

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Olomouc 2019

Ester Drastíková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Univerzita Palackého
v Olomouci

Laboratoř ve stříkačce

jako technika nízkonákladové analýzy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Ester Drastíková

Studijní program: Chemie B1407

Studijní obor: Aplikovaná chemie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Rok: 2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Dále prohlašuji, že jsem byla seznámena s právy vztahujícími se na mou bakalářskou práci a povinnostmi vyplývajícími z autorského zákona č. 121/2000 Sb., ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Na tomto místě bych ráda poděkovala osobám, které stály za zrodem mé bakalářské práce, především jejímu vedoucímu, doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za to, že si mě tzv. vzal pod křídla, za jeho pomoc a všechny ochotně poskytnuté odborné rady. Rovněž mé poděkování směřuje k prof. RNDr. Michalu Otyepkovi, Ph.D., vedoucímu katedry fyzikální chemie, za umožnění vypracovat bakalářskou práci na půdě katedry analytické chemie.

Děkuji také kamarádkám Kláře Konderlové za ochotu spolupracovat v laboratoři i mimo ni a Lucce Příbylové za přátelství, rady v krizových situacích příprav a také za její pomoc s překladem i formátováním práce.

V neposlední řadě patří velký dík celé rodině, a hlavně rodičům za vedení, podporu v průběhu celého studia a naději, kterou do mě vložili. Zvláštní poděkování směřuje k mému nejstaršímu bratrovi Tomášovi, který i přes svou bezmeznou skromnost chtěl být zmíněn zvlášť. Mám vás všechny moc ráda!

Bibliografická identifikace

Jméno příjmení autora	Ester Drastíková
Název práce	Laboratoř ve stříkačce jako technika nízkonákladové analýzy
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt <p>Tato bakalářská práce se zabývá problematikou v oblasti mikrofluidiky, zaměřenou na nízkonákladová zařízení – PDMS mikrofluidními čipy. Jsou zde uvedeny vybrané techniky pro výrobu čipů s důrazem na použití 3D tisku v mikrofluidice, vybrané metody a materiály. V experimentální části je pak sepsán postup výroby mikrofluidních kanálků v injekčních stříkačkách z různých filamentů pomocí 3D tisku, upravenou metodou ESCAGROT. Inovativní metoda umožňuje výrobu mikrofluidního kanálku v kratším čase, bez použití rozpouštědla.</p>	
Klíčová slova	mikrofluidika, mikrofluidní zařízení, mikrofluidní kanálky, 3D tisk, PDMS, laboratoř ve stříkačce, laboratoř na čipu
Počet stran	53
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Ester Drastíková
Title	Lab-in-a-syringe as a technique for low-cost analysis
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of analytical chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
The year of presentation	2019
<p>Abstract</p> <p>The topic of this thesis is microfluidics focused on low-cost devices – PDMS microfluidic chips. It includes different chip manufacturing methods and describes in detail the use of 3D printing in microfluidics, chosen manufacturing methods and material types. In the experimental part, the process of manufacturing microfluidic channels in syringe by 3D printing (modified ESCAGROT method) using different filaments is described. This innovative method allows to manufacture microfluidic channels faster and without using any solvent.</p>	
Keywords	microfluidics, microfluidic devices, microfluidic channels, 3D printing, PDMS, lab-in-a-syringe. lab-on-a-chip
Number of pages	53
Number of appendices	-
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod.....	11
2	Teoretická část.....	13
2.1	Mikrofluidika.....	13
2.2	Mikrofluidní čip	14
2.2.1	Historie mikrofluidních čipů.....	15
2.3	Polydimethylsiloxanové čipy a jejich výroba	16
2.3.1	Litografie.....	17
2.3.2	Fotolitografie	18
2.3.3	Měkká litografie	18
2.4	Použití 3D tisku v mikrofluidice	19
2.4.1	Stereolitografie	20
2.4.2	Multi Jet Modeling.....	22
2.4.3	Fused Deposition Modeling.....	22
2.4.4	Tvarování PDMS.....	23
2.5	Materiály využitelné pro 3D tisk.....	25
2.5.1	Polypropylen	25
2.5.2	Akrylonitril-butadien-styren	26
2.5.3	Polymléčná kyselina	27
2.5.4	Akrylonitril-styren-akrylát	27

2.5.5	Flexfill.....	28
3	Experimentální část	30
3.1	Chemikálie.....	30
3.2	Materiál.....	30
3.3	Metody	30
3.3.1	3D tisk a jeho příprava.....	30
3.3.2	Odlévání PDMS.....	32
4	Výsledky a diskuse	34
4.1	Odstranění kanálku.....	34
4.2	Struktura kanálku.....	36
4.3	Důkaz přítomnosti Ni ²⁺ pomocí Čugajevova činidla	38
4.4	Složitější struktura.....	42
5	Závěr.....	45
6	Summary.....	47
7	Literatura	50

Seznam použitých zkratek

ABS	Akrylonitril-butadien-styren
ASA	Akrylonitril-styren-akrylát
CNC	Computer Numeric Control (číslicové řízení pomocí počítače)
ESCAGROT	Embedded SCAffold RemovinG Open Technology
FDM	Fused Deposition Modeling
LED	Light-Emitting Diode (svítivá dioda)
LoC	Lab-on-a-Chip
MEMS	Micro Electro Mechanical System
MJM	Multi Jet Modeling
PDMS	Polydimethylsiloxan
PLA	Polylactic acid (polymléčná kyselina)
PP	Polypropylen
SL	Stereolitografie
TPU	Termoplastický polyuretan
UV	Ultra Violet (ultrafialový)
μ-TAS	Micro Total Analysis Systems (mikrozařízení pro celkovou analýzu)
3D	3-Dimension (trojrozměrný)

Cíle práce

1. Přehledná rešerše na téma mikrofluidika, zaměřená zejména na oblast nízkonákladové mikrofluidiky a výroby PDMS čipů, dále rešerše na téma použití 3D tisku v chemii, zejména v mikrofluidice.
2. Experimentální studium možností generování kanálku pro laboratoř ve stříkačce pomocí 3D tisku, návrh 3D motivu, optimalizace, tvorba PDMS stříkačky s 3D kanálkem a její testování.
3. Zhodnocení studia a zpracování diskuse k výsledkům z pohledu současných poznatků v odborné literatuře.

1 Úvod

Jelikož je v posledních letech trendem miniaturizace a zjednodušování zařízení napříč všemi odvětvími, ani v případě chemie tomu není jinak. Takovým příkladem může být mikrofluidika, což je technika zabývající se prouděním kapalin a plynů v kanálcích malých rozměrů (řádově se jedná o milimetry až jednotky mikrometrů). Tyto mikrokanálky mohou být do různých materiálů buď vytvarovány nebo vyleptány. Dříve se používalo např. sklo, ale nyní je nejpoužívanějším materiálem pro výrobu kanálek netoxický polymer polydimethylsiloxan (PDMS), který je hojně využíván především pro svou transparentnost, reverzibilní přilnavost k materiálům, pružnost a chemickou inertnost. Zařízení, která mají takovýchto kanálek více, mnohdy i různě propojených, označujeme jako mikrofluidní čipy a umožňují provádět např. směšování nebo separaci. Výhodou mikrofluidních zařízení je nejen jejich přenosnost a malá spotřeba vzorků i činidel, ale také, a to především, nízká pořizovací cena. To je příznivé nejen pro běžnou laboratorní praxi, ale také pro použití v rozvojových zemích, kde je vybavení laboratoří mnohdy nedostačující. Malá spotřeba vzorku a rychlost analýzy je vhodná mimo jiné i pro novorozenecký screening.

Způsobů, jak vyrobit mikrofluidní zařízení existuje celá řada. Mezi nejhlavnější z nich dříve patřily metody litografie, fotolitografie nebo měkké litografie, které k vytvoření požadované mikrofluidní struktury využívaly elektromagnetického záření. S velkým boomem 3D tiskáren se však zhruba od roku 2008 začal 3D tisk promítat i do výroby mikrofluidních zařízení, čímž tradiční metody výroby ustoupily. Mezi nejvyužívanější techniky 3D tisku v oblasti mikrofluidiky patří stereolitografie, dále pak „Multi Jet Modeling“, „Fused Deposition Modeling“ nebo metoda ESCAGROT využívající tvarování PDMS. Metody budou popsány v kapitole zaměřující se na použití 3D tisku v mikrofluidice.

Další úsek práce se bude zabývat tiskovými strunami – materiály, které jsou vhodné pro tisk mikrofluidních objektů. Příkladem může být polypropylen, polymléčná kyselina či akrylonitril-butadien-styren. Zde budou zobrazeny jejich chemické struktury a zmíněny jejich výhody a též nevýhody, jakož i srovnání nejdůležitějších fyzikálních vlastností vybraných filamentů.

Experimentální část práce bude zaměřena na celý postup výroby kanálku v injekční stříkačce, a to pomocí 3D tisku s upravenou metodou ESCAGROT. Nejdříve bude rozebrána tvorba návrhu mikrofluidní struktury, její rozdělení do horizontálních vrstev pomocí softwaru a následné převedení souboru do 3D tiskárny. Dalším krokem bude nastavení parametrů tiskárny podle použitého filamentu nebo požadované kvality a samotný tisk. V dalším oddílu bude práce zaměřena na upevnění kanálku ve stříkačce, odlévání a následné vytvrzování PDMS včetně odstranění zalitého kanálku inovativním způsobem, bez použití rozpouštědla. V neposlední řadě bude uvedeno využití této laboratoře ve stříkačce na příkladu detekce a kolorimetrického stanovení nikelnatých iontů ve vodném roztoku. Na konci experimentální části se bude práce zabývat řešením postupu výroby pomocí inovativní metody v případě složitějších struktur.

2 Teoretická část

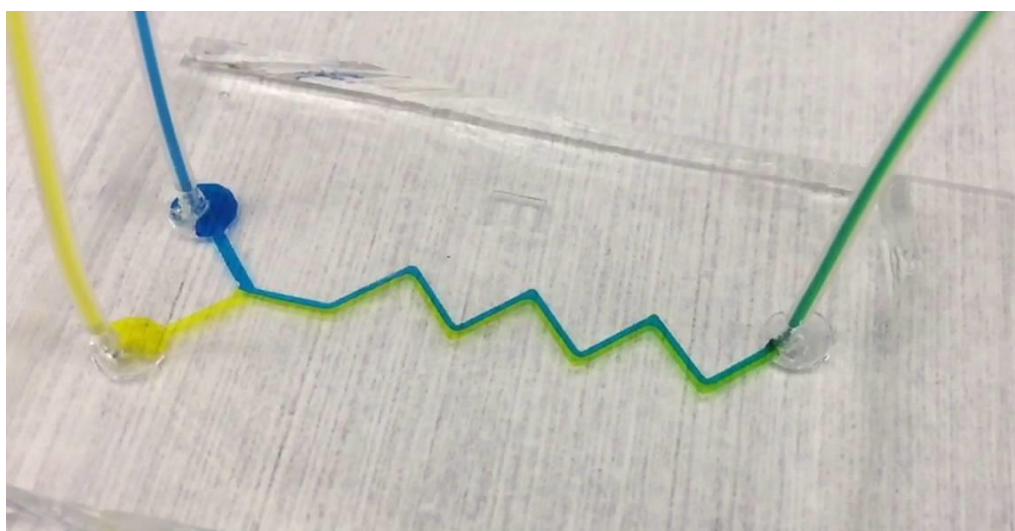
Na několika následujících stranách byla zpracována rešerše na téma mikrofluidika zaměřena zejména na oblast nízkonákladové mikrofluidiky. Dále byly popsány metody pro výrobu mikrofluidních zařízení, především polydimethylsiloxanových (PDMS) čipů. Následně bylo zpracováno také použití 3D tisku v chemii, především pak v oblasti mikrofluidiky.

