

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

Přírodovědecká fakulta

Analytická chemie

**Vývoj nízkonákladových mikrofluidních zařízení pro analýzu
biologicky aktivních látek**

Diplomová práce

Autor: Bc. Alena Opichalová

Studijní obor: Analytická chemie

Forma studia: Prezenční

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

Olomouc 2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Jana Petra, Ph.D. Veškeré literární prameny, které jsem použila v této práci, jsou v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Alena Opichalová

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za jeho čas, poskytnuté informace, rady a za optimistický přístup. Dále děkuji své rodině a příteli za velkou podporu po celou dobu mého studia.

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení autora:	Alena Opichalová
Název práce:	Vývoj nízkonákladových mikrofluidních zařízení pro analýzu biologicky aktivních látek
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017
Abstrakt:	Nízkonákladová mikrofluidní zařízení zažívají v posledních letech velký rozvoj. Zájem o ně je způsoben převážně jednoduchostí výroby a nízkou cenou. V této diplomové práci je popsán vývoj různých typů mikrofluidních zařízení.
Klíčová slova:	mikrofluidika, nízkonákladová mikrofluidika, origami mikrofluidika, lab-in-a-syringe
Počet stran:	46
Počet příloh:	0
Jazyk:	česky

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname:	Alena Opichalová
Title:	Development of low-cost microfluidic devices for analysis of biologically active compounds
Type of thesis:	Master
Department:	Department of Analytical chemistry
Supervisor:	Doc. RNDr. Jan Petr Ph.D.
The year of presentation:	2017
Abstract:	Low-cost microfluidic devices have recently experienced a great expansion. The interest in them is mainly because of the simplicity of fabrication and low price. In this thesis the development of different types of microfluidic devices is described.
Keywords:	microfluidics, low-cost microfluidics, origami, lab-in-a-syringe
Number of pages:	46
Number of appendices:	0
Language:	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Mikrofluidika	8
2.1.1	PDMS čipy.....	8
2.1.1.1	Výroba PDMS čipů.....	9
2.1.1.2	Separace.....	10
2.1.2	Nízkonákladová mikrofluidika	12
2.1.2.1	Materiály	12
2.1.2.2	Výroba mikrofluidních zařízení z papíru.....	14
2.1.2.3	Výroba mikrofluidních zařízení z fólie	17
2.1.2.4	Detekce	20
2.1.2.5	Skládaná mikrofluidika (origami)	23
2.1.3	Aplikace nízkonákladových mikrofluidních zařízení v klinické analytice.....	24
2.1.3.1	Separace plazmy z krve	25
2.1.3.2	Detekce krevních skupin	26
2.1.3.3	Detekce ketonů v moči.....	27
2.2	Cíle práce.....	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
3.1	Pomůcky.....	29
3.2	Přístroje.....	29
3.3	Chemikálie.....	29
4	VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE.....	31
4.1	Centrifugační mikrofluidika.....	31
4.2	Políčková mikrofluidika	33
4.3	Stříkačková mikrofluidika.....	37
5	ZÁVĚR.....	42
6	SUMMARY	43
7	LITERATURA.....	44

1 ÚVOD

V dnešním světě se téměř všude setkáváme s potřebou miniaturizace a stejně tak je tomu i v chemii. Pro různé aplikace potřebujeme přenosná zařízení, která jsou lehká, skladná a ideálně i dostatečně výkonná a levná.

Mikrofluidická zařízení se vyznačují malými rozměry a pracují s velmi malými objemy vzorků a reagentů. Splňují tedy požadavek miniaturizace a proto je mikrofluidika v poslední době populární obor. Stále se hledají nové aplikace a možnosti vylepšení mikrofluidních čipů. Důležitým faktorem je také cena vyrobeného zařízení, která se dá v mikrofluidice výrazně ovlivnit volbou materiálu. Původně se rozšířily čipy z polydimethylsiloxanu, následně se ale začal jako materiál pro výrobu používat i papír nebo fólie. V takovém případě už se hovoří o nízkonákladové mikrofluidice. Ta by mohla být velmi zásadní mimo jiné pro rozvojové státy, kde by výrazně zlepšila zdravotní péči. Poskytla by jednoduché a finančně nenáročné testy, které by rychle detekovaly patologické stavy pacientů. Na jednom čipu lze dokonce provést několik analýz a probíhá snaha o zvýšení tohoto počtu a o vytvoření tzv. laboratoře na čipu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikrofluidika

Mikrofluidika je vědní obor, který se zabývá prouděním kapaliny v kanálcích, jejichž rozměry jsou v řádech milimetrů až mikrometrů. Pro kanálky s rozměrem v nanometrech, které se vyskytují vyjíměčně, je potřeba vzít na vědomí pohyb samotných molekul a pro popis využít kvantovou mechaniku místo klasické mechaniky tekutin. [1] Reakční objemy se na mikrofluidních zařízeních pohybují v mikrolitrech až nanolitrech, což znamená, že k analýze stačí malé množství vzorku, malé množství reagensů a výhodou je také malé množství odpadu po analýze. Délka analýz na těchto systémech je několik sekund až minut. Mikrofluidika se v posledních letech masivně rozvíjí a hledají se stále nové postupy a možnosti aplikace.

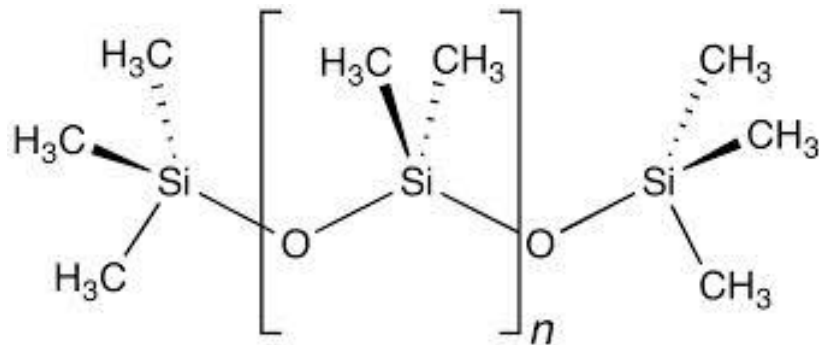
Separční kanálky na mikrofluidních zařízeních byly na počátku vývoje rovné, postupně se však jejich design vyvíjel a dnes je možné použít i komplikované systémy kanálků, které obsáhnou několik kroků analýzy. Mikrofluidní analyzátoři v sobě kromě kanálků slučují zásobníky na reagensie, směšovače, pumpy a detektor. Na jednom zařízení tedy probíhá několik kroků analýzy a proto jsou tyto systémy nazývány „micro Total Analysis System“ (μ -TAS). Vrcholem vývoje je laboratoř na čipu („Lab-on-a-chip“). [2] Použitím mikrofluidních čipů získáme také výhodu snadné automatizace.

Pro výrobu mikrofluidního zařízení je možné použít různé materiály. Dříve se využíval křemík a sklo, nyní převažují čipy vyrobené z polymerů. Nejrozšířenějším materiálem je dnes flexibilní elastomer polydimethylsiloxan (PDMS). (Obr.1) [3] Dalším možným přístupem je výroba mikrofluidních zařízení z papíru, protože jejich výroba je levná, označují se jako nízkonákladová mikrofluidní zařízení.

2.1.1 PDMS čipy

Polymery se vyznačují širokým rozsahem fyzikálních a chemických vlastností, je možné je modifikovat pomocí aditiv. Výroba polymerů není nákladná, takže i díky jejich dostupnosti se staly hojně používaným materiálem pro výrobu mikrofluidních čipů.

PDMS je nejpoužívanější materiál pro výrobu mikrofluidních čipů. Jeho výroba je jednoduchá a levná, není potřeba používat vysokých teplot. Při výrobě se snadno tvoří spoje. Jde o elastický materiál, který je chemicky inertní, problém může být pouze reaktivita s některými organickými rozpouštědly. Struktura PDMS je pórovitá, pro plyny je tento materiál propustný. PDMS je vhodný i pro biologické vzorky, protože není toxický. Díky jeho optickým vlastnostem je použitelný pro UV/Vis detekci, případně fluorescenční detekci. [4]



Obrázek 1: Polydimethylsiloxan

2.1.1.1 Výroba PDMS čipů

Prvním krokem při výrobě je navržení požadovaného tvaru kanálek a dále přenesení tohoto tvaru do zvoleného materiálu. Nakonec se kanálky uzavírají přilepením další vrstvy materiálu. Přenesení motivu kanálek na polymer je možné dělat pomocí fotolitografie a dalších metod.

Fotolitografie

Fotolitografie je metoda, která umožňuje přenesení motivu z fotomasky na substrát s využitím látky citlivé na elektromagnetické záření (fotorezistu). Fotorezist po vystavení záření změní svou strukturu buď vytvořením chemicky odolnější struktury nebo naopak vytvořením struktury, která je rozpustnější než původní. Pokud vznikla odolnější struktura, šlo o negativní fotorezist. Při vzniku rozpustnější struktury se jednalo o pozitivní fotorezist. Dále je třeba pomocí vývojky odstranit exponované části a naleptat povrch leptacím roztokem. Nakonec se opláchne zbylý fotorezist. Nejčastěji se používá UV záření a touto technikou je možné dosáhnout rozlišení v řádu nanometrů.

Výrobu čipů pomocí fotolitografie komplikují prachové částice, je proto nutné pracovat ve vysoce čistých prostorách.[5]

Lehká litografie

Při lehké litografii se čipy vyrábí odléváním do formy, která se může připravit pomocí fotolitografie nebo vytisknout na 3D tiskárně. Do formy se odleje monomer ve formě tekutiny s polymeračním iniciátorem a nechá se zpolymerovat.[5]

Vstříkování

Pokud polymer nelze odlévat, dá se použít metoda vstříkování. Polymer se po vyhřátí nad teplotu skelného přechodu pod tlakem vstříkuje do formy a po ochlazení se vyjme.

