

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**Vývoj mikrofluidního zařízení pomocí 3D tisku a jeho testování
pro forenzní účely**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Studijní obor:

Vedoucí práce:

Konzultant:

Bc. et Bc. Alena Šustková

Analytická chemie

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Mgr. Lenka Hárendarčíková

Olomouc 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Lence Hárendarčíkové za odborné vedení, cenné rady, nápady a připomínky, bez nichž by tato diplomová práce nevznikla. Zároveň bych také chtěla poděkovat studentům doktorského studia za pomoc v laboratoři, svojí rodině a nejbližším přátelům za podporu a víru, kterou ve mne vkládali.

SOUHRN

Tato diplomové práce si klade za cíl vyrobit mikrofluidní zařízení za použití 3D tisku. Zařízení tohoto typu by našlo využití pro testování léčiv či jedů, ať už v klinické nebo forenzní toxikologii, kde by ušetřilo nejen ekonomické náklady, ale také čas nebo taky prostor, který by toto zařízení zabíralo oproti klasickým instrumentálním zařízením.

Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Teoretická část se zabývá nejprve 3D tiskem, poté mikrofluidními systémy a detekcí látek z nich vycházející. Následně zde najdeme taky kapitoly zabývající se toxikologií klinickou i forenzní. Následná kapitola se zabývá omamnými a psychotropními látkami, které jsou rozděleny do jednotlivých podskupin. Na závěr teoretické části najdeme příklady využití mikrofluidních systémů ve forenzních vědách a medicíně.

V praktické části se setkáme s návrhem výroby mikrofluidního systému z PDMS a skla slepenými dohromady pomocí plazmy. Nejdříve byly vyrobeny 3 typy jednoduchých struktur kanálů, na kterých byla vyzkoušena izotachofóza, segmentovaný tok a zadržení magnetických mikročástic pomocí magnetického pole. Na závěr práce byl vytvořen složitější čip, na kterém byla provedena reakce léčiva ibuprofenu s kolorimetrickou detekcí.

SUMMARY

The aim of this diploma thesis is to produce microfluid device using 3D printing. The equipment of this type would find use in drug or poison testing, both in clinical and forensic toxicology, which would lead to save not only economic cost, but also time or space currently used by classical instrumental devices.

The thesis is divided into theoretical and practical sections. Theoretical part firstly addresses 3D print, thereafter microfluid systems and detection of substance coming out of them. Consequently, we will find chapters focused on clinical and forensic toxicology. The following chapter is dealing with narcotic and psychotropic substances, which are divided into individual subgroups. The end of the theoretical sections shows examples of microfluid systems in forensic science and medicine.

The practical section of the thesis shows proposal of production of microfluid system made of PDMS and glass fused together by plasma. Initially 3 types of simple channel structures we produced, on which isotachopheresis, segmented flow and restraint of magnetic microparticles we tested. At the end of the thesis, a more complex chip was created on which the reaction of ibuprofen with colorimetric detection was performed.

Bibliografická údaje:

| | |
|--------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora: | Bc. et Bc. Alena Šustková |
| Název práce: | Vývoj mikrofluidního zařízení pomocí 3D tisku a jeho testování pro forenzní účely |
| Typ práce: | Diplomová |
| Pracoviště: | Katedra analytické chemie |
| Vedoucí práce: | doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D. |
| Konzultant: | Mgr. Lenka Hárendarčíková |
| Rok odevzdání práce: | 2019 |
| Abstrakt: | Práce se zabývá vývojem mikrofluidního zařízení, ve kterém nepostradatelnou roli hraje 3D tisk. Využití takového zařízení by bylo možné např. ve forenzních vědách či farmaceutické analýze. |
| Klíčová slova: | 3D tisk, mikrofluidní systémy, mikrofluidní čipy, PDMS, toxikologie, forenzní vědy. |
| Počet stran: | 78 |
| Počet příloh: | 0 |
| Jazyk: | Čeština |

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. et Bc. Alena Šustková

Title: Development of microfluidic device using 3D print and its testing for forensic purposes

Type of thesis: Master

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Consultant: Mgr. Lenka Hárendarčíková

The year of submission: 2019

Abstract: The diploma thesis addresses development of microfluid device in which 3D printing has an indispensable role. The use of such a device would be possible for example in forensic science or pharmaceutical analysis.

Keywords: 3D print, microfluid systems, microfluid chips, PDMS, toxicology, forensic science.

