Reaktionsgemischen. Insbesondere zur Realisierung mehrstufiger Synthesen sind Trennprozesse häufig unverzichtbar. Chemische Synthesen werden in solchen Chiplaboratorien vielfach als kontinuierliche Durchflussreaktoren<sup>[2a-c, 6d, 9]</sup> umgesetzt, die sich durch übliche Verfahren der Mikrosystemtechnik einfach implementieren lassen. Die Integration von nach- oder zwischengeschalteten kontinuierlichen Trennprozessen ist jedoch anspruchsvoll.<sup>[10]</sup> Während die Kombination von chemischer Synthese<sup>[7-9]</sup> mit nachfolgender analytischer Trennung realisiert werden konnte, ist eine mikropräparative Auftrennung,

bei der die aufgereinigten Substanzen einem weiteren Prozess zugeführt werden können, ungleich schwieriger. Es wurden bereits bemerkenswerte mikrosystemtechnische Lösungen, wie die diskontinuierliche On-Chip-Destillation,<sup>[11]</sup> der Einsatz von chemischen Fängerreagentien<sup>[12, 13]</sup> oder die kontinuierlich arbeitende Flüssig-flüssig-Extraktion, präsentiert.<sup>[14]</sup> Zur Systemintegration ist die Mikro-Freiflusselektrophorese (μFFE) besonders vielversprechend, da sie sich nahtlos mit kontinuierlichen Durchflussreaktoren auf einem Chip kombinieren lässt.<sup>[15]</sup>

Eine Schwierigkeit bei der μFFE ist jedoch die analytische Verfolgung des Trennprozesses. Von speziellen Ausnahmen wie Raman-spektroskopischer Detektion<sup>[16]</sup> oder Zellsensork<sup>[17]</sup> abgesehen, basieren alle Detektionsansätze auf der Fluoreszenz,<sup>[18]</sup> mit entsprechend limitiertem Anwendungspotential für die organische Synthese. Um die μFFE zur intermediären Aufarbeitung von Reaktionsgemischen in integrierten Chipsystemen nutzen zu können, ist die Entwicklung eines geeigneten Detektionsverfahrens essenziell. Einer der interessantesten Ansätze ist die Kopplung mikrofluidischer Chips mit der Massenspektrometrie (MS), mit der Möglichkeit der eindeutigen Identifikation von Substanzen.<sup>[3d, 19]</sup> Die MS-Kopplung der Freiflusselektrophorese ist ungleich komplexer, da die getrennten Substanzbanden örtlich nebeneinander ließen, anstatt wie bei anderen Trennverfahren hintereinander zu eluieren. Allerdings haben Chartogne et al. am Beispiel der isoelektrischen Fokussierung von Proteinen gezeigt, dass auch eine miniaturisierte Variante der FFE prinzipiell an die MS gekoppelt werden kann.<sup>[20]</sup> Hierbei wurde eine konventionell mit Platten, Schrauben und Membranen konstruierte mikro-FFE-Zelle über Kapillaren mit einem Massenspektrometer verbunden.

Hier beschreiben wir nun einen Ansatz, mit dem die μFFE erstmals direkt mit der MS gekoppelt werden kann. Das Elektrospray wird unmittelbar über einen monolithisch integrierten Emitter eines μFFE-Borosilicatglaschips generiert. Der instrumentelle Ansatz zur Kombination von μFFE zur mikropräparativen Trennung auf einem Chip und der MS zur Verfolgung des kontinuierlichen Fraktionierungsprozesses ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Der in Abbildung 1a gezeigte Aufbau umfasst unter anderem ein Trennbett, in dem ein kontinuierlich zugeführtes Substanzgemisch durch ein senkrecht zur Flussrichtung angelegtes elektrisches Feld aufgetrennt wird. Es bilden sich nebeneinander liegende Analytbanden, deren Ablenkungswinkel von der elektrophoretischen Mobilität abhängen und somit in Zusammenhang mit dem Ladungszustand und der Größe der solvatisierten Ionen stehen. Am Ausgang des Trennbetts befinden sich Auslasskanäle, über welche die getrennten Substanzen abgeführt werden. Mittig liegt der