Laserová ablace

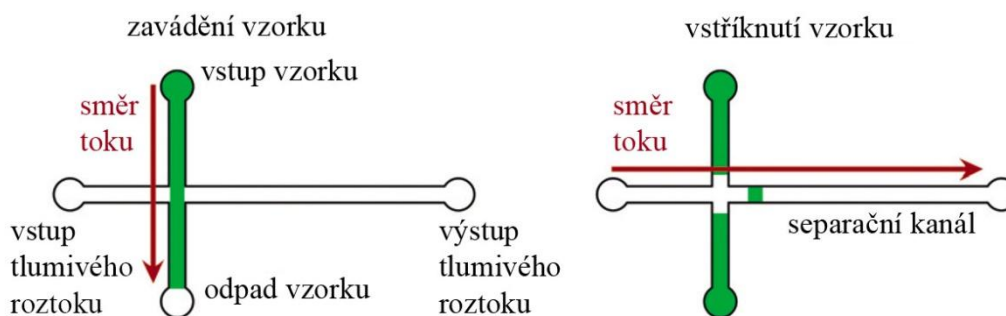
Laserová ablace využívá fokusovaný svazek UV záření, který v místě dopadu zvýší teplotu na stovky stupňů Celsia a materiál se odpaří. Kanálky, které takto vzniknou, nemají zcela hladký povrch.[6]

2.1.1.2 Separace

Separace kapilární elektroforézou

Nejčastěji využívanou separací v mikrofluidních zařízeních je separace kapilární elektroforézou a to zejména díky snadné miniaturizaci. Tato separace se uskutečňuje na čípech ve tvaru kříže, mikrokanálky jsou krátké a dochází k rozšiřování píku. Tím je účinnost separace limitovaná. Rozšiřování píku je způsobené podélnou difuzí, která probíhá během separace a detekce. [7]

Separace kapilární elektroforézou je zpravidla rychlá, protože se používá malý objem vzorku. Elektrické pole se na čípech křížového tvaru aplikuje nejdříve směrem od vstupu vzorku k odpadu vzorku. Následně se malé napětí přivede i do tlumivého roztoku a do odpadu, aby se zabránilo výtékání vzorku ze separačního kanálu. Nakonec se do tlumivého roztoku a odpadu přivede i hlavní elektrické pole, tím se vzorek nastříkne a začne separace (Obr.2).[3]



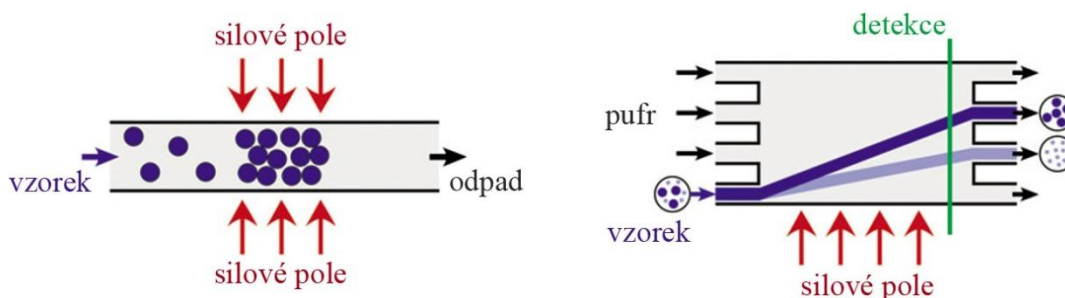
Obrázek 2: Zavádění vzorku do mikročipu (vlevo) a vstříknutí vzorku do separačního kanálu. [upraveno z cit. 3]

Chromatografická separace

Významnou metodou separace, která se v mikrofluidice využívá je chromatografie. Zpočátku byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie v mikrofluidních systémech špatně realizovatelná kvůli vysokému tlaku, který je potřeba pro její průběh. Problém bylo i začlenění vysokotlaké mikropumpy do čipu. Později se začalo využívat elektrické pole, které pomáhá separaci. Dalším vylepšením bylo využití mikrokanálek naplněných stacionární fází, kterou byl porézní polymer. Polymer prostřednictvím inkorporovaných elektrolytů umožňuje elektroosmotický tok. [3][7]

Separace bariérou nebo silovým působením

Separace částic a buněk se stala v mikrofluidice významnou. Buňky a částice mohou být ovládány pomocí bariéry nebo silového působení a toho se využívá při separaci. Buňky nebo částice se zachytí v kanálu, kde dochází k separaci, případně vystavení činidlům. Další možností je využití kontinuálního toku, kdy je vzorek pumpován přes mikrokomoru a vychýlen pomocí bariéry nebo silového působení. (Obr.3) [3]



Obrázek 3: Zachycení částic v mikrokanálu pomocí silového pole (vlevo), kontinuální vychýlení částic, které umožňuje separaci [upraveno z cit. 3]

2.1.2 Nízkonákladová mikrofluidika

Přesto, že náklady na výrobu PDMS čipů jsou poměrně nízké, je snaha o vývoj ještě levnějších mikrofluidních zařízení. Příznivější cena a jednoduchost by umožnily rutinní používání mikrofluidních chemických testů například v domácnostech nebo v zemích, kde chybí finance a školený personál. Nízkonákladová mikrofluidní zařízení se vyrábějí převážně z papíru, dá se využít i nitrocelulózová membrána, případně laminovací fólie.

2.1.2.1 Materiály

Papír

Papír byl v minulosti pro analytickou chemii důležitý materiál a stále se využívá pro některé aplikace, jako třeba chromatografie, imunotesty nebo kvalitativní testy v klinické diagnostice. Pro výrobu mikrofluidních zařízení bývá často používán díky jeho ceně, ale také dostupnosti. Důležitou vlastností papíru je jeho hydrofilita a schopnost transportovat tekutiny pomocí kapilárních sil. Dochází na něm tedy k pasivnímu transportu a není třeba používat pumpy.

Dalšími výhodami papíru jsou jeho fyzikální vlastnosti - jeho lehkost a dostupnost v různých šířkách. Není problém ani v jeho skladování a převozu. Jde o materiál kompatibilní s biologickými vzorky, protože je tvořen celulózou nebo směsí celulózy s polymerem. V případě potřeby je možné do papíru inkorporovat funkční skupiny, které se následně kovalentně vážou například na bílkoviny nebo DNA. Papír obsahující kovová vlákna nebo vodivý uhlík může vést elektrický proud nebo reagovat

na magnetické pole. Ve většině případů má papír bílou barvu a s barevným substrátem tvoří dobře znatelný kontrast, proto je výborným médiem pro kolorimetrickou detekci. V případě analýzy biologických vzorků je výhodou, že můžeme papír zapálit. Dojde k destrukci a nezůstane kontaminovaný materiál. [8][9]

Nevýhodou použití papíru pro mikrofluidní zařízení může být jeho nízká odolnost vůči vlivům prostředí. Snadno se dá roztrhnout nebo se zničí politím. I přesto je jeho použití pro výrobu mikrofluidních testů výhodné.

Nejlepší typ papíru pro mikrofluidní zařízení je filtrační papír (Obr.4). Filtračních papírů je možné sehnat mnoho druhů, které se liší pórovitostí a rychlostí průtoku tekutiny, případně retencí částic. Pokud filtrační papír neposkytuje požadované fyzikální vlastnosti, je možné využít například nitrocelulózovou membránu.

Nitrocelulózová membrána (Obr.4) je hydrofobní a má vysoký stupeň nescifického vázání na biomolekuly - enzymy, proteiny a DNA. Díky hladkému povrchu a uniformní velikosti pórů je tok tekutiny na této membráně stabilnější než na filtračním papíře a snadněji reprodukovatelný. Stejně jako u filtračního papíru lze celulózu chemicky modifikovat, existují například iontově výměnné celulózy. [10]



Obrázek 4: Filtrační papír (vlevo) [11] , nitrocelulózová membrána [12]

Fotopapír je další možností pro výrobu nízkonákladového mikrofluidního zařízení. Jde o materiál tvořený celulózu a anorganickou složkou. Má lesklý a hladký povrch.

Fólie

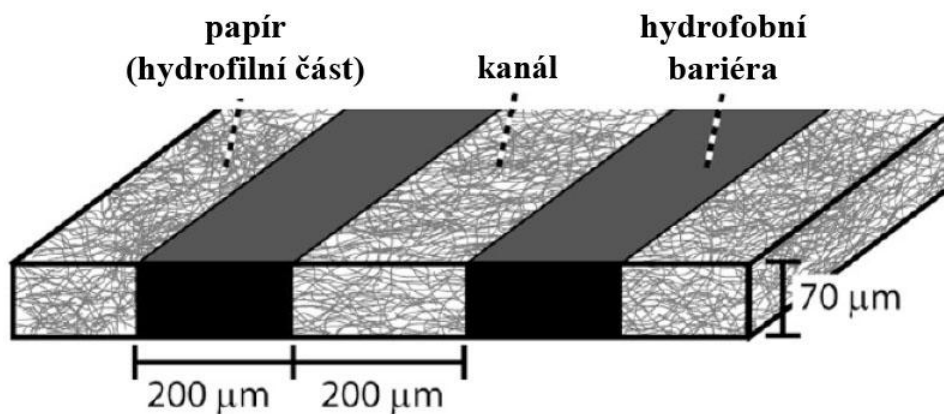
Kromě vývoje papírových mikrofluidních zařízení se vyvíjejí i laboratoře na čipu vyrobené z fólie. Fólie je, stejně jako papír, finančně nenáročný materiál pro výrobu. Dá se použít v kombinaci s papírem, kdy fólie slouží jako ochrana papírového čipu po zalaminování nebo se můžou vytvářet mikrofluidní zařízení přímo z fólie.

Fólie je velice flexibilní, lehký a tenký materiál, který se snadno skladuje. Je tvořena polymery. Většinou se jedná o polyetylen, polypropylen nebo polystyren. Laminováním je možné vytvořit vícevrstvé fólie z jednovrstevných. V jednotlivých vrstvách takto vytvořené vícevrstvé fólie mohou být rozdílné vlastnosti. Tohoto se dá využít, protože je možné takto upravovat mechanické a optické vlastnosti. Fólie mohou být i tepelně vodivé a to pokud obsahují kovový prvek. [13]

Ve fólii lze propíchnutím vytvořit dírka, vznikne tak otvor, který slouží pro zavedení vzorku do čipu. Toto může být výhoda fólie v porovnání s papírem.

2.1.2.2 Výroba mikrofluidních zařízení z papíru

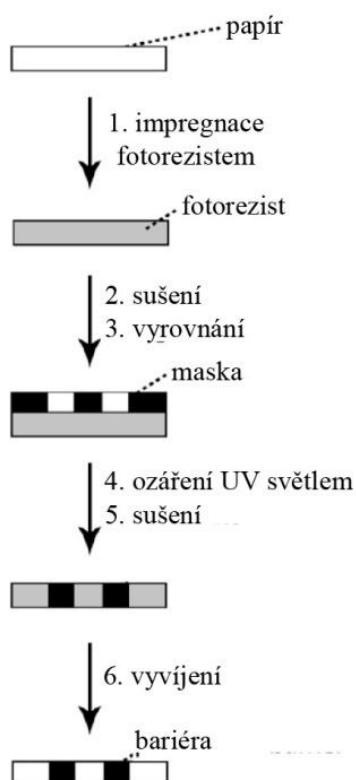
Výroba papírových mikrofluidních zařízení spočívá ve vytvoření hydrofilních kanálů, které jsou obklopeny hydrofobní bariérou (Obr.5). [8] Z těchto bariér se vytvoří vzor, který definuje šířku a délku mikrofluidních kanálů a tloušťka papíru definuje výšku kanálu. Tyto hydrofobní bariéry v požadovaných vzorech je možné připravit různými metodami. Postupy se liší cenou, spolehlivostí a rozlišením, které mohou poskytnout. Mezi nejznámější metody výroby mikrofluidních zařízení z papíru patří fotolitografie, tisk vosku, stříhání papíru, tisk a leptání pomocí inkoustové tiskárny a nebo ošetření plasmou. [8]



Obrázek 5: Kanál vytvořený pomocí hydrofobních bariér na papíře [upraveno z cit. 8]

Fotolitografie

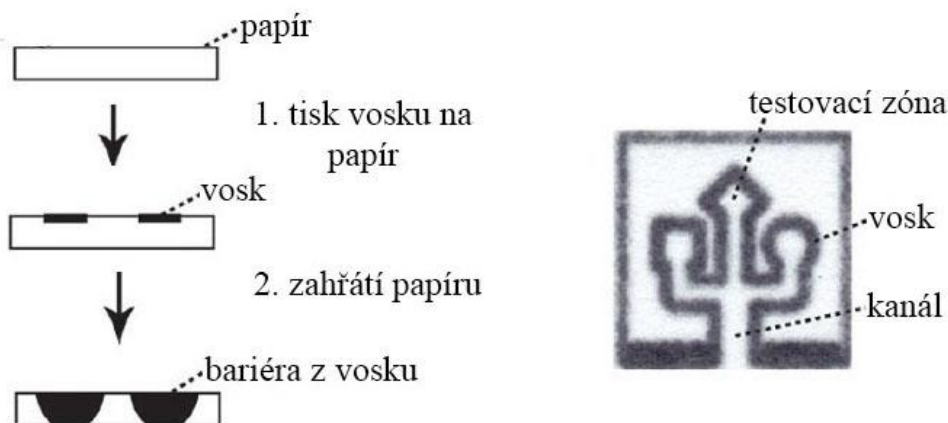
Výroba mikrofluidních zařízení s využitím fotorezistu a působení UV záření (Obr. 6) byla již popsána u výroby PDMS čipů. Tímto postupem je možné připravit kanálky o šířce 200 μm.