2.1 Mikrofluidika

Termínem mikrofluidika rozumíme technologii, nebo též obor na pomezí chemie, fyziky dokonce i inženýrství a buněčné biologie, který se zabývá prouděním tekutin v kanálcích a dutinách o velikosti od několika milimetrů po jednotky mikrometrů. Od makroskopických systémů se liší například převládajícím laminárním prouděním nad turbulentním, díky němuž mohou kapaliny souběžně proudit a mísit se pouze vlivem difuze, aniž by docházelo k chaotickému mísení. V mikrofluidních systémech rovněž dominují kapilární síly nad gravitačními. [1] Mikrofluidika vykazuje vysoký poměr povrchu k objemu, což umožňuje rychlý přenos hmoty i tepla, a právě proto je ideální technikou pro přesné řízení a sledování reakcí. Zařízení v tak malém měřítku odolává vysokému tlaku a teplotám. [2], [3] Výhodou mikrofluidních zařízení je nejen jejich nízká cena díky malé spotřebě materiálu, vzorku a činidel, ale příznivá je také jejich přenosnost. Dále tato technika díky automatizaci souběžných procesů zvyšuje počet analýz za den a tím vytváří i menší množství odpadu. [4] Navíc při práci s malým množstvím činidel mohou být vysoce reaktivní, výbušné nebo toxické reakce poměrně snadno zmírněny a hrozí tak daleko menší rizika. [5], [6] Těchto zařízení lze dobře využít též v místech, kde není možné provést kvalitní analýzu kvůli nedostačujícímu vybavení laboratoří, typicky v rozvojových zemích. Díky přesné technologii našla mikrofluidika své uplatnění rovněž v mnoha odvětvích, od biologických analýz a chemických syntéz až po optiku. Výzkumu v těchto oblastech se aktivně věnují pracovníci akademických i průmyslových laboratoří. [4], [2], [7]

2.2 Mikrofluidní čip

Jedná se o systém mikrokanálek vytvarovaných nebo vyleptaných do materiálu jako je například sklo či polymer. Mikrokanálky tvořící mikrofluidní čip mohou být vzájemně propojeny. Čip je pak připojen k vnějším vstupům a výstupům, jimiž se přivádějí nebo odvádějí kapaliny, případně plyny. [8] Toto propojení vytváří rozhraní mezi mikro a makro světem. Kromě kanálek jako takových může čip tvořit celá řada dalších komponent, např. pumpy, směšovače (Obr. č. 1) a uzávěry. Mikrofluidní čipy se označují také jako Lab-on-a-Chip (LoC) nebo Micro Total Analysis Systems (μ -TAS). Tyto termíny vyjadřují snahu o zkrácení cesty vzorku laboratoří a sloučení jednotlivých operací do analyzátoru např. o velikosti kreditní karty. [9]



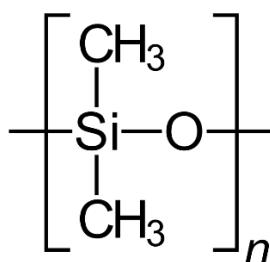
Obr. č. 1: Mikrofluidní čip pro směšování kapalin [10]

2.2.1 Historie mikrofluidních čipů

Mikrofluidní kanálky integrované do čipu se zprvu využívaly v elektrotechnice pro výrobu miniaturizovaných tranzistorů a později mikroprocesorů. Tehdy, v šedesátých letech minulého století, se díky investici Spojených států do programu Apollo, vyvinula technika fotolitografie umožňující miniaturizaci a integraci tisícovky tranzistorů na křemíkovou destičku. Později, v osmdesátých letech, se využívaly postupy leptání křemíku, čehož se využívalo rovněž v mikroelektronickém průmyslu. Jelikož tento způsob výroby umožňoval integraci mechanických mikrosoučástí zabudovaných v destičce, označoval se tento typ zařízení zkratkou MEMS, (tzn. Micro Electro Mechanical System). Dnes je tento typ zařízení také součástí „smartphonů“. Během devadesátých let byly zkoumány aplikace MEMS v různých odvětvích jako je biologie, chemie nebo biomedicína. Mikrofluidní čipy byly poprvé pro chemickou analýzu použity v roce 1990 a staly se důležitou součástí mikroanalýzy. [11] Velké úsilí výzkumníků bylo vynaloženo pro vytvoření laboratoře na čipu, které by umožnilo integraci procesů běžné analýzy do jednoho čipu. V té době byla ale většina mikrofluidních zařízení vyrobena především ze skla nebo křemíku, což bylo náročné na výrobu. Teprve v novém tisíciletí, s boomem 3D tisku, nastal růst technologií založených na formování mikrokanálků v polymeru. Jelikož je výroba rozměrných mikrofluidních zařízení pomocí 3D tisku náročná na pracovní sílu a vybavení pro některé z technik je nákladné, u analýz v laboratořích se upřednostňuje výroba v malém měřítku. [12] Zkrácením času výroby a snížením ceny zařízení se tak mikrofluidika díky 3D tisku dostala do mnoha výzkumných laboratoří. [8] V současné době rozvoj mikrofluidních systémů umožňuje svou miniaturizací jednotlivých procesů vyrobit např. kompletní laboratoř ve stříkačce (lab-in-a-syringe).

2.3 Polydimethylsiloxanové čipy a jejich výroba

V posledních dvou desetiletích je nejvyužívanějším materiálem pro výrobu mikrofluidních čipů snadno formovatelný polymer polydimethylsiloxan (PDMS). [8] (Obr. č. 2) Polymer PDMS, silikon původně využívaný především ve vlasové kosmetice, se stal nejrozšířenějším a nejoblíbenějším materiálem k výrobě 3D mikrofluidních zařízení především pro jeho úspornost, biokompatibilitu, snadnou manipulaci a vhodné fyzikální vlastnosti jako je např. průhlednost, chemická inertnost, nevodivost, reverzibilní přilnavost k materiálům, propustnost pro plyny a nepropustnost pro vodu nebo pružnost. Jeho index lomu (1,4) je blízký indexu lomu skla (1,52). Výhodou také je, že se na PDMS nevztahují žádná autorská práva. [12], [13], [14]

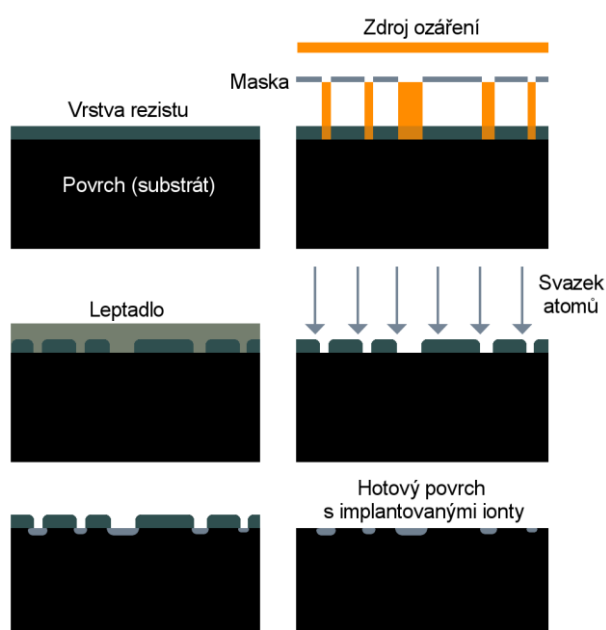


Obr. č. 2: Struktura PDMS [15]

Jak již bylo uvedeno výše, mikrofluidika má široké využití. Jelikož je tento vědní obor relativně mladý, pro čipy ještě nejsou ustálené výrobní postupy. Metod pro výrobu PDMS čipů je celá řada a v této práci budou zmíněny jen některé z nich. Výroba zařízení s využitím PDMS je jednoduchá, dokonce i v případě složitých struktur, avšak dosažení dobrých výsledků, zvláště u některých technik, vyžaduje spolehlivou techniku a zkušenosti. [12]

2.3.1 Litografie

Litografie je metoda chemicko-fyzikálního zpracování povrchu umožňující vytváření jemných mikrostruktur a nanostruktur. Jedná se o přenesení systému na povrch strukturovaného substrátu. [16] Principem je selektivní interakce elektromagnetického záření se složkou citlivou na světlo vymezené části fotosenzitivního povlaku naneseného na povrch substrátu. Obecným postupem je vytvoření, případně úprava vhodného povrchu, na který je pak nanесena vrstva tzv. rezistu, což je chemická substance citlivá např. na světlo nebo elektrony. Ta reaguje na podněty tak, že se změní její rozpustnost v určitém rozpouštědle. Následuje ozáření rezistu v místech, která nemají být odstraněna. Poté je na rezist nanесena vrstva leptadla, které narušuje pouze neozářená místa. Po vyleptání zůstává původní povrch s vrstvou ozářeného nerozpuštěného rezistu na požadovaných místech. Nyní dochází k samotné technologické operaci. Je však důležité, aby zbylá vrstva rezistu byla pro danou operaci nepropustná. Příkladem takové technologické operace může být vyleptání původního povrchu nebo nanесení nové vrstvy. Závěrečným krokem litografie je odstranění ozářeného rezistu a následné omytí povrchu. Pro lepší představu techniky litografie je zde uvedeno grafické znázornění tohoto postupu (Obr. č. 3). [17]



Obr. č. 3: Znázornění techniky litografie [17]

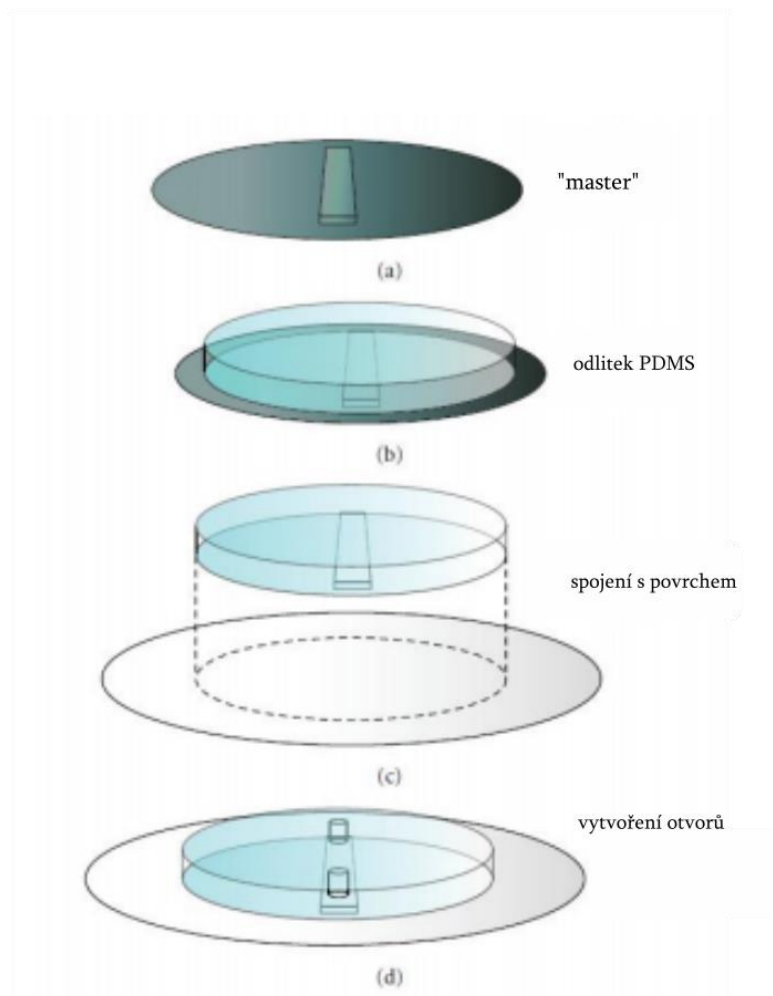
2.3.2 Fotolitografie

Jedná se o technologický postup optické litografie prováděný při vlnových délkách elektromagnetického záření 430–160 nm [16] a uskutečňuje se v pěti krocích. Cílem je přenos mikrokanálek z foto-masky na skutečnou formu pomocí světla. [18]

Na nečistot zbavený povrch substrátu (nejčastěji plastovou fólii nebo sklíčko pokryté vrstvou chromu) je nanesena vrstva polymeru, fotosenzitivního povlaku – rezistu. Tento krok se provádí u specializovaného výrobce nebo ve speciálně upravené čisté místnosti, tzn. v místnosti s určitým počtem částic v mikronech. Poté je třeba pomocí vhodného softwaru (AUTOCAD, LEDIT, Illustrator) [8] vytvořit počítačový návrh mikrofluidního čipu – masku se vzorem. Následuje expozice, ozáření rezistu přes masku s vytvořeným vzorem. Nakonec dochází k odleptání nebo odstranění fotorezistu. Je-li fotorezist pozitivní, odstraňuje se jeho exponovaná část (záření narušuje chemické vazby exponované části a ty se následně odleptají), v případě negativního fotorezistu odstraňujeme část neexponovanou (záření vede k fotochemickým reakcím a dochází k vytvrzení exponované části). [8], [16], [18]

2.3.3 Měkká litografie

Výhodnou technikou pro výrobu PDMS mikrofluidních čipů je odlévání a 3D formování tohoto polymeru – měkká litografie, která představuje jednoduchou cestu k rychlému získání prototypu v rozměru 3D (Obr. č. 4). Obecně je zapotřebí tzv. „master“, obvykle získaný litografií křemíkových destiček s požadovanou mikrofluidní strukturou. Následně se PDMS na „master“ nalije a po vytvrzení musí být polymer pečlivě odloupán a následně chemicky spojen s jiným povrchem. [13], [19] Nejjednodušším mikrofluidním zařízením tohoto zmíněného typu je systém mikrokanálek vytvarovaných v PDMS, který je spojen s plochým povrchem, např. podložním sklíčkem, na něž se PDMS dobře tvaruje a rovněž se na něj snadno lepí. [8] Aby mohly být tekutiny do kanálku přiváděny a odváděny, na povrchu PDMS se vytvoří otvory. [20]



Obr. č. 4: Postup výroby čipu pomocí měkké litografie [20]

2.4 Použití 3D tisku v mikrofluidice

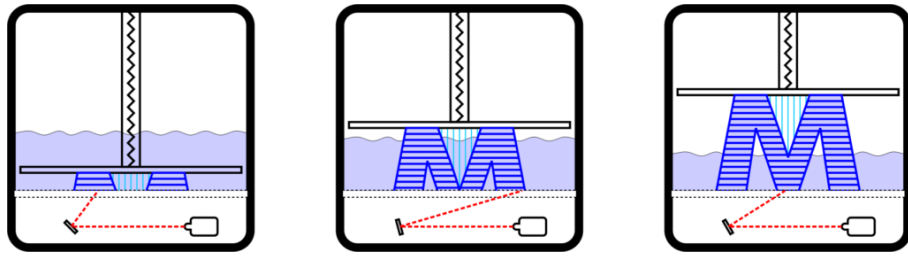
V současné době počet publikací věnující se použití 3D tisku v oblasti mikrofluidických zařízení exponenciálně roste. [14] Sortiment materiálu a jeho možnosti se neustále rozšiřují. V akademických pracovištích se na 3D tisk navíc nahlíží jako na způsob, jak získat hotový výrobek, nejen pouhý prototyp.