[\*] M. Sc. C. Benz, Prof. Dr. D. Belder

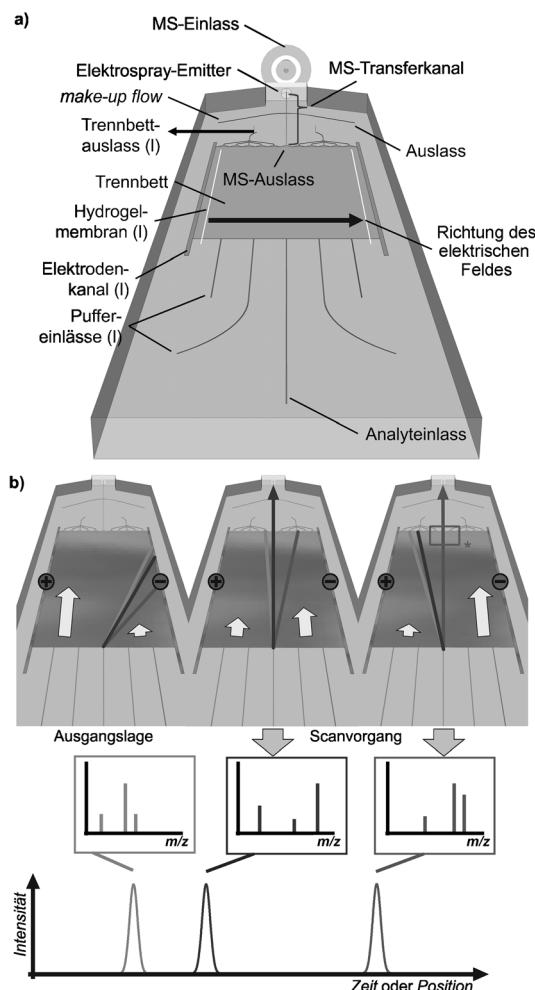
Institut für Analytische Chemie, Universität Leipzig  
Linnéstraße 3, 04103 Leipzig (Deutschland)  
E-Mail: belder@uni-leipzig.de

Dr. M. Boomhoff, M. Sc. J. Appun, Prof. Dr. C. Schneider  
Institut für Organische Chemie, Universität Leipzig  
Johannisallee 29, 04103 Leipzig (Deutschland)

M. Sc. C. Benz  
LIFE – Leipziger Forschungszentrum für Zivilisationserkrankungen,  
Universität Leipzig (Deutschland)

[\*\*] Diese Publikation wurde gefördert durch LIFE – Leipziger Forschungszentrum für Zivilisationserkrankungen. Dieses Projekt wird finanziert aus Mitteln des ESF und des Freistaates Sachsen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409663> zu finden.



**Abbildung 1.** a) Aufbau eines mikrofluidischen FFE-MS-Chips (l = links). b) Illustration des Analysenprinzips durch flussgesteuertes Lenken der getrennten Analyten zum MS-Auslass. Pfeilstärken entsprechen den relativen Flussraten, und das Rechteck (\*) entspricht dem Beobachtungsausschnitt.

Transferkanal, der zu einem Elektrosprayemitter führt und vor dem Einlass eines Massenspektrometers positioniert wird.

