

U n i v e r z i t a P a l a c k é h o v O l o m o u c i

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



## **Mikrofluidika pro bioanalýzu**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:

Bc. Petra Hubáčková

Vedoucí:

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Studijní obor:

Analytická chemie

Olomouc 2018

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci napsala samostatně pod odborným vedením doc. RNDr. Jana Petra, Ph.D. Veškeré literární prameny a zdroje, které jsem v této práci použila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

**Bc. Petra Hubáčková**

## **Poděkování**

Tím to bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytnul při vypracování této diplomové práce a za jeho optimistický přístup. Také bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za velkou podporu po celou dobu mého studia.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Bc. Petra Hubáčková
Název práce:	Mikrofluidika pro bioanalýzu
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2018
Abstrakt:	Tématem diplomové práce je mikrofluidika v bioanalýze. Práce se zabývá dvěma odvětvími mikrofluidiky. Prvním je studium generování segmentovaného toku, které je možné využít v klinické praxi. Druhým odvětvím je nízkonákladová mikrofluidika, do níž patří koncept laboratoř ve stříkačce. Kde se vyvíjel způsob oddělení několika reakcí ve stříkačce.
Klíčová slova:	Mikrofluidika, segmentovaný tok, nízkonákladová mikrofluidika, lab-in-a-syringe
Počet stran:	53
Jazyk:	Český

**Bibliographic identification:**

Author's first name and surname:	Bc. Petra Hubáčková
Title:	Microfluidics for bioanalysis
Type of thesis:	Master thesis
Department:	Department of Analytical Chemistry
Supervisor:	doc. RNDr. Jana Petra, Ph.D.
Year of presentation:	2018
Abstract:	The topic of the master's thesis is microfluidics in bioanalysis. This thesis describes two microfluidics case. The first case is the study of generating segmented flow that can be used in clinical practice. The second case is low-cost microfluidics which belongs the concept of the lab in a syringe. There developed the way to separate several reactions in the syringe.
Key words:	Microfluidics, droplet microfluidics, low-cost microfluidics, lab-in-a-syringe
Number of pages:	53
Language:	Czech

# Obsah

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
2.1 MINIATURIZACE V ANALYTICKÉ CHEMII.....	8
2.2 MIKROFLUIDIKA .....	9
2.2.1 <i>Chování kapalin v mikrofluidních zařízeních</i> .....	9
2.2.2 <i>Materiály pro výrobu mikrofluidních zařízení</i> .....	10
2.2.3 <i>Prvky mikrofluidních systémů</i> .....	12
2.2.4 <i>Separace</i> .....	15
2.2.5 <i>Detekce</i> .....	16
2.3 KONCEPTY MIKROFLUIDIKY .....	18
2.3.1 <i>Mikrofluidika kontinuálního toku</i> .....	18
2.3.2 <i>Digitální mikrofluidika</i> .....	19
2.3.3 <i>Mikrofluidika segmentovaného toku</i> .....	20
2.4 NÍZKONÁKLADOVÁ MIKROFLUIDIKA .....	25
2.4.1 <i>Materiály pro nízkonákladovou mikrofluidiku</i> .....	25
2.4.2 <i>Detekce pro nízkonákladovou mikrofluidiku</i> .....	28
2.4.3 <i>Lab-in-a-syringe (LIS)</i> .....	28
<b>3 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>30</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>31</b>
4.1 GENEROVÁNÍ SEGMENTOVANÉHO TOKU .....	31
4.1.1 <i>Použité chemikálie</i> .....	31
4.1.2 <i>Použité vybavení a přístroje</i> .....	31
4.2 LABORATOŘ VE STŘÍKAČCE.....	32
4.2.1 <i>Použité chemikálie</i> .....	32
4.2.2 <i>Použité vybavení a přístroje</i> .....	32
4.2.3 <i>Příprava směsného roztoku Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> iontů</i> .....	32
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>33</b>
5.1 SEGMENTOVANÝ TOK .....	33
5.1.1 <i>Generování segmentovaného toku v kapilárním uspořádání</i> .....	33
5.1.2 <i>Generování segmentovaného toku na mikročipu</i> .....	34
5.2 LABORATOŘ VE STŘÍKAČCE.....	37
5.2.1 <i>Detekce jednoho iontu</i> .....	37
5.2.2 <i>Detekce dvou iontů v jedné stříkačce</i> .....	39
5.2.3 <i>Oddělení dvou reakcí ve stříkačce teflonovou fólií</i> .....	40
5.2.4 <i>Oddělení dvou reakcí ve stříkačce vrstvou vosku</i> .....	42
5.2.5 <i>Oddělení dvou reakcí ve stříkačce pomocí prstencového uspořádání</i> .....	44
5.2.6 <i>Oddělení tří reakcí ve stříkačce</i> .....	45
<b>6 ZÁVĚR</b> .....	<b>50</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ</b> .....	<b>51</b>

# 1 Úvod

Trendem dnešní doby je používat miniaturizaci snad téměř ve všech vědních odvětvích. Jinak tomu není ani u chemie a biologie. Je zde snaha o vývoj co nejmenších, snadno ovladatelných, přenosných a levných zařízení, která vůči běžně používaným laboratorním přístrojům neztrácí na citlivosti a přesnosti.

Těmto vlastnostem odpovídají zařízení na bázi mikrofluidiky. Většinou se jedná o čipy, které mají rozměry jednotek až desítek mikrometrů. Výhodou je nízká spotřeba reagensů i samotného vzorku, kterého často bývá nedostatek. Pracují řádově v objemech piko až nanolitřů. Na čípech se integrují procesy od předběžné úpravy až po detekci vzorku. Tyto zařízení se označují jako tzv. laboratoř na čipu (lab-on-a-chip).

Podoborem mikrofluidiky je tzv. „droplet microfluidics“ neboli mikrofluidika segmentovaného toku. Kde jsou vytvářeny kapičky kapaliny v proudu jiné nemísitelné kapaliny. Tato metoda je perspektivní pro klinickou chemii. Výhodou použití je v uzavírání „nákladu“, jako jsou buňky nebo molekuly, v kapičkách. A následná analýza jednotlivých kapek. To umožňuje například analýzou rakovinných buněk najít odlišné buňky a blíže prozkoumat jejich chování.

Pro klinickou praxi je perspektivní i vývoj nízkonákladové mikrofluidiky, která by mohla být užitečná v rozvojových zemích. Tyto testy nevyžadují vyškolený personál, jsou snadno přenosné a poměrně levné. Na jednom zařízení lze provést i více operací. Nízkonákladové mikrofluidní testy by mohli vést ke zlepšení zdravotní péče v těchto oblastech.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Miniaturizace v analytické chemii

Analytická chemie se stala důležitým nástrojem v oblastech od monitorování životního prostředí až po odvětví, která se zabývají živou přírodou, jakou jsou farmacie a klinická diagnostika. S rychle se vyvíjejícími vědními obory rostou i požadavky na analytická zařízení. Požadavky se týkají množství vzorku, počtu testů na vzorek, času a rozpočtu. Miniaturizované analytické systémy na bázi laboratorních čipů, založených na mikrofluidních technologiích, se jeví jako možné řešení těchto požadavků [1, 2].

Vývoj miniaturizovaných zařízení vznikl z problémů při on-line monitorování průmyslových procesů. Ideálně by měl proces monitorování probíhat s minimálním časovým zpožděním, aby operátor mohl včas zareagovat na pozorované změny. To však vyžaduje vysoce automatizované analytické systémy. Jednou z možností jsou chemické a biologické senzory, které převádějí analytický signál na signál elektrický. Ten je průběžně měřený. Snímače mají rychlou odezvu, vysokou reprodukovatelnost a velký dynamický koncentrační rozsah. Mezi nedostatky patří nízká selektivita a omezená životnost. Alternativou je „Total Analysis System“ (TAS). Je založen na spojení vzorkování, předběžného zpracování vzorku (ředění, filtrace, značení, ...), separaci analytu, detekci a získávání dat do jednoho zařízení. Problémem je, že tyto zařízení mají velikost standardních laboratorních přístrojů, a proto je zde přenos vzorků pomalý a účinnost separace je omezena difúzí. Celkově je i velká spotřeba vzorku a reagenčních činidel. K překonání těchto problémů byla navržena miniaturizovaná verze tzv. „Micro Total Analysis System“ ( $\mu$ TAS). V  $\mu$ TAS jsou analytické součásti integrované na planární čip. Pro tyto mikrofluidní zařízení je typická velikost prvků v rozsahu mikrometrů. Budoucností integrovaných systémů by mohla být tzv. „Lab-on-a-chip“, kdy by celé chemické a biologické laboratorní postupy byly sjednoceny na mikročipu [1].



## 2.2 Mikrofluidika

Mikrofluidika se začala rozvíjet na přelomu 80. a 90. let. Zabývá se generováním a řízením pohybů proudící kapaliny v kanálcích a v dutinách mikrofluidních zařízení. Umožňuje manipulaci s malými objemy kapalin (typicky nl a pl). Dochází zde k tisíce násobnému snížení reakčních objemů a také ke zkrácení času analýz. Mikrofluidika představuje nový a výkonný nástroj pro provádění analýz na úrovni jedné buňky nebo jedné molekuly [2–5].

### 2.2.1 Chování kapalin v mikrofluidních zařízeních

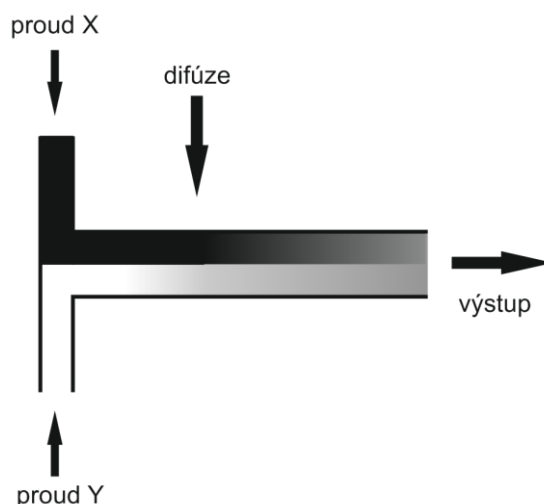
Tekutiny se v mikrofluidních zařízeních chovají jinak oproti kapalinám v makro systémech. Výhodou je, že se můžou uplatnit takové principy, které na makroskopické úrovni nelze použít.

Malé rozměry mají vliv na důležité analytické procesy, těmi jsou míchání, separace a detekce v proudu kapaliny, které brání turbulentnímu míchání. Dominují zde viskózní síly nad silami setrvačnými, což vede k laminárnímu toku, kde dvě kapaliny mohou proudit bez turbulentního míchání. Zda je tok laminární nebo turbulentní charakterizuje Reynoldsovo číslo ( $Re$ ). To je vyjádřeno vzorcem:

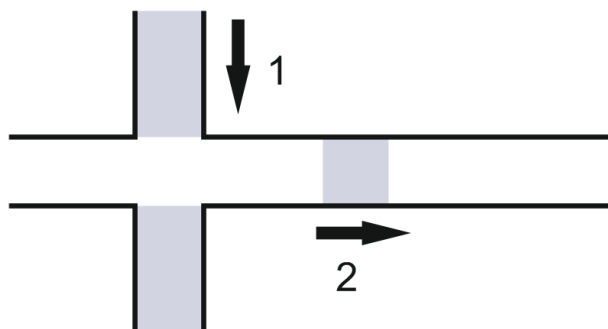
$$Re = \frac{r_h \cdot \rho \cdot v}{\eta} \quad (1)$$

kde  $r_h$  je průměr kapiláry nebo kanálku,  $\rho$  je hustota kapaliny,  $v$  průměrná rychlost proudění kapaliny a  $\eta$  dynamická viskozita kapaliny. Reynoldsovo číslo je bezrozměrné. Čím vyšší je číslo, tím pravděpodobnější je tvorba turbulentního proudění. Pokud je  $Re < 2300$ , jedná se o laminární tok. Při hodnotách okolo 2300 začíná tekutina vykazovat známky turbulence. V běžných systémech na makro úrovni, v kterých je laminární tok, má Reynoldsovo číslo hodnotu větší než 2000. Oproti tomu, v mikrosystémech je jeho typická hodnota menší než 1, protože jsou rozměrově stonásobně menší. Pokud by mělo být  $Re$  zachováno, musela by se stonásobně zvýšit rychlost proudění, což je těžko dosažitelné [1, 6].

V důsledku působení laminárního toku dochází k tomu, že dva nebo více proudů, které tečou ve vzájemném kontaktu se míchají pouze difúzí (Obrázek 1). Další technikou, která umožňuje laminární tok je vytvoření paketů kapaliny. Z každé strany paketu probíhá difuze, ale jinak pakety zůstávají skoro nezměněné. Pakety lze řídit a pomocí nich je umožněna například buněčná analýza (Obrázek 2) [6].



Obrázek 1: Dva proudy (X a Y), které proudí v kontaktu se budou míchat pouze difúzí. Čím déle jsou proudy v kontaktu, tím je větší míra difúze [6]



Obrázek 2: Kapalína proudí ve směru označeným číslem 1 s minimálním únikem do kolmého kanálu. Další tekutina proudí ve směru 2 a anaší paket v tomto směru [6]

Jak již bylo výše zmíněno difúze zajišťuje míchání a transport. Je dána rovnicí:

$$d^2 = 2Dt \quad (2)$$

kde  $d$  je vzdálenost, kterou se částice pohybuje v čase  $t$  a  $D$  je difuzní koeficient částice. Pro malou molekulu, která má difuzní koeficient  $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , je čas difúze 15 min při dráze 1 mm, 10 s při dráze 100  $\mu\text{m}$  a 100 ms při dráze 10  $\mu\text{m}$ . Kratší doba difúze zvyšuje výměnu molekulárních informací [1, 6].

### 2.2.2 Materiály pro výrobu mikrofluidních zařízení

Mikrofluidní zařízení mohou být vyráběna z různých materiálů, pomocí různých metod. Vyrábí se ze skla, křemíku a polymerů. Sklo a křemík, jsou materiály, které byly využívány hlavně na počátku vývoje. Nyní roste využití polymerů, z nichž nejvýznamnější je polydimethylsiloxan (PDMS). Využívají se také mikrofluidní papírové zařízení, které jsou důležité pro nízkonákladovou mikrofluidiku [4, 7].

## **Křemík a sklo**

Technologie výroby byla převzata z mikroelektronického průmyslu, kde už byla dobře zvládnutá. Tyto materiály jsou vysoce chemicky a tepelně stabilní, pevné a v případě skla i transparentní. Nevýhodou je jejich křehkost. Nejčastější výroba křemíkových čipů je pomocí fotolitografie a leptáním motivů směsí HF a HNO<sub>3</sub>. Povrch destičky, který nemá být leptán je chráněn vrstvou oxidu křemičitého. Na tuto vrstvu je nanesen fotorezistentní materiál, a ten je odstraněn na definovaných místech. Po vyleptání se na křemíkovou destičku s kanálky nechá působit vysoká teplota a elektrický proud a tím dojde ke spojení se skelněnou destičkou. Dochází k uzavření kanálků. Leptání se používá i u skleněných destiček, ale liší se leptacím roztokem. Leptací roztok obsahuje HF a NH<sub>4</sub>F [1, 8, 9].

Alternativním postupem pro vytvoření kanálků je použití laseru. Přímá metoda, u které není zapotřebí využívat nebezpečné leptací chemikálie a není kladen důraz na čisté prostory. Výhodou je i jednoduchá tvorba kanálků o různé hloubce [10].