3D tisk se využívá v souboru několika technik, které výsledný objekt tvoří vrstvu po vrstvě. Nejrelevantnější z nich, z hlediska mikrofluidiky, jsou: stereolitografie (SL), tzv. „Multi Jet Modeling“ (MJM) anebo „Fused Deposition Modeling“ technologie (FDM). [14]

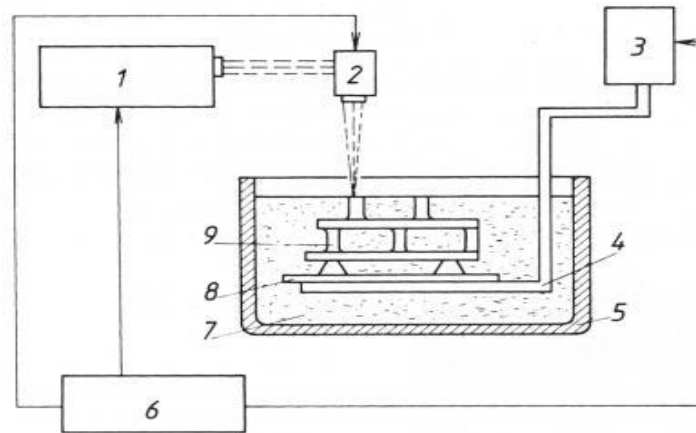
2.4.1 Stereolitografie

Označení pro úplný počátek metod aditivní výroby (nanášení tenkých vrstev na sebe) 3D tisku patří mezi tzv. „Rapid Prototyping“ technologie, pocházející z 80. let 20. století, umožňuje vytvoření libovolné trojrozměrné struktury prostřednictvím laserového paprsku (Obr. č. 5) a (Obr. č. 6) nebo pomocí LED zdroje. [21]

Povrch, podél kterého probíhá fotopolymerace pryskyřice, rozlišuje SL na dva postupy (Obr. č. 7). V postupu „volného povrchu“, používaném staršími stroji SL navrženými společností 3D Systems, je svrchní vrstva polymeru, která je ve styku se vzduchem fotopolymerována laserem. Každá vrstva je obrazem získaným digitálním rozdělením 3D objektu na vrstvy. U novějších systému je fotopolymerace uskutečňována proti dnu nádržky, jedná se o tzv. „vázaný povrch“. V tomto uspořádání je kovová konstrukční deska zavěšená nad nádržkou. Opakovaným ponořením do polymeru dojde ke vzniku vrstev a po ukončení se vytvrzený objekt odloupne ode dna pokrytého PDMS a vrátí se do původní polohy. Jelikož je výsledný objekt stereolitografie převrácený, běžně se toto uspořádání označuje jako konfigurace „netopýr“. Při výrobě složitějších tvarů je nutno použít dočasných podpěr, které se po vyhotovení modelu manuálně odstraní. Oba tyto postupy mají své výhody i nevýhody. Přesnost struktury je lepší v případě techniky s volným povrchem, jelikož mechanické odloupení objektu v konfiguraci netopýra může způsobit ohýbání a zvyšování drsnosti mezi vrstvami. Na druhou stranu technika volného povrchu je omezena hloubkou vany, a tudíž výškou objektu. Jelikož kyslík inhibuje proces fotopolymerace, doba vytvrzování je kratší u konfigurace netopýra, kde vytvrzování probíhá mimo rozhraní polymer-vzduch. Celkovou výhodou stereolitografie je její přesnost, možnost vytvářet objekty s dobrými fyzikálními vlastnostmi v krátkém čase a v co nejvyšší kvalitě. K nevýhodám patří vyšší cena zařízení a relativně pomalý proces vytvrzování polymeru. U některých materiálů se lze také setkat s malou tepelnou odolností vzniklého modelu. [14], [22], [23], [24]



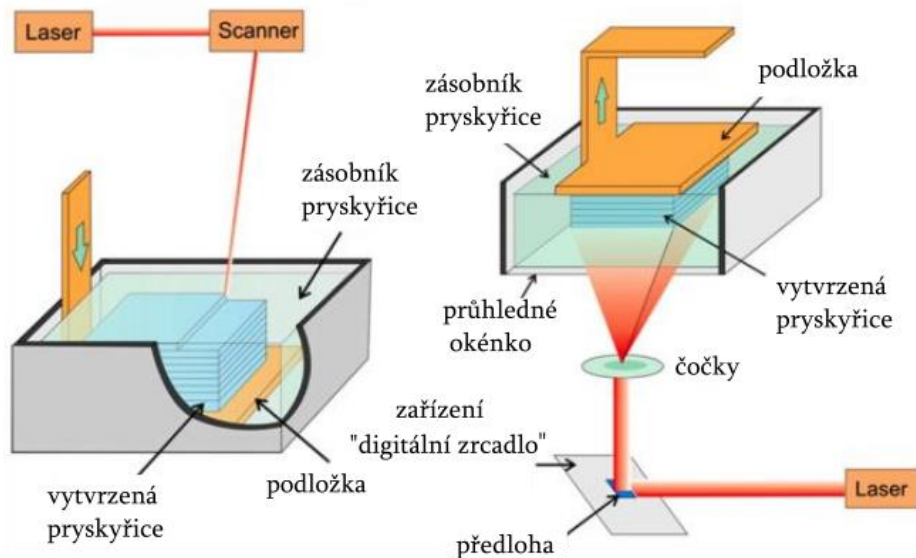
Obr. č. 5: Princip tisku SL [25]



Obr. č. 6: Schéma zařízení pro technologii stereolitografie (1 – laser, 2 – pracovní hlava laseru, 3 – systém pro posuv nosné desky, 4 – nosná deska, 5 – pracovní vana, 6 – CNC řídicí systém, 7 – fotopolymér, 8 – podložka, 9 – vyráběná součást) [24]

A. Technika "volného povrchu"

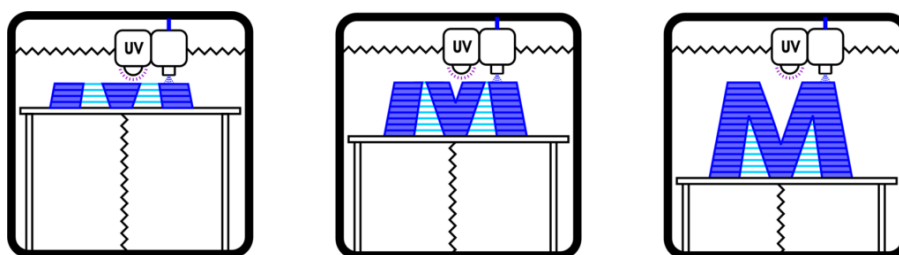
B. Uspořádání "netopýr"



Obr. č. 7: Konfigurace stereolitografie A. technika „volného povrchu“ B. technika „vázaného povrchu“ (konfigurace netopýr) [14]

2.4.2 Multi Jet Modeling

Multi Jet Modeling je technologie 3D tisku, známá také jako „Polyjet“ nebo „Photopolymer Inkjet Printing“, patentována v roce 1999 firmou Objet. V této tiskové metodě je každá vrstva kapalného fotopolymery nanášena postupně pomocí tiskové hlavy. Ta, v případě techniky MJM, obsahuje až 352 v řadě umístěných trysek. Model se tiskne na desku, která se po nanesení vrstvy posune o tloušťku vrstvy směrem dolů (Obr. č. 8). Tloušťka vrstvy se odvíjí od typu tiskárny. Nanášený materiál tuhne polymerací pomocí UV ihned po styku s podložkou. V případě převisů nebo složitých struktur je třeba použít podpěry. Inkoustové zásobníky mohou dodávat gelovitý materiál, který se po dokončení tisku rozpustí. Tisk MJM je atraktivní technologií pro mikrofluidní aplikace, a to díky vysokému rozlišení a možností tisku z více materiálů. Pomocí tisku MJM lze v jednom kroku spolehlivě odstranit materiál z uzavřeného kanálku pomocí válcové sondy nebo ultrazvuku se stlačeným vzduchem, a proto je možná produkce libovolných mikrofluidních sítí. [14], [25]

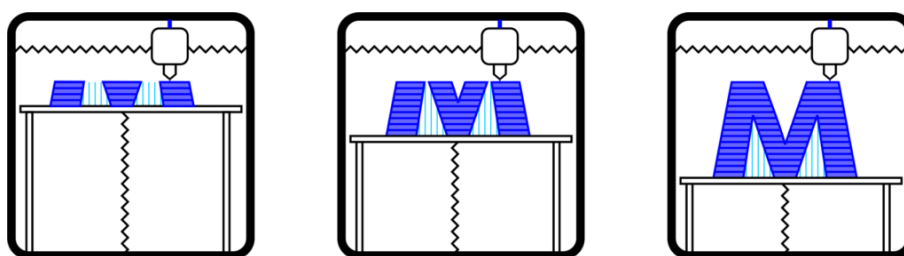


Obr. č. 8: Princip tisku MJM [25]

2.4.3 Fused Deposition Modeling

Technologie FDM nebo též „termoplastická extruze“ byla patentována Scottem Crumpem v roce 1992. Pomocí trysky pohybující se vertikálně ve třech směrech se vytlačuje roztavený termoplastický materiál z tiskové struny navité na cívku. Když je vrstva hotová, stavební platforma se posune o průměr vlákna směrem dolů a vytváří se nová vrstva (Obr. č. 9). Výsledná struktura modelu má nerovný povrch vodorovné vrstvy, lze jej však dále upravovat broušením nebo leštěním. Jelikož ale vytlačovaný materiál okamžitě po vytlačení tvrdne, sousední vrstvy nejsou dobře tavené, což má za následek nízkou konstrukční pevnost FDM tištěných

objektů. Zahřnutí vyhřívané skříně zvyšuje fúzi mezi vrstvami a strukturální integritu, ale nevylučuje deformace tištěného objektu. Výroba mikrokanálku pomocí technologie FDM je náročná hned z několika důvodů: vlákna, která jsou dána procesem vytlačování, nemohou být libovolně spojena v průsečících kanálech; nedostatek strukturální integrity mezi vrstvami má za následek špatné těsnění a průměr vytlačovaných vláken je větší než u běžných kanálků používaných v mikrofluidice. Omezením tohoto postupu je také to, že mohou být vyrobeny pouze kanálky s kruhovými průřezy a kolnými spoji. [14], [25]

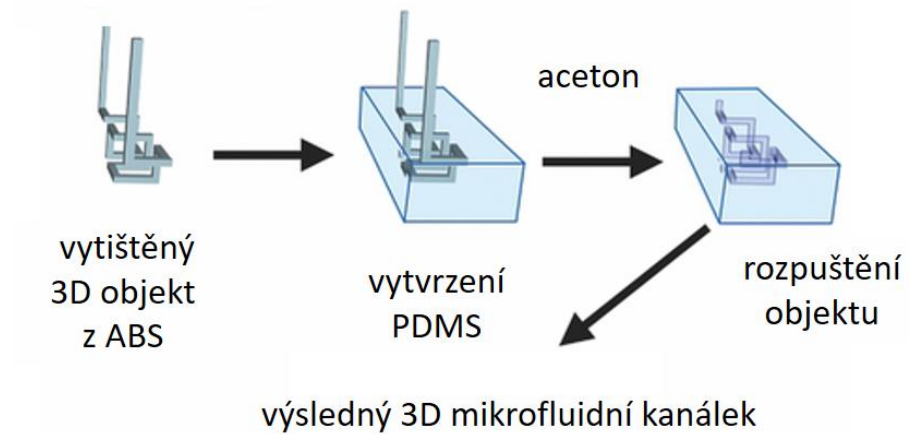


Obr. č. 9: Princip tisku FDM [25]