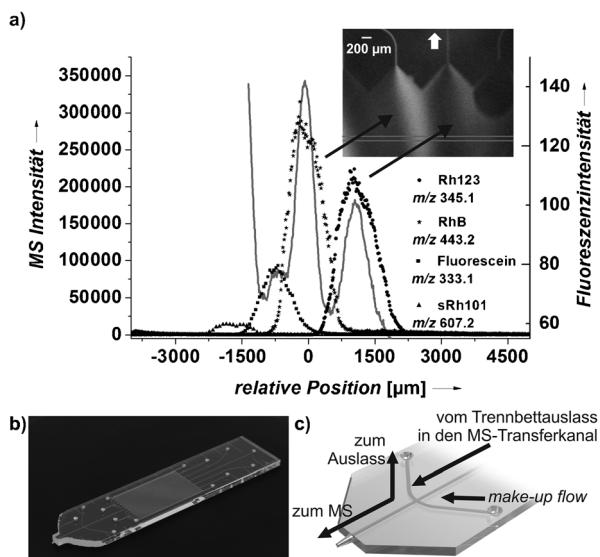
Ein zentraler Aspekt des funktionalen Chiplayouts sind zwei sich kreuzende Kanäle im Bereich des Transferkanals (siehe Abbildung 2c). Über einen „make-up flow“-Kanal können Additive zur Unterstützung des Elektrosprayprozesses zugeführt werden. Gleichzeitig wird über eine elektrische Kontaktierung das Elektrospraypotential definiert. Darüber hinaus dient die Kreuzung als Fluss-Splitter zum Einstellen der Flussrate am Emitter von ca.  $1 \mu\text{L min}^{-1}$ . Dies gelingt über das Anschließen von Restriktionskapillaren variabler Länge am Auslass.

Mit diesem Ansatz zur  $\mu$ FFE-MS-Kopplung kann nun das Trennbett massenspektrometrisch abgetastet werden. Dies gelingt durch gezielte Steuerung der Flussraten der flankierenden Pufferströme bei konstantem elektrischem Feld, um die elektrophoretische Trennung beizubehalten. Damit werden die getrennten Banden dem MS-Auslass sukzessive zugeführt (Abbildung 1b). Im Massenspektrometer werden

so zeitlich getrennte Massenspektren der fraktionierten Substanzen erhalten, womit auf die Lage der Banden im Trennbett geschlossen werden kann.

Das zuerst in Kunststoffchips<sup>[21]</sup> optimierte Layout wurde schließlich mit Borosilikatglas als Chipmaterial realisiert und mit Nanosprayemittern<sup>[22]</sup> versehen. Um die Funktion des Systems zu testen, wurden zunächst Fluoreszenzfarbstoffe untersucht, wodurch eine visuelle Verfolgung des Prozesses gelang. Hierzu wurde ein spezieller Epifluoreszenzaufbau unterhalb des Chips vor dem Massenspektrometer positioniert. Die Trennbettdimensionen betragen  $20 \text{ mm} \times 11.7 \text{ mm}$ , die Strukturhöhe  $20 \mu\text{m}$  und die Kanalbreiten  $50 \mu\text{m}$ . Aus Gründen der Einfachheit wurden die weiteren Auslasskanäle des Prototyps in einem anoden- und einem kathodenseitigen Kanal zusammengefasst. Über angeschlossene Restriktionskapillaren wurde ein gleichmäßiger Druckabfall realisiert. Der Eintrag von störenden Elektrolysegasen<sup>[18b]</sup> in das Trennbett wurde durch die Integration von ionenleitenden Hydrogelwänden zwischen Trennbett und Elektrodenraum verhindert.<sup>[18a,f]</sup> In diesem Zuge wurden die Glasoberflächen silanisiert, was einen signifikant unterdrückten elektroosmotischen Fluss zur Folge hatte. Aufbau, Fertigungsprozess und experimentelle Details sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