## **PDMS (polydimethylsiloxan)**

Později se začaly vyrábět miniaturizované analytické systémy z polymerů. Z důvodu široké škály dostupných polymerů. Nejpoužívanějším polymerem je polydimethylsiloxan (PDMS). Je to opticky transparentní elastomer, má nulovou toxicitu a je propustný pro plyny. Této vlastnosti se využívá při experimentech s živými buňkami. Výhodou je schopnost výroby pomocí replikačních technologií, což umožňuje rychlou a levnou výrobu. Nevýhodou je například adheze některých organických látek, nízká elektrická vodivost a rozpustnost nějakými organickými rozpouštědly [1, 11].

U mikročipů vyrobených z polymerů se využívá tzv. měkké litografie a existuje několik postupů pro výrobu. Jedním z nich je metoda vytlačení za tepla, kde se negativní šablona lisuje do tenké vrstvy termoplastického polymeru. Poté se systém vyhřeje nad teplotu měknutí polymeru a šablona se odstraní. Další technologií je vstřikování polymerů. Roztavený termoplastický polymer se vstřikuje do evakuované komory, obsahující šablonu s vysokou přesností. Po ochlazení komory je pak připravený polymer v požadovaném tvaru podle šablony [1].

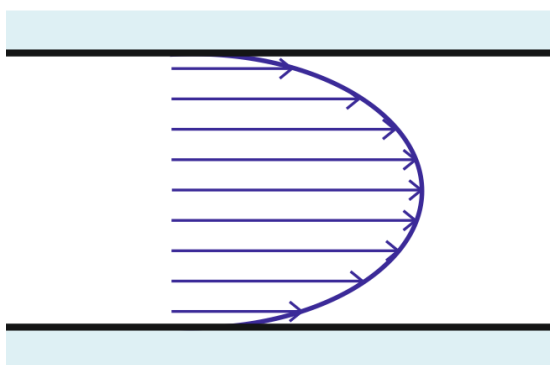
Někdy je vyžadována modifikace mikrokanálového povrchu, tak aby vykazoval určité vlastnosti. To lze dosáhnout několika technikami. Jedním z nich je ukládání organosilanů [4].

## 2.2.3 Prvky mikrofluidních systémů

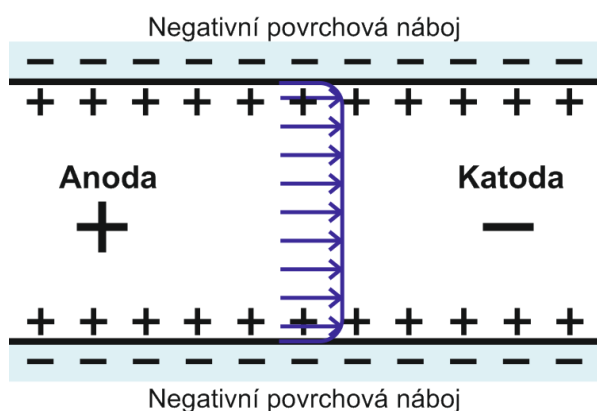
### Pumpy

K čerpání v mikrofluidních kanálcích jsou k dispozici různé typy pump. Liší se svými vlastnostmi, jako je průtok, stabilita, účinnost a spotřeba energie. Metod čerpání je také několik. Nejčastěji používané jsou metody, založené na hydrodynamickém a elektroosmotickém průtoku [4, 6].

Hydrodynamické čerpání vyžaduje aplikaci tlaku např. pomocí injekční stříkačky nebo hydrostatických a odstředivých sil. Jeho průtok je parabolický (Obrázek 3). Oproti tomu, čerpání na bázi elektroosmotického toku nastává, když je aplikován rozdíl napětí v mikrosystému, který obsahuje nabitě plochy. Na povrchu kanálu je vytvořena elektrická dvojvrstva a vložené napětí pohání roztok kanálem. Profil toku je zde téměř plochý (Obrázek 4) [4].



Obrázek 3: Parabolický profil toku v mikrokanálu, který vytváří hydrodynamická pumpa [4]

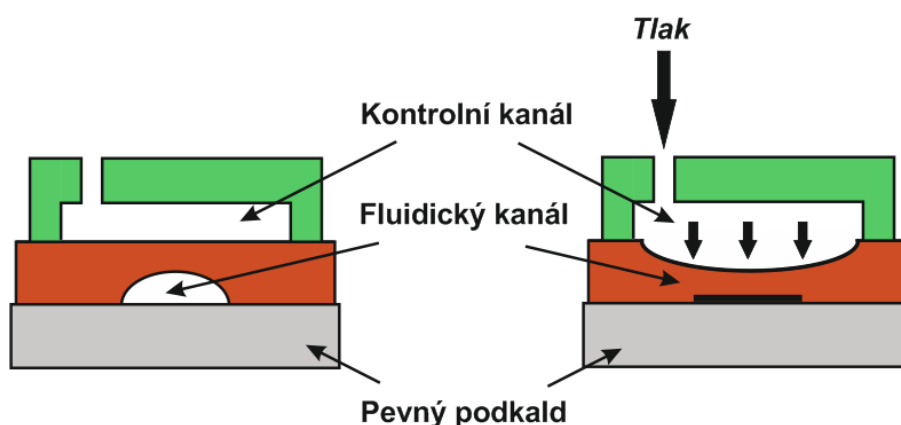


Obrázek 4: Plochý profil toku v mikrokanálu, generovaný EOF [4]

## Ventily

Integrované ventily jsou důležitou součástí mnoha mikrofluidních systémů. Existují dvě skupiny ventilů, pasivní a aktivní. Pasivní ventily nevyžadují přidanou energii a používají se k omezení průtoku v jednom směru, k odstranění vzduchu nebo k dočasnému zastavení toku. Aktivní ventily potřebují pro svou činnost energii, kterou jim většinou poskytují externí makrosystémy. Některé konstrukce zahrnují například elektromagneticky ovládaný mikroventil, vzduchový tlakový ventil nebo využívají energie z hnací kapaliny [4, 6].

Nejběžnějším typem je tzv. „Quake“ ventil. Fluidní kanál, vyrobený z PDMS, je uzavřen pomocí tlaku vzduchu na kontrolní kanál přítomný ve vrstvě, která se nachází nad nebo pod ním. Uvolnění tlaku umožňuje opětovné otevření ventilu. Tyto pneumatické ventily umožňují komplexní a vysoce paralelní zpracování v mikrofluidické velkoplošné integraci [4].



Obrázek 5: Jedná se o „Quake“ ventil. Tlak vzduchu je aplikován přes kontrolní kanál, čímž se PDMS fluidický kanál zavře [4]

## Mixéry

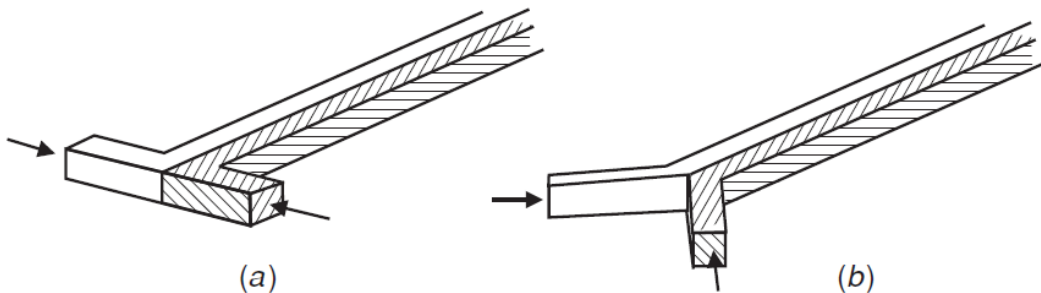
Míchání je základním procesem, který je vyžadován pro biologické a chemické aplikace v mikrofluidice. V mikroměřítku, podmínky laminárního toku, dovolují míchání pouze pomocí difúze. To probíhá pomalu a v některých analýzách je míchání potřeba urychlit. Proto ke zlepšení mísení reakční složek v mikrofluidních kanálech existuje řada metod. Slouží k tomu, aby se dosáhlo ještě rychlejších reakcí a vazeb. Tyto metody jsou od návrhů kanálků až po použití silových polí, které vyvolávají turbulenci uvnitř toku [4, 6].

V mikrofluidních zařízeních existují dva způsoby směšování proudící kapaliny. Jedná se o pasivní a aktivní mixéry. Pasivní mikromixéry používají ke směšování geometrii kanálu,

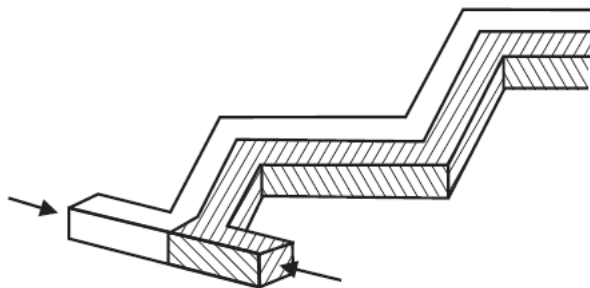
aby se zvětšila plocha, na které dochází k difúzi. Aktivní mikromixéry potřebují externí zdroje pro zvětšení oblasti mezi proudy kapalin [6].

Pasivní mikromixéry mají jednodušší koncept a nepotřebují k směšování externí zdroje energie. Míchání pomocí pasivních mixérů se díky laminárnímu toku spoléhá pouze na molekulární difúzi a chaotickou advekci. Pro zlepšení difúze, jak již bylo zmíněno výše, se zvětšuje kontaktní plocha mezi kapalinami a s tím spojené zkrácení difúzní dráhy. Chaotická advekce je realizována manipulací laminárního toku v mikrokanálech. Jednoduché konstrukce pasivních mikromixérů jsou robustní, stabilní a snadno integrovatelné do složitějších systémů. Mohou být rozděleny do kategorií podle upořádání směsných fází: laminární (paralelní a sériové), injekční, kapkové mikromixéry a mikromixéry založené na chaotické advekci [12].

Nejjednodušší a nejčastěji se vyskytující jsou T-mixér (Obrázek 6 a) a Y-mixér (Obrázek 6 b), které patří do skupiny paralelních laminárních mixérů. Základní konstrukcí je dlouhý kanál se dvěma vstupy. Tyto mixéry rozdělují vstupní proudy do dílčích toků a poté jsou spojeny do jednoho proudu jako lamely. Dalším zajímavým a neméně důležitým pasivním mixérem je mixér „cik-cak“ (Obrázek 7), založený na chaotické advekci [12].



Obrázek 6: Paralelní laminární mikromixéry: a) základní T-mixér b) Y-mixér [12]

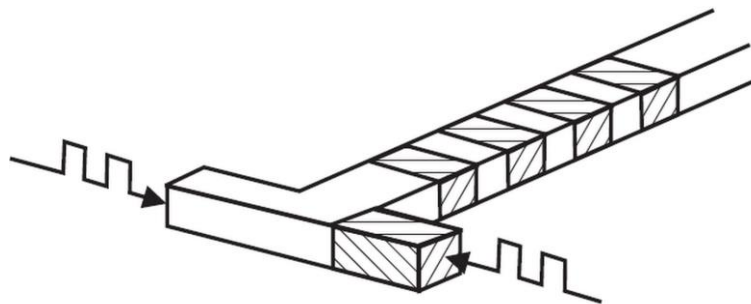


Obrázek 7: Planární konstrukce pro míchání chaotickou advekci. „Cik-cak“ tvar kanálu [12]

Aktivní mikromixéry používají externě generovanou energii pro proces míchání. Mohou být rozděleny právě podle typů vnější energie jako je tlak, teplota,

elektrohydrodynamika, dielektroforetika, elektrokinetika, magnetohydrodynamika a akustika. Aktivní mixéry mají vysokou efektivitu míšení, ale jejich struktury jsou často komplikované a vyžadují složité výrobní procesy. Integrace aktivních mikromixérů do mikrofluidních systému je náročná a nákladná [12].

Příkladem aktivních mikromixérů je T-mixér sériové segmentace, který je poháněný tlakem. Mixér je integrován do mikrofluidního zařízení společně s mikropumpou, která pohání a zastavuje průtok v mísícím kanálu. Díky tomu, zde dojde k rozdělení smíšené kapaliny na segmenty. Mikropumpa je důležitá také proto, aby míchání bylo nezávislé na proudění [12].

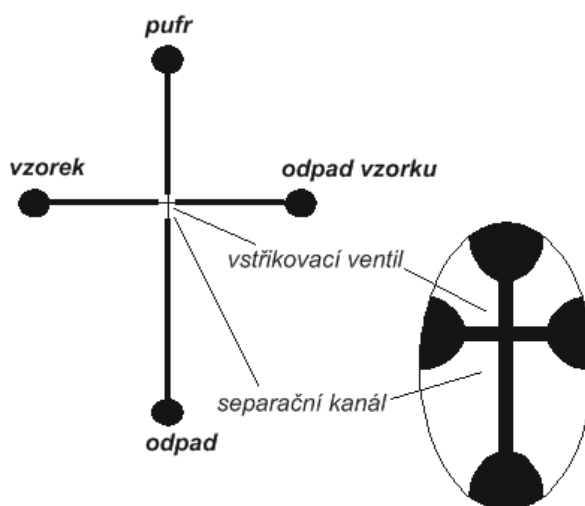


Obrázek 8: Aktivní mikromixér sériové segmentace, poháněný tlakem [12]

#### **2.2.4 Separace**

Základním úkolem mikrofluidiky je separace a analýza vzorků směsi. Jako první byla použita separace pomocí kapilární elektroforézy na čipu. Separace je snadno miniaturizována a dosahuje výkonnostního nárůstu. Díky těmto vlastnostem je nejúspěšnější a nejčastěji používanou aplikací pro separaci v mikrofluidních zařízeních [4].

Elektroforetická separace probíhá převážně na čípech křížového tvaru. Pro kratší mikrokanály je účinnost separace postupně omezena rozšiřováním píků. Rozšiřování způsobuje vstřikování vzorku a podélná difúze během separace a detekce. Časy analýzy jsou krátké, proto je podélná difúze omezena a detekční oblast odpovídá malému segmentu separačního kanálu velikosti mikrometru. V křížovém vstřikování se nejprve aplikuje elektrické pole v oblasti od vstupu vzorku směrem k odpadu vzorku, tak aby se vyplnil celý kanál. Malé elektrické potenciály se aplikují do tlumivého roztoku a zásobníku odpadu, aby nedošlo k úniku vzorku do separačního kanálu. Poté je hlavní elektrické pole přivedeno do tlumivého roztoku a odpadu. Dojde k nastříknutí vzorku a následné separaci [1].



Obrázek 9: CE mikročip křížového tvaru [1]

Další významnou separační technikou na čipu je chromatografie, a to zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Ze začátku byla málo aplikovaná z důvodu potřeby vysokého tlaku pro analýzu na mikročipu a s tím spojená složitá integrace vysokotlakých mikropump do mikrosystému. Později se začalo k proudění využívat elektrické pole, které pomáhá k realizaci chromatografické separace. Elektrické pole není ovlivněno miniaturizací systému. V systémech se používají mikrokanály plněné porézním polymerem, který slouží jako stacionární fáze. Polymer má velkou povrchovou plochu, může být selektivně vzorován a umožňuje elektroosmotický tok pomocí zabudovaných elektrolytů [1, 4].