Obrázek 6: Výroba mikrofluidních zařízení metodou fotolitografie [upraveno z cit. 8]

Voskový tisk

Tisk vosku je metoda, která je vhodná pro výrobu velkého množství papírových zařízení (stovky až tisíce). [14] Tento proces se skládá z nejmenšího počtu kroků. Prvním krokem je natištění vosku v požadovaném tvaru na povrch papíru. Následuje druhý krok, kterým je rozpouštění vosku. Při rozpouštění vosk prostoupí celou tloušťkou papíru a vytvoří se hydrofobní bariéry (Obr.7). [15]



Obrázek 7: Výroba mikrofluidních zařízení voskovým tiskem (vlevo), ukázka papírového mikrofluidního zařízení vyrobeného voskovým tiskem

[upraveno z cit. 8]

Pro tisk je využívána inkoustová tiskárna, obsahující místo inkoustu nízkotavitelný vosk. Vosk se při tisku roztaví, natiskne se na papír v požadovaném vzoru a na papíře okamžitě ztuhne. Takto natisknutý vosk je pouze na povrchu papíru a pro vytvoření hydrofobních bariér je třeba, aby prostoupil celou tloušťkou papíru. Proto se musí papír s voskem ještě zahřát.

Výroba pomocí tisku vosku je vhodná pro větší čipy a nedosahuje takového rozlišení jako fotolitografie. Hydrofobní bariéry jsou široké asi 850 μm a kanálky 560 μm . [8] Výhodou tohoto postupu výroby je rychlost, protože lze natisknout několik čipů na jeden papír a rychlost tisku je zhruba stejně rychlá jako klasický inkoustový tisk. Vosk použitý pro tisk může mít různou barvu. Díky tomu, že se při výrobě nepoužívají žádné chemikálie není papírový čip nijak kontaminován. Na vytvoření papírové zařízení se do testovací zóny zavedou reagentie, což je poslední krok výroby.

Ošetření plasmou

Papír je při tomto výrobním postupu nejdříve upraven silanizací pomocí oktadecyltrichlorosilanu, čímž se stane hydrofobním. Zhydrofobizovaný papír se následně ošetří plasmou přes masku se vzorem. Část, která není zakrytá maskou, je vystavena působení plasmy a v důsledku toho dochází degradaci hydrofobních molekul oktadecyltrichlorosilanu navázaného na celulózová vlákna. Tím se tato oblast stává opět hydrofobní a vzniknul tak potřebný kanál. [16]

U ošetření plasmou je potřeba sledovat intenzitu a čas vystavení plasmě, aby bylo dosaženo reprodukovatelných šířek kanálů.

Další možnosti výroby

Mikrokanálky je možné vyrobit i pomocí inkoustového tisku, kdy dochází k leptání polymeru naneseného na povrchu papíru. Inkoustovou tiskárnu je možné využít i pro nanesení reagentů do testovacích zón na čipu.

Laserové ošetření využívá polymerizaci fotopolymeru a touto technikou výroby lze dosáhnout nejužších kanálků. Kanálky vyrobené použitím laseru mohou být až 80 μm úzké. Hydrofobní bariéry dosahují šířky 120 μm .

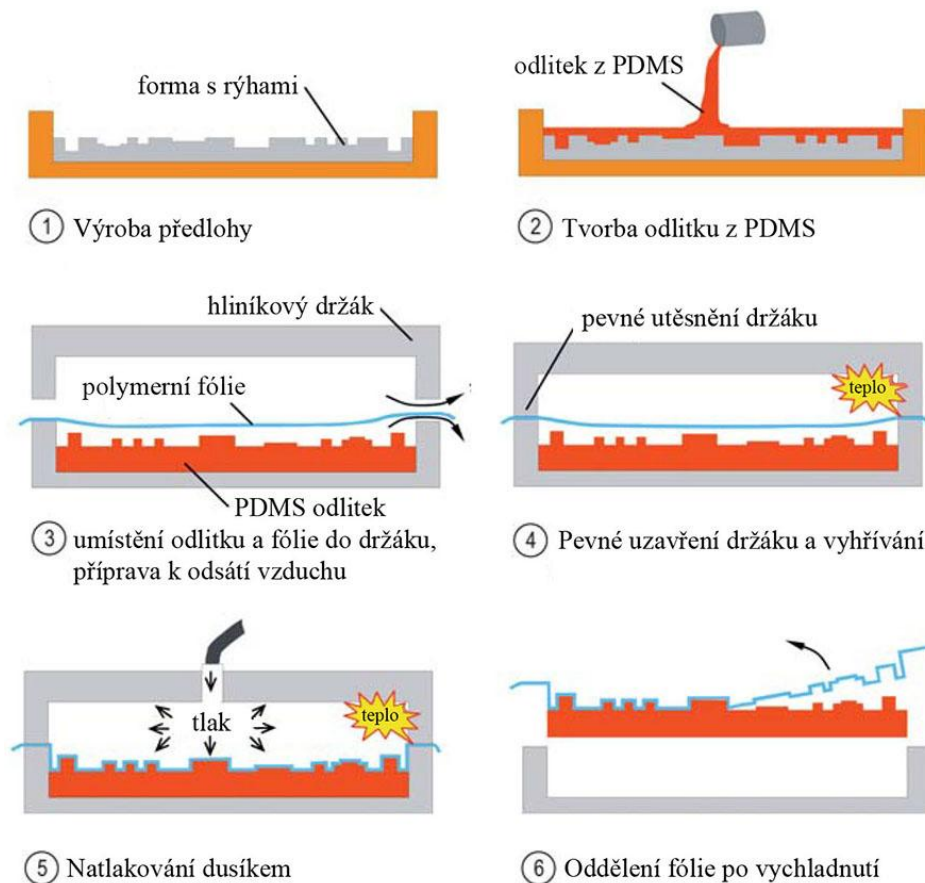
Pro výrobu je také možné filtrační papír nastříhat nůžkami do požadovaných tvarů. Takto lze vyrobit jednodušší tvary s přesností, která závisí na šikovnosti člověka, který vystřihuje.

2.1.2.3 Výroba mikrofluidních zařízení z fólie

Způsob výroby čipů z fólie se volí podle aplikace mikrofluidního zařízení. Například pokud je potřeba, aby měl čip malý tepelný odpor, zvolí se taková technika výroby, která umožní připravit tenký čip. Výroba zahrnuje utvoření různě komplikovaných komor a kanálů ve fólii. Nejsnazší metoda výroby je utvoření otvorů ve fólii a následně umístění další fólie jako vrchní a spodní vrstvy. Tak získáme uzavřený systém kanálů. Další techniky výroby jsou složitější, ale poskytují lepší možnosti úpravy fólie. Nejpoužívanější metody výroby jsou fotolitografie, tepelné formování, vtláčení vzorů, mokré leptání, stříhání a řezání. Technika výroby se volí podle její aplikovatelnosti, robustnosti, flexibility, kvality a ceny. [13]

Tepelné formování

Tento proces výroby čipu z fólie je založen na formování polymeru do trojrozměrného tvaru. Realizuje se pomocí vakuového formování termoplastických folií. Při tomto postupu se fólie zahřeje aby byla dost měkká a poté se pevně sevře do tvarovací formy. Působením vakua nebo zvýšeného tlaku se fólie formuje podle tvarovací formy a vzniká požadovaný tvar. (Obr.8) [17] Po ochlazení se může fólie oddělit od formy. Tvarovací formy mohou být vyrobeny například z polydimethylsiloxanu, který díky své flexibilitě umožňuje snadné oddělení fólie a rychlou výrobu.

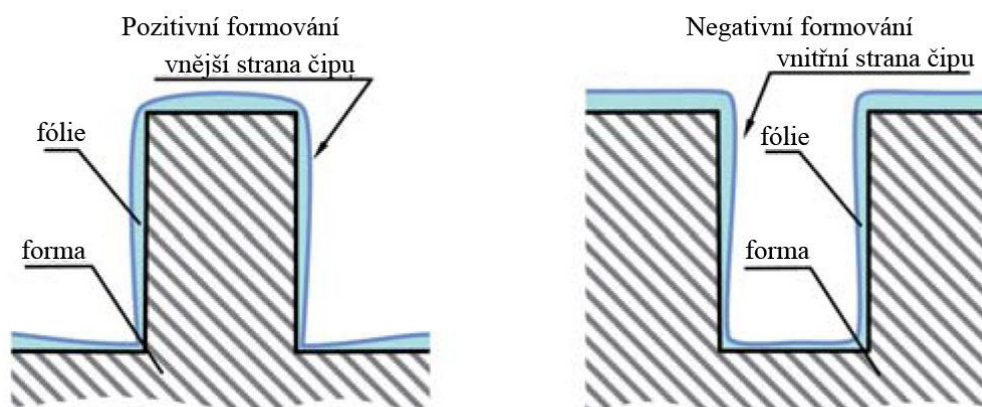


Obrázek 8: Výroba mikrofluidního zařízení z fólie [upraveno z cit.13]

Formování může být buď pozitivní nebo negativní. Vyvýšená struktura u pozitivního formování vede k přesnému tvaru vnitřní strany povrchu fólie. (Obr.9) Dna dutin jsou tlustá, okraje a boční stěny jsou naopak tenké. Negativní formování se vyznačuje prohloubenou strukturou, která vede k přesným tvarům na vnějším povrchu fólie. (Obr.9) Dna dutin jsou v tomto případě tenká. Pro negativní formování se využívá plošná pomůcka s překážkami, pomocí které se vytváří požadovaný tvar prohlubní.

Proto je tento typ formování výhodnější. Nevýhoda negativního formování je tá, že nelze dosáhnout úplné přesnosti povrchu a krajů mikrofluidních kanálů. Výběr typu formování proto určuje důležité vlastnosti získaného tvaru.