2.4.4 Tvarování PDMS

Při použití metody využívající 3D tisk je mikrofluidní zařízení získáno kratší cestou, není potřeba litografických kroků ani silikonových masterů. Odpadá rovněž nutnost spojení PDMS s jiným povrchem a opakovaných postupů pro získání víceúrovňových kanálků. Díky tomu se výroba mikrofluidních zařízení stává snazší a levnější. Proces začíná návrhem 3D modelu v příslušném softwaru, např. Fusion nebo OnShape. S takto vytvořeným modelem umí pracovat jakákoliv 3D tiskárna. Tzv. „slicovací software“ převede návrh do dvoudimenzionálních horizontálních vrstev, které tiskárna tiskne postupně vrstvu po vrstvě, až vytiskne celý trojdimenzionální model kanálku. [26] Takto vytištěný kanálek, například z plastické polymléčné kyseliny (PLA) nebo akrylonitril-butadien-styrenu (ABS), se vloží do kapalného PDMS a po jeho vytvrzení se PLA, resp. ABS rozpustí za použití rozpouštědla, které je inertní vůči PDMS. Tím pak v polymeru vznikne dutina – mikrokanálek. Tato metodika byla pojmenována zkratkou ESCARGOT (Embedded SCAffold RemovinG Open Technology), tedy technologie umožňující odstranění kanálku přímo v mikrofluidním zařízení (Obr. č. 10). Pomocí této metody lze vytvořit jakoukoli strukturu kanálku, a to i extrémně složitou, ve dvou jednoduchých krocích,

v podstatě bez znalosti litografie nebo zkušenostmi s výrobou mikrofluidních zařízení. Ve srovnání s ostatními výrobními postupy je ESCAGROT metodou všestrannou a výkonnou pro vytvoření složitých struktur kanálku, s možností snadné integrace externích součástí (komponent), jako je například topné těleso nebo plně funkční mikrocívka pro NMR. [13]



Obr. č. 10: Princip technologie ESCAGROT [13]

2.5 Materiály využitelné pro 3D tisk

V metodě 3D tisku je využívána hned celá řada materiálů tiskových strun tzv. filamentů (Obr. č. 11). Hlavním kritériem při jejich výběru je nejen cena, rozhodující jsou také požadavky na vlastnosti výsledného výrobku jako je pružnost, mechanická a chemická odolnost nebo průhlednost, ale i trvanlivost.



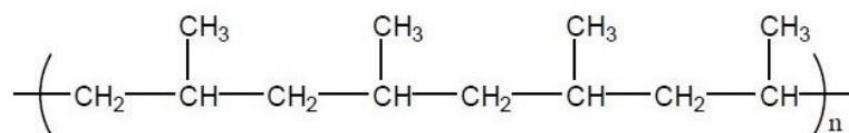
Obr. č. 11: Ukázka cívek filamentů pro 3D tiskárny [27]

Mezi nejběžnější extrudované materiály pro mikrofluidiku, tedy ty, ze kterých je pomocí teploty a tlaku původní materiál (struna či granulát) roztaven a protlačován přes matici za vzniku vlákna, patří polypropylen (PP), akrylonitrýl-butadien-styren (ABS) a polymléčná kyselina (PLA). [28], [29]

2.5.1 Polypropylen

Polypropylen se skládá z monomerních jednotek propylenu. Strukturu určují methylové skupiny, které jsou připojeny ke každému druhému atomu uhlíku v řetězci. Pokud tyto skupiny směřují na stejnou stranu, PP označujeme jako izotaktický (Obr. č. 12). Právě tato pevná a silná forma vysoce krystalizovaného PP je komerčně nejvýznamnější. Polypropylen je termoplastický polymer, který se používá především pro svou vysokou biologickou kompatibilitu, dobré mechanické vlastnosti, chemickou odolnost, flexibilitu a odolnost vůči vyšším teplotám, než je tomu u ABS a PLA. Jedná se o polo-krystalický materiál, což zapříčiňuje, že se viskozita nemění postupně s rostoucí teplotou, ale změna nastává skokově. Při extrudaci PP v kapalném stavu nastává po ochlazení pod bod tání

krystalizace. Pokud jde o aplikaci PP v 3D tisku, je známo, že vytisknout výrobek z něj je obtížné kvůli deformaci a špatné přilnavosti vrstev. Pokud by tomu ale tak nebylo, zřejmě by PP díky své výborné mechanické a chemické odolnosti v 3D tisku konkuroval PLA. [28], [29], [30], [31]

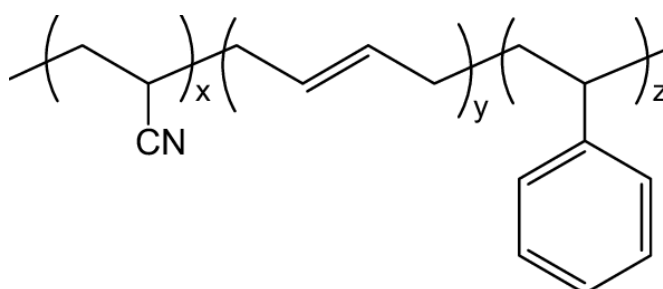


Obr. č. 12: Struktura izotaktického polypropylenu [30]

2.5.2 Akrylonitril-butadien-styren

Materiál ABS je na rozdíl od PP neprůhledný amorfnní termoplastický kopolymer, což znamená, že může být opakovaně roztaven a krystalizován, aniž by došlo ke znehodnocení materiálu.

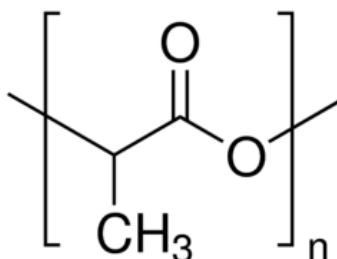
Skládá se ze tří druhů monomerů: akrylonitrilu (21–27 %), 1,3-butadienu (12–25 %) a styrenu (54–63 %) [32] (Obr. č. 13). ABS lze snadno modifikovat změnou poměru jednotlivých přísad, proto existuje množství různých typů pro různé aplikace. Jeho využití je všestranné díky snadnému opracování, chemické odolnosti a odolnosti vůči mechanickému poškození. Je odolný také vůči nízkým i vysokým teplotám, kyselinám i hydroxidům. ABS je rozpustný v acetonu, čehož se využívá také při výrobě kanálku. V případě ABS se z vytištěného objektu snadno odstraňují podpurné prvky. Nevýhodou je náchylnost k deformacím materiálu při změnách teplot. Nutností je vyhřívání podložka tiskárny a zajištění pomalého ochlazování výrobku. ABS struny jsou dostupné v mnoha barevných provedeních a hotový výrobek lze také snadno natřít na jakoukoli barvu. [28], [29], [30], [34]



Obr. č. 13: Struktura ABS [35]

2.5.3 Polymléčná kyselina

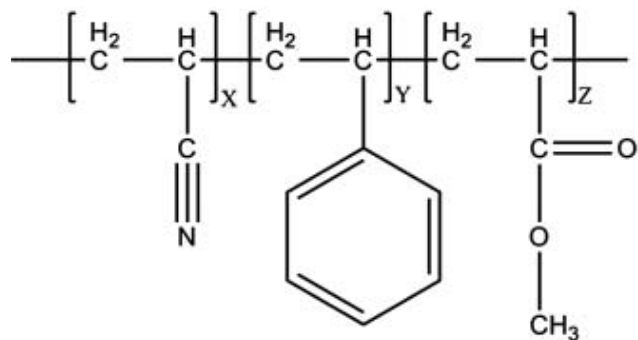
Dalším, dnes nejpoužívanějším materiálem pro 3D tisk, je termoplastický polymer PLA, patřící do skupiny alifatických polyesterů. Může být polykrystalický nebo amorfní, v závislosti na počtu stereoizomerů v hlavním řetězci (Obr. č. 14). Mezi hlavní jeho přednosti patří nízká cena, univerzálnost, a ve srovnání s běžnými plasty na bázi oleje, přirozená degradace po vystavení životnímu prostředí. Výrobky z něj se snadno tisknou, jsou velmi tvrdé a křehké. Polymléčná kyselina se vyrábí z bramborového, kukuřičného nebo tapiokového škrobu, či cukrové třtiny. Nevýhodou tohoto materiálu je sklon k pohlcování vlhkosti, což má za následek tvoření bublin na povrchu. Není náchylný ke kroucení díky minimálnímu rozpínání při tavení. Hotový výrobek je méně odolný vůči vyšším teplotám, než je tomu u ABS (PLA měkne při 60 °C, ABS při 100 °C). Výrobky vytištěné z PLA jsou na rozdíl od ABS méně pružné a mají vyšší lesk. [28], [29], [33]



Obr. č. 14: Struktura PLA [24]

2.5.4 Akrylonitril-styren-akrylát

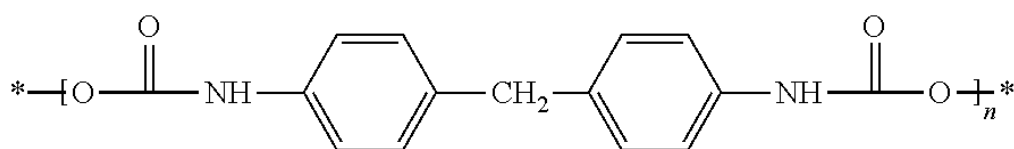
Akrylonitril-styren-akrylát (ASA) byl vytvořen jako chemicky podobná alternativa k materiálu ABS. Polybutadien je zde nahrazen nasyceným elastomerem polymetakrylátu (Obr. č. 15), a tím dochází ke zvýšení tuhosti. ABS je vysoce kvalitní termoplast s dobrou mechanickou odolností a zvýšenou odolností proti vyšším teplotám i UV záření. Jeho zpracovatelnost na 3D tiskárnách je jednoduchá a přitom je kvalita tisku i při náročných detailech vysoká. Výhodou je také zachování fyzikálních vlastností a malý sklon ke žloutnutí, což je důležité u aplikací s důrazem na kvalitu dlouhodobého vzhledu. Další předností je celková prostorová stabilita. ASA je vhodný pro tiskárny s technologií FDM. [28], [33], [36]



Obr. č. 15: Struktura ASA [36]

2.5.5 Flexfill

Flexibilní materiál označovaný jako „Flexi“, „Rubber“ nebo též „Flexfill“ je speciální fotopolymer podobný gumě (Obr. č. 16). V našem konkrétním případě se jedná o termoplastické polyuretanové vlákno „TPU 92 A“ (měkčí ze dvou stupňů tvrdosti) s vysokou zpracovatelností a výtečnými mechanickými vlastnostmi – TPU je pružný, velmi silný a odolný materiál se skvělou přilnavostí mezi vrstvami. Tyto parametry jsou způsobeny zastoupením měkkých (elastomerních) a tvrdých (termoplastických) segmentů v řetězci, jejichž změnami poměru lze ovlivnit výsledné vlastnosti materiálu. Filament Flexi se používá v případech, kdy tisk z klasického tvrdého plastu není vhodný, např. při požadavcích na absorbování nárazů. [28], [33]



Obr. č. 16: Struktura TPU [37]

Typické mechanické a fyzikální vlastnosti zmíněných materiálů tiskových strun jsou pro porovnání zmíněny níže (Tab. č. 1).

Tab. č. 1: Přehled vlastností vybraných materiálů pro 3D tisk

Materiál a jeho vlastnosti	PP	ABS	PLA	ASA	FLEXI	Zdroje
Hustota [kg/m ³]	910	1050	1250	1070	1200	[28], [38]
Teplota skelného přechodu [°C]	-20–20	-85–105	60–65	100	-	[39]
Teplota tání [°C]	160–165	amorfní	150–160	210–240	-	[38], [39]
Teplota zpracování [°C]	210–230	220–240	185–235	250–255	240–260	[28]
Teplotní deformace (při 0,46 MPa) [°C]	100	98	50	97	-	[40], [41], [42]
Pevnost v tahu [MPa]	26	34	60	47	49	[28], [34]
Odolnost vůči nárazu [J/m]	150	250	47	156	-	[34], [39]

Z tabulky je zřejmé, že z hlediska hustoty a pevnosti vykazuje nejvyšší hodnoty PLA. Jelikož je PLA křehký materiál a má spíše sklony k lámání nežli ohýbání, práce s ním je při tisku náročnější oproti PP, který vykazuje větší pružnost. Ve srovnání s ostatními materiály má PLA nejnižší hodnotu teplotní deformace. Co se týče odolnosti vůči nárazu, PP je mnohem houževnatější než PLA. Nejvyšší odolnost vůči nárazu má však ABS. [34]

3 Experimentální část

V druhé části bakalářské práce bude demonstrováno experimentální studium možností generování kanálků z několika druhů filamentů pro laboratoř ve stříkačce pomocí 3D tisku, návrh 3D modelu, optimalizaci, tvorbu PDMS stříkačky s mikrofluidním kanálkem a následně její testování.