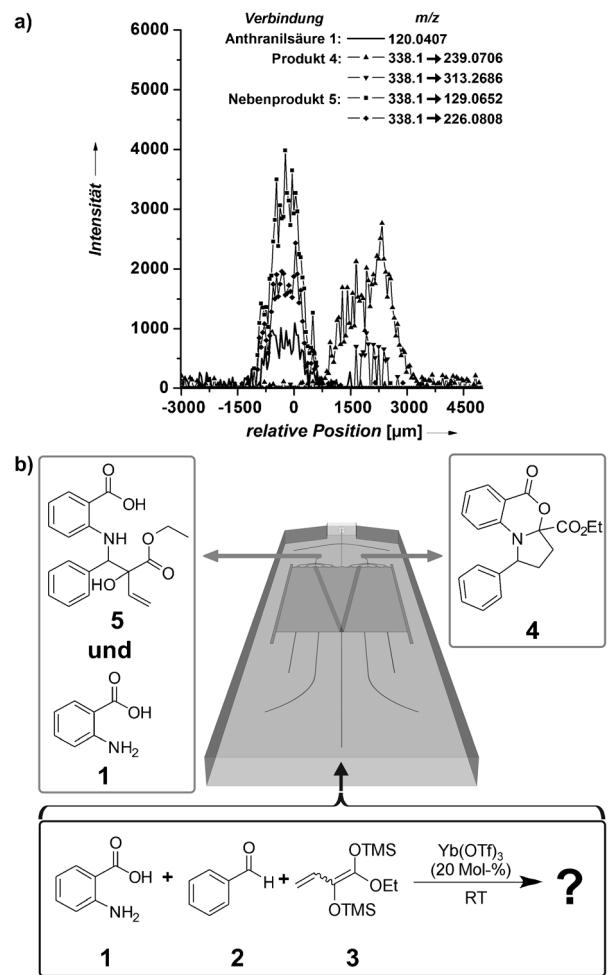
Die Funktion des Systems wurde nun anhand der Trennung eines fluoreszierenden Testgemisches aus Rhodamin 123 (Rh123), Rhodamin B (RhB), Fluorescein und Sulforhodamin 101 (sRh101) evaluiert und optimiert. Hierzu wurde die Lösung des Testgemisches über den Analyteinlass in das Trennbett eingebracht. Durch gezielte Steuerung der flankierenden Pufferströme, bestehend aus einer  $2 \text{ mM}$  Ammoniumacetatlösung (pH 4) in einem Methanol/Wasser-Gemisch (70:30, v/v), wurde der Analytstrahl nach rechts abgelenkt (Abbildung 1b, oben). Hierzu wurden programmierbare Spritzenpumpen eingesetzt. Der Puffer (links) wurde linear von  $13.2$  auf  $0.4 \mu\text{L min}^{-1}$  und Puffer (rechts) von  $0.4$  auf  $13.2 \mu\text{L min}^{-1}$  verändert. Die Flussraten von Analyt, Elektroden und make-up flow (hier identisch mit Trennpuffer) betrugen je Kanal  $0.2$ ,  $6.0$  bzw.  $0.1 \mu\text{L min}^{-1}$ . Nach Anlegen des elektrischen Feldes ( $-602 \text{ V}$ ,  $-33 \mu\text{A}$ ) und daraus resultierender elektrophoretischer Trennung wurden die flankierenden Pufferströme wie angegeben variiert, sodass die aufgetrennten Banden der Analyten innerhalb von  $150 \text{ s}$  im Trennbett von rechts nach links dirigiert wurden und so nacheinander den MS-Auslass überstrichen. Dieser Prozess wurde fluoreszenzvideomikroskopisch überwacht. Die Bande des Fluoresceins befindet sich in der gezeigten Fluoreszenzaufnahme des Chipausgangs weniger gut erkennbar zwischen denen von RhB und sRh101 (Abbildung 2a). Der Transport der Analyten vom MS-Auslass zum Emitter erfordert je nach Gesamtflussrate im Trennbett eine bestimmte Zeit, die durch Abgleich der Fluoreszenz- und MS-Daten für diese Experimente auf  $8 \text{ s}$  bestimmt wurde. Mithilfe der sich zeitlich ändernden Massenspektren gelang die massenspektrometrische Abbildung der Trennung. Die entsprechenden Ionenspuren sind in Abbildung 2a gezeigt, wobei auf der x-Achse der Ort auf dem FFE-Chip relativ zur RhB-Bande dargestellt ist. Die Aufteilung der Flüsse zwischen Emitter und Auslass betrug ca. 1.4:1.