Výhodou tepelného formování je to, že touto metodou se vytváří trojrozměrná struktura, kterou lze využít. V této struktuře je možné vytvořit komůrky pro uskladnění reagensů na čipu. Kritickým momentem při aplikaci této metody je rychlé zahřátí fólie a rychlá evakuace prostoru nad fólií.[13]



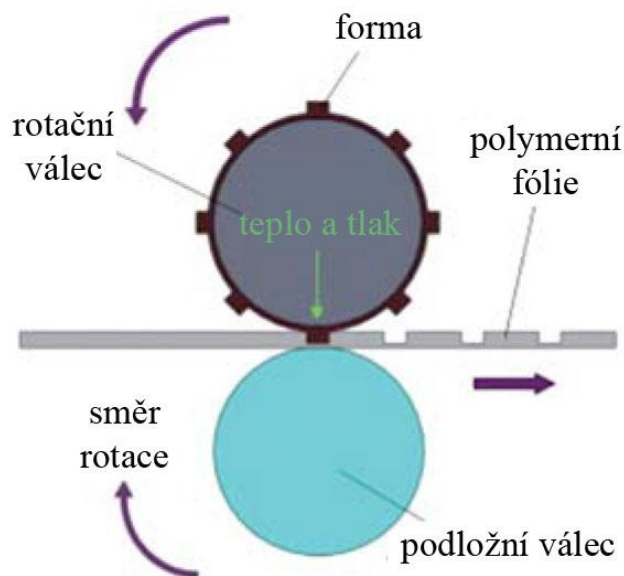
Obrázek 9: Pozitivní a negativní tepelné formování fólie. [upraveno z cit. 13]

Ražení horkým rotačním válcem

Tato výrobní technika se vyznačuje velkou produkcí fólie s mikrostrukturou. Velkého výkonu je dosaženo pomocí cylindrického válce, který vytváří mikrostrukturu na rozsáhlé ploše fólie. Zahřátý válec přenáší vzor na dočasně změkčenou polymerní fólii, která je v kontaktu s podložním válcem. (Obr.10) Při tomto procesu se fólie formuje kontinuálním vtlačáním vzoru do fólie, což je rozdíl proti tepelnému formování, kde se fólie tvaruje jejím prohloubením do vzoru.

Kritické parametry při výrobě pomocí rotačního válce jsou teplota válce, jeho rychlost a tlak. Značné zlepšení výrobního procesu může způsobit předehřátí fólie. Mezi možné varianty procesu patří například ražba pomocí dvou válců se vzorem, které vytvoří mikrostrukturu na obou stranách fólie. Dále je možné využít variantu vtlačení tvarů válcem a následné vystavení UV záření, které zapříčiní ztvrdnutí fólie. Existuje i varianta, při které se roztavená fólie přivádí na chladicí válec. Konvenční průmyslová výroba pomocí ražení válcem je velmi rychlá, dokáže vyrobit až 10 metrů fólie za minutu. V mikroměřítku se dosahuje pouze nižších rychlostí, často je to pod 0,5 metrů

za minutu. To je způsobeno tím, že výroba přesných vzorů vyžaduje delší kontakt válce s fólií. [13]



Obrázek 10: Rotační a podložní válec pro výrobu mikrofluidního zařízení z fólie ražením [upraveno z cit. 13]







2.1.2.4 Detekce

Kolorimetrická detekce

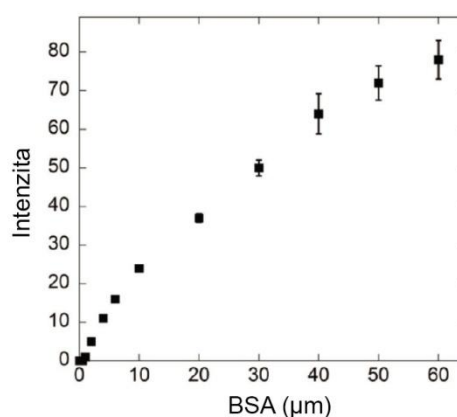
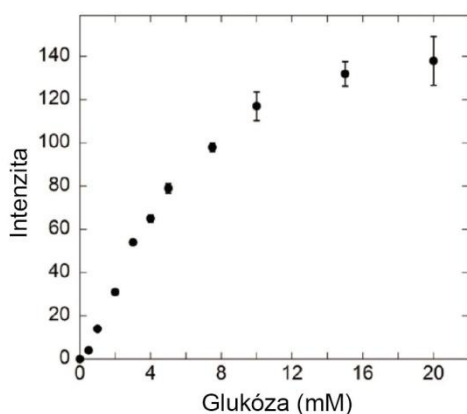
Nejčastěji využívanou detekční metodou u papírových mikrofluidních zařízení je kolorimetrická detekce. Tato metoda využívá intenzitu zbarvení reakční zóny na čipu k určení výsledku. Vzniklé zbarvení je funkcí koncentrace analytu.

Kolorimetrická detekce je založena na měření světla, které se odrazí od povrchu testovací zóny na mikrofluidním čipu. Toto odražené světlo se dá zachytit pomocí skeneru, digitálního fotoaparátu, je možné využít i fotoaparát na mobilním telefonu. Získáme digitální obraz testovací zóny a na tom je pak možné změřit intenzitu barvy. Pomocí změřené intenzity a s využitím kalibrační křivky můžeme vypočítat koncentraci sledovaného analytu. [8] Případně se dá zbarvení posoudit pouhým okem a následně porovnat s kalibrační křivkou. V takovém případě má kvantitativní výsledek spíše orientační charakter, jelikož vnímání barvy je subjektivní. Kalibrační závislost u kolorimetrické detekce většinou nebývá lineární (Obr.11), je to důsledek saturace barvy při vyšších koncentracích.

Pro využití s papírovými mikrofluidními zařízeními je kolorimetrická detekce vhodná díky jednoduchému přístrojovému vybavení a jednoduché obsluze. Nevýhodou je to, že může být použita jen pro barevné vzorky. Také je třeba vzít v úvahu to, že při využití fotoaparátu jsou výsledky závislé na kvalitě obrázku a světelných podmínkách při pořízení fotky. Výsledky při použití skeneru jsou reprodukovatelnější, protože jsou konstantní světelné podmínky. [8]

Glukóza (mM)		BSA (μm)
0		0
2.5		0.38
5.0		0.75
10		1.5
50		7.5
500		75

0.5 cm



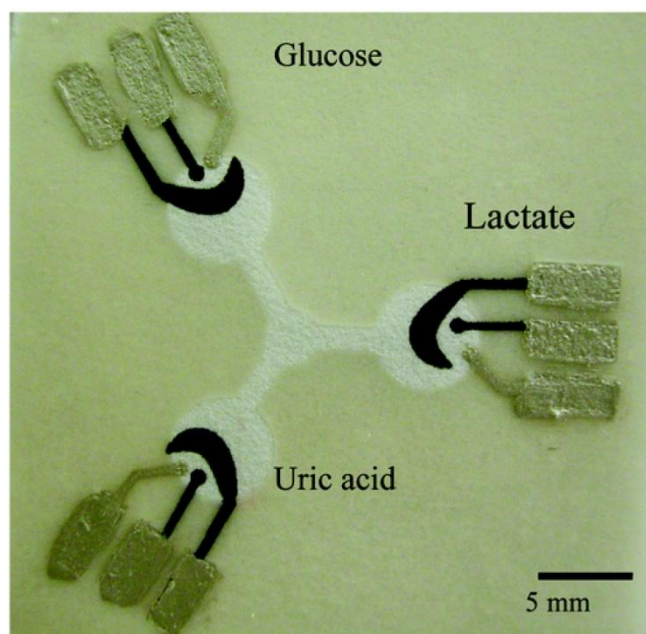
Obrázek 11: Výsledky papírového testu na glukózu a BSA v různých koncentracích v syntetické moči (nahore), nelineární kalibrační křivky pro určení koncentrace glukózy a BSA v syntetické moči [upraveno z cit. 8]

Elektrochemická detekce

Další alternativou kvantitativní detekce pro papírová mikrofluidní zařízení je elektrochemická detekce. Tento typ detekce může poskytnout lepší citlivost a selektivitu a také nižší detekční limit. [18] Pro papírové mikrofluidní čipy je elektrochemická

detekce vhodná z několika důvodů. Prvním důvodem je, že se elektrody dají miniaturizovat a snadno nanést na papír. Dále je výhodou elektrochemie, že nepotřebuje komplikovaná zařízení. V neposlední řadě je předností to, že je znám široký rozsah elektrochemických metod, jsou dobře popsány a jejich použití se rozšiřuje do různých oblastí. [18]

Detekční systém je tvořen třemi elektrodami (Obr.12) - pracovní elektrodou, referenční a pomocnou. Pro výrobu elektrod se používají různé materiály. Pro pracovní a pomocnou elektrodu se používá uhlík, pro referenční elektrodu se nejčastěji využívá chlorid stříbrný. [10] Elektrody pro potřeby mikrofluidních zařízení jsou miniaturizované a tento tříelektrodový systém je převeden na čip. Uložení elektrod na čipu je důležitý krok výroby.



Obrázek 12: Příklad papírového mikrofluidního zařízení s tříelektrodovým systémem pro analýzu glukózy, laktózy a kyseliny močové. Pracovní a pomocné elektrody jsou vyrobeny z uhlíku, referenční elektrody jsou z chloridu stříbrného. Do centrálního místa se nanese vzorek a ve třech reakčních zónách probíhají enzymové reakce. [10]

Další detekční techniky

K detekci je možné použít i další metody, i když nejsou příliš rozšířené. Příkladem je vodivostní detekce, která je založena na principu změny vodivosti materiálu v přítomnosti analytu. Ačkoliv je tato metoda jednoduchá, využívá se pro papírová mikrofluidní zařízení jen málo. [10]

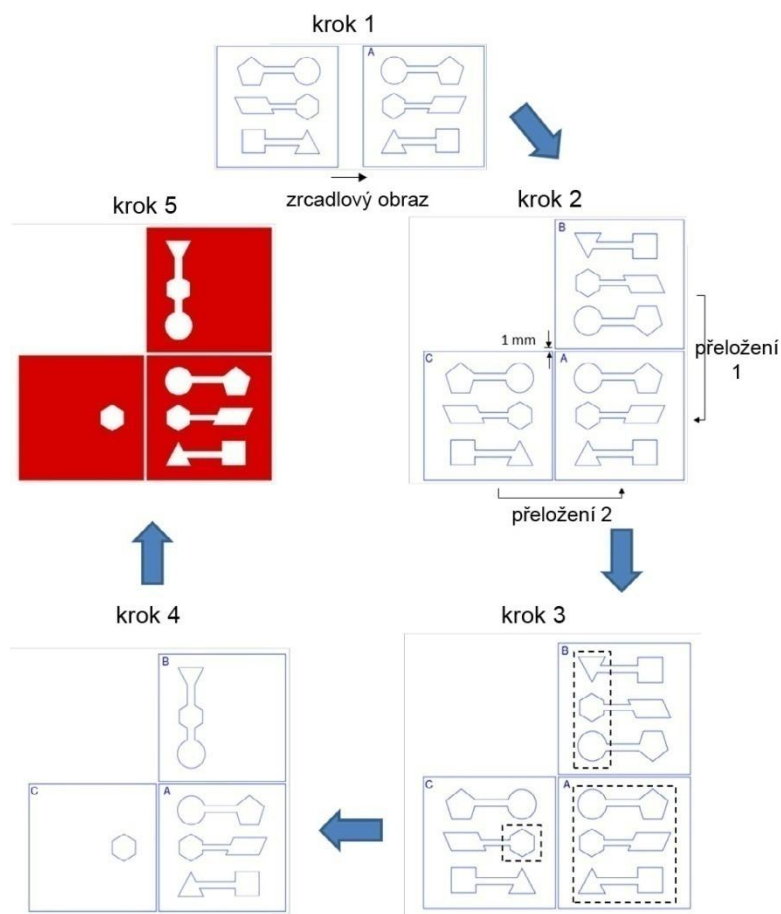
Chemiluminiscenční a elektrochemiluminiscenční detekci lze pro papírové čipy také využít, navíc jsou to metody levné, jednoduché a citlivé. Kvalitativní analýza je založena na intenzitě píku emitovaného světla, které je přímo úměrné koncentraci analytu. Chemiluminiscenci je možné spojit s elektrochemickou detekcí, spojená technika se pak nazývá elektrochemiluminiscence a poskytuje lepší selektivitu a má větší dynamický koncentrační rozsah. [10]