Oddělení částic a buněk je také velmi cennou separací pro mikrofluidiku. Dochází zde k oddělení cílových částic od matrice. Třídění a počítání buněk je důležitý proces pro biologické studie. Jako je například oddělení krevních buněk od plazmy, což je rozhodující krok pro analýzu. S částicemi nebo buňky může být v mikrokanálu manipulováno pomocí bariér nebo sil, jako je magnetismus, povrchová akustická vlna, dielektroforéza a některé další. Techniky se aplikují na zachycení částic/buněk, pro oddělení, vystavení chemickým činidlům a pozorování změn. Dalším způsobem je použití kontinuálního toku. Kde se vzorek čerpá přes mikrokomoru, která vychyluje částice. To je způsobeno opakovaným použitím bariéry nebo působením silového pole, dokud nedojde k úplné separaci částic [4].

### **2.2.5 Detekce**

Pro mikrofluidiku se rozvíjí spousta detekčních metod. Detekce probíhá on-line, přímo na čipu, nebo off-line konvekčními metodami. Detekce konvekčními metodami je možná pouze tehdy, lze-li odebrat dostatečný objem vzorku. Detekce na čipu se používá za účelem



plně integrovaného systému nebo při sledování děje v reálném čase. Aplikují se metody optické detekce. Zejména fluorescence, ale také absorbance nebo chemiluminiscence. Měření intenzity fluorescence je velmi citlivá metoda a fluorescenčně značené chemikálie jsou dobře dostupné. Pomocí fluorescence se měří parametry jako teplota, funkce buňky, rychlost průtoku a profil průtoku. Detekce může probíhat i pomocí elektrochemických metod, kde se integrují elektrody na čip během jeho výroby. Významný vývoj zaznamenala také detekce hmotnostní spektrometrií [4, 6].

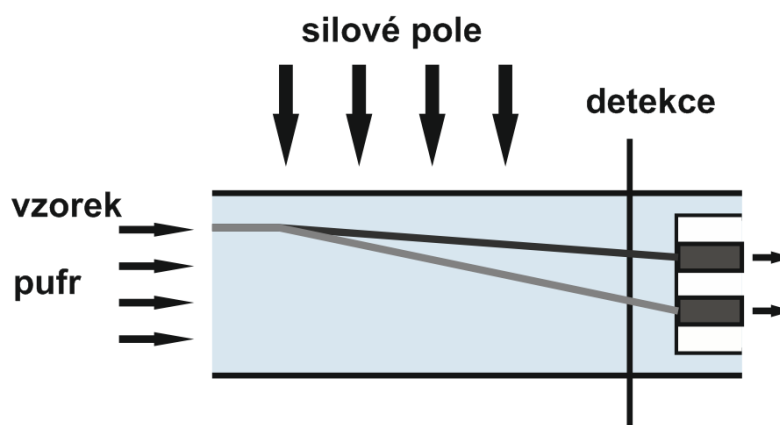
Nejběžnější detekční metodou pro separační systém na mikročipu je laserová indukovaná fluorescenční detekce (LIF). Je to velmi citlivá metoda, která umožňuje detekci na úrovni jedné molekuly. Laserový paprsek vyvolává fluorescenci z molekul analytu, které jsou buď nativně fluorescenční nebo značené. Emitovaná fluorescence je detekovaná CCD (charge-coupled device) kamerou nebo fotonásobičem. Alternativou drahých a objemných laserových zařízení se staly světelné diody (LED). Jsou levnější, menší a mohou být snadno integrovány na mikročip [1].

## 2.3 Koncepty mikrofluidiky

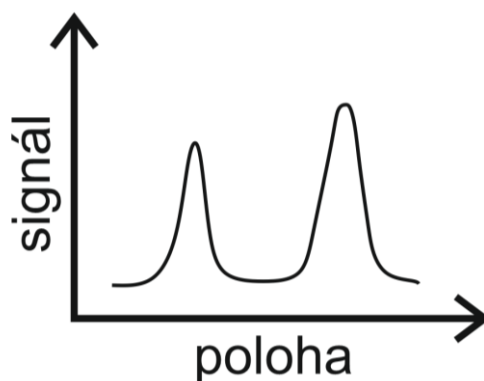
Existuje několik pod-oborů mikrofluidiky. Hlavními koncepty jsou mikrofluidika kontinuálního toku, digitální mikrofluidika a mikrofluidika segmentovaného toku.

### 2.3.1 Mikrofluidika kontinuálního toku

V mikrofluidice kontinuálního toku je vzorek nepřetržitě přiváděn do separačního kanálu. Není nutné vstřikování malého a přesného množství vzorku, jako je tomu například u chromatografie nebo elektroforézy. Síla působí na komponenty vzorku většinou v kolmém úhlu vzhledem ke směru toku (Obrázek 10). Proto mají složky vzorku odlišné cesty přes separační kanál a jsou shromažďovány v různých vývodech. Účinnost separace může být sledována v reálném čase a parametry separace se mohou měnit za účelem optimalizace podmínek. Signál je detekován v závislosti na poloze (Obrázek 11). To umožňuje průběžnou zpětnou vazbu pro separační parametry a také souvislý sběr vzorků. Byla použita velká škála sil pro separaci komponent vzorku. Patří sem elektrické nebo magnetické pole, stojaté ultrazvukové vlny nebo inteligentní konstrukce průtokových překážek [13].



Obrázek 10: Separace kontinuálním tokem: vzorek se vstříkuje kontinuálně společně s nosnou kapalinou do široké separační komory, působí zde síla v kolmém úhlu k proudění a složky vzorku jsou odkloněny, a tak prostorově odseparovány [13].



Obrázek 11: Separace kontinuálním tokem: závislost signálu na poloze [13]

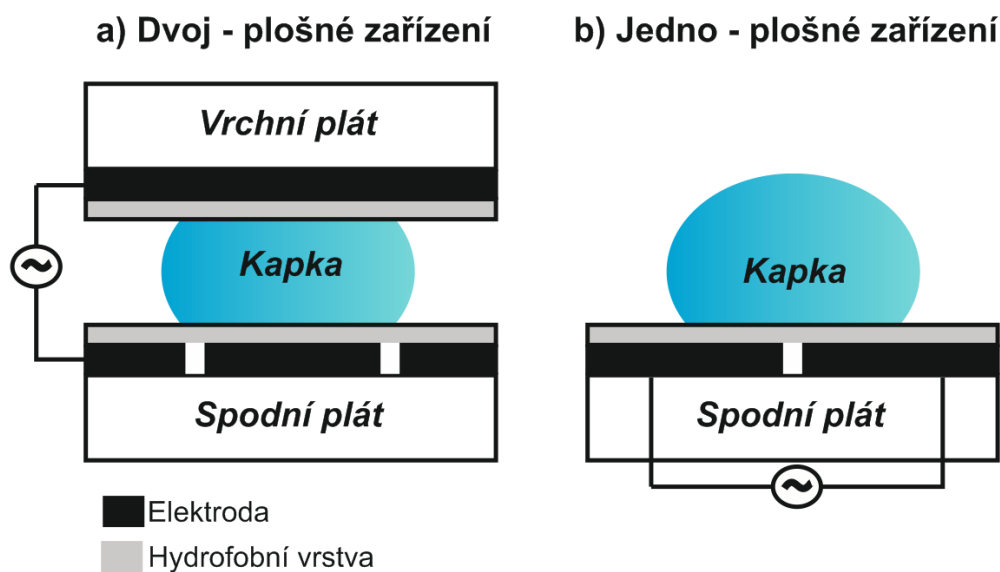
Mikrofluidika kontinuálního toku se využívá například při purifikaci DNA, s malým objemem vzorku a činidla, pro PCR. Zajímavou aplikaci zveřejnili Brody a kol. [14] a Crowley a Pizziconi [15], filtrovali plazmu z plné krve prostřednictvím kontinuálního toku. Ten zabraňoval ucpání nebo zaseknutí buněk. Tak jako ostatní mikrofluidiky, mikrofluidika kontinuálního toku našla uplatnění při separaci buněk a lýze bílých krvinek [16].

### **2.3.2 Digitální mikrofluidika**

Digitální mikrofluidika je technologie, která slouží, tak jako ostatní typy mikrofluidiky, k manipulaci s kapalinami. Byla popularizována počátkem roku 2000 skupinou Faira [17] a Kima [18]. Kapalina je umístěna, ve formě diskrétních kapek, v integrovaných mikrofluidních zařízeních. Existuje dvouplášťový nebo otevřený systém. Ve dvouplášťovém (uzavřeném systému), jsou kapky vloženy mezi spodní a horní vrstvu (Obrázek 13 a). V otevřeném systému jsou kapičky umístěny na horní ploše jediného substrátu (Obrázek 13 b). V integrovaných systémech je kapkami manipulováno pomocí řady elektrod. Ty jsou pokryty hydrofobním izolátorem, aby se zabránilo „přilepení“ kapičky na povrch. Pohyb kapek je řízen za účelem spojování, smíchání, rozdělení nebo separování. Stejně jako ostatní mikrofluidiky, využívá digitální mikrofluidika výhod nízké spotřeby činidel a rychlého přenosu tepla. Na rozdíl od ostatních metod, je v digitální mikrofluidice každá kapka řízená jednotlivě bez potřeby kanálku, čerpadel, ventilů nebo mechanických míchadel. Výhodou je, že mohou být používány i pevné vzorky, protože v systému nehrozí k ucpání kanálku [19, 20].



Obrázek 12: Obrázek platformy pro digitální mikrofluidiku [21]



Obrázek 13: Ukázka digitální mikrofluidiky. A) Dvoj-plošné zařízení. B) Jedno-plošné zařízení [21]

Digitální mikrofluidika nachází uplatnění v oblastech chemie, biologie i medicíny. Tím, že každá kapka jde ovládat jednotlivě, lze ji použít při práci s buňkami, která je důležitá pro biologii a medicínu. Jako je třídění buněk, analýza buněčných lyzátů, testování biochemicky intaktních buněk a vyhodnocování mechanických a elektrických buněčných odpovědí. Také ji můžeme využít při PCR, imunitních testech a klinických testech. Digitální mikrofluidika je vhodnou metodou i pro některé chemické syntézy organických látek [20, 22].

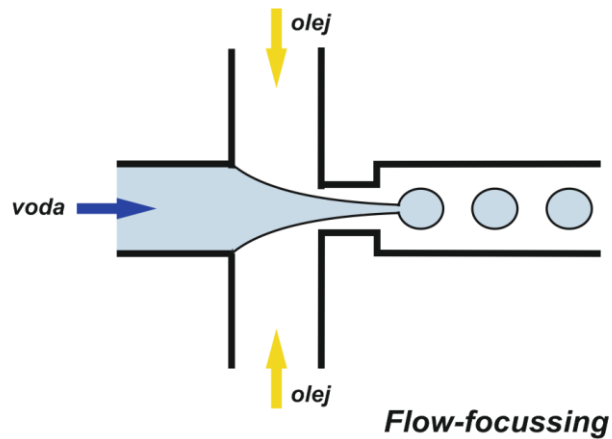
### 2.3.3 Mikrofluidika segmentovaného toku

Mikrofluidika segmentovaného toku se stala obzvlášť cenným nástrojem pro chemické a biologické procesy. Zařízení pro tvorbu segmentovaného toku produkují kapky jedné kapaliny v druhém nemísitelném nosném médiu. Produkce kapek využívá řadu geometrií mikrofluidních kanálů, kde je monodisperzní soustavou voda v oleji (w/o) přeměněna na řadu stejně velkých femto až nano litrových kapiček rychlostí až 100 kHz. Každá z kapiček je mikroreaktor se specifickým chemickým složením a zapouzdřeným „nákladem“. Tím mohou být například částice, buňky a biomolekuly (DNA, proteiny). V rámci každé kapky lze provést oddělený experiment, který může odhalit heterogenitu vzorku [4, 23, 24].

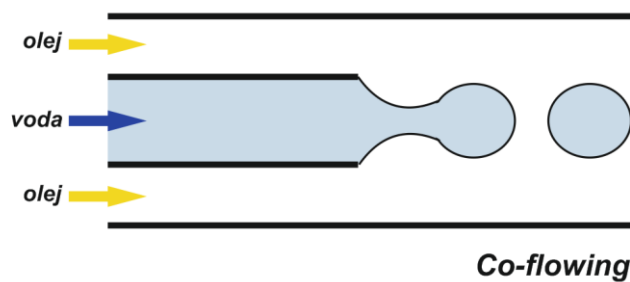
### Princip tvorby kapek

Pro generování kapek se používají aktivní módy, jako jsou piezoelektrické ovladače a elektrická pole. Ale častěji se pro generování monodisperzních kapek vody v oleji uplatňují tlakové hubice s tryskami s proudovým zaostřením tzv. flow-focussing geometrie (Obrázek 14), co-flowing uspořádání (Obrázek 15) nebo zařízení ve tvaru písmene T,

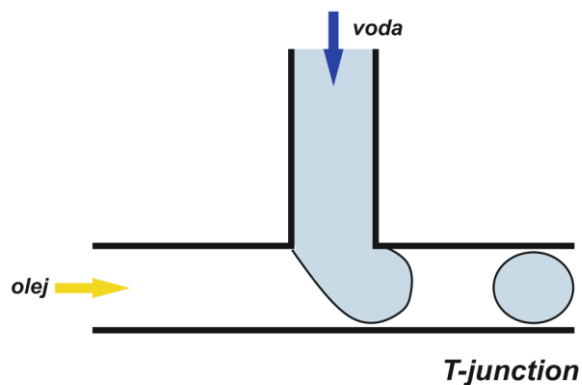
T-junction (Obrázek 16). Jsou známy i V-junction a dvojité T-junction, které pro zatím nenašli velké uplatnění. Tyto metody mají výhodu v tom, že pro zvýšení propustnosti lze jednoduše přidat paralelní kanál, protože nevyžadují individuální ovládání. Vzniká tak kaskádovitě rozhraní, pomocí něj se generují kapičky v sérii a jsou vytvořeny komplexnější emulze v emulzích. [23, 24].



Obrázek 14: Flow-focusing mikrofluidní geometrie kanálu pro výrobu kapiček [24]



Obrázek 15: Co-flowing mikrofluidní geometrie kanálu pro výrobu kapiček [24]



Obrázek 16: T-junction mikrofluidní geometrie kanálu pro výrobu kapiček [24]

Základní funkční princip pro každou výše popsanou geometrii je stejný. Rozhraní je vytvořeno mezi dvěma tekoucími nemísitelnými kapalinami, kde se jedna kapalina odděluje do kapiček, které jsou obklopeny druhou kapalinou. Jedna tekutina se stává dispergovanou fází (ta, která tvoří kapičky) a druhá kontinuální fází (ta, která obklopuje kapičky). To je řízeno příslušnými povrchovými silami kapalin. Ve většině případů, např. při použití hydrofobních PDMS kanálů a soustavy voda v oleji (w/o), se vodná fáze disperguje a olej tvoří fází kontinuální. Naopak je to, pokud jsou kanály modifikovány a jejich povrch je hydrofilní. Pro více emulzí je nutné střídání hydrofilních a hydrofobních povrchů kanálu [24].

V geometrii typu flow-focusing a co-flowing, se kapičky vody v oleji oddělují od vodného proudu kapaliny tehdy, když smykové napětí oleje překoná povrchové napětí, které udržuje kapičky připojené k vodnému hrdlu. Pro trysky T-junction platí, že při nízkých průtocích oleje, jeho proud tlačí na vodné kapičky v tu chvíli, kdy vodný proud blokuje kontinuální průtokový kanál. Čímž dochází k nárůstu tlaku, a to vede k tvorbě kapiček. Při vyšších průtocích oleje vzniká smykové tření a kapky se oddělují podobným způsobem jako u flow-focusing a co-flowing geometrie. Velikost a rychlost tvorby kapek závisí na kombinaci rychlosti průtoku vodné a olejové fáze, geometrii trysek, příslušných dynamických viskozitách ( $\eta$ ) a hustotách ( $\rho$ ), a mezifázovém napětí ( $\sigma$ ). Rovnováha mezi setrvačností, viskozitou a mezifázovým napětím upravuje tvorbu kapiček a omezuje jejich tok [23].