**Abbildung 2.** a) Bestimmung der Position der elektrophoretischen Banden von Rh123, RhB, Fluorescein und sRh101 mit den Konzentrationen 131, 102, 266 bzw. 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$  durch Vergleich der MS- und Fluoreszenzdaten (weißer Pfeil markiert MS-Auslass). Gegenübergestellt sind die extrahierten Ionenspuren der protonierten Molekülionen sowie die Fluoreszenzintensität (in Grau). b) Lichtbildaufnahme eines  $\mu\text{FFE}$ -MS-Chips. c) Vergrößerte Darstellung der „make-up flow“-Struktur. Pfeillängen verdeutlichen die relativen Flussraten.

Nach der erfolgreichen Validierung des Systems wurde eine organische Reaktion untersucht. Wegen der in der Regel fehlenden Eigenfluoreszenz der Reaktanten und Produkte ist dies jedoch schwieriger. Um den Prozess dennoch optisch überwachen zu können, wurde das Gemisch mit einer fluoreszierenden Referenzsubstanz versetzt, deren Lage sich im Chip verfolgen ließ. Als Modellreaktion wurde eine Mehrkomponenten-[3+2]-Cycloanellierung von Anthranilsäure (**1**), Benzaldehyd (**2**) und einem Bis(silyl)diendiolat **3** durchgeführt, die in einer Stufe direkt zu einem Pyrrolobenzoxazinon **4** führt (Abbildung 3). Diese Reaktion lehnt sich an unsere kürzlich beschriebene Herstellung von Pyrrolobenzoxazolen an, sollte jedoch mithilfe des hier vorgestellten Verfahrens unter Verwendung von Anthranilsäure erstmals auf eine zusätzliche Substanzklasse erweitert werden.<sup>[23]</sup> Orientierende Vorversuche in klassischen Batchverfahren unter Variation der Reaktionsbedingungen hatten gezeigt, dass bei der Reaktion außer Produkt **4** in geringen Mengen auch ein durch „ $\alpha$ -Addition“ entstehendes Nebenprodukt **5** gebildet wird.

Zur kontinuierlichen Trennung des Synthesegemisches im entwickelten System wurde eine Lösung aus **1** (1.88  $\mu\text{mol}$ ), **2** (1.88  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{Yb}(\text{OTf})_3$  (0.377  $\mu\text{mol}$ ) und **3** (30.2  $\mu\text{mol}$ ) zusammen mit sRh101 (24.0 nmol) als Referenz über den Analytkanal in den Chip eingebracht. Das Gemisch wurde in 15 mM Ammoniumacetat (pH 6.7; 9:1 Acetonitril/Wasser, v/v) elektrophoretisch aufgetrennt, woraufhin die Banden analog zur oben geschilderten Arbeitsweise innerhalb von 7.5 min über den Auslasskanal gelenkt wurden. Damit wurde das Trennbett massenspektrometrisch abgetastet, wobei der zeitliche Verlauf der MS-Spuren eine Aussage über die Lage



**Abbildung 3.** Versuchablauf und Ergebnisse der Analyse des Produktgemisches einer Mehrkomponenten-[3+2]-Cycloanellierung. a) Extrahierte Ionenspuren von Anthranilsäure (**1**) sowie der spezifischen Fragmente erster Generation der Produkte **4** und **5**; b) Darstellung der erhaltenen Fraktionen.