2.1.2.5 Skládání mikrofluidika (origami)

Papírová mikrofluidní zařízení je možné skládáním navrstvit a vytvořit tak 3D mikrofluidní zařízení. Podle staré japonské techniky skládání papíru se toto odvětví mikrofluidiky nazývá origami mikrofluidika. [19] Tato třírozměrná papírová zařízení vyžadují účinné těsnění mezi vrstvami papíru, aby bylo zajištěno, že kapalina nebude unikat, a aby byl dobrý kontakt na místech spojů. Toto je důležité pro funkčnost takového zařízení. K účinnému spojení papírových vrstev se využívá například oboustranná lepicí páska, případně adhezivní sprej, který také účinně těsní a zajistí dobrý kontakt mezi vrstvami. Ve spojovacích vrstvách se připraví mezery tak, aby se umožnilo tekutině projít na určitých místech. Na trojrozměrném zařízení dochází k transportu kapaliny vertikálně i horizontálně a nedochází k míchání jednotlivých proudů kapaliny. Kapalina se na takovém třírozměrném zařízení může dostat až do desítek detekčních míst. [19][20] Při návrhu designu skládaného mikrofluidického zařízení se tvoří zrcadlové obrazy, jednotlivé části se přes sebe skládají a vyberou se potřebné cesty pro kapalinu. (Obr.13)

Proti dvojrozměrnému mikrofluidnímu zařízení má trojrozměrný papírový čip několik výhod. Velkým plusem je, že se jedná o malé zařízení, na kterém může být paralelně provedeno velké množství testů. Je možné využít i víceúrovňové reakce nebo zařadit předúpravu vzorků. Zároveň je výhodou těchto 3D zařízení rychlá distribuce vzorků přes několik vrstev čipu. [21] Pro origami mikrofluidiku už byly popsány

aplikace například pro testy na glukózu a proteiny, detekci markerů tumoru [22] a nebo pro důkazy těžkých kovů [23].



Obrázek 13: Krok 1 znázorňuje vytvoření zrcadlového obrazu papírového čipu. Krok 2 je opět vytvoření zrcadlového obrazu pro vytvoření další vrstvy. Krok 3 zobrazuje vertikální kanály, kterými může kapalina téct. Potřebné kanály pro transport kapaliny přes všechny vrstvy jsou vyznačeny tečkovaně. Odstraněním částí designu mimo tečkované části je návrh dokončen (krok 4) a v kroku 5 je realizován voskovým tiskem. [upraveno z cit. 19]

2.1.3 Aplikace nízkonákladových mikrofluidních zařízení v klinické analytice

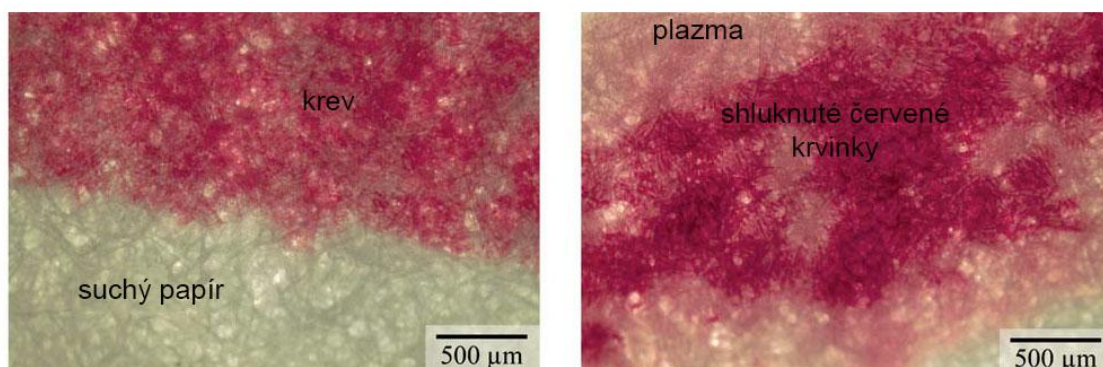
Nízkonákladová mikrofluidika nachází svá uplatnění v různých oborech. Lze ji využít při monitorování kvality životního prostředí, pro kontrolu kvality potravin, i pro klinickou analýzu. Díky vlastnostem papírových čipů jako jednoduchost použití,

rychlost analýz a nízké náklady na výrobu jsou nízkonákladová mikrofluidní zařízení vhodná k rychlým orientačním testům a také k využití v rozvojových zemích. Dosud byly uskutečněny různé studie, které využívaly papírová mikrofluidní zařízení pro analýzu reálných vzorků moči, slin a krve. [10]

2.1.3.1 Separace plazmy z krve

Mnoho diagnostických testů v klinických laboratořích se provádí v krevní plazmě, protože její složení často indikuje patologické procesy v těle. Proto je důležitým krokem separace plazmy. Yang a kol. [24] popsali separaci plazmy na papírovém mikrofluidním čipu. Tato metoda je založena na shlukování červených krvinek, dochází k separaci plazmy přímo na papíře následně je použita kolorimetrická detekce pro stanovení glukózy. Mikrofluidní zařízení pro tuto aplikaci bylo vyrobeno pomocí voskového tisku. Čip obsahuje tři zóny pro kolorimetrickou detekci, kontrolní zónu s plazmou a separační část, na které jsou naneseny protilátky.

Pro analýzu použili autoři jednu kapku krve, což je dostatečné množství, a nanесли ji na čip. Červené krvinky se v separační části působením protilátek shlukují (Obr.14) a plazma pokračuje dále pomocí kapilárních sil separační částí do výstupních částí, kde reaguje s činidly a proběhne barevná změna. Barevnou skvrnu naskenovali a vyhodnotili v digitální podobě pomocí kalibrační křivky.

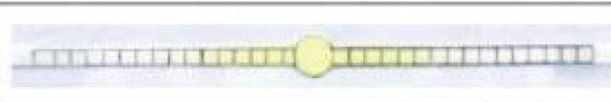
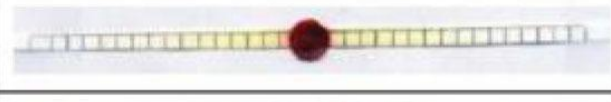





Obrázek 14: Vzorek krve na papíře upraveném fyziologickým roztokem pufrovaným fosfátem (vlevo), vzorek krve na papíře s protilátkami[upraveno z cit. 24]

2.1.3.2 Detekce krevních skupin

Khan a kol. [25] publikovali studii, která se věnuje využití papírového mikrofluidního zařízení pro detekci krevních skupin. Studie je založena na faktu, že shlukování červených krvinek, které je spuštěno specifickou interakcí antigenu s protilátkou, drasticky snižuje prosakování a transport krve na papíře. Proces shlukování zároveň výrazně zvyšuje separaci krevních složek, zejména separaci červených krvinek od plazmy.

Autoři smíchali vzorky krve s roztoky protilátek v různých poměrech (25:75, 50:50 a 75:25). Směsí ve vialkách 20 sekund jemně třepali a poté nechali 2 až 3 minuty odpočinout. Papírové proužky ponořili nejdříve do pufovaného fyziologického roztoku a po tomto ošetření do centra každého proužku kápili připravený vzorek krve o určitém poměru krev/protilátka. Rychlost transportu zaznamenali autoři na kameru a analyzovali na počítači. Pozorovali rozdílnou rychlost transportu krve v závislosti na tom, zda docházelo ke shlukování červených krvinek nebo ne. Míra separace červených krvinek se snižovala se snižujícím se poměrem krev/protilátka. (Obr.15) [25]

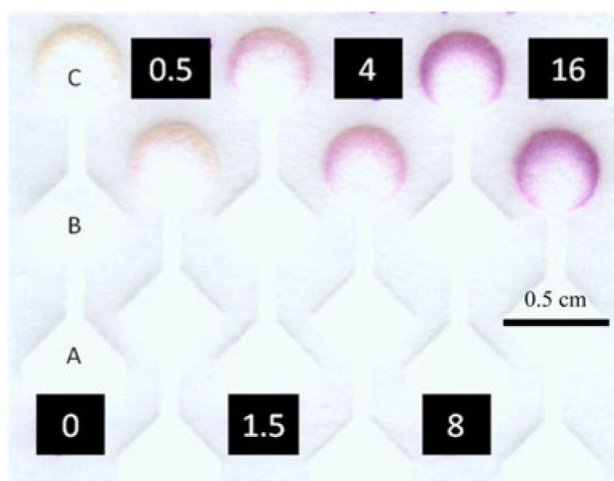
poměr krev/protilátka	
0 : 100	
25 : 75	
50 : 50	
75 : 25	
100 : 0	

Obrázek 15: Papírové proužky 10 minut po nanesení vzorku krve s protilátkou v různých poměrech. Krev skupiny B+ se specifickou protilátkou.

[upraveno z cit. 25]

2.1.3.3 Detekce ketonů v moči

Klasner a kol. [26] popsali mikrofluidní test na detekci ketonů v moči, který poprvé demonstruje možnost online chemické derivatizace na takovém zařízení. Tento test se skládá ze dvou částí, což umožňuje chemickou modifikaci před detekcí. Acetoacetát v moči nejprve reaguje s glycinem za vzniku iminového derivátu. Iminový derivát pokračuje kanálem dále až se dostane do detekční části, kde reaguje s nitroprusidem sodným za tvorby fialového komplexu. (Obr.16) Úspěch online reakce mezi acetoacetátem a glycinem je potvrzen skutečností, že když jedna z těchto dvou složek přijde do styku s nitroprusidem sodným jednotlivě, tak barevná změna neproběhne. Obě činidla musí být smíchány a zreagovat než proběhne reakce s nitroprusidem.[26]



Obrázek 16: Papírový test na ketony, koncentrace acetoacetátu jsou uvedeny v mM. Část A slouží pro nanášení vzorku, část B je derivatizační zóna, část C je detekční zóna. [26]

Intenzita zbarvení se mění s časem a optimální doba odečítání výsledku je asi 50 minut po nanášení vzorku. Pokud je však nutné rychlé provedení testu, je možné výsledek odečíst i dříve na úkor intenzity signálu. Intenzita barvy v detekční zóně není jen funkcí koncentrace ketonů ve vzorku, ale také závisí na účinnosti reakce, při které vzniká iminový derivát. [26]

2.2 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo vyzkoušet a popsat různé možnosti výroby a použití nízkonákladových mikrofluidních zařízení z papíru a fólie. V této práci bylo snahou poukázat na jednoduchost výroby a použití takových zařízení v klinické analytice.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Pomůcky

Pro výrobu nízkonákladových mikrofluidních zařízení jsem jako hlavní pomůcky používala filtrační papír Whatman, laminovací fólii a injekční stříkačky.