3.1 Chemikálie

Silikonové elastomerní vytvrzovací činidlo 184 SYLGARD® a potřebný silikonový elastomer – báze 184 SYLGARD® (zakoupené od firmy Elchemco, s.r.o., Praha), vodné roztoky NiCl_2 o různých koncentracích (zásobní koncentrace 0,1 mol/l) a Čugajevovo činidlo (1% ethanolový roztok dimethyldioximu), vše zakoupeno od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

3.2 Materiál

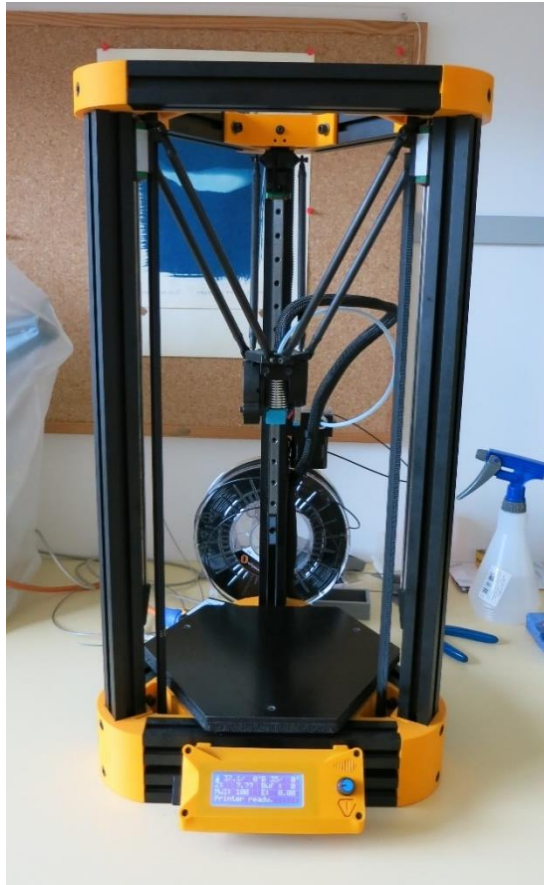
Tiskové struny (PLA, ABS, ASA, FLEXI) zakoupené od firmy TriLAB, s.r.o., Brno, modelovací hmota a celulózový papír (CFSP20300 Millipore) zakoupený od firmy Labicom (Olomouc).

3.3 Metody

V následující kapitole bude popsán postup přípravy a samotná výroba mikrofluidního kanálku ve stříkačce.

3.3.1 3D tisk a jeho příprava

Nejdříve byla navržena 3D struktura kanálku v softwaru Autodesk® Fusion 360™. Tato struktura byla následně v softwaru Meshmixer (Autodesk®) převedena na soubor ve formátu „.stl“. Poté byla pomocí tzv. „slicovacího“ softwaru (Kisslicer®) převedena do jednotlivých horizontálních vrstev již připravených pro samotný 3D tisk. V tomto bodě bylo možné upravovat velikost modelu, tloušťku horizontálních vrstev, kvalitu tisku nebo materiál pro tisk. Takto rozvrstvený model s údaji o souřadnicích byl uložen na SD kartu ve formátu „.g.code“ a převeden do 3D tiskárny DeltiX Mini od firmy TriLAB, s.r.o., Brno (Obr. č. 17).



Obr. č. 17: 3D tiskárna

Před tisknutím byla podložka tiskárny očištěna isopropanolem pro docílení lepší přilnavosti k povrchu filamentů, zejména u PLA, ABS a ASA. Rozprašovačem bylo na podložku tiskárny nastříkáno malé množství tohoto alkoholu a poté byl povrch přetřen papírovým ubrouskem. V případě materiálu FLEXI bylo před tiskem třeba povrch opatřit nátěrem běžného tyčinkového lepidla.

Po nahřátí tiskové hlavice a podložky na požadovanou teplotu podle použitého materiálu (Tab. č. 2) byl tisk zahájen. Změna teploty byla kontrolována pomocí displeje na tiskárně. Tiskárna byla nejdříve automaticky kalibrována a poté byl proveden automatický zkušební tisk pomocí několika tenkých vláken. Ta byla po dokončení zkušební tisku z podložky odstraněna a následoval již tisk požadovaných struktur. Pro zvýšení efektivity byl na podložku navolen co největší počet tisknutelných objektů. Délka tisku závisela tedy na počtu tisknutých objektů, jejich velikosti, použitém materiálu a značný vliv měla také požadovaná kvalita tisku.

Tab. č. 2: Přehled teplot tisku a povrchu pro vybrané materiály [33]

Materiál	PP	ABS	PLA	ASA	FLEXI
Teplota trysky [°C]	254	255	215	270–280	230
Teplota podložky [°C]	95–100	80–110	50–60	100–110	50–65

Po dokončení tisku se tisková hlavice vrátila do původní polohy a začala se ochlazovat. Jelikož filament rychle tuhne, nebylo nutné čekat na vytvrzení objektů, ale bylo možné je ihned odstranit z podložky. V případě chybných pokusů nebo nesprávného nastavení tiskárny byl tisk manuálně přerušen.

Nejčastěji tisknutými objekty byly především přímé mikrofluidní kanálky ve tvaru tyčinek pro vytvoření kanálků v injekčních stříkačkách.

3.3.2 Odlévání PDMS

Po vytisknutí byl kanálek tyčinkového tvaru vložen do těla stříkačky a v jejím hrdle (otvoru) byl upevněn a zároveň utěsněn pomocí modelovací hmoty. Ve vertikální poloze byla tyčinka téměř celá zalita silikonovým elastomerem PDMS smíseným s vytvrzovacím činidlem v poměru 10:1 (v/v). Takto zalité kanálky ve stříkačkách byly ve vertikální poloze umístěny pro větší stabilitu do kádinky (Obr. č. 18), která byla vložena do exsikátoru. Po jeho uzavření bylo vytvořeno vakuum z důvodu odstranění vzniklých bublin. Za několik minut byl kohout exsikátoru uzavřen a odpojen od vakua. Následovalo samovolné tvrdnutí PDMS (cca 48 hodin).



Obr. č. 18: Zalité kanálky v injekčních stříkačkách upevněné modelovací hmotou (vlevo) a vytvrzené kanálky po odstranění vytištěných tyčinek (vpravo)

4 Výsledky a diskuse

V následující části zhodnotím studium dané problematiky a zpracuji diskusi k výsledkům z pohledu současných poznatků v odborné literatuře.

4.1 Odstranění kanálku

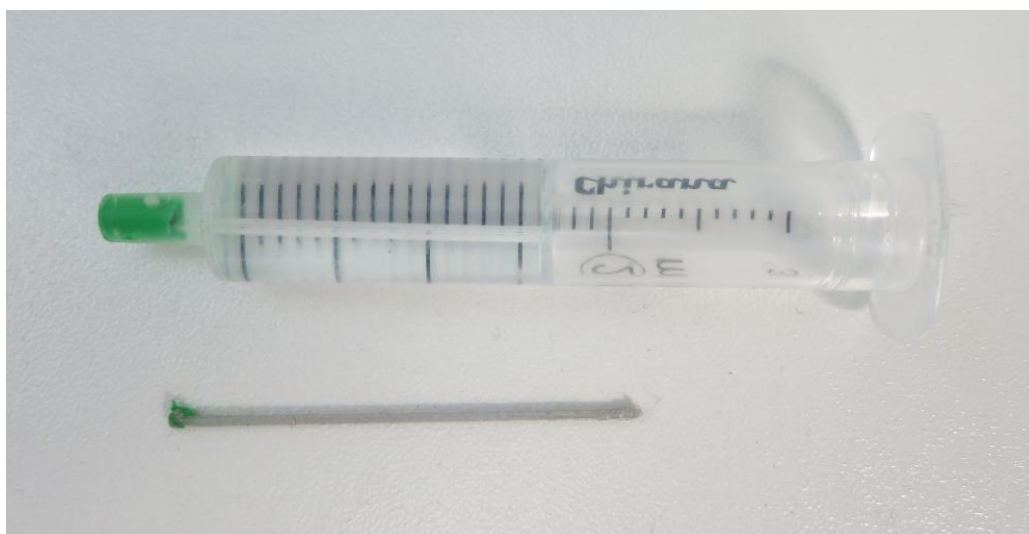
Tato práce navazuje na publikaci Hárendarčíkové a kol. [43] na téma vývoje tzv. stříkačkové mikrofluidiky („lab-in-a-syringe“ čili laboratoř ve stříkačce). V tomto postupu jsou do injekční stříkačky umístěny celulózové podušky, které jsou napuštěny reagensy. Při nasátí vzorku do stříkačky se podušky zbarví. Jedním z problémů publikované práce je potřeba poměrně velkého objemu analyzovaného vzorku, i v případě malých stříkaček je nutné nasát nejméně 2 ml vzorku. Další z možných nedostatků je samotný návrh stříkačky, který umožňuje provádět pouze jednoduchou analýzu (např. kolorimetrii), a neumožňuje tak provádět složitější analytické postupy. Posledním důležitým nedostatkem tohoto návrhu je nutnost vázat reagenty na celulózové podušky, což může být v některých případech nevýhodné – např. když je reagent na celulózu citlivá.

Řešením výše uvedených problémů je využití 3D tisku a PDMS mikrofluidiky v kombinaci s technikou laboratoře ve stříkačce. Pomocí 3D tisku lze navrhnout a vytisknout struktury kanálků, které se poté zalijí PDMS, a po jeho vytvrzení se kanálky odstraní. Proto bylo cílem této práce ověřit, zda je metoda 3D tisku a PDMS mikrofluidiky vhodná i pro techniku „lab-in-a-syringe“.

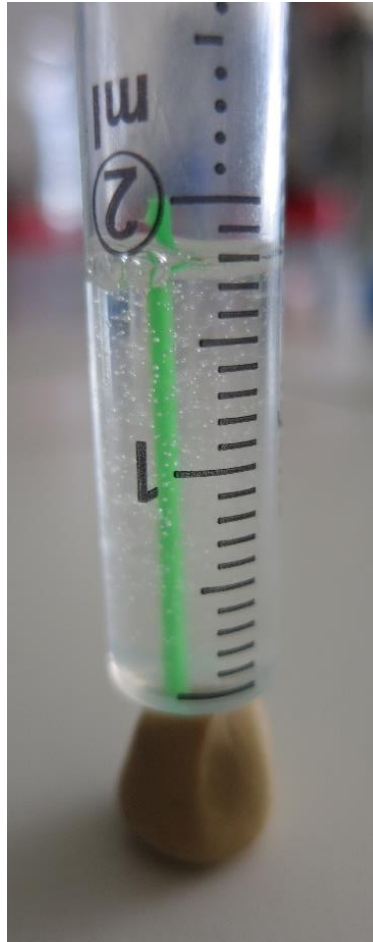
Jelikož bylo žádoucí vyhnout se zdlouhavému rozpouštění kanálku pomocí rozpouštědla po vytvrzení polymeru (rozpouštění ABS v acetonu), jak je tomu u metody ESCAGROT [13], byl v tomto bodě hledán jiný způsob odstranění kanálku. Nejprve bylo vyzkoušeno odstranění PLA kanálku nahříváním pomocí horkovzdušné pistole. Jelikož PDMS je odolnější vůči vyšším teplotám než použitý filament, předpokládalo se, že se PLA rozpustí. Tento postup se ukázal jako neúčinný i za použití teplot v rozmezí 200–400 °C. Pravděpodobně se tak stalo kvůli špatnému prohřátí celého PDMS zařízení. Navíc tato technologie by nebyla účinná ve spojení s běžně dostupnými injekčními stříkačkami, protože ty jsou vyrobeny z plastů, které se taví při nižších teplotách (70–90 °C).

Poté byl ale objeven rychlý a nenáročný způsob odstranění kanálku. Pokud se kanálek zcela nezalije elastomerem, lze jeho konec uchopit pinzetou a kanálek jednoduše manuálně odstranit (Obr. č. 19). Zajímavým zjištěním také bylo, že kanálky z materiálu Flexfill (Obr. č. 20) lze odstranit mnohem jednodušeji, než ty z PLA nebo ASA. Příčinou byla zřejmě pružnost materiálu, díky které je průměr při vytahování menší. Důsledkem byl také hladší povrch vnitřních stěn kanálku bez okem pozorovatelných trhlin. Na druhou stranu materiál Flexfill je uživatelsky málo přívětivý a kvůli jeho pružnosti není pro tisk mikrofluidních struktur, které mají pouze několik vrstev, vhodný.