der nichtfluoreszierenden Banden relativ zur Referenz sRh101 ermöglicht. Über den make-up flow wurde ein Gemisch aus Trifluoressigsäure/Essigsäure/Wasser/Methanol im Verhältnis 3:1:46:50 (v/v) zugeführt. Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abbildung 3 zusammengefasst. Wir konnten mit diesem Ansatz die durch  $\mu\text{FFE}$  getrennten Substanzen auf dem Chip anhand der Massenspektren identifizieren und lokalisieren. So wurden die elektrophoretischen Banden für Produkt **4** und Nebenprodukt **5** mit einem Abstand von  $(2120 \pm 180) \mu\text{m}$  getrennt. Da das Nebenprodukt beim Ionisieren durch Kondensation ein Wassermolekül abspaltet, wird es in der MS ausschließlich als Konstitutionsisomer des Produkts **4** mit einer ähnlich akkurate Masse von 338.1398 gegenüber 338.1440 des Produkts **4** detektiert. Das Nebenprodukt **5** wird unter den gegebenen Bedingungen nicht vollständig von **1** getrennt, eine Unterscheidung von Produkt **4** gelang aber anhand von  $\text{MS}^2$ -Daten. Untersuchungen mithilfe von Kapillarelektrophorese und Tandem-MS stützen diese Befunde. Der Transport der Analytlösung durch den gesamten Chip benötigte bei beiden Experimenten weniger als 2.5 min.

Durch die On-Chip-Kopplung von Freifluselektrophorese und Massenspektrometrie wird die massenspektrometrische Überwachung kontinuierlicher mikropräparativer Trennungen im Mikrodurchfluss ermöglicht. Damit steht ein neues Hilfsmittel für die Realisierung integrierter Chiplaboratorien zur Verfügung, mit der Möglichkeit, die Funktionalitäten von Mikrodurchflusssynthese und -trennung sowie Analytik nahtlos zur vereinen. Dieser neue Ansatz ist vielversprechend für die Realisierung mehrstufiger Synthesen mit intermediären Aufarbeitungsschritten in hochintegrierten Chiplaboratorien.

## Experimentelles

Die mikrofluidischen Glas-Chips wurden nach unseren Vorgaben von iX-factory durch nasschemisches Ätzen in Borosilikatglas (BF33) gefertigt. Es kamen Niederdruckspritzenpumpen (neMESYS) und ein Agilent-Technologies-G6520-Q-TOF-LC/MS zum Einsatz. Fluoreszenzaufnahmen wurden mithilfe eines nach unseren Vorgaben gefertigten, portablen Systemmikroskops (TSO Thalheim Spezialoptik) inklusive LED (Seoul 3.5W, 525 nm, LED-TECH.DE optoelectronics), FITC/Cy3/Cy5-Filter bzw. Cy3-Filter (86016 & UN41007, Chroma Technology) und Farbkamera (WAT221S, Watec) aufgenommen. Für die [3+2]-Cycloanellierung betragen die Trennspannung  $-218\text{ V}$  ( $-159\text{ }\mu\text{A}$ ) und die Flussraten für Analyt, Puffer (l), Puffer (r), make-up flow und Elektroden  $0.08, 12.2\rightarrow0.7, 0.7\rightarrow12.2, 0.18$  bzw.  $6.0\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ . Details hierzu finden sich in den Hintergrundinformationen. Statistische Angaben gelten für 95 % Vertrauensbasis des T-Tests bei dreimaliger Wiederholung.

Eingegangen am 1. Oktober 2014,  
veränderte Fassung am 12. November 2014  
Online veröffentlicht am 21. Januar 2015

**Stichwörter:** Cycloadditionen · Elektrophorese ·  
Kontinuierlicher Mikrodurchfluss · Massenspektrometrie ·  
Mikrofluidik