Number of pages: 78

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Obsah

| | |
|--|----|
| SEZNAM ZKRATEK | 10 |
| ÚVOD | 12 |
| TEORETICKÁ ČÁST | 13 |
| 1 3D tisk | 14 |
| 1.1 Historie 3D tisku | 14 |
| 1.2 Současné použití a budoucnost 3D tisku | 15 |
| 1.2.1 3D tisk z písku..... | 15 |
| 1.2.2 3D tisk betonu..... | 16 |
| 2 Mikrofluidní systémy | 19 |
| 2.1 Mikrofluidní čipy | 19 |
| 2.1.1 Čipy z PDMS | 20 |
| 2.1.2 Čipy z křemíku..... | 20 |
| 2.1.3 Čipy ze skla..... | 21 |
| 2.2 Vybrané typy detekce | 21 |
| 2.2.1 Optické detekce | 21 |
| 2.2.2 Elektrochemická detekce..... | 29 |
| 2.2.3 Hmotnostní spektrometrie | 32 |
| 2.2.4 Ostatní typy detekce..... | 35 |
| 3 Toxikologie | 37 |
| 3.1 Klinická toxikologie..... | 39 |
| 3.2 Forezní toxikologie | 40 |
| 4 Psychotropní a omamné látky | 41 |
| 4.1 Těkavé OPL..... | 41 |
| 4.2 Opioidy | 42 |
| 4.3 Cannabinoidy..... | 42 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.4 | Hypnotika | 42 |
| 4.5 | Psychostimulanty | 43 |
| 5 | Využití mikrofluidiky ve forezních vědách a medicíně | 44 |
| | CÍL PRÁCE | 46 |
| | PRAKTICKÁ ČÁST | 47 |
| 5.1 | Design mikrofluidního zařízení..... | 47 |
| 5.2 | Proof-of-concept | 54 |
| 5.2.1 | Rovný kanál | 55 |
| 5.2.2 | T-kanál..... | 56 |
| 5.2.3 | Křížový kanál | 57 |
| 5.3 | Složitější čip | 61 |
| | ZÁVĚR..... | 70 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ..... | 71 |
| | SEZNAM LITERATURY..... | 73 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-------|---|
| μ-TAS | Micro Total Analysis System |
| ABS | Akrylonitrilbutadienstyren |
| BFM | Bromfenolová modř |
| BVOH | Butendiolvinylalkohol kopolymer |
| CE | Kapilární elektroforéza |
| ESI | Ionizace elektrosprejem |
| GSV | Gray-scale-valuation |
| HEC | 2-hydroxyethylcelulóza |
| HPLC | High-performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) |
| ISE | Iontově selektivní elektroda |
| LIT | Laserem indukovaná fluorescence |
| MALDI | Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization |
| MS | Hmotnostní spektrometrie |
| NMR | Nukleární magnetická rezonance |
| OPL | Omamné a psychotropní látky |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce |
| PSD | Jednorozměrný detektor citlivý na polohu |
| RIG | Gradient indexu lomu |
| SERRS | Ramanův rozptyl s povrchově zvýšenou rezonancí |
| SLA 1 | Stereolithographic apparatus #1 |
| SPE | Extrakce tuhou fází |
| STA | Systematická analytická toxikologie |

| | |
|-----|---------------------------------------|
| TNT | Trinitrotoluen |
| TOF | Time-of-Flight (Průletový analyzátor) |
| UV | Ultrafialová oblast záření |
| VIS | Oblast viditelného světla |

ÚVOD

V dnešní době je tendence všechny zařízení zmenšovat, ale zároveň vyžadovat, aby uměly co nejvíce funkcí. Tomuto trendu se nevyhnula ani oblast chemie. Na světě se specializuje spousta vědců na mikrofluidní systémy a jejich propojení s dalšími zařízeními, tak aby byly schopny odvést co nejvíce práce. V budoucnu by to pak mohlo vypadat třeba tak, že by jeden jediný čip mohl nahradit několik zařízení, ne-li celou laboratoř.

Pokud už mluvíme o trendech dnešní doby, nesmíme opomenout 3D tisk. Doba kdy, se na takových tiskárnách tiskly drobné předměty z polymerů, je dávno pryč. Dnes najdou tyto zařízení uplatnění v nejrůznějších průmyslových odvětvích, ať už mluvíme o letectví, stavebnictví, potravinářství, nebo dokonce bioinženýrství.

Co se však stane, když tyto dva trendy spojíme? 3D tisk může napomoci k výrobě mikrofluidních systémů za zlomkovou cenu, a přitom funkčnost systému zůstane zachována. Více o tomto tématu se věnuje tato diplomová práce, ve které je popsána výroba mikrofluidního čipu za požití 3D tisku. Tyto čipy by pak v budoucnu mohly najít uplatnění jak už ve farmaceutické analýze, tak i třeba ve forezních vědách.

TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část diplomové práce je rozdělena do 6 hlavních kapitol. První kapitola se zabývá 3D tiskem, jeho historií i využití v současné době, kdy jej můžeme nalézt v nejrůznějších průmyslových odvětvích.

V druhé části se diplomová práce zabývá mikrofluidními systémy, které by v budoucnu mohly výrazně zjednodušit a zrychlit práci nejen v laboratoři, ale provádět analýzy i mimo ně. Výroba těchto zařízení se provádí z různých materiálů a různými metodami, které jsou zmíněny v podkapitolách. Důležitou součástí analýz jsou také detekce látek, kterými se zabývají také jednotlivé podkapitoly mikrofluidních systémů. Jedná se zejména o detekce optické, elektrochemické, hmotnostní, ale také NMR, pomocí chytrých telefonů a další.

Další kapitola, v pořadí třetí, se věnuje toxikologii, která úzce souvisí i s farmakologií. Toxikologii lze rozdělit podle specifikací, kterým se daný obor toxikologie věnuje. Jednotlivé obory toxikologie se navzájem prolínají, avšak nejčastěji se rozdělují podle nox, které stanovují. Dva nejdůležitější obory, které jsou částečně předmětem zájmu této diplomové práce, jsou popsány v jednotlivých podkapitolách.