Vztah mezi setrvačností a mezifázovým napětím je daný Weberovým číslem:

$$We = \frac{\rho \cdot U^2 \cdot D_h}{\sigma} \quad (3)$$

kde  $\rho$  je hustota vodné kapaliny,  $U$  střední rychlost,  $\sigma$  mezifázové napětí mezi oběma nemísitelnými kapalinami a  $D_h$  hydraulický průměr kanálu. Při stanovování dynamiky pro tvorbu kapiček je společně s Weberovým číslem ( $We$ ) stěžejní i číslo kapilární ( $Ca$ ). To představuje poměr viskózních sil k silám mezifázovým a je dán vztahem:

$$Ca = \frac{\eta \cdot U}{\sigma} \quad (4)$$

kde  $\eta$  je viskozita olejové tekutiny,  $U$  střední rychlost a  $\sigma$  mezifázové napětí mezi oběma nemísitelnými kapalinami.  $We$  a  $Ca$  ilustrují význam setrvačných, viskózních a mezifázových sil. Weberovo číslo vodné fáze a kapilární číslo olejové fáze společně

poskytují jakési zmapování režimu tvorby kapiček a označují přechod od stálých kapek k tryskání.

Při malých průtokových rychlostech vody a oleje ( $We \ll 1$  a  $Ca \ll 1$ ), vodné formy kapaliny od sebe oddělují vodní hrdlo, aby se minimalizovala povrchová energie, a tím dojde ke vzniku monodisperzních kapiček. Při větších průtokových rychlostech vody ( $We \sim 1$  nebo větší) začnou setrvačné síly převládat nad silami mezifázovými. Při kriticky vysokém  $We$  se vodní hrdlo pohybuje jako široký nestabilní proud vodné tekutiny z trysky. Přechod od kapání k tryskání také nastává, když stoupá průtok oleje ( $Ca \sim 1$  nebo větší). V případech kdy je  $Ca$  kriticky velké, dochází k tomu, že viskózní síly z vnějšího nosného oleje táhnou vodní tok natolik, aby překonaly síly mezifázového napětí. To způsobí protáhnutí vnitřní kapaliny na bázi vody do dlouhých tenkých proudů [23].

U T-junction, jsou trochu odlišné rozdělovací mechanismy, které vedou k přechodům od kapání k tryskání. Při nízkých  $Ca$  (nízký průtok oleje) se vodná fáze pohybuje na rozhraní s kontinuální olejovou fází, kde vytváří ucpání kanálku. Tlak působí proti proudu tak dlouho, až tlaková síla překoná síly mezifázové a kapka se uvolní z hlavního proudu. Při zvyšujícím se  $Ca$  (vyšší průtok oleje), tok deformuje kapičku tak, že vodný proud zcela nezakrývá průtokový kanál. Podobně jako u režimů flow-focusing a co-flowing, se monodisperzní kapičky vytvářejí jako smyčka oleje táhnoucí kapičku z hlavního vodného proudu [23].

Aby bylo zajištěno plynulé vytváření kapiček v proudu, v systémech co-flowing nebo T-junction, musí být vodné a olejové průtoky dostatečně malé, aby se zabránilo setrvačnému a smykovému tryskání. To ukládá omezení průtoku, dosažitelných průtokových rychlostí a pokles frekvencí generování pro danou trysku. Zvýšené průchodnosti se dosahuje přidáním paralelních kanálů, a nikoliv pouze zvýšením průtoku [23].

### **Využití mikrofluidiky pro bioanalýzu**

Schopnost analyzovat obsah v kapkách kvalitativně i kvantitativně hraje velkou roli ve vývoji a aplikaci mikrofluidních systému na bázi segmentovaného toku. Toho lze využít jak pro chemické, tak i biologické experimenty. V následujícím odstavci jsou uvedeny některé z hlavních aplikací mikrofluidiky segmentovaného toku [25].

Mikrofluidika segmentovaného toku, byla úspěšně zavedena pro molekulárně biologické aplikace. Jednotlivá DNA a molekuly enzymů mohou být zachyceny v ultra malých kapkách, amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a reakcí katalyzovanou enzymem, a nakonec kvantifikovány digitálním počítáním. Takovou metodu

je možné použít pro kvantifikaci vzorků s extrémně nízkými koncentracemi. Zapouzdřeny do kapek mohou být také jednotlivé buňky nebo subcelulární orgány. Z důvodu rozlišení rozdílů v enzymové aktivitě, genech a expresi proteinů. To vše na úrovni jedné buňky. Toho se dá využít při objevování léků, testování toxicity a studiu vzácných buněk [23, 25].

Mimo jiné lze tuto metodu aplikovat i pro screening krystalických proteinů, léků a katalyzátorů. Vzhledem k tomu, že míchání a přenos hmoty se zvyšuje v rámci kapky, systémy založené na segmentovaném toku mohou být použity ve studii dynamiky rychlých reakcí a on-line syntézy mikročástic s jednotnými rozměry [25].



## **2.4 Nízkonákladová mikrofluidika**

Analýza biologických tekutin je nezbytná pro sledování zdraví obyvatelstva. Tyto analýzy jsou obtížně realizovatelné v rozvojových zemích, v mimořádných situacích nebo při domácí zdravotnické péči. Konvenční laboratorní přístroje poskytují kvalitní analýzu biologických vzorků, ale v těchto situacích nejsou příliš vhodná. Protože jsou velké, drahé, vyžadují vyškolený personál a značné množství biologických vzorků. Platformy na bázi nízkonákladové mikrofluidiky se staly zajímavou alternativou k těmto konvenčním biologickým analýzám [26, 27].

Diagnostické testy, založené na principu mikrofluidiky jsou přenosné a k analýze stačí malý objem vzorků a reagensů. Zkoumání bylo zaměřeno hlavně na vývoj a vyhodnocování nových substrátů, mikrokapacitních technik a detekčních metod pro dosažení levných, robustních, jednorázových a přenosných diagnostických přístrojích zaměřených na POC (point-of-care). Tato zařízení jsou možným řešením pro zlepšení diagnostiky lidského zdraví v rozvojových zemích [27].

Náklady na diagnostiku POC by měly být co nejmenší. Ale i přes nízké náklady, musí být substrát biokompatibilní, snadno funkční, vhodný pro diagnostické metody detekce a biologicky nezávadný při jeho likvidaci [27].

Přesto že křemík a ve větší míře sklo, byly primárně používány pro výrobu mikrofluidních zařízení, související náklady a požadované výrobní postupy nejsou praktické pro hromadnou výrobu mikrofluidních zařízení určených do rozvojových zemích. V současné době jsou papír a plasty považovány za nejlevnější, jednoduše použitelné a všestranné materiály pro velkovýrobu levných přístrojů s mikrofluidními vlastnostmi [27].

### **2.4.1 Materiály pro nízkonákladovou mikrofluidiku**

#### **Papír**

Užitečnost papíru nejen v mikrofluidice vyplývá již z jeho fyzikálních vlastností. Jedná se o vysoce sofistikovaný materiál, který může být vyroben tenký, lehký a pružný v závislosti na zpracování. Hlavní složkou jsou celulózová vlákna. Ty umožňují, aby kapalina pronikla do hydrofilní vláknové matrice bez potřeby aktivní pumpy nebo externího zdroje. Kromě toho, mohou být celulózová vlákna funkcionalizovaná, čímž se mění jejich vlastnosti, jako je hydrofilita, propustnost a reaktivita [28].

Papír je potenciální materiál pro senzory a přístroje v analytické a klinické chemii, kvůli své všestrannosti, vysoké hojnosti a nízkým nákladům. Tyto analytická zařízení jsou flexibilní, přenosné, jednorázové a snadno ovladatelné [28].

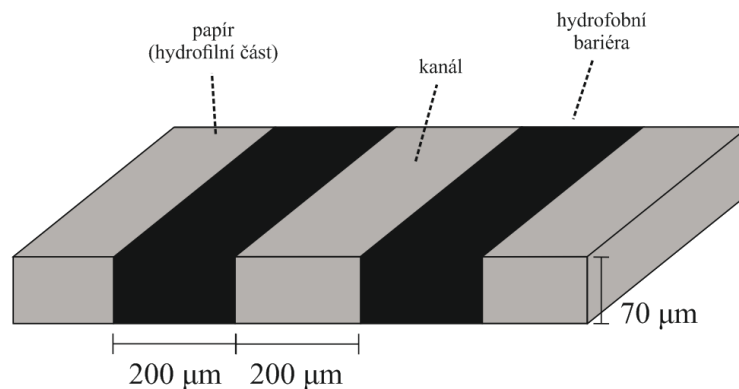
Existuje celá řada papírových materiálů. Jejich výběr je založen na výrobních krocích, které jsou nutné pro vývoj zařízení a také na konkrétní oblast použití. Nejčastěji používaným se stal filtrační papír. Typy filtračního papíru se rozlišují podle parametrů jako jsou poréznost, zadržování částic a průtok [28].

I když je filtrační papír široce používán, nemá vždy požadované fyzikální vlastnosti. Proto byly zkoumány i jiné typy papíru. Příkladem jsou hydrofobní nitrocelulóзовые membrány, které vykazují vysoký stupeň nespecifické vazby k biomolekulám a jsou vhodné pro imobilizaci enzymů, proteinů a DNA. Nitrocelulóзовые membrány jsou hladké a mají poměrně rovnoměrnou velikost pórů ( $0,45\mu\text{m}$ ), což vede ke stabilnějšímu a reprodukovatelnějšímu proudění kapalin v papíru [28].

Další možností je chemická modifikace celulózových vláken. Existují iontoměničové celulózové papíry a kompozitní papíry složené z celulózy a polyesteru [28].

Vhodnou platformou v sensorových technologiích je i fotopapír. Lesklý papír je flexibilní substrát vyrobený z celulózových vláken smíchaných s anorganickým plnidlem. Vzhledem k nedegradovatelnosti a relativně hladkému povrchu lesklého papíru je dobrou náhradou filtračního papíru [28].

Principem výroby mikrofluidických zařízení na bázi papíru je tvorba hydrofilních kanálů, které jsou uzavřeny hydrofobní bariérou. Pomocí těchto bariér je vytvořen vzor, který charakterizuje šířku a délku mikrofluidního kanálu, a výšku kanálu definuje tloušťka papíru. Výsledné kanály mohou být buď otevřené nebo uzavřené tenkými vrstvami polymeru. Mezi nejpoužívanější techniky výroby papírových mikrofluidních zařízení patří fotolitografie, inkoustový tisk, řezání papíru, ošetření plazmatem, voskový tisk a další [28, 29].



Obrázek 17: Mikrofluidický kanál na papíře, který je vytvořený pomocí hydrofobních bariér [29]

## Fólie

Dalším důležitým materiálem pro nízkonákladovou mikrofluidiku jsou fólie různých polymerů. Ty jsou charakterizovány nízkou spotřebou materiálu a malými náklady na něj. Fólie lze definovat jako polotovar z jakéhokoliv materiálu, který je tenčí než 500  $\mu\text{m}$  a má pružný charakter. Tenké a flexibilní fólie mají i další užitečné vlastnosti. Těmi jsou vysoká ohebnost a možnost fólii částečně prorazit, jako je tomu například ve farmaceutickém průmyslu u blistrových obalů na tablety. Výhodou oproti papíru je možnost propíchnutí fólie a zavedení vzorku do čipu [30].

Fólie jsou tvořeny polymery různého typu. Většinou se jedná o termoplasty, duromery, fotorezistivní polymery a polymery obsahující kov. Termoplasty jako polyethylen, polystyren, polypropylen a další, jsou široce dostupné jako jednovrstvé fólie. I duromery jako polyimid byly použity pro výrobu fólií. Kromě jednovrstvých fólií může mikrofluidika snadno využít vícevrstvé nebo složené fólie. Dva nebo více polymerů jsou společně vytlačovány nebo laminovány na sebe tak, že výsledná fólie má na svém průřezu různé vlastnosti. Tím lze regulovat optické, mechanické a ochranné vlastnosti [30].

Výroba čipů z fólie vyžaduje vytvoření různě komplikovaných kanálů a komor. To může být provedeno s odlišnou složitostí. Nejjednodušší způsob pro tvorbu vzorů na folii, je vyrobení sady otvorů do fóliového substrátu v kombinaci s následným umístěním horní a spodní vrstvy, tak aby byl kanál uzavřen. Jiné techniky jsou složitější, ale zlepšují funkce fólie. Mezi nejvýznamnější patří tvarování za tepla, fotolitografie, řezání, mokré leptání a tvoření vrypů. Výběr techniky se volí v závislosti na jejich aplikovatelnosti, flexibilitě, ceně, robustnosti a kvalitě [30].

#### **2.4.2 Detekce pro nízkonákladovou mikrofluidiku**

Pro zachování jednoduchosti, cenové dostupnosti a přenositelnosti jsou jako detektory vhodné techniky s nízkou spotřebou energie. Jako jsou optické a elektrochemické metody. Mezi nejpoužívanější techniky patří kolorimetrie, elektrochemie, chemiluminiscence, elektrochemiluminiscence a elektrická vodivost [28].

##### **Kolorimetrie**

V nízkonákladové mikrofluidice je nejčastější metodou detekce kolorimetrie. Ta je založena na měření intenzity zbarvení reakční části v závislosti na koncentraci. Měří se světlo, které se odrazilo od povrchu testovací zóny. Odražené světlo může být zachyceno například pomocí fotoaparátu. Zachycený obraz se přenese do počítače a interpretuje se pomocí zobrazovacího softwaru. Prostřednictvím kalibrační křivky a změřené intenzity se vypočítá koncentrace analytu [28].

##### **Elektrochemická detekce**

Další velmi využívanou technikou v nízkonákladové mikrofluidice je elektrochemická detekce. Ta často využívá tříelektrodový systém, tj. protielektrodu, referenční elektrodu a pracovní elektrodu. Tento systém se převádí na papírový čip ve formě vodivých barev. Pro voltametrické experimenty je nutný potenciostat, který má malý výkon a může být přenosný. Pro tvorbu elektrod se využívají různé inkousty. Běžné jsou uhlíkové inkousty pro pracovní elektrody a protielektrody. Pro referenční elektrody se používá stříbro/chlorid stříbrný.

#### **2.4.3 Lab-in-a-syringe (LIS)**

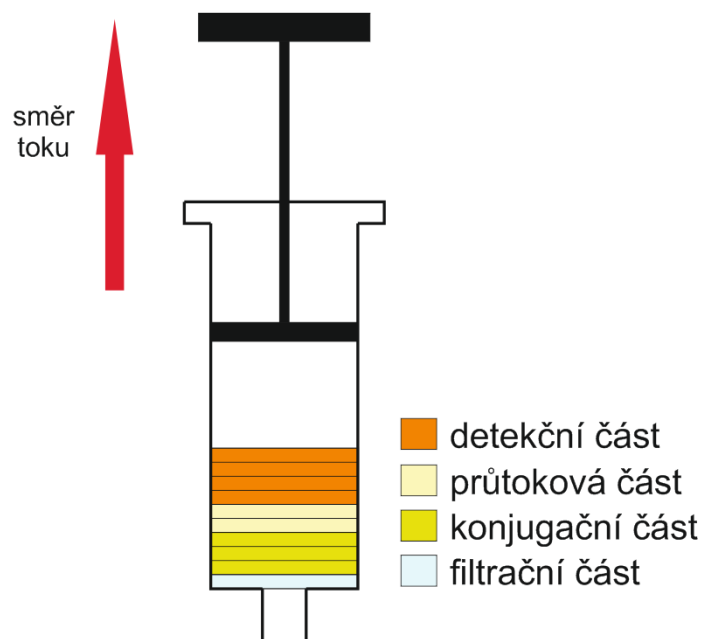
Příkladem nízkonákladové mikrofluidiky je i laboratoř ve stříkačce neboli lab-in-a-syringe (LIS). Představuje novou metodu pro biosenzory. Ty jsou založeny na konceptu testů s postranním (LFA) nebo vertikálním (VFA) průtokem a na principu mikrofluidických zařízení, které jsou vyrobeny na bázi papíru ( $\mu$ PAD) [31].