Velkou výhodou při použití manuálního odstranění těchto kanálků je mimo časovou úsporu také skutečnost, že již vytištěné kanálky lze použít znova k dalšímu zalití. Tím se tvoří méně odpadu.



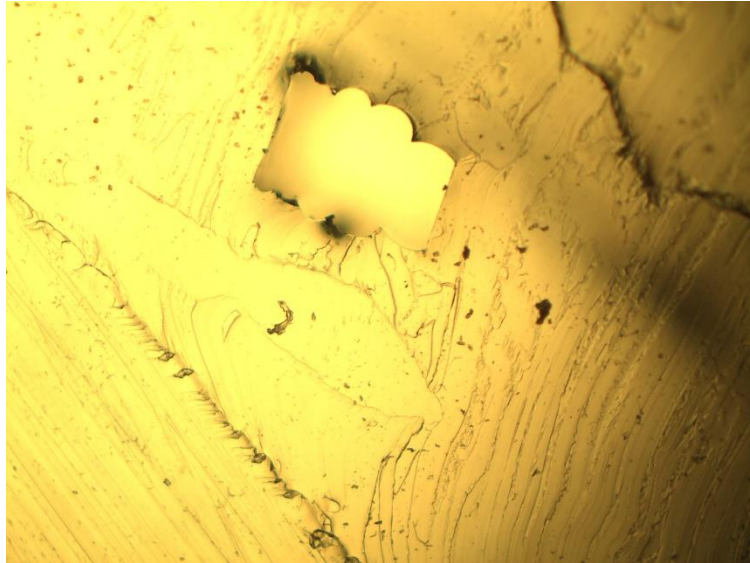
Obr. č. 19: PLA kanálek v injekční stříkačce



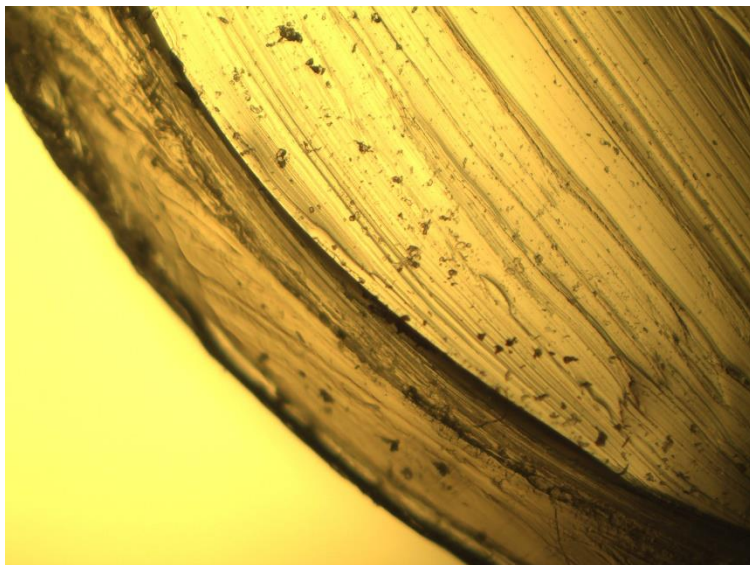
Obr. č. 20: Zalitý Flexfill kanálek

4.2 Struktura kanálku

Pomocí mikroskopu byla pozorována struktura kanálků se zaměřením zejména na tvar průřezu (Obr. č. 21), z něhož jsou zřejmé nedostatky 3D tisku způsobené nedokonalým přilnutím jednotlivých vrstev. Kvůli těmto nerovnostem není zaručeno dokonalé laminární proudění. Pro naše účely byla však tato kvalita tisku dostačující. Pokud by byla potřeba zajistit méně turbulentní proudění toku, mohla by se vytisknout např. pouze jedna vrstva. Dalším aspektem bylo pozorování struktury vytvrzeného PDMS (Obr. č. 22), kde je zřejmá dokonalá přilnavost ke stěnám stříkačky.



Obr. č. 21: Mikroskopický snímek průřezu kanálku ve stříkačce

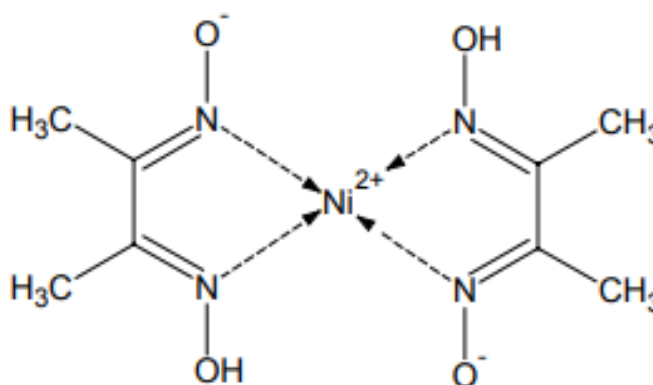


Obr. č. 22: Mikroskopický snímek okraje stříkačky a struktury PDMS

4.3 Důkaz přítomnosti Ni²⁺ pomocí Čugajeva činidla

V kanálcích vytvořených dle výše uvedeného postupu byla ověřena funkčnost zařízení na důkazové reakci nikelnatých iontů v roztoku pomocí Čugajeva činidla.

Čugajevovo činidlo (1% ethanolový roztok dimethyldioximu, diacetylglyoximu) dává ve slabě alkalickém prostředí (při pH = 7–9) červenou sraženinu Ni(DH)₂. Nikelnaté ionty vytváří se dvěma molekulami diacetyldioximu neutrální komplex. V tomto komplexu má nikl koordinační číslo 4, jelikož jsou k němu připoutány dva dvojjazné ligandy (Obr. č. 23). [44], [45]



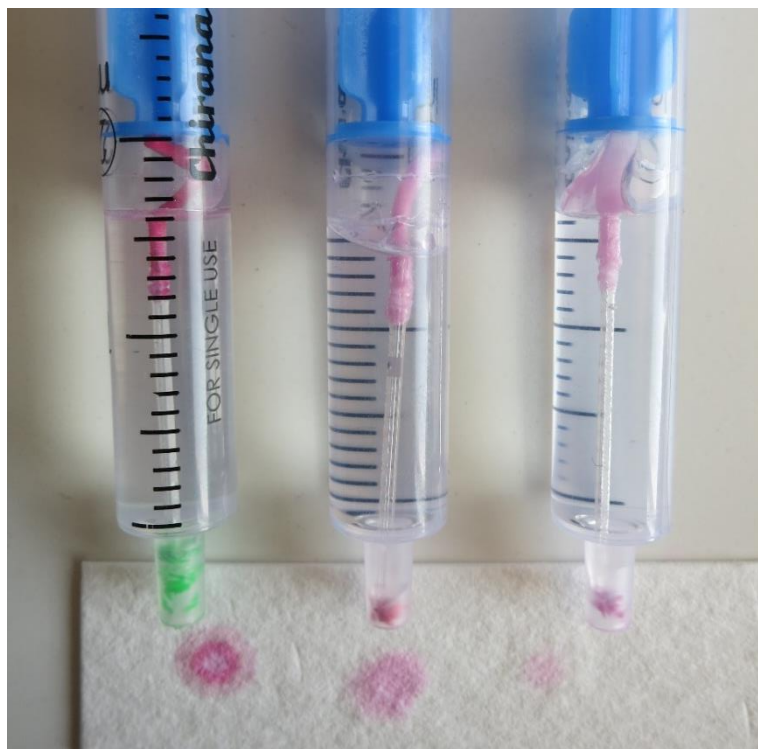
Obr. č. 23: Sraženina [43]

Na následujícím obrázku lze vidět přímý mikrofluidní kanálek ve stříkačce, do něhož jsme pomocí pinzety částečně vložili celulózový papírek nasáklý Čugajevovým činidlem a vysušený fénem (Obr. č. 24).



Obr. č. 24: Kanálek s indikačním celulóзовým papírkem

Po nasátí roztoku s nikelnatými ionty do kanálku došlo k zabarvení celulóзовého papírku podle míry koncentrace Ni^{2+} (Obr. č. 25) v jednotlivých roztocích do růžova až červena (koncentrace klesá směrem zleva doprava). Tato reakce by se zajisté mohla provést také bez vytvoření kanálku uvnitř stříkačky. Avšak právě díky kanálku umožňující malou spotřebu vzorku i činidla, se stává toto inovativní provedení důkazové reakce nízkonákladovým.



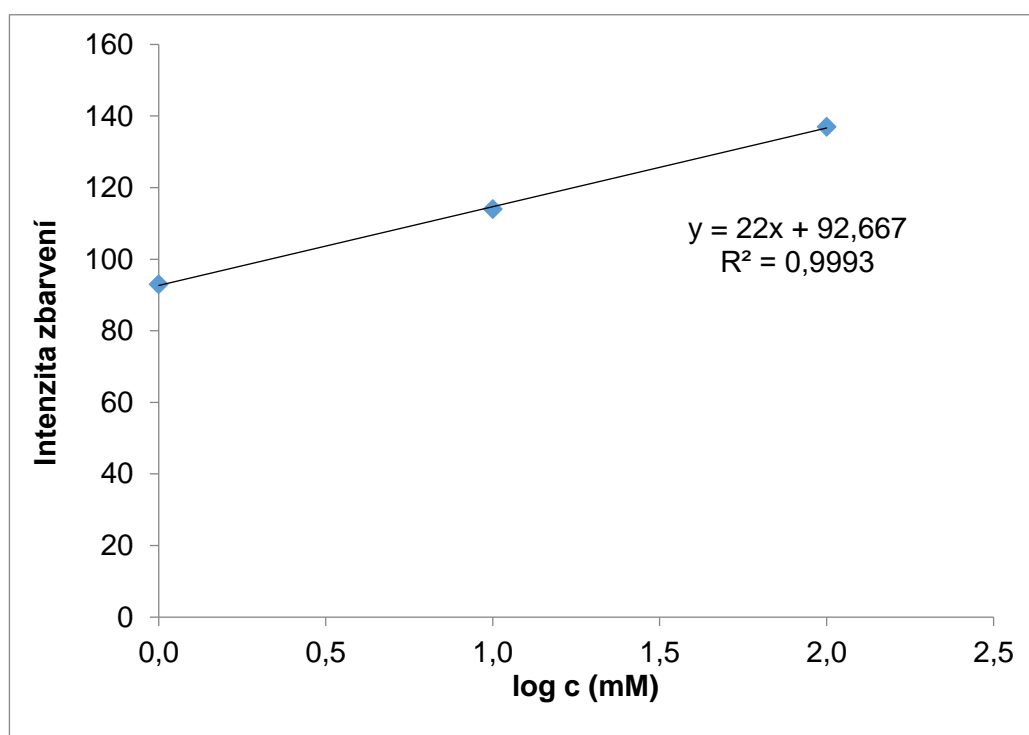
Obr. č. 25: Důkaz nikelnatých iontů pomocí Čugajeva činidla

Stříkačku pro testování Ni^{2+} by bylo možné ještě upravit, a to použitím menšího celulózového papírku, který se ještě před nasáknutím vzorku celý umístí do kanálku, jak je zřejmé z následujícího obrázku (Obr. č. 26).



Obr. č. 26 Důkaz nikelnatých iontů pomocí Čugajeva činidla

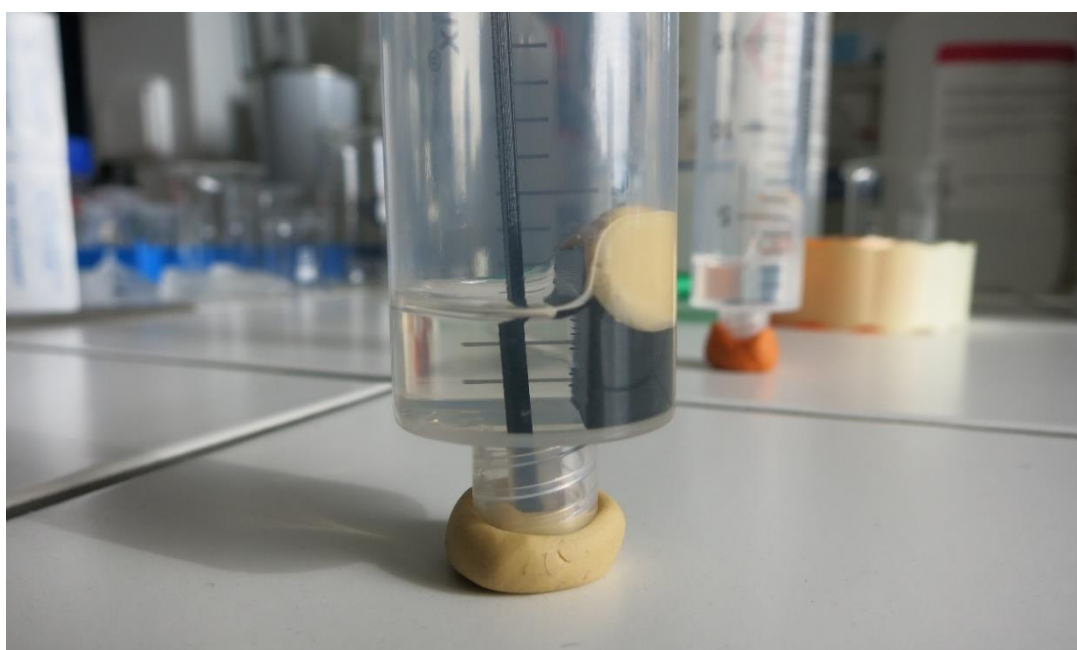
Intenzitu zbarvení lze vyhodnotit např. na základě snímku stříkačky pořízeného mobilním zařízením, který je potřeba následně zpracovat. V tomto případě byl ke zpracování použit program Corel Photo-Paint X4 dle postupu Hárendarčíkové a kol. [43]. Byla vybrána zbarvená část celulózového papírku a pomocí funkce histogram byla určena střední hodnota intenzity zbarvení. Tato hodnota byla odečtena od maximální hodnoty zbarvení, tj. 255 – určená střední hodnota intenzity zbarvení. Výsledné hodnoty byly vyneseny do spojnicového grafu v závislosti na koncentraci (Obr. č. 27). Je zřejmé, že vlastní stanovení Ni²⁺ není tak přesné jako v případě instrumentálních metod a limity detekce budou poměrně vysoké, a to zejména kvůli výše uvedenému přepočtu, resp. zpracování obrazu. Tento způsob je však dostačující pro rychlou, levnou a laickou „screeningovou“ metodu analýzy mnoha chemických parametrů.