Předposlední kapitola se zabývá omamnými a psychotropními látkami. Tyto látky jsou často léky s určitými specifickými účinky, avšak vyvolávají určité stavy, ať už euforie či halucinace, díky nimž jsou často zneužívány.

Poslední podkapitolou se uzavírá teoretická část, kdy zde najdeme využití mikrofluidních systémů ve forenzních vědách a medicíně.

1 3D tisk

Tato technologie umožňuje vytisknout 3D model pomocí digitálních dat, které 3D tiskárna je schopna zpracovat. Tato data 3D modelu můžeme získat dvěma způsoby. Prvním způsobem je použití 3D skeneru, který vytváří virtuální model shodný s naskenovaným fyzickým modelem. Druhým z nich je navržení 3D modelu pomocí 3D grafického softwaru. Pokud bychom se bavili o využití v technickém průmyslu, nejvíce rozšířené softwary na navržení 3D modelů pro dané aplikace jsou CAD systémy. Mezi nejznámější zástupce těchto systémů můžeme jmenovat např. SolidWorks, Solid Edge nebo progeCAD. [1]

1.1 Historie 3D tisku

První experimenty spojené s 3D tiskem se objevily zhruba před třiceti lety, kdy začaly být dostupné první počítače. Experimenty spočívaly v rozvoji strojů, které by byly schopny vytvořit skutečný model za použití různých materiálů. Vznikly tzv. tiskové plotry, které byly zařazeny mezi nejznámější stroje. Tak jak když pero kreslí na papír obraz, tak princip se zakládal v upevnění nože vyřezávající pláty z lepenky. Vyřezané pláty se na sebe poskládaly a vznikl tak 3D model. Tato technologie byla využívána např. v topografických studiích při analýze terénu. [2]

Velký pokrok udělal v roce 1984 americký vědec Charles Hull, který přeměnil tisk klasickými inkoustovými tiskárnami na tisk materiály. Zkoumal zejména fotopolymery, u kterých zjistil výjimečné fyzikální vlastnosti, kdy při ozáření těchto materiálů UV zářením začalo docházet k tuhnutí těchto materiálů. Tato skutečnost zapříčinila to, že Hull začal vyvíjet technologii, která by byla schopna vytisknout reálný 3D model z digitálních dat. O dva roky později slavil úspěch, kdy na svoji technologii stereolitografie získal patent. Tentýž rok 1986 založil společnost s názvem 3D Systems a vyvinul vůbec historicky první opravdovou 3D tiskárnu s označením SLA 1. Tento prototyp byl vyroben jen v omezeném množství pro hrstku vybraných zákazníků. Díky jejich zpětné vazbě se technologie mohla dále vyvíjet, a tak v roce 1988 byla vytvořena lepší verze s označením SLA-250. Od doby, co vyšel na trh první prototyp 3D tiskárny SLA 1, prošlo tohle prvotní dílo více než 260 inovacemi. [1, 2]

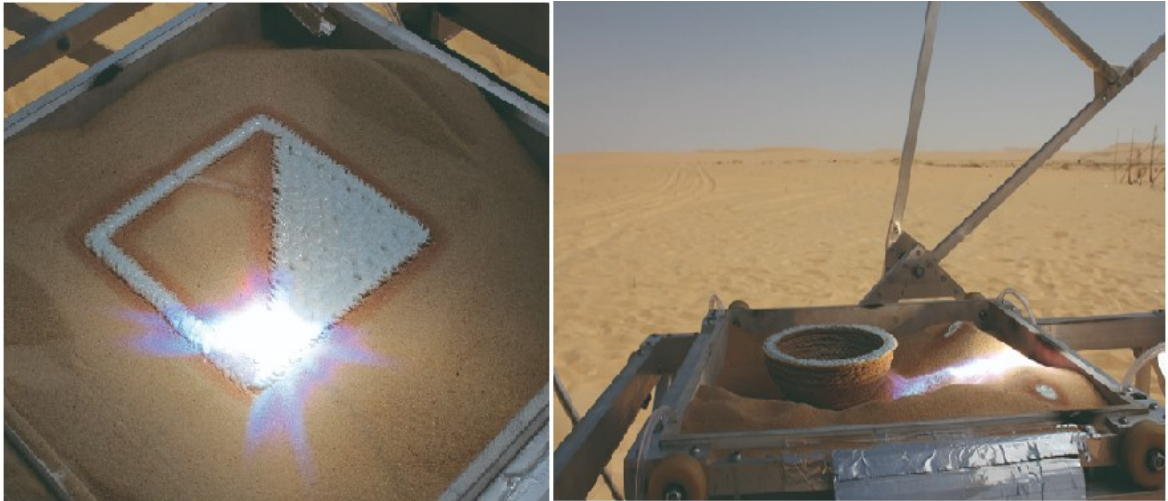
1.2 Současné použití a budoucnost 3D tisku

3D tisk má velký potenciál pro využití ve většině průmyslových odvětví. V medicíně se tato technologie může uplatnit od tisku kloubních náhrad, přes výrobu snímatelných rovnátek v ortodoncii, až k protetice a jednou třeba až po tisk skutečných orgánů [3, 4, 5]. Ve strojírenství je využití mnohem častější. Například v letectví už nyní existuje spousta technik 3D tisku nejen pro polymery, ale také pro kovy [6, 7]. I v potravinářství najde své využití. Již nyní se tisknou cukrovinky, čokolády, zdobí perníčky [54, 55]. Do budoucna by však 3D tisk mohl oživit jídelníček kolonizátorů na Marsu, jak uvedl Elon Musk [56].