Příkladem testů LFA je běžný těhotenský test, při kterém se zjišťuje přítomnost lidského choriogonotropinu (hCG) v moči. Ve VFA zařízeních, jak už název napovídá, je průtok kapaliny vertikální ve srovnání s LIF. Tyto testy jsou tvořeny z vrstev, které jsou umístěny na sobě. Existují mikrozařízení pro vertikální proudění, které se skládají z kazety připojené k injekční stříkačce. Kazeta se skládá z testovacího proužku s reakčním mikročipem. Další variantou jsou zařízení s dvěma spojenými kazetami a jednou z nich spojenou s injekční stříkačkou. Tyto kazety byly použity jako držáky filtrů, konjugačních a detekčních podložek. Autoři pro tyto testy použili termín LIS. Tato metodika se použila při oddělení

D od L-alaninu. Jako LIS byla nazvána i metoda automatizované disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina. Termínem LIS jsou v této práci označovány zařízení s vertikálním průtokem na bázi papíru [31–35].

Hlavní problém LIS spočívá v detekci. Při testování LFA je detekční podložka pro uživatele snadno viditelná, naopak je tomu u LIS. Při detekci musí uživatel otevřít kazetu, ve které je umístěná detekční podložka. Tato skutečnost představuje velký problém při analýze potenciálně škodlivých nebo infekčních vzorků [31].

Výše zmiňovaný problém s detekcí byl vyřešen vyvinutím „pravého testu lab-in-a-syringe“. V tomto zařízení jsou, na rozdíl od ostatních metod, konjugační a detekční podložky umístěny přímo ve válci stříkačky. A detekční podložky jsou zde pro uživatele snadno viditelné a detekovatelné [31].



Obrázek 18: Ukázka pravého LIS testu [31]

### **3 Cíle práce**

Prvním cílem této diplomové práce bylo generování segmentovaného toku. Pro generování byla vybrána dvě uspořádání. Kapilární se stříkačkovými pumpami a uspořádání na čipu s pumpou MFCS Flex.

Druhým cílem bylo stanovení látek přítomných ve vzorku pomocí nízkonákladové mikrofluidiky. Pro tyto účely byla použita tzv. laboratoř ve stříkačce. Získané informace by mohly být užitečné pro stanovení iontů v moči i pro imunoanalýzu.

## 4 Experimentální část

Experimentální část je rozdělena na dvě části. První se týká generování segmentovaného toku a druhý lab-on-a-syringe neboli laboratoře ve stříkačce, která patří do oblasti nízkonákladové mikrofluidiky.

Chemikálie, s kterými se pracovalo, byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich, (St. Louis, USA) v p.a. čistotě.

### 4.1 Generování segmentovaného toku

#### 4.1.1 Použité chemikálie

Při vytváření segmentovaného toku byla použita olejová a vodná fáze. Roztoky fluorohexanu a fluorinertu® FC-770 reprezentovaly olejovou fázi a roztok bromfenolové modři fázi vodnou.

#### 4.1.2 Použité vybavení a přístroje

Pro kapilární uspořádání byly zapotřebí injekční stříkačky Omnifix® Luer Lock Solo o objemu 5 ml (Braun). Dále T-spojka Micro Tee PEEK 360  $\mu\text{m}$  w/Fittings (IDEX) a elektroforetické kapiláry o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a vnějším 360  $\mu\text{m}$  pokryté polyimidem. Dále bylo použito podložní sklíčko a izolepa.

Z přístrojů byly potřebné dvě stříkačkové pumpy NE – 1000 (New Era Pump System, Inc. Syringe Pump.com) a mikroskop Motic BA 310. Obraz z mikroskopu byl snímán kamerou a přenášen do počítače, kde byl monitorován počítačovým programem Motic Images Plus 2.0.

Pro uspořádání na čipu byl hlavní pomůckou mikrofluidický čip, spojky a záslepky (microfluidic ChipShop), hadičky z PTFE a plastová nádobka na odpad.

V uspořádání na čipu se pracovalo s těmito přístroji. Pumpou MFCS Flex (Fluigent), která byla ovládána počítačovým programem Maesflo (v 2.1.3). Ke zobrazování sloužil fluorescenční invertovaný mikroskop FLIM. Z něhož byl obraz zobrazován, focen a nahráván pomocí počítačového programu DinoCapture 2.0.

V obou uspořádání se pracovalo s analytickými váhami, automatickými pipetami, kádinkami, odměrnými baňkami a nůžkami.

## **4.2 Laboratoř ve stříkačce**

### **4.2.1 Použité chemikálie**

Pro důkazové reakce ve stříkačce byly použity tyto roztoky: 2 M hydroxid amonný, 0,1 M dimethylglyoxim, 0,1 M hexakynoželeznan draselný, Nesslerovo činidlo (tetrajodortuřnan draselný) o koncentraci 1,16 g/ml, 0,1 M chlorid železitý, 0,1 M síran nikelnatý a 0,1 M chlorid amonný.

### **4.2.2 Použité vybavení a přístroje**

Pro experimenty ve stříkačce byly použity 2 ml injekční stříkačky s luerovým zakončením (Chirana, Stará Turá), Xcut Docrafts děrovačka s kruhovým nožem, který má průměr 9,5 mm (Artea trading, Ostrava). Podložky z celulóзовého vlákna CFSP203000 Milipore (Labicom, Olomouc), biopsy punche s průměrem 1,5 mm a 4 mm (Electrom Microscopy Sciences) a teflonová fólie o tloušťce 0,05mm (BOLA, Bohlender, Německo).

Dále byly při práci se stříkačkami použity Petriho misky, kádinky, pinzeta, fén, žehlička, pečící papír, nůžky a odměrné baňky.

### **4.2.3 Příprava směsného roztoku $Ni^{2+}$ , $Fe^{3+}$ a $NH_4^+$ iontů**

Roztoky 0,1 M  $NiSO_4$ , 0,1 M  $FeCl_3$  a 0,1 M  $NH_4Cl$  byly smíchány v poměru 1:1:1. Ze směsného roztoku byly připraveny roztoky pro kalibraci. Koncentrace jednotlivých iontů v kalibračních roztocích byla 0,033 M, 0,01 M, 0,005 M, 0,0025 M a 0,001 M.



## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Segmentovaný tok

Mikrofluidika segmentovaného toku je velmi přínosná pro bioanalýzu. Segmenty slouží jako samostatné „reaktory“. Toho lze využít například v medicíně, při analýze rakovinných buněk. Mikrofluidika segmentovaného toku řeší problém heterogenních nádorových buněk tím, že buňky jsou uzavřené do segmentů a lze je analyzovat jednotlivě [36]. Tyto důvody nás vedly k tomu, abychom se zabývali generování segmentovaného toku.

Pro generování segmentovaného toku byly zvoleny dvě metody. Generování stříkačkovými pumpami a uspořádání s pumpou MFCS Flex. Pro generování stříkačkovými pumpami byly použity kapiláry a T-spoj Micro Tee Peek. Naopak při generování MFCS Flex pumpou se pracovalo s mikročipem.

#### 5.1.1 Generování segmentovaného toku v kapilárním uspořádáním

Jak již bylo zmíněno výše, první experimenty generování segmentovaného toku byly provedeny v kapilárním uspořádání pomocí stříkačkových pump (Obrázek 19).

Důležitou částí uspořádání je tvar T-spoje. Prostor, kde se vytváří kapky musí být co nejmenší, aby měly kapky stejnou velikost. Pokud by uprostřed T-spoje vznikal příliš velký prostor, mohlo by docházet k tomu, že vycházející segmenty nebudou stejně velké. Také je potřeba aby okraj kapilár, které jsou upevněny do T-spoje, byl co nejrovnější. Na hrubém okraji by mohla zůstat tekutina, a i v tomto případě by kapky nemusely mít stejnou velikost. Zde byl použit T-spoj Micro Tee Peek o vnitřním průměru 360  $\mu\text{m}$ , který splňoval tyto požadavky.

Nejprve se injekční stříkačky naplnily roztoky potřebnými pro vytvoření segmentovaného toku. Jedna byla naplněna fluorohexanem (olejová fáze) a druhá roztokem bromfenolové modři (vodná fáze). Stříkačky byly upevněny do pump. Z každé byla vedena kapilára o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a vnějším 360  $\mu\text{m}$ , která byla s druhou kapilárou spojena T-spojem Micro Tee Peek o vnitřním průměru 360  $\mu\text{m}$ . T-spoj vyústovala třetí kapilárou, kde se již měl tvořit segmentovaný tok. Asi ze 2 cm této kapiláry byla odstraněna vnější vrstva polyimidu, aby se v tomto místě mohl mikroskopem pozorovat vznikající segmentovaný tok. Kapilára byla upevněna izolepou na podložní sklíčko tam, kde byla odstraněna vrchní vrstva polyimidu. To bylo uděláno opatrně, aby nedošlo ke zlomení, protože křemenná kapilára je bez vnější vrstvy polyimidu velmi křehká. Posledním krokem při sestavování přístrojů a pomůcek pro pokus bylo připojení mikroskopu k notebooku.

Po sestavení byl nastaven průtok olejové a vodné fáze. Průtok byl zvolen podle článku M. Volného a kol. [37], kteří použili průtok olejové fáze 2,5  $\mu\text{l}/\text{min}$  a vodné fáze 0,75  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Tento pokus byl několikrát opakován, ale vždy s negativními výsledky. Z tohoto důvodu byl experiment zopakován s různými průtoky, ale nepovedlo se vygenerovat segmentovaný tok. Toto uspořádání se stříkačkovými pumpami nevedlo k úspěchu.

To že se segmentovaný tok nepodařilo vytvořit mohlo být způsobeno problémem s ekvilibrační pumpou. Odezva pumpy při změně nastavení trvala dlouho. Tato metoda se nejeví jako vhodná pro vytváření segmentovaného toku, ani pro rutinní vyžívání v praxi.

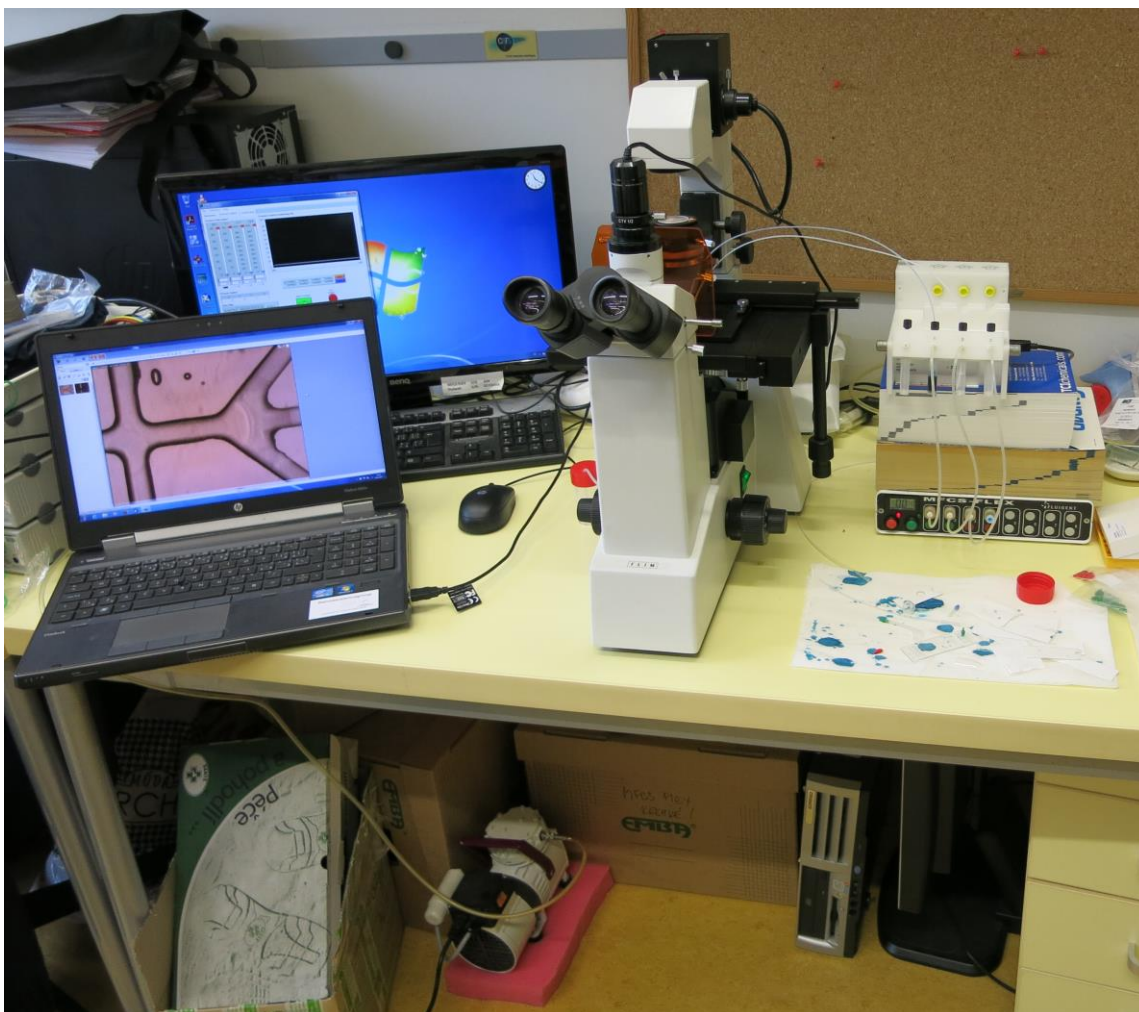


Obrázek 19: Sestava pro generování segmentovaného toku v kapilárách stříkačkovými pumpami

### **5.1.2 Generování segmentovaného toku na mikročipu**

Druhou metodou pro generování segmentovaného toku, které byla věnována pozornost je na mikrofluidním čipu. Tento experiment kladl větší nároky na pumpu, která měla mnohem rychlejší odezvu.

Mikrofluidický čip (Obrázek 21), z něhož byly vedeny hadičky do rezervoárů pumpy, byl umístěn pod mikroskop. Rezervoáry, které byly součástí pumpy, se naplnily. První fluorinertem FC-770 (olejová fáze) a druhý roztokem bromfenolové modři (vodná fáze). Kanály mikročipu, kde nebyly připojeny hadičky do reagentů a do odpadu, byly zaslepeny. Mikroskop i pumpa MFCS Flex byli připojeni k počítači. Tím byla sestava nachystaná pro experiment. Poté byl čip promyt fluorinertem a začala se přivádět i vodná fáze.