Obr. č. 27: Závislost intenzity zbarvení na koncentraci nikelnatých iontů

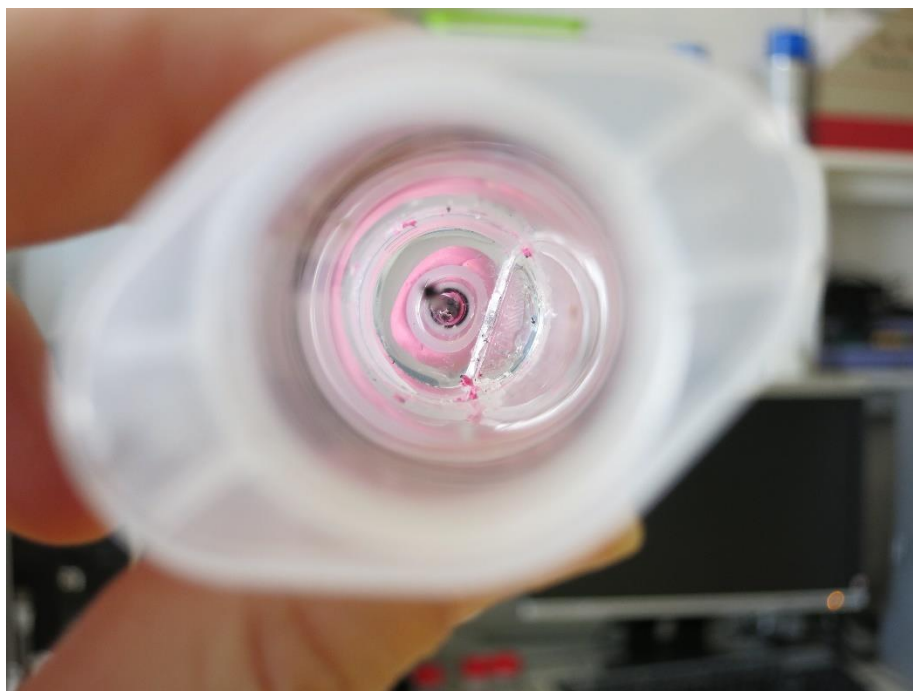
4.4 Složitější struktura

Nevýhodou manuálního odstranění kanálku je možnost použití pouze u jednodušších struktur. Tento problém lze v některých případech vyřešit zaléváním na vícekrát. Např. následující snímky ukazují vytvoření kanálku ve stříkačce se zásobníkem, které byly vytvořeny na dvakrát. Nejdříve byl modelovací hmotou upevněn zásobník půlválcového tvaru do stříkačky, poté byl obvyklým způsobem utěsněn otvor stříkačky a vložen kanálek. Takto připravený systém byl následně zčásti zalit PDMS (Obr. č. 28).



Obr. č. 28: Upevněný zásobník s kanálkem, zalitý PDMS

Po vytvrzení PDMS byl zásobník i kanálek manuálně odstraněn (Obr. č. 29). Otvor byl opět utěsněn modelovací hmotou a na vytvrzenou část byla nalita další vrstva PDMS.



Obr. č. 29: Dutina po vytvrzení PDMS sloužící jako zásobník

Následně byl do stříkačky vložen píst a stříkačka byla obrácena otvorem vzhůru. Čerstvě nalitý PDMS tak vytekl z předem vytvořených dutin. Na závěr bylo odstraněno těsnění, na původní místo byl vložen kanálek a takto připravená stříkačka byla (otvorem vzhůru) umístěna do exsikátoru a přivedena na vakuum.

Výsledné „stříkačkové“ zařízení (Obr. č. 30) může sloužit k provádění složitějších reakcí nebo k uchovávání reagentů přímo ve stříkačce, aniž by musely být navázány na celulóзовou podušku. Toto zařízení lze využít i v případě, kdy jsou reagenty citlivé na celulóзовou podušku. Tento případ může nastat při stanovení celkových proteinů (např. metodou dle Bradfordové), kdy není možné použít celulózu, resp. celulóзовé podušky, protože se ve většině případů při výrobě klíží směsí kaseinu anebo albuminu, který reaguje s činidlem.



Obr. č. 30: Stříkačkové zařízení po vytvrzení PDMS

Pro ověření funkčnosti tohoto zařízení byla použita opět reakce Ni^{2+} s Čugajevovým činidlem. Toto činidlo bylo další stříkačkou s injekční jehlou nastříknuto přes hrdlo do vytvořeného rezervoáru stříkačkového zařízení. Potom byl stříkačkovým zařízením nasát vzorek Ni^{2+} . Výsledek důkazové reakce lze pozorovat na obrázku níže (Obr. č. 31). Jelikož jsou stěny stříkačky dokonale průhledné, je toto zařízení vhodné pro reakce, při kterých dochází k zbarvení, a tedy i ke kolorimetrickému stanovení různých chemických parametrů. Zajímavou možností může být i použití uzávěru stříkačky (standardní medicínský uzávěr na Luer konektor injekčních stříkaček). Stříkačkové zařízení lze naplnit reagensy, uzavřít, případně sterilizovat, a pak může být skladována až do využití koncovým uživatelem.



Obr. č. 31: Stříkačkové zařízení z PDMS po reakci s Čugajevovým činidlem

5 Závěr

Byla zpracována literární rešerše v oblasti mikrofluidiky, zaměřená především na nízkonákladovou mikrofluidiku, dále pak na seznámení s pojmem mikrofluidní čip a jeho metodami výroby. Tato práce byla orientována především na 3D tisk v mikrofluidice. Z rešerše vyplývá, že právě metoda 3D tisku je dnes v této oblasti ze všech technik výroby nejpoužívanější. Mimo postup 3D tisku byly spolu s ním popsány další kroky výroby mikrofluidních kanálků v injekčních stříkačkách zalitých polymerem PDMS. Tento polymer je používán pro vhodné fyzikální i chemické vlastnosti a požadovanou cenovou dostupnost.

Jednou z hlavních motivací bylo nalézt alternativní metodu odstranění vytištěného objektu (v případě této práce mikrokanálku) z vytvrzeného polydimethylsiloxanu (PDMS). U metody ESCAGROT využívající 3D tisk je totiž k odstranění vytištěného objektu potřeba rozpouštědlo. Tento způsob je však časově náročný a nedochází u něj k dokonalému odstranění objektu z dutiny polymeru. Proto bylo postupnými experimenty docíleno jednoduché metody, a to manuálního odstranění pomocí pinzety. Navíc bylo ověřeno, že již jednou zalité objekty lze použít znovu, což je v dnešní době snahy o co nejmenší zatížení životního prostředí jistě příznivé. Pro srovnání náročnosti bylo pro odstraňování 3D objektů z polymeru použito více druhů filamentů. Překvapivým zjištěním bylo, že na rozdíl od kanálku vytištěného z PLA, ABS nebo ASA, kanálek z materiálu Flexfill, který vykazuje pružnost, tím pádem se u něj předpokládalo přilnutí k polymeru a horší uchycení i celková manipulace, byl i přesto z PDMS odstraněn nejsnadněji.

Způsobu manuálního odstranění ve dvou krocích lze však využít pouze v případě jednoduchých struktur, např. u přímého kanálku, kanálku ve tvaru kříže nebo „T“ kanálku. Nicméně složitější struktury dutin lze vytvořit zaléváním na vícekrát – postupným vytvrzováním.

Jako zásadní se v tomto případě jeví i cena vlastního zařízení, kdy se výrobní náklady na jednu „stříkačku“ v případě kusové výroby pohybují v řádu desítek korun. Navíc v případě sériové výroby bude možné náklady pravděpodobně snížit až na řády jednotek korun. Takto by bylo možné velice levně vyrábět uživatelsky přívětivá zařízení, kterých by mohla využívat i laická veřejnost (např. pro kontrolu kvality vody nebo potravin).

6 Summary

The trend of today's whole world of technology is miniaturization and the field of chemistry is no exception to that. One of examples of this trend is microfluidic devices. This technology is based on flow of fluids inside of channels manufactured in microscale. One of the leading materials used in microfluidic devices manufacturing is polydimethylsiloxane – PDMS. Among other advantages, this low-cost transparent material is also free of copyright.

For the experimental part of this paper a non-modified 3D printer and various printing materials such as PLA, ABS, ASA and FLEXI were used. 3D printing is a low-cost and fast manufacturing method which has been the main topic of recent research. To print a microfluidic channel using a 3D printer, first a 3D model must be designed in a specialised 3D design software; then the model is to be exported to a slicing software and it is to be finally 3D printed layer by layer. According to the ESCAGROT method, after the model has been printed, PDMS should be applied and after it has cured it must be dissolved. However, during our experimental research a new method of removing channels has been discovered. If the structure of produced microfluidic channel is not complex (such as line, cross and T-shape structures), it is possible to remove the channel simply by pulling it out manually using a pair of tweezers. If the structure is more complex, a multiple-step curing method can be used. Both of these methods are described in this paper.

Furthermore, the manufacturing methods introduced in present paper can also be used on a so-called “lab-in-a-syringe” technology. These highly portable devices offer low reagent and sample consumption rate. Apart from that, the reactions conducted in such a device can be controlled with ease and have no observation restrictions, since mass-produced syringes are transparent. Produced devices are also high-pressure and high-temperature resistant. Above all, this technology is extremely low-cost and allows for a very low unit cost which is a number one advantage of 3D printed microfluidic devices. When produced in small scale, the cost of one microfluidic device does not exceed a few dollars. If produced in large scale, the cost of one unit could drop substantially, meaning that 3D printing might be the best solution available for microfluidic devices manufacturing. Microfluidic devices could be used on daily basic by layman society for instance to control water or food quality.