1.2.1 3D tisk z písku

Velmi zajímavý projekt, kterému se věnoval student Nizozemské univerzity, se zaměřuje na sestavení 3D tiskárny, která by využívala písek jako stavební materiál a sluneční světlo, jako energii pro slinování jednotlivých vrstev. Podobné technologie využívající písek, jako stavební materiál, už byly vyrobeny a používají se např. v umění. Cíl práce však byl v prozkoumání možností solárního tisku pomocí písku pro výrobu bydlení hlavně v rozvojových zemích. Jelikož v těchto zemích je volně dostupný písek a vysoké množství slunečního záření, byl by tento způsob 3D tisku zajímavý pro nový druh podnikání. [11,12]

Nevýhodou však je poměrně pomalý tisk, což umožňuje tisknout pouze malé výrobky (Obr. 1). V závislosti na materiálových vlastnostech může být tisknuta spousta věcí. Zatím však materiálové vlastnosti, jako je pevnost, tepelná odolnost nebo vzhled nebyly testovány. Další nevýhodou je cena stroje, která je poměrně vysoká díky nákladům na objektiv. I když je v práci navržena přívětivá cesta, jak náklady snížit, i tak jsou náklady odhadovány na částku okolo 1000 euro. I přes tyto úspory je tato částka příliš vysoká pro podnikatele z rozvojových zemí. [11]



Obr. 1: 3D tisk pomocí slinování písku [12]

1.2.2 3D tisk betonu

Materiály používané s technologií 3D tisku nejsou omezeny pouze na plasty a kovové materiály. Nedávný vývoj v oblasti konkrétního 3D tisku dokazuje, že je zde nevyužitý potenciál v rychlém budování cenově dostupných domů nebo dokonce celých komunit. Jakmile architekt nebo designér vytvoří návrh, může okamžitě převést své 3D plány na g-kód a odeslat je do tiskárny. Tato konkrétní 3D tiskárna pak může okamžitě přeměnit nápad na realitu. To může být použito nejen pro výrobu domovů pro lidi bez domova, ale také pro lidi, kteří o svůj domov přišli např. díky přírodní katastrofě. Použití by bylo i pro moderní stavby na jejichž geometrii jsou tradiční stavební techniky krátké. [13]

I když tato technika skýtá velké množství výhod, jako jsou nízké náklady, vysoká rychlost montáže, neplýtvá se zbytečně materiálem (šetrné k životnímu prostředí), díky přenositelnosti výstavba na různých místech pomocí jedné tiskárny, i tak nedokáže 3D tisk plně nahradit tradiční stavební techniky (Obr. 2). [13]



Obr. 2: *Návrh 3D tiskárny na stavbu domů od společnosti ICON Vulcan [13]*

Hlavním cílem bylo dosáhnout betonové směsi, která by byla schopna zajistit maximální stavitelnost při vylévání betonu a zároveň maximalizovat tekutost betonové směsi, aby se zajistilo, že tryska nebude ucpaná. Jednoduše řečeno, cílem je mít vrstvy, které rychle ztvrdnou, ale zůstanou dostatečně tekuté, aby se úspěšně spojily s novými vrstvami (Obr. 3). Aby byly splněny tyto podmínky, musí taková směs obsahovat nejen množství daných chemikálií, ale také přesné množství např. superplastifikátorů používajících se k redukcí vody ve směsi. Zároveň výrobci do betonových směsí přidávají vlákna, aby docílili vyšší pevnosti. [13]



Obr. 3: 3D tisk domu – nanášení jednotlivých vrstev na sebe [14]

Začátkem roku 2018 byl firmou ICON v USA vytisknut dům o rozloze 350 čtverečních stop za 10000 dolarů. Jejich cílem je však dostáhnout ceny 4000 dolarů za dům v Salvadoru o rozloze 600–800 čtverečních stop. Jednou ze zemí, která má obzvlášť zájem o využití 3D tisku při stavbě domů a mostů, je Nizozemí. Na letošní rok je plánováno v Eindhovenu postavit pět nových domů pomocí speciálních betonových 3D tiskáren. Domy budou obývány rodinami a největší z pěti domů bude mít tři ložnice vedle tří pater. [13]

Nizozemí je také domovem prvního betonového 3D tištěného mostu pro cyklisty a chodce. Tato konstrukce byla vyrobena stejnou firmou, která poskytuje zařízení, které bude použito pro stavbu 3D tištěných domů v Eindhovenu. Most se skládá z několika 3D tištěných kusů betonu. [13]