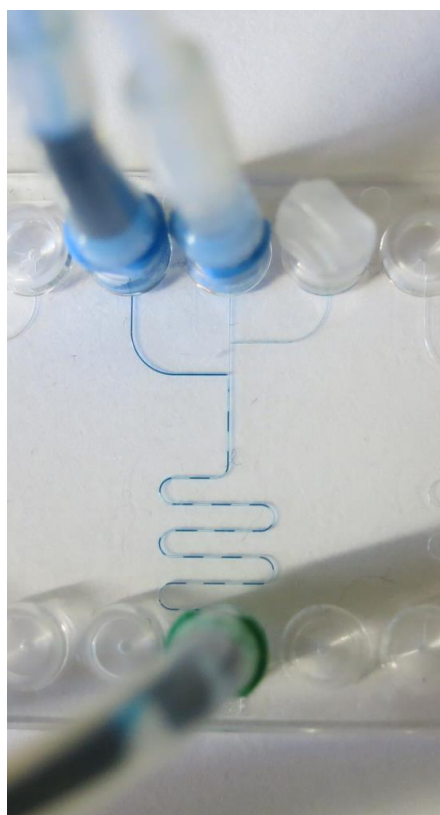
Obrázek 20: Uspořádání pro generování segmentovaného toku na mikročipu

Pro experiment bylo důležité zvolit správný tlak při přivádění obou roztoků do mikročipu tak, aby vznikaly vhodně dlouhé segmenty. Bylo vyzkoušeno několik různých tlaků pro obě fáze, které jsou popsány v tabulce níže (Tabulka 1). Při tlacích 50 mbar vodné fáze a 54 mbar olejové fáze byla rychlost tvorby segmentů nejpomalejší, ale mezi středně dlouhými segmenty byl moc velký interval, než vznikne další segment. Nejvhodnější byla tvorba segmentů při tlaku 85 mbar vodné fáze a 100 mbar olejové fáze (Obrázek 22) a taky při tlaku 95 mbar vodné fáze a 100 mbar olejové fáze (Obrázek 21).

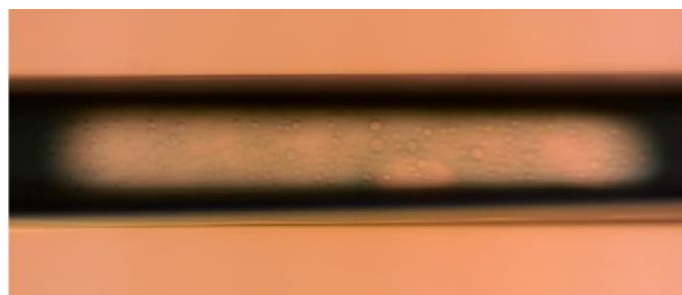
Bylo vyzkoušeno několik různých kombinací tlaků. V tabulce jich je uvedeno sedm. Všechny uvedené kombinace vedly k úspěšnému vzniku segmentovaného toku. Tyto experiment lze považovat jak pilotní studii pro generování segmentovaného toku.

Tabulka 1: Použité tlaky olejové a vodné fáze pro tvorbu segmentovaného toku.

	Tlak (mbar)		Délka segmentů (v porovnání s ostatními)	Rychlost tvorby segmentů	Frekvence toku (Hz)
	Vodná fáze	Olejová fáze			
1.	116	124	Různá	Rychlá	10
2.	91	100	Střední	Rychlá	6
3.	95	100	Střední	Střední	3
4.	85	100	Dlouhé	Střední	2
5.	73	85	Krátké	Střední	3
6.	71	85	Dlouhé	Pomalá	0,5
7.	50	54	Střední	Pomalá	1



Obrázek 21: Tvorba segmentovaného toku na mikrofluidickém čipu. Tlak vodné fáze 95 mbar a olejové fáze 100 mbar.



Obrázek 22: Snímek segmentovaného toku z mikroskopu, při tlaku vodné fáze 85 mbar a olejové fáze 100 mbar.

## **5.2 Laboratoř ve stříkačce**

Dalším tématem této práce byla mikrofluidika v injekční stříkačce. Jedná se o „pravou“ metodu lab-in-a-syringe, kde vyhodnocení probíhá přímo ve válci stříkačce a není nutná další manipulace se vzorky. Je to prospěšné především u vzorků potencionálně toxických nebo v případě biologických tekutin, jako je moč a krev, které mohou být infekční.

V této práci jsme se zabývali více reakcemi v jedné stříkačce. To je výhodné z hlediska cenové dostupnosti. Protože pokud se umístí tři reakční části do jedné stříkačky, je cena nižší než při použití tří stříkaček pro důkaz stejných reakcí. Také se analýza zkrátí o čas, při kterém se natahuje roztok vzorku do stříkačky. Tento krok se provede pouze jednou místo třikrát.

Bylo připraveno několik druhů testů ve stříkačce. Pro všechny byly pomocí Xcut děrovače vyřezané kulaté celulózové podložky o průměru 9,5 mm. Průměr byl zvolen podle velikosti válce stříkačky. Použité stříkačky Chirana mají průměr válce 9,0 mm a podložky o rozměru 9,5 mm zde byly dobře uchyceny. Kulaté celulózové podložky tvořily ve stříkačce průtokovou a detekční část zařízení. Celulózové podložky pro detekci byly pak vloženy do reakčních roztoků a usušeny fénem. Suché podložky byly naskládány do válce stříkačky pomocí pinzety a pečlivě zatlačeny pístem stříkačky do konečné podoby. Počet podložek pro každou část byl zvolen podle druhu testu, a tak aby detekční barevná část měla dobrou viditelnost pro analýzu uživatelem. Ideální počet celulózových podložek pro detekční část byl 3-5 kusů.

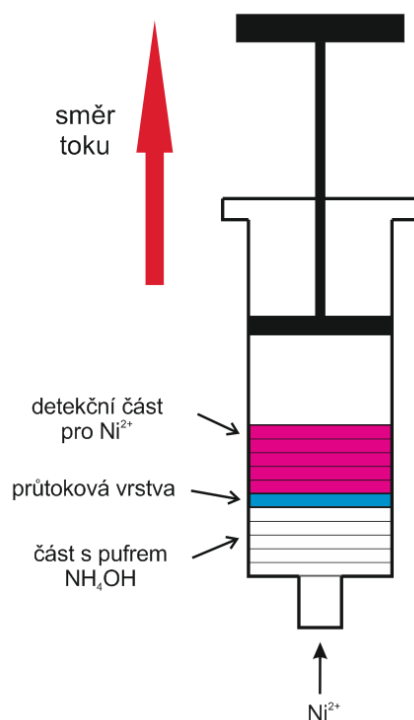
### **5.2.1 Detekce jednoho iontu**

Jako modelová reakce se použila detekce  $\text{Ni}^{2+}$  iontů dimethylglyoximem, který je znám jako tzv. Čugajevovo činidlo.

Do reakčního roztoku 0,1 M dimethylglyoximu v methanolu byly vloženy celulózové podložky. Tyto kulaté podložky s průměrem 9,5 mm napuštěné dimethylglyoxiem sloužily jako detekční část. Další podložky byly vloženy do 2 M roztoku hydroxidu amonného, který byl použit jako pufr. Všechny podložky byly vysušeny fénem a naskládány do válce stříkačky.

Prvně bylo do válce stříkačky vloženo pět podložek s hydroxidem amonným, který měl funkci reakčního pufru. Tato část byla od detekční oblasti oddělena čistou podložkou (průtoková vložka) a na ni bylo naskládáno pět podložek s dimethylglyoximem, jako část detekční. Průtoková vložka oddělovala detekční část a zónu s reakčním pufrem. Šířka jedné

celulózové podložky je asi 1,5 mm. To znamená, že šíře detekční části, která se skládá z pěti podložek je 7,5 mm. Tento rozměr je vhodný pro běžnou vizuální detekci.



Obrázek 23: Stříkačka pro detekci nikelnatých iontů

Do takto připravené injekční stříkaček byly nasáty  $\text{Ni}^{2+}$  ionty jako 0,1 M roztok  $\text{NiSO}_4$ . Došlo k barevné reakci v detekční části. Kde reagovali  $\text{Ni}^{2+}$  s dimethylglyoximem za vzniku růžového zbarvení. Zbarvení v reakční části bylo dobře vizuálně detekovatelné (Obrázek 24).

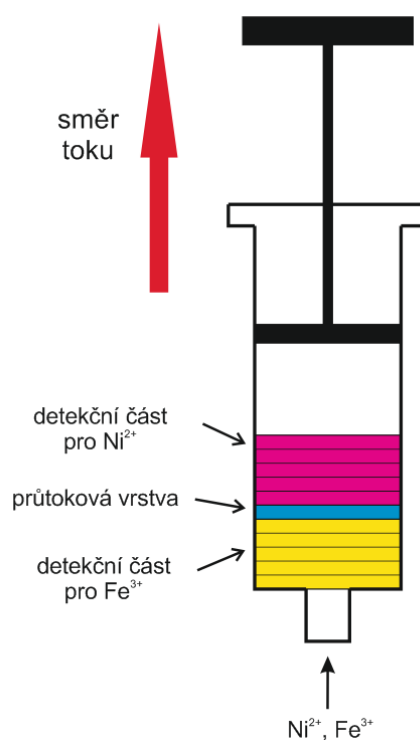


Obrázek 24: Stříkačky pro detekci nikelnatých iontů. A) Stříkačka připravená k použití, B) Stříkačka po reakci s  $\text{Ni}^{2+}$  ionty

### 5.2.2 Detekce dvou iontů v jedné stříkačce

Pro detekci dvou iontů v jedné stříkačce byly vybrány  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  ionty. Nikelnaté ionty se dokazovaly jako v předchozím případě pomocí dimethylglyoximu a železité ionty reakcí s hexakyanoželeznatanem draselným za vzniku berlínské modří.

Polovina kulatých podložek byla vložena do Petriho misky s hexakyanoželeznatanem draselným a druhá polovina do dimethylglyoximu. Podložky byly vysušeny fénem a naskládány do válce stříkačky. Jako první bylo vloženo pět podložek s hexakyanoželeznatanem draselným, které sloužili coby detekční část železitých iontů. Na nich byla umístěna jedna průtoková podložka. Ta oddělovala obě detekční části. Nakonec bylo umístěno pět podložek s dimethylglyoximem pro detekci nikelnatých iontů.



Obrázek 25: Stříkačka pro detekci nikelnatých a železitých iontů

Stříkačka byla nachystána k použití. Do stříkačky byl nasán roztok  $\text{Ni}^{2+}$  jako 0,1 M  $\text{NiSO}_4$  a roztok  $\text{Fe}^{3+}$  jako 0,1 M  $\text{FeCl}_3$ . Po proběhnutí reakcí vzniklo růžové zbarvení způsobené reakcí dimethylglyoximu a  $\text{Ni}^{2+}$  a toto zbarvení bylo překryto vznikající berlínskou modří, která je důsledkem reakce  $\text{Fe}^{3+}$  s  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (Obrázek 26).



Obrázek 26: Stříkačky pro detekci nikelnatých a železitých iontů. A) Stříkačka připravená k použití, B) Stříkačka po reakci s  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  ionty, došlo ke smíchání reakčních zón.

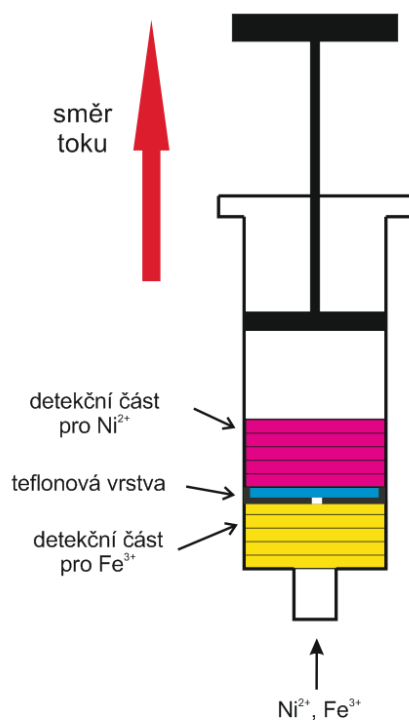
Tento výsledek vedl k myšlence, že je potřeba detekční vrstvy řádně oddělit. Protože pouze jedna průtoková podložka nestačila. Pro oddělení vrstev bylo provedeno několik pokusů, které jsou popsány v následujících oddílech. Reakce ve stříkačce byly nejprve odděleny teflonovou fólií, voskem, a nakonec pomocí prstencově uspořádaných podložek. Kde jsou dvě kolečka různé velikosti vložena v sobě.

### **5.2.3 Oddělení dvou reakcí ve stříkačce teflonovou fólií**

První možností oddělení dvou detekčních vrstev bylo použití teflonové fólie. Teflonová fólie byla vystřižena děrovačkou Xcut a uprostřed byl pomocí biopsy puncheru vyřezán otvor s průměrem 1,5 mm.

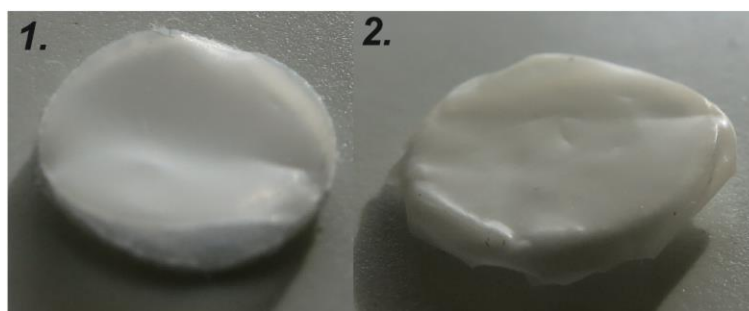
Jako v předchozím případě byly podložky namočeny v hexakynoželeznatanu draselném a v dimethylglyoximu. Tyto podložky byly vysušeny fénem a naskládány do válce stříkačky. První bylo pět podložek pro detekci železitých iontů, teflonová fólie a čisté celulózové kolečko s 1,5 mm otvorem, a nakonec pět detekčních podložek pro nikelnaté ionty. Do nachystané stříkačky byl nadávkován roztok  $\text{Ni}^{2+}$  (0,1 M  $\text{NiSO}_4$ ) a  $\text{Fe}^{3+}$  (0,1 M  $\text{FeCl}_3$ ). Poté bylo pozorováno vzniklé zbarvení.





Obrázek 27: Stříkačka pro detekci nikelnatých a železitých iontů. Detekční vrstvy jsou zde odděleny teflonovou fólií.

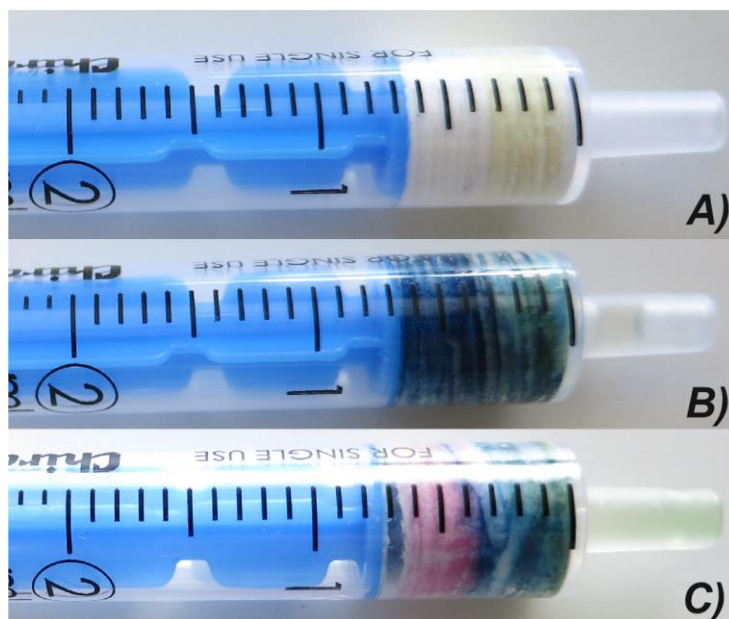
Pokud kolečko z teflonové fólie mělo stejný průměr jako celulózové podložky tj. 9,5 mm, docházelo k míchání barevných reakcí kolem stěn, kde teflon úplně nedoléhal. Výsledek byl takový, že se detekční zóny nedaly vizuálně vyhodnotit (Obrázek 29 B). Proto byla teflonová fólie vyřezána s přesahem. Tím že je měkká, nebyl problém tento přesahat vyřezat stejnou Xcut děrovačkou (Obrázek 28).