- filtrační papír Whatman 1 - tloušťka 180 μm , velikost pórů 8 μm
- filtrační papír Whatman 2 - tloušťka 190 μm , velikost pórů 8 μm

Dále jsem při práci na vytvoření čipů používala nůžky, děrovačku, pinzetu, žehličku, fén, magnety, automatické pipety, analytické váhy, injekční stříkačky, eppendorfky, Petriho misku, kádinky a odměrné baňky.

3.2 Přístroje

Během práce jsem používala tyto přístroje:

- vosková tiskárna Xerox ColorQube
- automatický laminátor Fellowes Cosmic A4 (Obr.17), který byl využíván pro zalaminování papírových čipů
- centrifuga (Labicom, s.r.o., Olomouc)



Obrázek 17: Automatický laminátor Fellowes [27]

3.3 Chemikálie

Při práci jsem používala tyto chemikálie:

- 1,10-fenanthrolin
- destilovaná voda

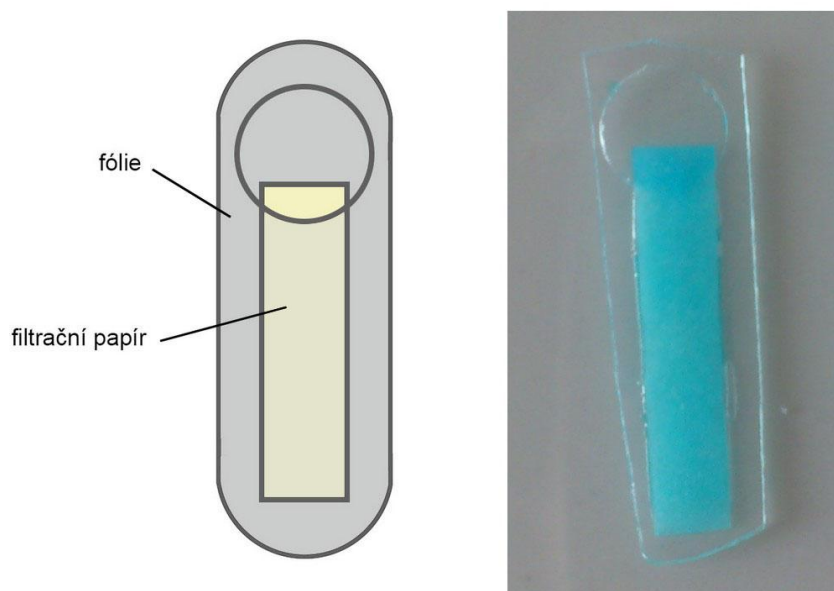
- dimethylglyoxim
- eriochromčern T
- fluorid sodný
- hexahydrát dusičnanu nikelnatého
- hydroxid amonný
- hydroxid sodný
- chelaton 3 (disodná sůl kyseliny diaminotetraoctové)
- chlorid železnatý
- kyselina octová

Použité chemikálie byly analytické čistoty (p.a.), všechny od firmy Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

4 VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE

4.1 Centrifugační mikrofluidika

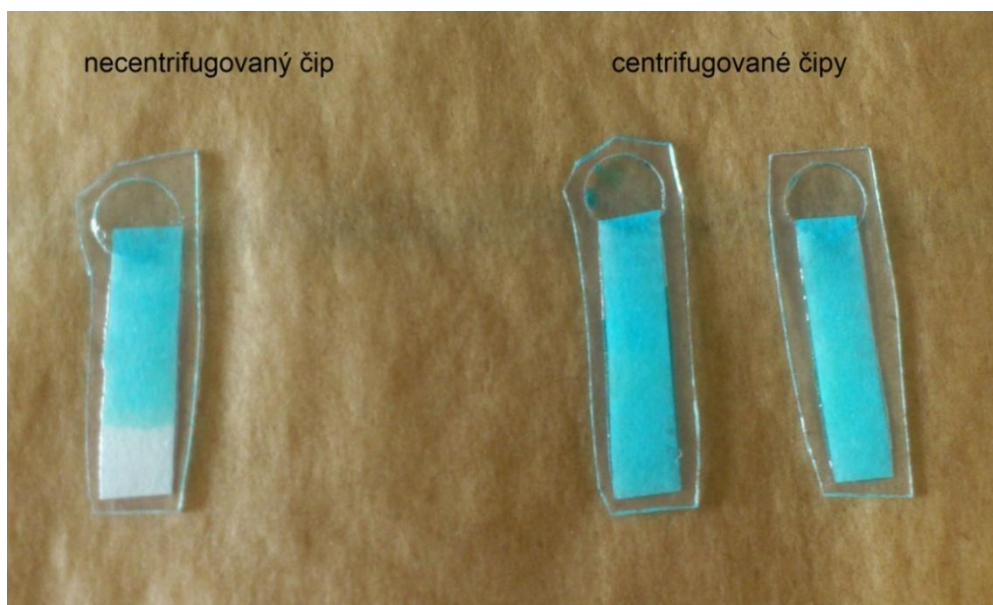
Prvním z testovaných způsobů nízkonákladové mikrofluidiky bylo využití centrifugy pro urychlení analýz na papírovém podkladu. Byly nastříhány proužky filtračního papíru široké asi 3 až 4 mm a každý proužek byl umístěn mezi dvě laminovací fólie. Na horní fólii byl vždy u jednoho konce proužku děrovačkou vytvořen kruhový otvor. Takto připravená proděravělá fólie s proužky papíru se opatrně nechala projet laminovačkou. Následně byly nůžkami vystříhány jednotlivé mikrofluidní čipy. (Obr.18)



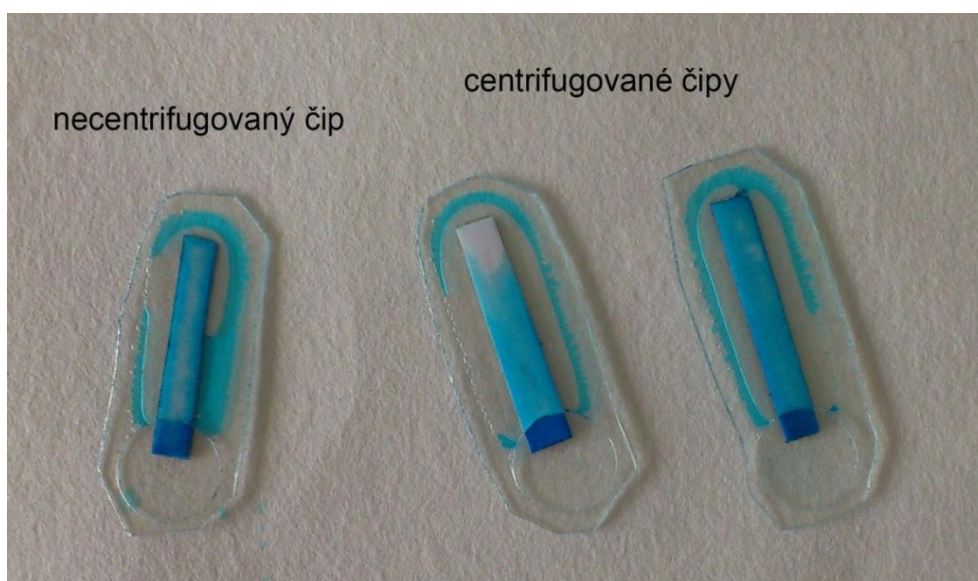
Obrázek 18: Návrh mikrofluidního čipu z papíru a fólie (vlevo), použitý čip pro centrifugační mikrofluidiku.

Byla testována rychlost transportu obarvené vody čipem. Čipy byly vloženy do eppendorfky naplněné obarvenou vodou, eppendorfky se uzavřely a dvě z nich byly vloženy do centrifugy na pozici proti sobě. Třetí eppendorfka zůstala na stole. Po jednu minutu se nechalo centrifugovat a poté se čipy ze všech tří eppendorfek vyjmuly pinzetou a položily do vodorovné polohy vedle sebe na stůl. Následně se porovnávalo jak daleko kapalina na čipu dorazila a sledoval se případný rozdíl mezi centrifugovaným čipem a čipem, který centrifugovaný nebyl. Bylo provedeno množství pokusů, při nichž senejprve jevílo využití centrifugy jako výhodné. (Obr.19) Bylo ale

i mnoho pokusů, kde se toto nepotvrdilo. Při pokusech se vyzkoušelo vložení čipu do eppendorfky dírou pro vstup vzorku nahoru a následně i dolů. Problémem tohoto čipu byly mezery kolem papíru mezi dvěma fóliemi, které často vznikaly při laminování. Tyto mezery umožňovaly kapalině proniknout čipem jinak než zamýšlenou cestou přes papír. (Obr.20) Zdálo se, že velikost mezery ovlivňovala rychlost transportu kapaliny více než centrifuga. Nepodařilo se tedy prokázat rychlejší transport kapaliny čipem v centrifuze.



Obrázek 19: Jeden z úspěšných pokusů, kdy na nacentrifugovaném čipu kapalina nedorazila do takové vzdálenosti jako na čípech, které prošly centrifugou.

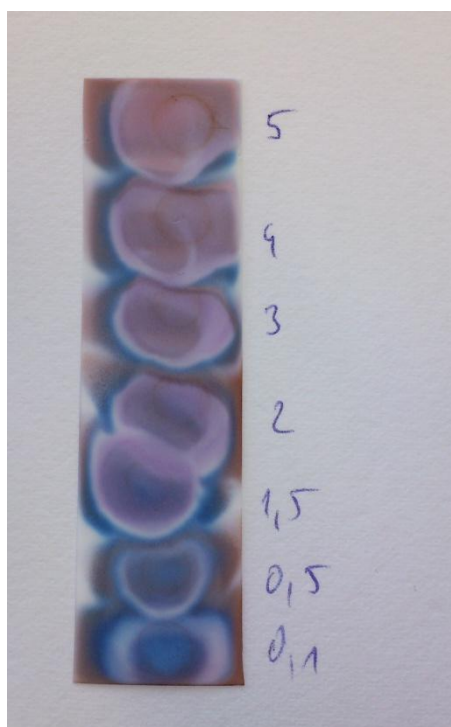


Obrázek 20: Pokus, kde jsou patrné velké mezery mezi fóliemi.

Na tomto designu čipu bylo také vyzkoušeno bezdotykové vytahování čipů pomocí magnetů. Čip byl opět vytvořen vložením papíru mezi dvě fólie, v tomto případě se přidal ještě kousek magnetického proužku. Po zalaminování a vhození čipu do roztoku bylo testováno bezdotykové vytahování pomocí magnetu. Silný magnet se přiložil ke straně eppendorfky a pohybem vzhůru byl z roztoku vytažen čip. Tento způsob by teoreticky umožnil automatizované vytažení takového čipu z eppendorfky, resp. jakékoliv jiné nádoby, po centrifugaci. Nicméně, jak bylo napsáno výše, použití centrifugy jako nástroje pro urychlení analýz v papírové mikrofluidice, nebylo potvrzeno.