2 Mikrofluidní systémy

Mikrofluidní systémy jsou zařízení čipového formátu používající se pro biologické postupy a testy zejména v oblasti bioanalytického vyšetření. Tato vědní disciplína z oboru analytické chemie se zabývá analýzou xenobiotik, což jsou látky, které jsou organismu cizí, a biotik, látek, které jsou organismu vlastní např. lipidy, nukleové kyseliny, proteiny a jiné. Jelikož je množství vzorku většinou omezené a často poměrně dosti malé, pokrok si žádá vznik nových zařízení, pro které jsou malé množství dostačující, ale zároveň poskytují výsledky, které budou robustní a reprodukovatelné. Tyto podmínky poměrně dobře splňují mikrofluidní čipy, jež jsou označovány jako „Micro Total Analysis System“ zkráceně také μ -TAS. Tento název se snaží vystihnout vložení co největšího počtu analytických operací do jednoho zařízení, které velikostně odpovídá např. kreditním kartám, anebo možným menším velikostem. Špičkou této technické evoluce by mohlo být vytvoření laboratoře na čipu neboli Lab-on-a-chip. Momentálně však konečnou fází tohoto vývoje jsou mikro a nanočipy. [15, 16]

2.1 Mikrofluidní čipy

Tyto miniaturní verze sčítají mnoho pozitiv, mezi které patří nejen nízké požadavky na objem rozpouštědla, ale i na další komponenty zahrnuté v těchto systémech, např. činidla a buňky. Další výhody těchto mikrofluidních systémů jsou nízké náklady spojené s nízkou spotřebou energie, snadná přenositelnost a ovladatelnost zařízení, krátké reakční časy, univerzální design, ale také možnosti pro souběžný provoz a pro integraci s dalšími miniaturizovanými zařízeními. [17]

Různé biologické postupy a testy využívají miniaturních systémů, kdy velmi malé objemy rozpouštědla, činidla a vzorku se pohybují pomocí mikrokanálů vložených do čipu. Mezi takové postupy a testy můžeme řadit např. imunologické a enzymatické testy, techniky typu elektroforézy, sekvencování či separace DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR), počítání a kolonizace buněk. [18, 19, 20]

2.1.1 Čipy z PDMS

PDMS neboli polydimethylsiloxan je organokřemičitanový elastomer, který vyniká svými neobvyklými reologickými vlastnostmi. Proto je to také jeden z materiálů, který se používá pro výrobu mikrofluidních čipů. PDMS se řadí mezi nejrozšířenější organické polymery obsahující křemík. Obecně se tyto sloučeniny nazývají silikony. [21, 22, 23]

Tento elastomer čítá mnoho výhod. Je inertní, flexibilní, netoxický, nehořlavý, levný a transparentní až do 230 nm, což je výhodné pro použití optických metod detekce [17]. Mezi jeho další důležité vlastnosti patří fakt, že kromě elasticity má velmi užitečné vlastnosti pro měkkou litografii. Dostí velkou výhodou je, že povrch PDMS má nízkou mezifázovou volnou energii, která činí asi 21,6 dyn/cm, s čímž souvisí i dobrá chemická stabilita, ovšem nevýhodou následně může být, že většina molekul nebo polymerů, které jsou vzorované nebo lisované, nepřilnou nevratně k povrchu PDMS nebo s povrchem dokonce reagují. Další výhodou u PDMS je, že příliš nebotná s vlhkostí, a tedy není hygroskopický. Zároveň membrány vyrobené z tohoto materiálu povolují snadný průchod plynům. Tento elastomer se vyznačuje stabilitou až do teploty 186 °C. Vytvarované prepolymeru lze vytvářet buď tepelně, nebo UV zesíťováním (zejména transparentní prepolymeru). Díky izotropii a homogenitě mohou být formy vyrobené z tohoto elastomeru mechanicky deformované na povrchu za účelem vytvoření nejrůznějších vzorů a reliéfních struktur. [21, 22, 23]

Pro použití elastomeru PDMS v různých oborech je možno měnit jeho vlastnosti. Toho lze docílit např. modifikací pre-polymerů. Dalším způsobem je upravení povrchu pomocí plazmy a následnou tvorbou siloxanů, nebo vhodnými interferenčními interakcemi s materiály, jež samy o sobě mají širokou škálu mezifázových volných energií. [24, 25]

2.1.2 Čipy z křemíku

Jako první volba pro výrobu analytických mikrofluidních systémů byl křemík, což vycházelo z výzkumu mikroelektroniky, kde se používají křemíkové plotny o vysoké kvalitě a čistotě. Jelikož je čistý křemík také polovodič, je nevhodný pro elektroforetické separace. Zároveň, stejně jako u skla, nejsou čipy z křemíku vhodné k vytváření složitých struktur kanálů. Ovšem oxid křemičitý díky svým vynikajícím elektrickým vlastnostem je využíván ve vysokonapěťových aplikacích. Takové elektroforetické mikročipy však vyžadují vyložení pouze jednoduché struktury kanálů. Nejčastější metoda výroby

takových čipů je fotolitografie. Zejména křemíkové mikročipy jsou však vyžadovány pro aplikace zahrnující detekci pomocí ultrafialové adsorpce, protože sklo pohlcuje UV záření. [26, 27]