Seznam obrázků

Obr. č. 1: Mikrofluidní čip pro směšování kapalin [10].....	14
Obr. č. 2: Struktura PDMS [15]	16
Obr. č. 3: Znázornění techniky litografie [17]	17
Obr. č. 4: Postup výroby čipu pomocí měkké litografie [20].....	19
Obr. č. 5: Princip tisku SL [25]	21
Obr. č. 6: Schéma zařízení pro technologii stereolitografie (1 – laser, 2 – pracovní hlava laseru, 3 – systém pro posuv nosné desky, 4 – nosná deska, 5 – pracovní vana, 6 – CNC řídicí systém, 7 – fotopolymer, 8 – podložka, 9 – vyráběná součást) [24]	21
Obr. č. 7: Konfigurace stereolitografie A. technika „volného povrchu“ B. technika „vázaného povrchu“ (konfigurace netopýr) [14].....	21
Obr. č. 8: Princip tisku MJM [25].....	22
Obr. č. 9: Princip tisku FDM [25].....	23
Obr. č. 10: Princip technologie ESCAGROT [13]	24
Obr. č. 11: Ukázka cívek filamentů pro 3D tiskárny [27].....	25
Obr. č. 12: Struktura izotaktického polypropylenu [30].....	26
Obr. č. 13: Struktura ABS [35].....	26
Obr. č. 14: Struktura PLA [24]	27
Obr. č. 15: Struktura ASA [36]	28
Obr. č. 16: Struktura TPU [37]	28
Obr. č. 17: 3D tiskárna	31

Obr. č. 18: Zalité kanálky v injekčních stříkačkách upevněné modelovací hmotou (vlevo) a vytvrzené kanálky po odstranění vytištěných tyčinek (vpravo)	33
Obr. č. 19: PLA kanálek v injekční stříkačce	35
Obr. č. 20: Zalitý Flexfill kanálek.....	36
Obr. č. 21: Mikroskopický snímek průřezu kanálku ve stříkačce	37
Obr. č. 22: Mikroskopický snímek okraje stříkačky a struktury PDMS	37
Obr. č. 23: Sraženina [43]	38
Obr. č. 24: Kanálek s indikačním celulózovým papírkem	39
Obr. č. 25: Důkaz nikelnatých iontů pomocí Čugajeva činidla.....	40
Obr. č. 26 Důkaz nikelnatých iontů pomocí Čugajeva činidla.....	40
Obr. č. 27: Závislost intenzity zbarvení na koncentraci nikelnatých iontů	41
Obr. č. 28: Upevněný zásobník s kanálkem, zalitý PDMS.....	42
Obr. č. 29: Dutina po vytvrzení PDMS sloužící jako zásobník	43
Obr. č. 30: Stříkačkové zařízení po vytvrzení PDMS	44
Obr. č. 31: Stříkačkové zařízení z PDMS po reakci s Čugajevovým činidlem.....	44

Seznam tabulek

Tab. č. 1: Přehled vlastností vybraných materiálů pro 3D tisk	29
Tab. č. 2: Přehled teplot tisku a povrchu pro vybrané materiály [33]	32

7 Literatura

- [1] REYES, D., D. IOSSIFIDIS, P. AUROUX a A. MANZ. Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory and Technology. Analytical Chemistry [online]. June 15, 2002, 74(12), 2623-2636 [cit. 2019-02-01]. Dostupné z: https://www.academia.edu/11561620/Micro_total_analysis_systems.1.Introduction_theory_and_technology
- [2] MCMILLAN, Alex a Guilhem Velve CASQUILLAS. MICROREACTORS & MICROFLUIDICS IN CHEMISTRY: A REVIEW [online]. [cit. 2018-10-31]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/microreactors-and-microfluidics-in-chemistry-a-review/>
- [3] BAEK, Jinyoung, Peter ALLEN, Mounji BAWENDI a Klavs JENSEN. Investigation of indium phosphide nanocrystal synthesis using a high-temperature and high-pressure continuous flow microreactor [online]. 2010, 627-630 [cit. 2018-10-31]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.201006412>
- [4] Automated Methods of Analysis. SKOOG, Douglas A., F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Principles of instrumental analysis* [online]. 6th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007, s. 929-950 [cit. 2018-09-16]. ISBN 978-0-495-01201-6.
- [5] TESAŘ, Václav. Mikrofluidika: mikro-elektro-mechanické soustavy. *Automa* [online]. FCC Public, 2008, 14(10-2008), 4 [cit. 2018-07-11]. ISSN 1210-9592. Dostupné z: http://automa.cz/cz/casopis-cislo/automa-2008_10/
- [6] LEE, Chung Cheng. Multistep synthesis of a radiolabeled imaging probe using integrated microfluidics [online]. 2005 [cit. 2018-10-31]. Dostupné z: <http://science.sciencemag.org/content/310/5755/1793>
- [7] WHITESIDES, George. The origins and the future of microfluidics [online]. 2006, 368-373 [cit. 2018-10-31]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nature05058>
- [8] *Microfluidics and microfluidic devices* [online]. [cit. 2018-07-22]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/microfluidics-and-microfluidic-device-a-review/>
- [9] SMEJKAL, Petr a František FORET. *Mikrofluidika v bioanalytické instrumentaci* [online]. 2012, 104-112 [cit. 2018-07-22]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_02_104-112.pdf
- [10] TIKSON, Parker. Microfluidic serpentine mixing device made from 3D printed master. In: *You Tube* [online]. USA, c2019, 27. 5. 2016 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=05ECRklOak4>
- [11] MANZ, A., N. GRABER a H. M. WIDMER. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing [online]. 1990, 244-248 [cit. 2018-07-18]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/092540059080209I>

- [12] FRIEND, James a Leslie YEO. Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane: Biomicrofluidics [online]. 2010, 1-5 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1063/1.3259624. ISBN 1932-1058. Dostupné z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.3259624>
- [13] SAGGIOMO, Vittorio a Aldrik H. VELDEERS. Simple 3D Printed Scaffold-Removal Method for the Fabrication of Intricate Microfluidic Devices. *Advanced Science* [online]. 2015, 2(9) [cit. 2018-11-04]. DOI: 10.1002/advs.201500125. ISSN 21983844. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/advs.201500125>
- [14] BHATTACHARJEE, Nirveek, Arturo URRIOS, Shawn KANG a Albert FOLCH. The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics. *Lab on a Chip* [online]. 2016, 16(10), 1720-1742 [cit. 2019-02-03]. DOI: 10.1039/C6LC00163G. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4862901/>
- [15] Polydimethylsiloxan. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Polydimethylsiloxan>
- [16] *Co je litografie?* [online]. In: 2015, s. 1-11 [cit. 2018-08-08]. Dostupné z: https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010359/07_Litografie.pdf?redirected
- [17] Stručný popis metod SPM: Litografie. In: *Laboratoř mikroskopie atomárních sil* [online]. Olomouc: TEX, 2007, 11. 5. 2007 [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/texty/ospm.pdf>
- [18] Fotolitografie. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, c2001-2017 [cit. 2018-08-08]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Fotolitografie>
- [19] LI, Zong'an, Jiquan YANG, Kelou LI, Li ZHU a Wencheng TANG. Fabrication of PDMS microfluidic devices with 3D wax jetting [online]. 2017, 3313-3320 [cit. 2018-07-18]. DOI: 10.1039/c6ra24884e. ISBN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA24884E>
- [20] OBRÁTIL, Vilém. Využití mikrofluidních systémů pro studium živočišných buněk [online]. Brno, 2016 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/otzh0/BP_Obratil_IS.pdf. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita, Fakulta přírodovědecká, Ústav biochemie. Vedoucí práce Mgr. Jan Víteček, Ph. D.
- [21] Technologie 3D tisku. In: *3D tisk online* [online]. Brno, c2019 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: <https://www.3dtisk-online.cz/technologie-3d-tisku/>
- [22] HOMOLA, Jan. *Stereolitografie* [online]. In: 26. 2. 2013 [cit. 2019-02-03]. Dostupné z: <https://www.3d-tisk.cz/stereolitografie/>
- [23] WALDBAUR, Ansgar, Holger RAPP, Kerstin LÄNGE a Bastian E. RAPP. Let there be chip—towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes. *Analytical Methods* [online]. 2011, 3(12) [cit. 2019-02-03]. DOI: 10.1039/c1ay05253e. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1ay05253e>

- [24] ŘASA, Jaroslav a Zuzana KEREČANINOVÁ. Nekonvenční metody obrábění 9. díl. *MM Průmyslové spektrum* [online]. Praha, 2008, 19. 11. 2008 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: <http://firmy.mmspektrum.com/clanek/nekonvencni-metody-obrabeni-9-dil.html>
- [25] BELAI, Elena. Příprava geografických dat pro 3D tisk podrobného modelu budovy [online]. Plzeň, 2015 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: <https://www.kgm.zcu.cz/> Diplomová. Západočeská univerzita v Plzni.
- [26] GROSS, Bethany C., Jayda L. ERKAL, Sarah Y. LOCKWOOD, Chengpeng CHEN a Dana M. SPENCE. Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences. *Analytical Chemistry* [online]. 2014, **86**(7), 3240-3253 [cit. 2019-02-03]. DOI: 10.1021/ac403397r. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac403397r>
- [27] Filament for FDM 3D Printers. In: *Sculpteo* [online]. France, c2009-2019 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.sculpteo.com/en/glossary/filament-definition/>
- [28] VOSYŇKOVÁ, Jana. Materiál pro 3D: Materiálový slovník. Materiál pro 3D [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <https://www.materialpro3d.cz/materialovy-slovník/>
- [29] PRANZO, Daniela, Piero LARIZZA, Daniel FILIPPINI a Gianluca PERCOCO. Extrusion-Based 3D Printing of Microfluidic Devices for Chemical and Biomedical Applications: A Topical Review. *Micromachines*[online]. 2018, 9(8) [cit. 2019-02-26]. DOI: 10.3390/mi9080374. ISSN 2072-666X. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-666X/9/8/374>
- [30] BRANDRUP, J., E. H. IMMERGUT a Eric A. GRULKE. Polymer handbook. 4th ed. New York: Wiley, c1999. ISBN 0-471-16628-6.
- [31] CROMPTON, T. R. Mechanical Properties of Polymers. Physical Testing of Plastics [online]. Velká Británie: Smithers Rapra, 2012, s. 2-4 [cit. 2019-03-25]. ISBN 978-1-84735-487-7. Dostupné z: www.polymer-books.com
- [32] CHA, J. Acrylonitrile-butadiene-styrene (ABS) Resin. MARGOLIS, J. M. Engineering plastics handbook[online]. New York: McGraw-Hill Education, c2006, s. 101-102 [cit. 2019-03-19]. ISBN 0-07-158910-4. Dostupné z: <https://epdf.tips/>
- [33] Průvodce materiály. In: Prusa research [online]. Praha: Josef Průša, c2019 [cit. 2019-03-18]. Dostupné z: <https://www.prusa3d.cz/materialy/>
- [34] IUNOLAINEN, Elina. *Suitability of recycled PP for 3D printing filament* [online]. Finland, 2017 [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: <https://www.theseus.fi>. Diplomová práce. Arcada University. Vedoucí práce Maiju Holm.
- [35] MARIANO DOMINGUES DA SILVA, Carolina, Adney Luis A. SILVA, Robson PACHECO a Ana Maria ROCCO. Conductivity and Thermal Behaviour of Sulfonated ABS Membranes for Fuel Cell Applications. *ECS Transactions* [online]. ECS, 2009, 2009, 882 [cit. 2019-03-25]. DOI: 10.1149/1.3210642. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/266642359_Conductivity_and_Thermal_Behaviour_of_Sulfonated_ABS_Membranes_for_Fuel_Cell_Applications

- [36] LIU, Shan, Shuhao QIN, Zhu LUO, Jie YU, Jianbing GUO a Min HE. Reactive Compatibilization of Poly(Butylene Terephthalate)/Acrylonitrile-Styrene-Acrylate Blends by Epoxy Resin: Morphology and Mechanical Properties. *Journal of Macromolecular Science, Part B* [online]. 2011, **50**(9), 1780-1790 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1080/00222348.2010.549073. ISSN 0022-2348. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/>
- [37] SHAN ET AL, Haifeng. Ophthalmic lens containing a fresnel surface and method for manufacturing same: TPU. In: *Google Patents* [online]. United States, c2019, 16. 5. 2013 [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/d0/4d/ca/3e08b2e618a568/US20130120707A1.pdf>
- [38] Acrylate Styrene Acrylonitrile - ASA. In: *AZO materials* [online]. United Kingdom: AZoM, c2000-2019, 25. 4. 2001 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=335>
- [39] Generic Families of Plastic. PROSPECTOR [online]. UL, c2019 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://plastics.ulprospector.com/generics>
- [40] Everything You Need To Know About Polypropylene (PP) Plastic. Creative Mechanisms [online]. Warminster, 2016, 4. 5. 2016 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://www.creativemechanisms.com/blog/all-about-polypropylene-pp-plastic>
- [41] ROGERS, Tony. Everything You Need To Know About Polylactic Acid (PLA). *Creative Mechanisms* [online]. Warminster, 2015, 7. 10. 2015 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://www.creativemechanisms.com/blog/learn-about-polylactic-acid-pla-prototypes>
- [42] Deflection Temperature Testing of Plastics. In: MatWeb: Material property data [online]. USA: The MatWeb Team, c1996-2019 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <http://www.matweb.com/reference/deflection-temperature.aspx>
- [43] HÁRENDARČÍKOVÁ, Lenka, Daniel BARON, Andrea ŠEBESTOVÁ, Jan ROZSYPAL a Jan PETR. True lab-in-a-syringe technology for bioassays. *Talanta* [online]. 2017, **174**, 285-288 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.06.017.
- [44] OTYEPKOVÁ, Eva, Libor KVÍTEK, Michal OTYEPKA a Aleš PANÁČEK. Cvičení z vybraných fyzikálně-chemických metod: Analytické reakce. In: *Fyzikální chemie* [online]. Olomouc: Katedra fyzikální chemie, c2004 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/anal/anal_teorie.htm
- [45] HOFFMAN, Jan. Důkaz Ni²⁺ pomocí Čugajevova činidla. In: *Studium chemie* [online]. Praha: Přírodovědecká fakulta UK, c2009-2019 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <http://studiumchemie.cz/experiment/dukaz-ni2-pomoci-cugajevova-cinidla/>