4.2 Políčková mikrofluidika

V této části práce byl vyvíjen čip na určení tvrdosti vody s využitím reakce Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů s chelatonem 3. Nejprve probíhal výběr vhodného papíru, vyzkoušena byla i nitrocelulózová membrána. Výběr probíhal z filtračních papírů různé tloušťky Whatman (dodáno firmou Labicom). Na každém papíře byla provedena orientační „titrace na papíře“ tak, že se nakápl chelaton 3 a na něj kapka barviva, což vytvořilo modrou skvrnu. Na tuto skvrnu se následně kápl roztok hořečnatých iontů a skvrna se zbarvila do růžovofialova. Na některých filtračních papírech tato reakce nefungovala správně a pro další pokusy byly zvoleny filtrační papíry Whatman Grade 1 a 2. U nitrocelulózové membrány docházelo k velkému rozmývání barev ze středu do stran, proto nebyla vybrána jako vhodná pro tento účel. (Obr.21)



Obrázek 21: Rozmývání barev na nitrocelulóзовé membráně

Byly připraveny roztoky chelatonu 3 o koncentracích 10;5;4;3;2;1,5;0,5;0,1 mmol/l a roztoky hořečnatých iontů o stejných koncentracích. Na vybrané filtrační papíry byl natištěn pomocí voskové tiskárny (Xerox ColorQube) voskový vzor (čtverečky o velikosti 4 x 4 mm, viz fotografie testu níže). Papír se vložil mezi dva pečící papíry a po dobu asi 30 sekund se ohříval pomocí žehličky (nastavené na 205°C). Tím došlo k prostoupení vosku přes celou tloušťku papíru. K 200 μ l roztoku chelatonu 3 bylo přidáno 20 μ l hydroxidu sodného (0,5 M), promícháno a 5 μ l se nanoslo do jednoho políčka. Ihned poté byla nanosena kapka indikátoru. Fénem byl čip opatrně vysušen do sucha a pak bylo nakápnuto 5 μ l roztoku hořečnatých iontů o stejné koncentraci. Takto se vyzkoušela reakce přímo na čipu pomocí nakápnutí pipetou.

Dále bylo testováno přivedení kapaliny. Chelaton 3 s hydroxidem sodným a s indikátorem byly nanoseny a vysušeny fénem jak bylo popsáno výše. Poté byl umístěn filtrační papír, který měl sloužit pro transport kapaliny na vrchol testu. Bylo vyzkoušeno několik možností umístění tohoto proužku papíru.

Nejprve byl sací proužek umístěn vedle detekčních okének, se kterými byl spojen malými kanálky. (Obr.22) Proužek byl připevněn po straně oboustrannou lepicí

páskou. Byla vytvořena varianta s proužkem pod testem i s proužkem nad testem. Tento design testu nepřinesl očekávané výsledky, reakce byla pomalá.

Také se zkušelo umístění sacího proužku přímo pod detekční okénka a zajištění izolepou a také obalení celého testu izolepou. (Obr.23) Kapalina se v tomto případě dostala do horních políček rychleji než u předchozího případu. Nejrychleji fungoval test, který měl sací proužek přichycen izolepou, ale nebyl jí obalen. Dalšího zrychlení průběhu testu bylo dosaženo zatížením celého testu těžkým předmětem.

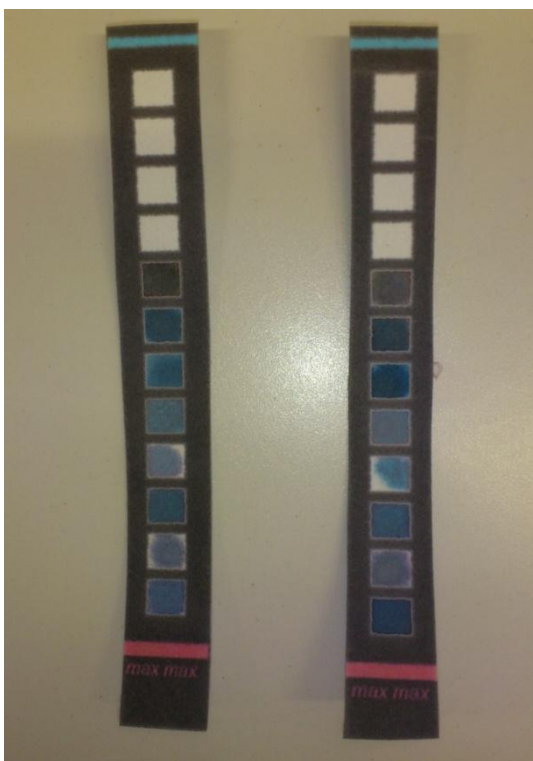
Problémem u tohoto testu na tvrdost vody byla hůře patrná změna barvy v detekčních políčkách, jelikož se barva měnila z modré na fialovou. Tento přechod byl pro uživatele špatně rozpoznatelný. (Obr.24) Řešením by bylo pravděpodobně analyzovat tento barevný přechod pomocí vhodného software, např. pomocí chytrých telefonů. Nicméně toto nebylo cílem této diplomové práce.



Obrázek 22: Test na tvrdost vody se sacím proužkem umístěným vedle detekčních políček.



Obrázek 23: Test na tvrdost vody se sacím proužkem umístěným pod detekčními okénky.

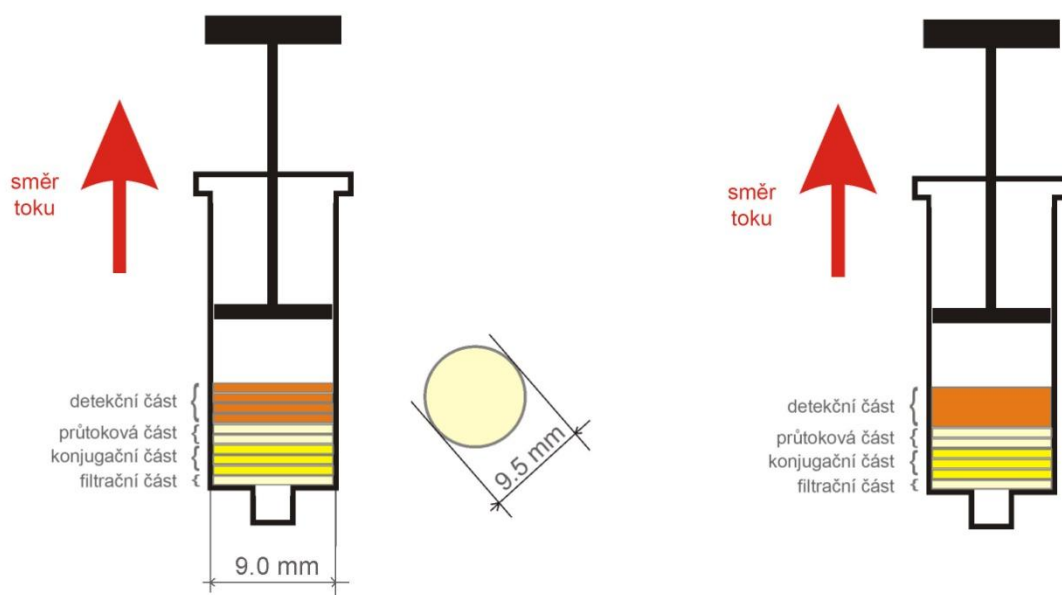


Obrázek 24: Test na tvrdost vody, kde je intenzita zbarvení problematicky vyhodnotitelná.

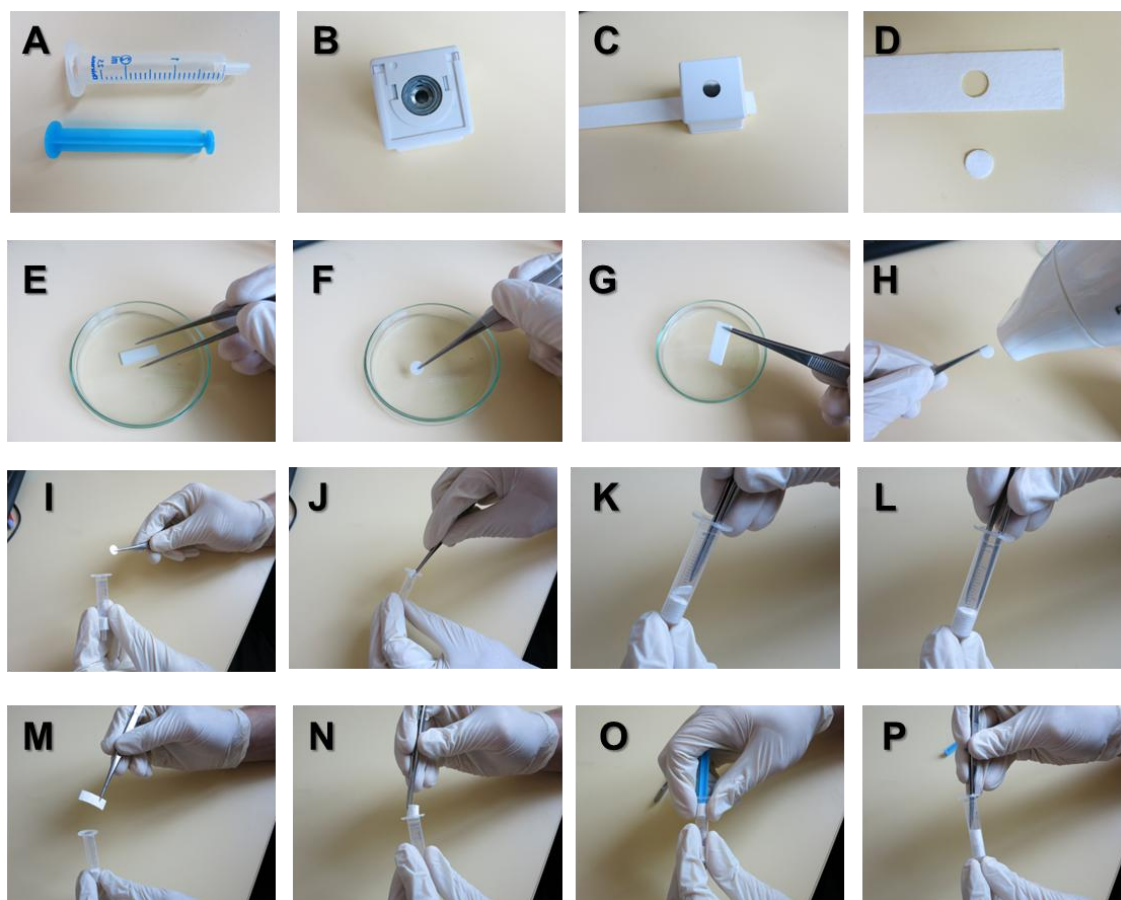
4.3 Stříkačková mikrofluidika

Posledním ze studovaných způsobů analýzy bylo využití tzv. stříkačkové mikrofluidiky (tzv. lab-in-a-syringe). Tento způsob analýz byl představen v roce 2015 skupinou prof. Merkociho [28], která na injekční stříkačku umístila dva zásobníky (patrony) na držení filtračních papírů. Do jednoho umístili konjugační roztok a do druhého detekční reagentii. Injekční stříkačkou způsobili podtlak, který nasál přes konjugační část (konjugační patronu) vzorek, přes detekční část do stříkačky. Detekční část pak autoři rozšroubovali a analyzovali zbarvení. Takto připravený test představuje ale zásadní problém v případě analýzy biologické tekutiny, např. moče nebo krve. V tomto případě totiž uživatel musí po provedení testu pracně rozšroubovat patronu a dotýkat se (v rukavicích) reakčních míst.