2.1.3 Čipy ze skla

Jelikož v porovnání se sklem je čistý křemík je mnohem dražší, tak se stalo sklo jasnou volbou pro výrobu mikrofluidních čipů. Pro výrobu čipů bylo použito mnoho druhů skla, např. borosilikátové sklo, sodnovápenaté sklo, Pyrex sklo aj. Výhodou je, že v závislosti na pH můžeme ovlivnit povrchový náboj skla, což se v mikrofluidice využívá např. pro elektroosmotické pumpy. Tento materiál má i svoje nevýhody, jako je křehkost materiálu, nelze jej používat v alkalickém prostředí (naleptávání povrchu) nebo taky nákladná výroba. I tak jsou však stále často využívány v mikrofluidice, i když je do značné míry nahradily polymery. [27, 28]

2.2 Vybrané typy detekce

2.2.1 Optické detekce

Optické metody detekce se řadí mezi instrumentální metody, kdy dochází k interakci mezi analyzovanou látkou a zářením. Při této interakci mohou molekuly, atomy či ionty podléhat několika změnám. Buď při absorpci energie ze záření tyto částice přecházejí z kvantově nižších energetických stavů do vyšších nebo naopak vyzařují energii odpovídající přechodu z vyšších energetických hladin do nižších. Tyto metody se nazývají jako spektrální metody. Mohou taky podléhat jiným změnám při interakci se zářením, jako je např. změna směru, optické otáčivosti záření nebo změna rychlosti. Tak se označují jako nespektrální metody, jelikož nedochází k výměně energie mezi látkou a zářením. Podle těchto interakcí můžeme rozdělit spektrální metody na:

1. **Absorpční metody** – dělí se podle toho, zda absorbují energii záření atomy či molekuly a z jaké oblasti záření tuto energii absorbují.
 - a) *Infračervená spektrofotometrie* – absorpce molekulami, které přechází z nižších vibračně -rotačních stavů do vyšších.
 - b) *Spektrofotometrie v UV a VIS oblasti* – absorpce molekulami, které přechází z nižších elektronových stavů do vyšších.

- c) *Atomová absorpční spektrofotometrie* – absorpce atomy, které přechází z nižších elektronových stavů do vyšších.
2. **Emisní metody**– dělí se podle toho, jakým způsobem se vyvolává emise a zda se zářením interagují atomy či molekuly.
- a) *Emisní spektrální analýza* – využití termické excitace, kdy dochází k interakci atomů, jejichž elektrony přechází z vyšší energetické hladiny do nižší.
- b) *Rentgenová spektrální analýza* – využití proudu elektronů k excitaci atomů, kdy přechází elektron z vyšší energetické hladiny na místo jiného elektron, který byl vyražen v nižší energetické hladině atomu.
- c) *Atomová fluorescenční analýza* – k excitaci dochází elektromagnetickým vlněním, které pohlcuje atom, a tak přechází elektron z vyšší energetické hladiny do nižší.
- d) *Luminiscenční analýza* – opět dochází k excitaci pomocí elektromagnetického vlnění, ovšem k pohlcení dochází molekulou a jak tomu bylo u předchozí metody, dochází k přechodu elektronu z vyšší hladiny na nižší energetickou hladinu. [29, 30]

U nespektrálních metody máme několik druhů měření, kdy záleží, jaký je důsledek interakce vzorku se zářením. Příklady nespektrálních metod jsou:

- 1) *Polarimetrie* – tato metoda je založena na měření úhlu stočení roviny polarizovaného světla u látek, které jsou tzv. opticky aktivní.
- 2) *Refraktometrie* – díky změně směru a rychlosti záření se měří index lomu.
- 3) *Turbidimetrie* – měří se záření prošlé vzorkem, jenž je ochuzeno o rozptýlenou složku záření. Použití je pro roztoky suspenzí a koloidní roztoky ve vysokých koncentracích rozptýlených částic.
- 4) *Nefelometrie* – měří se záření rozptýlené v kolmém směru (nejčastěji) vůči vstupujícímu paprsku. Použití je pro roztoky suspenzí a koloidní roztoky v nižších koncentracích rozptýlených částic. [29, 30]

Bližší bude v následujících odstavcích přiblížena ze spektrálních absorpčních metod infračervená detekce a detekce pomocí Ramanovy spektroskopie, ze spektrálních emisních metod fluorescenční detekce a z nespektrálních metod detekce pomocí indexu lomu neboli refraktometrie. Speciální příkladem optických metod je kolorimetrie, kdy jako detektor nám slouží oči (vizuální kolorimetrie) nebo přístroj tzv. kolorimetr (fotokolorimetrie) [31].

U většiny z těchto optických metod bude uveden příklad, kdy jsou tyto typy detekce použity pro mikrofluidní zařízení. Existují i další typy detekce, např. UV/VIS spektrofotometrie, další typy chemiluminiscence, plazmová emisní detekce aj., které lze také použít ve spojení s mikrofluidními čipy. [32]

Kolorimetrie

Jedná se o optickou metodu, při které se porovnává roztok neznámé koncentrace, který má určitou intenzitu zbarvení, s roztokem stejné látky, jejíž koncentraci známe. Jelikož je intenzita barevnosti, která je charakteristická pro danou látku, závislá na koncentraci v roztoku, nejčastěji se vytváří kalibrační řady. S takovou řadou se pak roztok o neznámé koncentraci porovnává. Rozlišujeme dva typy kolorimetrie podle měření světelné pohltivosti:

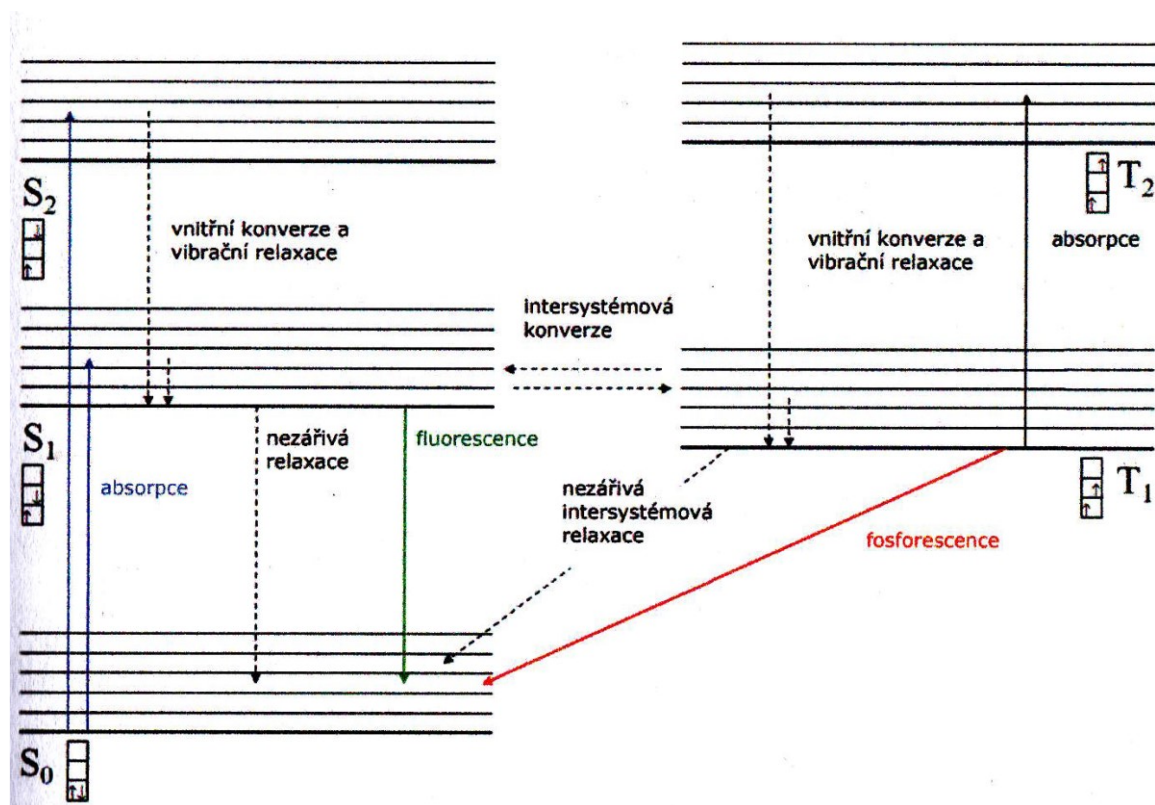
- 1) Vizuální kolorimetrie – postupy, díky kterým se pomocí zraku zjišťuje rovnost světelných hodnot.
- 2) Fyzikální kolorimetrie (fotokolorimetrie) – postupy, kdy se měří na kolorimetru při dané vlnové délce množství světla procházející vzorkem. [31, 33, 34]

Fluorescenční detekce

Když molekula absorbuje energii záření ve formě fotonu z UV/VIS oblasti spektra, dostává se do excitovaného stavu. Jestliže se při návratu do základního stavu zbaví přebytečné energie tím, že vyzáří jiný foton, jedná se o (foto)luminiscenci. Tyto látky pak nazýváme luminofory. Vyzářený foton má menší energii (tzn. větší vlnovou délku) oproti absorbovanému fotonu, který způsobil excitaci. Ke ztrátě rovnající je rozdílu těchto energií došlo díky různým relaxačním procesům, když byla molekula v excitovaném stavu. Jakmile se vrací molekula do základního stavu fotoluminiscencí, můžeme ji rozdělit na dva typy. [30, 35]