Obrázek 28: Teflonová kolečka: 1. teflonové kolečko o průměru 9,5 mm, 2. teflonové kolečko s přesahem

Když teflon přesahoval přes celulózovou podložku (Obrázek 29 C), byl prostor okolo stěn válce stříkačky utěsněn a roztoky se do druhé detekční části přiváděly pouze 1,5 mm otvorem ve středu teflonové fólie. K mísení barevných produktů docházelo jen od středu a na okrajích stříkačky toto mísení nebylo viditelné.

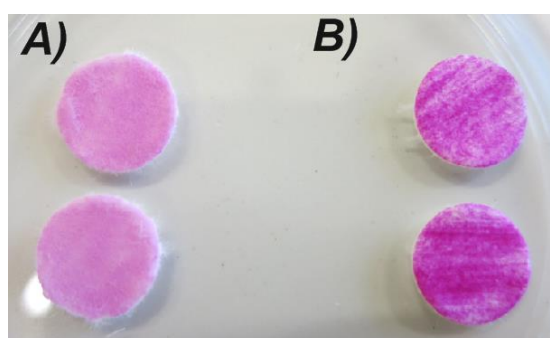
Tohoto výsledku bylo dosaženo jen v některých případech. Bylo obtížné teflonovou fólii umístit do stříkačky tak, aby dobře těsnila ze všech stran. Proto oddělení pouze teflonovou fólií nebylo úplně ideální.



Obrázek 29: Stříkačka pro detekci nikelnatých a železitých iontů s oddělenými reakčními zónami teflonovou fólií. A) Stříkačka připravená k použití, B) a C) Stříkačky po reakci s Ni<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> ionty, B) Teflonová fólie s průměrem 9,5 mm C) Teflonová fólie s přesahem

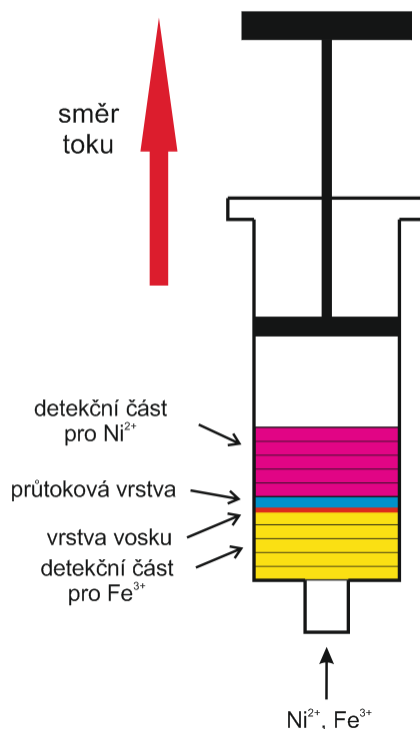
#### 5.2.4 Oddělení dvou reakcí ve stříkačce vrstvou vosku

Další možností pro oddělení dvou detekčních částí bylo nanesení voskové vrstvy na celulózové podložky. Byly použity dvě možnosti. Při první se pouze nanasla vosková vrstva a při druhé byla nanesená vosková vrstva zažehlena do celulózové podložky.



Obrázek 30: Podložky pokryté voskem, A) zažehlená vrstva vosku, B) nezažehlená vrstva vosku

Stejně jako ve dvou posledních případech byla stříkačka naplněna pěti podložkami pro detekci Fe<sup>3+</sup> iontů, čistou kulatou podložkou s nanesenou vrstvou vosku a pěti detekčními podložkami pro stanovení Ni<sup>2+</sup> iontů. Do připravených stříkaček byly nasáty roztoky Ni<sup>2+</sup> (0,1 M NiSO<sub>4</sub>) a Fe<sup>3+</sup> (0,01 M FeCl<sub>3</sub>). Vizually se hodnotila vzniklá zbarvení.



Obrázek 31: Stříkačka pro detekci nikelnatých a železitých iontů. Reakce zde byly odděleny vrstvou vosku.

V případě kdy byla vrstva vosku zažehlena přes pečící papír do celulózové podložky, došlo k promíchání barevných produktů reakce. A výsledek se nedal vyhodnotit (Obrázek 33 B). Došlo k tomu protože, některá celulózová vlákna podložky nebyly pokryty voskem a barevný roztok nimi prošel i do druhé detekční zóny a tím se barvy smísily.

U experimentu, kdy byla nanesena souvislá vrstva vosku byl výsledek o poznání lepší (Obrázek 33 A). Tato nepřetržitá vosková vrstva zabraňuje míchání barevných výsledných produktů. U těchto stříkaček šlo vizuálně vyhodnotit o jaké ionty se jedná. Barvy zde byly nepatrně smíchány.



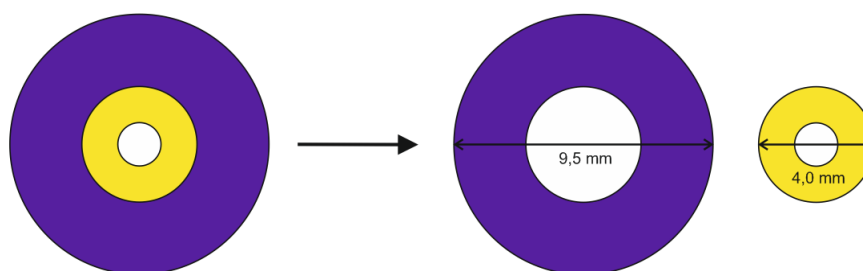
Obrázek 32: Stříkačky pro detekci nikelnatých a železitých iontů. A) Podložka s nezažehlenou oddělovací voskovou vrstvou, B) Podložka se zažehlenou voskovou vrstvou



Obrázek 33: Stříkačky po reakci s  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  ionty, A) Podložka s nezažehlenou oddělovací voskovou vrstvou, B) Podložka se zažehlenou voskovou vrstvou

### 5.2.5 Oddělení dvou reakcí ve stříkačce pomocí prstencového uspořádání

Jako nejlepší varianta pro oddělení dvou detekčních zón se jevílo prstencové uspořádání. Zde bylo ve vyřezané podložce o průměru 9,5 mm vykrojeno další kolečko pomocí biopsy puncheru o průměru 4 mm a v něm ještě jedno o průměru 1,5 mm. Nejmenší kolečko bylo vyhozeno a s ostatními se pracovalo dále (Obrázek 34).



Obrázek 34: Celulózná podložka s průměrem 9,5 mm, do které byly vyřezány kolečka o průměru 4,0 mm (žluté) a 1,5 mm (bílé). Dále se pracovalo s podložkami a vnějším průměrem 9,5 mm (fialové) a 4,0 mm (žluté).

Část větších koleček (o průměru 9,5 mm) byla namočená do dimethylglyoximu a jejich vnitřní části (o průměru 4 mm) do hydroxidu amonného. Další podíl větších koleček byl dán do hexakvanoželeznanu draselného a jejich vnitřní kolečka zůstala čistá. Všechny části byly vysušeny fénem.

Podložky byly naskládány do stříkaček, tak že kolečka o průměru 9,5 mm a 4 mm byly vloženy ve stříkačce do sebe a tvořili v podstatě jednu podložku. Jako první se do stříkačky vložilo pět koleček s hexakynoželeznatanem draselným s čistými vnitřními podložkami. Dále jedna podložka, jako průtoková. Tato vrstva byla čistá, ale také vyřezaná. A poslední vrstva byla tvořena pěti podložkami, kde větší kolečko bylo napuštěno dimethylglyoximem a vnitřní kolečko hydroxidem amonným.

Připravené stříkačky byly naplněny roztoky  $\text{Ni}^{2+}$  (0,1 M  $\text{NiSO}_4$ ) a  $\text{Fe}^{3+}$  (0,01 M  $\text{FeCl}_3$ ). V tomto případě vznikly barevné produkty, které se nesmíchaly. Výsledek tohoto pokusu byl velmi pozitivní (Obrázek 35).



Obrázek 35: Stříkačka s prstencovým uspořádáním po reakci s nikelnatými a železitými ionty.

Tím že se podložka skládala ze dvou vložených koleček, byla difúze z prostřední části do stran pomalejší než v předešlých případech. A k okrajům válce stříkačky, do části, která se hodnotí vizuálně, se nedostal druhý produkt barevné reakce.

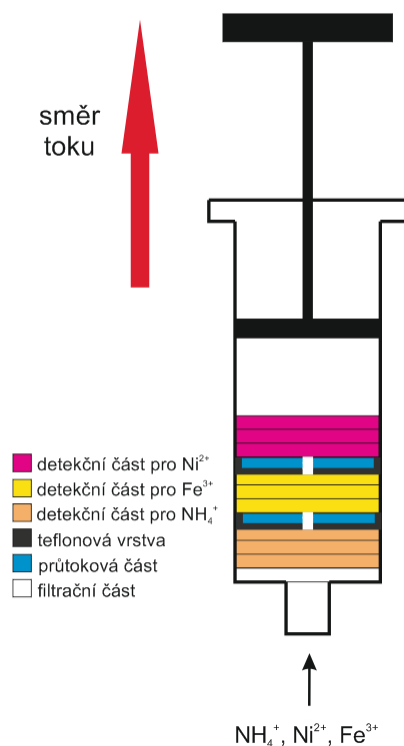
### **5.2.6 Oddělení tří reakcí ve stříkačce**

Pro detekci tří reakcí v jedné stříkačce byly vybrány  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  ionty. Nikelnaté ionty se dokazovaly reakcí s dimethylglyoximem za vzniku růžového zbarvení, železité ionty s hexakynoželeznatanem draselným za vzniku berlínské modři a amonné ionty reakcí s Nesslerovým činidlem za vzniku hnědého zbarvení.

Pro oddělení tří reakcí v jedné injekční stříkačce bylo použito více výše zmíněných metod. Teflonové fólie s přesahem a prstencově uspořádaných podložek pro pomalejší difúzi do stran.

Tento pokus byl realizován stejně jako ty předchozí. Větší podložky o vnějším průměru 9,5 mm byly napuštěny reakčními činidly pro důkaz nikelnatých, amonných a železitých iontů. Prostřední menší kolečka o vnějším průměru 4 mm byla čistá až na kolečka, která sloužila k důkazu nikelnatých iontů. Ty byly ponořeny v hydroxidu amonném, který sloužil jako pufr. Všechny podložky byly vysušeny fénem nebo na vzduchu.

Podložky byly vloženy do válce stříkačky v následujícím pořadí. Po filtrační podložce byla první reakční vrstva tvořena třemi kolečky s Nesslerovým činidlem pro důkaz amonných iontů. Dále teflonová fólie s jednou čistou podložkou, které měly vprostřed otvor 1,5 mm, jako oddělovací část. A tři podložky s hexekyanoželeznatanem draselným pro důkaz železitých iontů. Tato část byla znovu oddělena proděravěnou teflonovou fólií a čistou podložkou. Poslední vrstvou byly tři kolečka pro důkaz nikelnatých iontů napuštěné dimethylglyoxime.



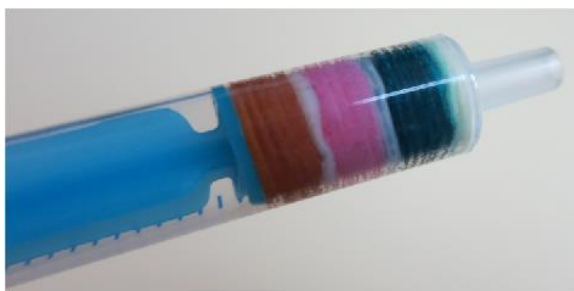
Obrázek 36: Stříkačka pro detekci amonných, nikelnatých a železitých iontů. Detekční vrstvy jsou zde odděleny teflonovou fólií a pomocí prstencového uspořádání.



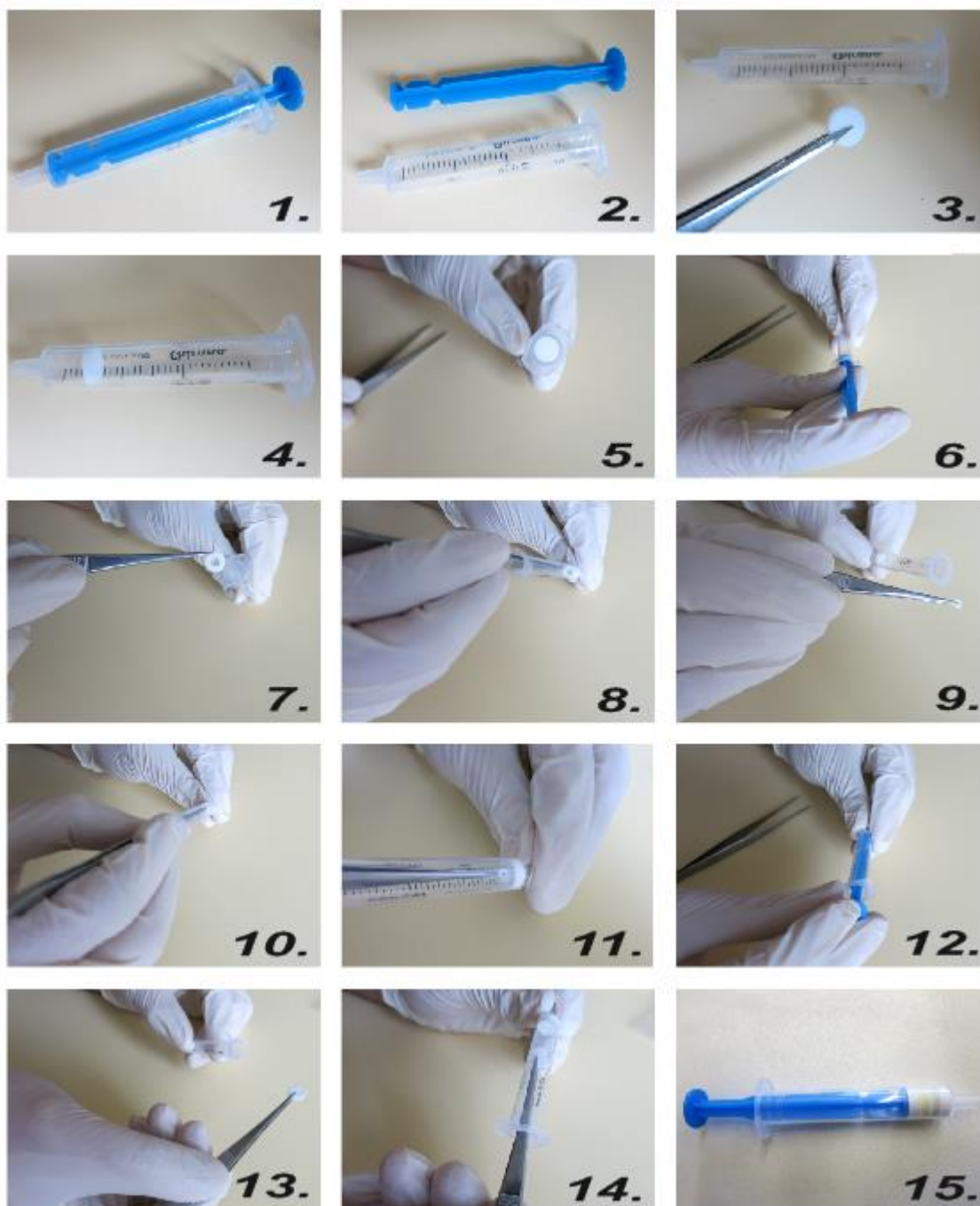
Obrázek 37: Připravená stříkačka pro detekci amonných, železitých a nikelnatých iontů

U některých experimentů bylo pořadí reakčních vrstev přeměněno, tak jak je tomu v ukázce na obrázku (Obrázek 38). První byla vložena vrstva pro detekci železitých iontů, druhá pro detekci nikelnatých iontů a třetí pro detekci iontů amonných.