- [1] a) G. M. Whitesides, *Nature* **2006**, *442*, 368–373; b) A. Arora, G. Simone, G. B. Salieb-Beugelaar, J. T. Kim, A. Manz, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4830–4847; c) A. B. Theberge, F. Courtois, Y. Schaeerli, M. Fischlechner, C. Abell, F. Hollfelder, W. T. S. Huck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5846–5868; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5982–6005; d) R. R. Pompano, W. Liu, W. Du, R. F. Ismagilov, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2011**, *4*, 59–81; e) P. S. Dittrich, A. Manz, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 210–218; f) D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten, R. Zengerle, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1153–1182; g) S. Hardt, T. Hahn, *Lab Chip* **2012**, *12*, 434–442; h) H. N. Joensson, H. Andersson Svahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12176–12192; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12342–12359.
- [2] a) A. J. deMello, *Nature* **2006**, *442*, 394–402; b) R. L. Hartman, J. P. McMullen, K. F. Jensen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7502–7519; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7642–7661; c) C. Wiles, P. Watts, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6512–6535; d) J. Wegner, S. Ceylan, A. Kirschning, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 17–57; e) I. R. Baxendale, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2013**, *88*, 519–552; f) M. Oelgemöller, *Chem. Eng. Technol.* **2012**, *35*, 1144–1152; g) A. Abou-Hassan, O. Sandre, V. Cabuil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6268–6286; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6408–6428; h) A. Popp, J. J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8958–8960; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9092–9095; i) B. Gut-

- mann, J.-P. Roduit, D. Roberge, C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7101–7105; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7255–7259.
- [3] a) J. S. Moore, K. F. Jensen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 470–473; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 480–483; b) A. März, T. Henkel, D. Cialla, M. Schmitt, J. Popp, *Lab Chip* **2011**, *11*, 3584–3592; c) P. S. Dittrich, M. Jahnz, P. Schwille, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 811–814; d) S. K. Küster, S. R. Fagerer, P. E. Verboket, K. Eyer, K. Jefimovs, R. Zenobi, P. S. Dittrich, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1285–1289; e) S. Ehlert, U. Tallarek, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388*, 517–520; f) J. P. Kutter, *J. Chromatogr. A* **2012**, *1221*, 72–82; g) J. Yue, J. C. Schouten, T. A. Nijhuis, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, *51*, 14583–14609; h) P. Jáć, G. K. E. Scriba, *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 52–74; i) S. Ohla, D. Belder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 453–459.
- [4] a) K. Geyer, J. D. C. Codée, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8434–8442; b) D. Belder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3736–3737; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3790–3791; c) D. T. McQuade, P. H. Seeberger, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 6384–6389.
- [5] K. S. Elvira, X. C. I. Solvas, R. C. R. Wootton, A. J. deMello, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 905–915.
- [6] a) D. Janasek, J. Franzke, A. Manz, *Nature* **2006**, *442*, 374–380; b) K. Jähnisch, V. Hessel, H. Löwe, M. Baerns, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 406–446; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 410–451; c) M. Grumann, A. Geipel, L. Rieger, R. Zengerle, J. Dürre, *Lab Chip* **2005**, *5*, 560–565; d) M. Brivio, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *Lab Chip* **2006**, *6*, 329–344; e) V. Hessel, B. Cortese, M. H. J. M. de Croon, *Chem. Eng. Sci.* **2011**, *66*, 1426–1448.
- [7] a) J. P. McMullen, K. F. Jensen, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2010**, *3*, 19–42; b) J. Yoshida, H. Kim, A. Nagaki, *ChemSusChem* **2011**, *4*, 331–340; c) M. Rasheed, T. Wirth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 357–358; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 374–376.
- [8] a) S. Fritzsche, S. Ohla, P. Glaser, D. S. Giera, M. Sickert, C. Schneider, D. Belder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9467–9470; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9639–9642; b) J. Wegner, S. Ceylan, A. Kirschning, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4583–4592; c) B.-B. Xu, Y.-L. Zhang, S. Wei, H. Ding, H.-B. Sun, *Chem.-CatChem* **2013**, *5*, 2091–2099; d) D. Belder, M. Ludwig, L.-W. Wang, M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2463–2466; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2523–2526; e) F. E. Valera, M. Quaranta, A. Moran, J. Blacker, A. Armstrong, J. T. Cabral, D. G. Blackmond, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2478–2485; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2530–2537; f) O. Trapp, S. K. Weber, S. Bauch, W. Hofstadt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7307–7310; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7447–7451; g) E. Vereshchagina, R. A. Wolters, H. J. G. E. Gardeniers, *Sens. Actuators A* **2011**, *169*, 308–316.
- [9] a) M. Oelgemöller, *Chem. Eng. Technol.* **2012**, *35*, 1144–1152; b) T. Rodrigues, P. Schneider, G. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5750–5758; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 5858–5866.
- [10] Siehe Lit. [5, 7a].
- [11] R. C. Wootton, A. J. deMello, *Chem. Commun.* **2004**, 266–267.
- [12] P. H. Seeberger, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 258–260.
- [13] I. R. Baxendale, S. V. Ley, A. C. Mansfield, C. D. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4017–4021; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4077–4081.
- [14] J. G. Kralj, H. R. Sahoo, K. F. Jensen, *Lab Chip* **2007**, *7*, 256–263.
- [15] S. Jezierski, V. Tehsmer, S. Nagl, D. Belder, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11644–11646.
- [16] M. Becker, C. Budich, V. Deckert, D. Janasek, *Analyst* **2009**, *134*, 38–40.
- [17] S. Jezierski, A. S. Klein, C. Benz, M. Schaefer, S. Nagl, D. Belder, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 5381–5386.
- [18] a) D. Kohlheyer, G. A. Besselink, S. Schlautmann, R. B. Schasfoort, *Lab Chip* **2006**, *6*, 374–380; b) D. Kohlheyer, J. C. Eijkel, A. van den Berg, R. B. Schasfoort, *Electrophoresis* **2008**, *29*, 977–993; c) R. T. Turgeon, M. T. Bowser, *Electrophoresis* **2009**,