V této práci byl testován nový způsob stříkačkové mikrofluidiky – tzv. pravá stříkačková mikrofluidika („true lab-in-a-syringe“), kde jsou všechny reakční roztoky umístěny přímo do vlastní injekční stříkačky. Byly připraveny dva druhy testů, které se lišily uspořádáním detekce. Nejprve byly děrovačkou s průměrem 9,5 mm vyříznuty z papíru kolečka. Průměr byl určen podle šířky použité injekční stříkačky, v tomto případě se jednalo o injekční stříkačku od firmy Chirana o průměru 9,0 mm. Papírová kolečka byla později vložena do injekční stříkačky, kde takto vytvořily filtrační, konjugační a průtokovou část zařízení. Pro první druh testu tato vložená kolečka tvořila i detekční část. Pro druhý druh testu byl z papíru vyříznut obdélník 27 mm dlouhý a 8 mm vysoký, který byl nasunut do injekční stříkačky (Obr.25). Kolečka pro konjugaci a detekci byla ponořena do konjugačního roztoku nebo reakčního roztoku a pak byla vysušena fénem. Píst injekční stříkačky se vytáhnul ven a pomocí pinzety byla kolečka opatrně vložena do stříkačky. Kolečka byla jedno po druhém zatlačena do stříkačky pístem. V případě druhého typu testu s obdelníkovou detekcí byl obdelník srolován a pomocí pinzety byl nasunut do stříkačky a opatrně rozložen tak, aby se dotýkal vnitřního povrchu injekční stříkačky. (Obr.26)



Obrázek 25: První druh testu s detekční částí tvořenou kolečkem (vlevo), druhý typ testu s obdelníkovou detekční částí.



Obrázek 26: Výroba lab-in-a-syringe testů

Byl připraven 60 mM roztok dimethylglyoximu v metanolu. Dále byl pro studium maskování Fe^{2+} připraven maskovací roztok smícháním 0,5 M fluoridu sodného a 6,3 M kyseliny octové (pH 4,5) v poměru 1:1. Jako pufr byl použit roztok hydroxidu amonného (pH 9,5). Roztok železnatých iontů o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ byl nabrán do injekční stříkačky a prošel přes maskovací část (4 až 5 koleček). Prošlé železnaté ionty byly poté detekovány pomocí reakce s 1,10-fenantrolinem (8mg/ml) v acetátovém pufru (pH 4,5). Při použití 4 a 5 papírových koleček v maskovací části bylo zamaskováno více než 90% železa.

V testu byly použity 3 papírová kolečka pro průtokovou část. Ta měla za úkol oddělit maskovací a detekční část. V některých případech může sloužit i pro oddělení matrice. Pro samotný test se do injekční stříkačky nasál roztok dusičnanu nikelnatého. Pro detekci byla použita reakce Ni^{2+} iontů s dimethylglyoximem. V případě prvního druhu testu bylo v detekční části 5 papírových koleček, jejichž celková výška byla asi 7,5 mm, což je dostačující pro vizuální detekci. Intenzita barvy závisela na koncentraci. Mezi jednotlivými kolečky byla vidět světlejší barva, ale v celkovém pohledu oko vyhodnotí intenzitu barvy správně. (Obr.27) Byl proveden i test druhého typu s obdelníkovou detekcí. Detekční část má v tomto případě výšku asi 8 mm. (Obr.28)

U obdelníkové detekce může kapalina ze vzorku vyplavit sraženinu nikelnatého komplexu, který ztěžuje hodnocení. Při použití tohoto testu v praxi by pro zjednodušení mohla být umístěná barevná kalibrační řada přímo na injekční stříkačku, což by umožnilo snadnou orientaci uživatele. (Obr.29)



Obrázek 27: První druh testu s využitím detekční části z papírových kroužků.



Obrázek 28: Druhý druh testu s obdelníkovou detekcí.



Obrázek 29: Fotografie lab-in-a-syringe testu s kalibrační řadou pro snadnou orientaci uživatele.

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla otestována možnost využití centrifugy pro urychlení průchodu kapaliny čipem. Přístup využitý v této práci nevedl k pozitivním výsledkům.

Dále byl vytvořen papírový test na tvrdost vody, u kterého se podařilo změnou umístění sacího proužku zvýšit rychlost transportu kapaliny testovacím proužkem, avšak problematická byla kolorimetrická detekce. Proto výsledek této studie je také negativní.

S využitím injekčních stříkaček byl vyroben test „lab-in-a-syringe“. Připraveny byly dva druhy tohoto testu, které se lišily uspořádáním detekce. Ta byla v obou případech kolorimetrická a u prvního druhu testu byly v detekční části kolečka z filtračního papíru, u druhého typu testu byla detekční část tvořena filtračním papírem obdelníkového tvaru. Využití „lab-in-a-syringe“ bylo v této práci ukázáno na detekci niklu, který je častým alergenem. Tento test může být však využit pro různé aplikace a při uvážení jeho nízké ceny má potenciál být velkým přínosem pro klinickou analytickou chemii.

6 SUMMARY

In this diploma thesis the use of centrifuge for speeding up the liquid flow in a chip was tested. The approach tested in this work did not lead to positive results.

Next, a paper test for water hardness was made. We managed to optimize the position of a flow strip and to increase the speed of liquid transport through the strip. However, there was a problem with colorimetric detection. That is why the outcome of this study is negative.

With using syringes the „lab-in-a-syringe" test was made. Two types of tests which differed in detection arrangement were prepared. The first type was colorimetric detection with using rounded pads-based detection. The second type was also colorimetric detection with using rectangular detection pads. We proved that this test can be used for determination of nickel levels but generally it can be used for any assay. Considering the low cost of this test, it can be a great benefit for analytical chemistry.

7 LITERATURA

- [1] V. Tesař, Mikrofluidika, Automa. 10 (2008).
- [2] P. Smejkal, F. Foret, Microfluidics in Bioanalytical Instrumentation, Chem. List. 106 (2012) 104–112.
- [3] M.D. Tarn, N. Pamme, Microfluidics, Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng. (2014) 0–7.
- [4] V. Dolnik, S.R. Liu, S. Jovanovich, Capillary electrophoresis on microchip, Electrophoresis. 21 (2000) 41–54.
- [5] A. Folch, Introduction to BioMEMS, CRC Press, 2012.
- [6] H. Becker, L.E. Locascio, Polymer microfluidic devices, Talanta. 56 (2002) 267–287.
- [7] R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, M. Valcárel, H.M. Widmer, Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science, 2nd Editio, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- [8] A.W. Martinez, S.T. Phillips, G.M. Whitesides, E. Carrilho, Diagnostics for the developing world: Microfluidic paper-based analytical devices, Anal. Chem. 82 (2010) 3–10.
- [9] P. Valaská, Vývoj nízkonákladových analytických zariadení s využitím laminovacích technológií, 2014.
- [10] D.D. Liana, B. Raguse, J. Justin Gooding, E. Chow, Recent advances in paper-based sensors, Sensors (Switzerland). 12 (2012) 11505–11526.
- [11] <http://www.psscscientific.com/shop//whatmangrade2qualitativefilterpapers.aspx> (26.3.2017).
- [12] <http://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?TablePage=17215790> (26.3.2017).
- [13] M. Focke, 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) 1365–1386.

- [14] E. Carrilho, A.W. Martinez, G.M. Whitesides, Wax Printing – a Simple Micropatterning Process for Paper-based Microfluidics, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1–5.
- [15] <http://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/paper-microfluidic-devices-a-review-2017/> (27.3.2017).
- [16] Y. Xia, J. Si, Z. Li, Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review, *Biosens. Bioelectron.* 77 (2016) 774–789.
- [17] T. Velten, H. Schuck, M. Richter, G. Klink, K. Bock, C.K. Malek, S. Roth, H. Schoo, P.J. Bolt, Microfluidics on foil: state of the art and new developments, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part B J. Eng. Manuf.* 222 (2008) 107–116.
- [18] J. Mettakoonpitak, K. Boehle, S. Nantaphol, P. Teengam, J.A. Adkins, M. Srisa-Art, C.S. Henry, Electrochemistry on Paper-based Analytical Devices: A Review, *Electroanalysis.* 28 (2016) 1420–1436. doi:10.1002/elan.201501143.
- [19] S. Smith, K. Moodley, U. Govender, H. Chen, L. Fourie, S. Ngwenya, S. Kumar, P. Mjwana, H. Cele, M.B. Mbanjwa, S. Potgieter, T.-H. Joubert, K. Land, Paper-based smart microfluidics for education and low-cost diagnostics, *S. Afr. J. Sci.* Volume 111 (2015) 1–10.
- [20] A.W. Martinez, S.T. Phillips, G.M. Whitesides, Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 19606–11.
- [21] L. Xiao, X. Liu, R. Zhong, K. Zhang, X. Zhang, X. Zhou, B. Lin, Y. Du, A rapid, straightforward, and print house compatible mass fabrication method for integrating 3D paper-based microfluidics, *Electrophoresis.* 34 (2013) 3003–3007.
- [22] L. Ge, J. Yan, X. Song, M. Yan, S. Ge, J. Yu, Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence immunodevice for multiplexed measurement of biomarkers and point-of-care testing, *Biomaterials.* 33 (2012) 1024–1031.
- [23] M. Zhang, L. Ge, S. Ge, M. Yan, J. Yu, J. Huang, S. Liu, Three-dimensional paper-based electrochemiluminescence device for simultaneous detection of

- Pb²⁺ and Hg²⁺ based on potential-control technique, *Biosens. Bioelectron.* 41 (2013) 544–550.
- [24] X. Yang, O. Forouzan, T.P. Brown, S.S. Shevkoplyas, Integrated separation of blood plasma from whole blood for microfluidic paper-based analytical devices, *Lab Chip.* 12 (2012) 274–280.
- [25] M.S. Khan, G. Thouas, W. Shen, G. Whyte, G. Garnier, Paper diagnostic for instantaneous blood typing, *Anal. Chem.* 82 (2010) 4158–4164.
- [26] S.A. Klasner, A.K. Price, K.W. Hoeman, R.S. Wilson, K.J. Bell, C.T. Culbertson, Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1821–1829.
- [27] https://www.google.cz/search?q=Fellowes+Cosmic+A4&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiHgfiXo6HTAhWBmBQKHdVMAHEQ_AUICSgC&biw=1278&bih=678#imgrc=_mQFhXdJvEYx7M: (12.4.2017).
- [28] G.E.N. Pauli, A. de la Escosura-Muniz, C. Parolo, I.H. Bechtold, A. Merkoci, Lab-in-a-syringe using gold nanoparticles for rapid immunosensing of protein biomarkers, *Lab Chip.* 15 (2015) 399–405.