Výsledkem výše popsaných experimentů, jsou dobře oddělené zóny, které lze vizuálně vyhodnotit.



Obrázek 38: Stříkačka po reakci s železitými, nikelnatými a amonnými ionty.



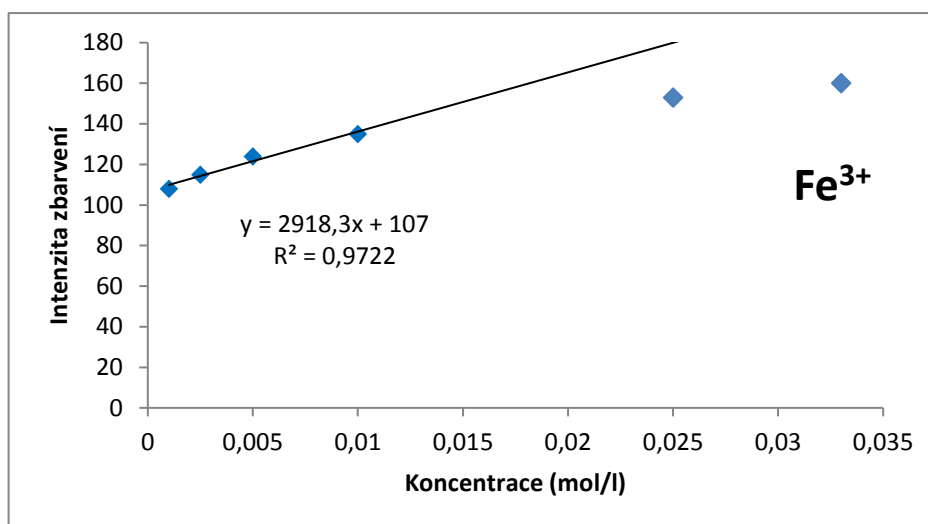
Obrázek 39: Postup přípravy „Lab-in-syringe“. S teflonovou fólií a prstencovým uspořádáním podložek pro tři reakce v jedné stříkačce.

## Důkaz $\text{NH}_4^+$ , $\text{Ni}^{2+}$ a $\text{Fe}^{3+}$ iontů v moči

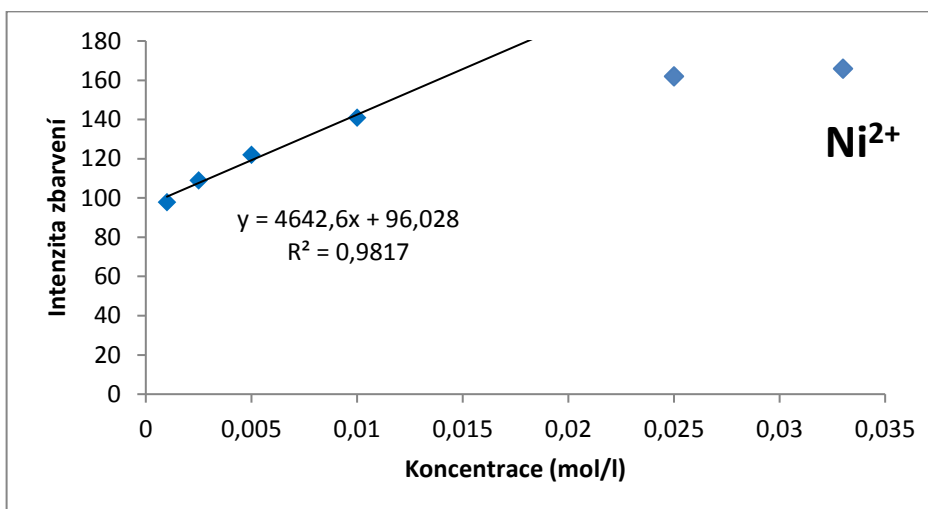
Laboratoř ve stříkačce by mohla sloužit v klinické praxi k analýze iontů v moči. Pro tuto analýzu jsme použili uspořádání, kde detekční část odděluje teflon a jsou použity prstencové podložky. Protože tato metoda byla nejspolehlivější.

Do stříkačky, která byla naskládána tak jako v předchozím případě, byla nasáta moč. Pozorovalo se zbarvení detekčních podložek.

Pro tento experiment byla sestavena kalibrační řada šesti roztoků o různé koncentraci a stanovovala se intenzita zbarvení podložek ve válci stříkaček. Koncentrace jednotlivých iontů byla 0,001 M, 0,0025 M, 0,005 M, 0,01 M, 0,025 M a 0,033 M. Kalibrační řada se připravovala v moči zdravého dobrovolníka. Výsledkem jsou následující grafy závislosti intenzity zbarvení na koncentraci jednotlivých iontů.

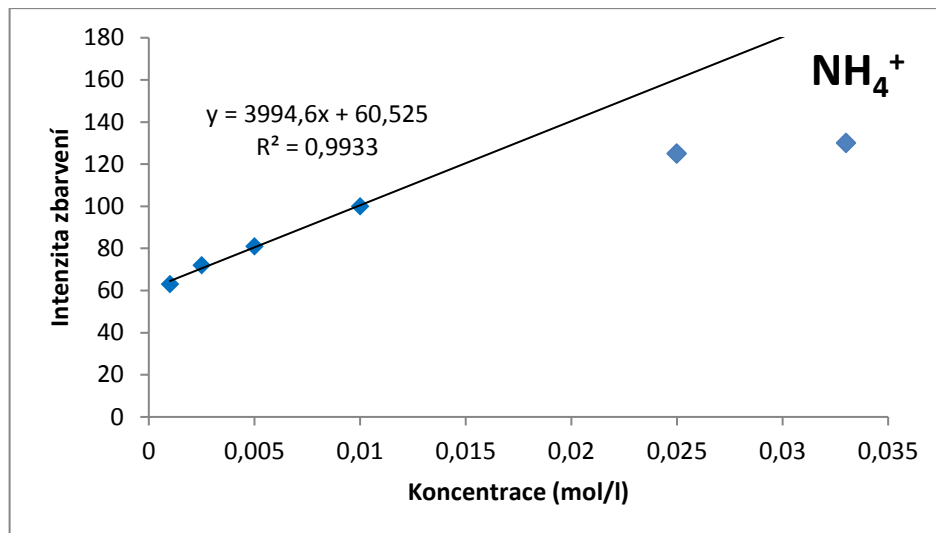


Graf 1: Závislost intenzity zbarvení na koncentraci železitých iontů v moči.



Graf 2: Závislost intenzity zbarvení na koncentraci nikelnatých iontů v moči.





Graf 3: Závislost intenzity zbarvení na koncentraci amonných iontů v moči.

## 6 Závěr

V této diplomové práci, která se zabývá mikrofluidikou, byl generován segmentovaný tok dvěma metodami. První metoda se stříkačkovými pumpami v kapilárním uspořádání s T-spojem nevedla k úspěšnému generování. Druhá metoda, kde se generoval segmentovaný tok pumpou MFCS Flex, již vedla ke generování segmentovaného toku. Tento výsledek se dá považovat za úspěch při pilotní studii.

V injekčních stříkačkách byl vyroben test tzv. „pravá“ lab-in-a-syringe. Zkoumalo se oddělení dvou a více reakcí v jedné stříkačce. Oddělení pouze pomocí teflonové fólie nebylo úplně úspěšné. Proto byla vyzkoušena metoda oddělení detekčních částí vrstvou vosku. I u tohoto uspořádání došlo k menšímu smíchání vrstev. Třetím způsobem bylo oddělení prstenci, které se jeví jako nejlepší. Protože ani jedno oddělení nebylo stoprocentní, použili se prstence v kombinaci s teflonovou fólií. To bylo nejspolehlivějším řešením.

Využití laboratoře ve stříkačce bylo v tomto případě demonstrováno na nikelnatých, železitých a amonných iontech. Ty byly v poslední kapitole dokazovány v moči. Ale ve stříkačce mohou být použita jakékoliv reakční roztoky. Budoucností by mohla být imunochemie. Kde se dají do stříkačky umístit podložky obsahující protilátky nebo antigeny.

Lab-in-a-syringe s jednoduchostí analýzy, rozmanitostí využití a z důvodu nízké ceny může být velkým přínosem pro klinickou analytickou chemii.

## 7 Seznam použitých zdrojů

- [1] J. M. Mermet, M. Otto, M. Valcárcel, R. A. Kellner a H. M. Widmer, *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, second ed., Weinheim: Wiley-VCH 2004.
- [2] M. Najah, A. D. Griffiths, M. Ryckelynck, Teaching single-cell digital analysis using droplet-based microfluidics, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1202–1209.
- [3] V. Tesař, *Mikrofluidika*, Automa, (2008) 6–9.
- [4] M. D. Tarn, N. Pamme. *Microfluidics. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (2013) 1–7.
- [5] P. Smejkal, F. Foret, *Mikrofluidika v bioanalytické instrumentaci*, *Chem. Listy* 106 (2012) 104–112.
- [6] D. J. Beebe, G. A. Mensing, G. M. Walker. *Physics and Applications of Microfluidics in Biology*. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4 (2002) 261–286.
- [7] D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz. *Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology*. *Anal. chem.* 74 (2002) 2623–2636.
- [8] D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, A. Manz, *Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip*. *Science* 261 (1993) 895–897.
- [9] A. Manz, Y. Miyahara, J. Miura, Y. Watanabe, H. Miyagi, K. Sato. *Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology*. *Sens. Actuators, B* 1 (1990) 249–255.
- [10] J. Y. Cheng, M. H. Yen, Ch. W. Wei, Y. Ch. Chuang, T. H. Young. *Crack-free direct-writing on glass using a low-power UV laser in the manufacture of a microfluidic chip*, *J. Micromech. Microeng.* 15 (2005) 1147–1156.
- [11] E. K. Sackamnn, A. L. Fulton, D. J. Beebe. *The present and future role of microfluidics in biomedical research*, *Nature* 507 (2014) 181–189.
- [12] N.-T. Nguyen, Z. Wu, *Micromixers—a review*, *J. Micromech. Microeng.* 15 (2005) R1–R16.
- [13] N. Pamme, *Continuous flow separations in microfluidic devices*. *Lab.* 7 (2007) 1644.
- [14] J.P. Brody, T.D. Osbom, F.K. Forster, P. Yager. *A Planar Microfabricated Fluid*

- Filter. Proc. Int. Solid-State sensors and Actuators Conf. 1 (1995) 704–708.
- [15] T. A. Crowley, V. Pizziconi, Isolation of plasma from whole blood using planar microfilters for lab-on-a-chip applications. *Lab. Chip* 5 (2005) 922.
- [16] X. Chen, D. Cui, C. Liu, H. Li, J. Chen. Continuous flow microfluidic device for cell separation, cell lysis and DNA purification. *Anal. Chim. Acta.* 584 (2007) 237–243.
- [17] M. G. Pollack, R. B. Fair, A. D. Shenderov. Electrowetting-based actuation of liquid droplets for microfluidic applications. *Appl. Phys. Lett.* 77 (2000) 1725–1726.
- [18] H. Moon, S. K. Cho, R. L. Garrell, C. J. Kim. Low voltage electrowetting-on-dielectric, *J. Appl. Phys.* 92 (2002) 4080–4087.
- [19] K. Choi, A. H.C. Ng, R. Fobel, A. R. Wheeler, Digital Microfluidics. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 5 (2012) 413–440.
- [20] M. J. Jebrail, M. S. Bartsch, K. D. Patel, Digital microfluidics: a versatile tool for applications in chemistry, biology and medicine. *Lab. Chip* 12 (2012) 2452.
- [21] M. J. Jebrail, A. R. Wheeler, Let's get digital: Digitizing chemical biology with microfluidics, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 574–581.
- [22] I. Barbulovic-Nad, H. Yang, P. S. Park, A. R. Wheeler, Digital microfluidics for cell-based assays. *Lab. Chip* 8 (2008) 519.
- [23] T. P. Lagus, J. F. Edd, A review of the theory, methods and recent applications of high-throughput single-cell droplet microfluidics, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 46 (2013) 114005.
- [24] D. J. Collins, A. Neild, A. Demello, A.-Q. Liu, Y. Ai, The Poisson distribution and beyond: methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation, *Lab. Chip* 15 (2015) 3439–3459.
- [25] Y. Zhu, Qun Fang, Analytical detection techniques for droplet microfluidics-A review, *Anal. Chim. Acta.* 787 (2013) 24–35.
- [26] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, G. M. Whitesides, Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays, *Angew. Chem., Int. Ed.* 46 (2007) 1318–1320.
- [27] W. K. Tomazelli, C. M. Cheng, E. Carrilho, D. P. De Jesus, Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications, *Electrophoresis* 35

- (2014) 2309-2324.
- [28] D. D. Liana, B. Ragues, J. Justin Gooding, E. Chow, Recent advances in paper-based sensors. *Sensors (Basel)* 12 (2012) 11505–11526.
- [29] A. W. Martiez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, E. Carrilho, Diagnostics for the developing world: Microfluidic paper-based analytical devices. *Anal. Chem.* 82 (2010) 3–10.
- [30] M. Focke, M. D. Kosse, C. Müller, H. Reinecke, R. Zengerle, F. Von Stetten, Lab-on-a-Foil: microfluidics on thin and flexible films. *Lab.Chip* 10 (2010) 1365.
- [31] L. Hárendarčíková, D. Baron, A. Šebestová, J. Rozsypal, J. Petr. True lab-in-a-syringe technology for bioassays, *Talanta* 174 (2017) 285–288.
- [32] F. Maya, B. Horstkotte, J. M. Estela, V. Cerdá, Lab in a syringe: Fully automated dispersive liquid-liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 909–917.
- [33] T. Chinnasamy, L. I. Segerink, M. Nystrand, J. Gantelilus, H. A. Svahn, Point-of-care vertical flow allergen microarray assay: Proof of concept, *Clin. Chem.* 60 (2014) 1209–1216.
- [34] G.E.N. Pauli, A. de la Escosura-Muniz, C. Parolo, I.H. Bechtold, A. Merkoci, Lab-ina-syringe using gold nanoparticles for rapid immunosensing of protein biomarkers, *Lab. Chip* 15 (2015) 399-405.
- [35] E. Zor, N. Bekar, Lab-in-a-syringe using gold nanoparticles for rapid colorimetric chiral discrimination of enantiomers, *Biosens. Bioelectron.* 91 (2017) 211–216.
- [36] D. K. Kang, M. Monsur Ali, K. Zhang, E. J. Pone, W. Zhao, Droplet microfluidics for single molecule and single-cell analysis in cancer research, diagnosis and therapy, *Trends Anal. Chem.* 58 (2014) 145-153.
- [37] M. Volný, J. Rolfs, B. Hakimi, P. Fryčák, T. Schneider, D. Liu, G. Yen, D. T. Chiu a F. Tureček, Nanoliter segmented-flow sampling mass spectrometry with online compartmentalization, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3647–3652.