- 30, 1342–1348; d) J. A. Wen, J. W. Albrecht, K. F. Jensen, *Electrophoresis* **2010**, *31*, 1606–1614; e) Y. A. Song, M. Chan, C. Celio, S. R. Tannenbaum, J. S. Wishnok, J. Han, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2317–2325; f) S. Jezierski, L. Gitlin, S. Nagl, D. Belder, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 2651–2656.
- [19] a) R. S. Ramsey, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1174–1178; b) Q. F. Xue, F. Foret, Y. M. Dunayevskiy, P. M. Zavracky, N. E. McGruer, B. L. Karger, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 426–430; c) S. Koster, E. Verpoorte, *Lab Chip* **2007**, *7*, 1394–1412; d) J. Lee, S. A. Soper, K. K. Murray, *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44*, 579–593; e) G. T. Gibson, S. M. Mugo, R. D. Oleschuk, *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 918–936; f) M. Prudent, H. H. Girault, *Analyst* **2009**, *134*, 2189–2203; g) T. Sikanen, S. Franssila, T. J. Kauppila, R. Kostiainen, T. Kotiaho, R. A. Ketola, *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*, 351–391; h) D. Gao, H. X. Liu, Y. Y. Jiang, J. M. Lin, *Lab Chip* **2013**, *13*, 3309–3322; i) A. E. Kirby, A. R. Wheeler, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6178–6184; j) N. Gasilova, Q. L. Yu, L. Qiao, H. H. Girault, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4408–4412; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4497–4501; k) X. Feng, B. F. Liu, J. Li, X. Liu, *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, DOI: 10.1002/mas.21417.
- [20] A. Chartogne, U. R. Tjaden, J. van der Greef, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 1269–1274.
- [21] S. Köhler, C. Benz, H. Becker, E. Beckert, V. Beushausen, D. Belder, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 520–525.
- [22] P. Hoffmann, U. Haeusig, P. Schulze, D. Belder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4913–4916; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5000–5003.
- [23] M. Boomhoff, C. Schneider, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 4185–4189.