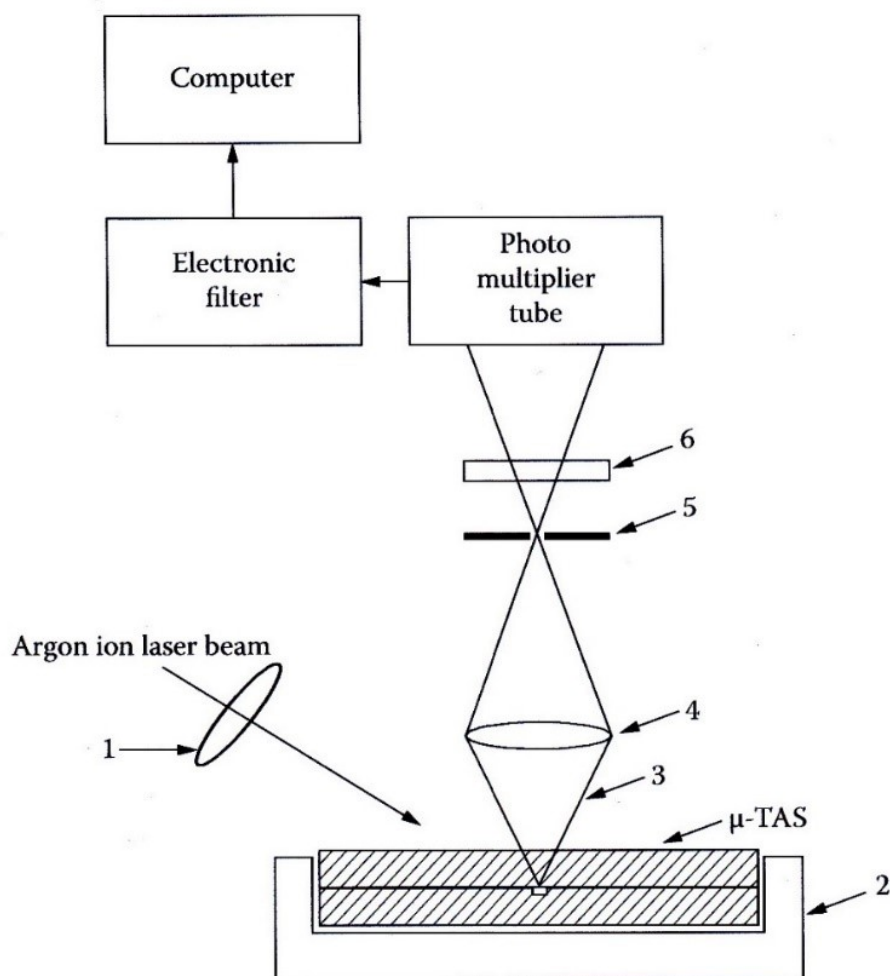
Prvním typem, jak už název kapitoly napovídá, je fluorescence. Tyto látky (fluorofory) přechází zářivým přechodem z excitovaného stavu do základního stavu v rámci 10^{-10} až 10^{-7} sekund. Tato krátká doba je způsobena tím, že zářivý přechod je pouze mezi singletními elektronovými stavy. Oproti druhému typu – fosforescenci, kdy se molekula dostává relaxací do tzv. tripletového (metastabilního) stavu, a teda při návratu do základního stavu

se mění nejen elektronový, ale i spinový stav molekuly (málo pravděpodobné). Díky tomu dohasínání luminiscence trvá delší dobu – déle než 10^{-6} sekund. Tyto procesy jsou schematicky znázorněny na Jablonského diagramu (Obr. 4). [30, 35]



Obr. 4: Jablonského diagram [35]

Jako příklad lze uvést fluorescenční detekci v jednobanálním mikrofluidním čipu. Pro takhle miniaturizovaná zařízení se nejčastěji používá k indukci fluorescence laser (LIF) jak je znázorněno na Obr. 5. Zde bylo pro excitaci použito argonové laserové světlo z důvodu zvýšení měřené fluorescenční emise. Pro snížení množství excitačního světla vstupujícího do fotodetektoru se obvykle používají pásmové emisní filtry (Obr. 5–6). Laserový paprsek se zafokusuje pomocí čočky (Obr. 5–1) na dané místo v separačním kanále čipu, který drží na místě držák Plexiglas (Obr. 5–2). Fluorescenční emise (Obr. 5–3) byla snímána mikroskopickým objektivem (Obr. 5–4), následně zaostřena na prostorový filtr (Obr. 5–5) a emisní filtr. Detekce byla provedena pomocí fotonásobiče. [32]



Obr. 5: Schématický náčrt fluorescenčního detekčního systému LIT [32]

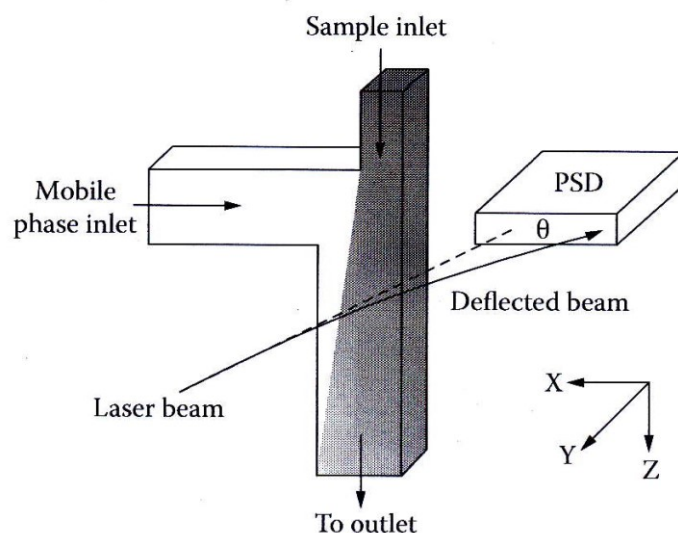
Detekce pomocí indexu lomu

Relativní index lomu značící se n_{21} se vypočítá jako poměr rychlostí světla, kdy prochází paprsek z jedné látky do druhé. Pokud je tento poměr počítán z rychlosti světla ve vakuu (označující se jako c) ku rychlosti světla v určitém hmotném prostředí, nazývá se tento poměr *absolutní index lomu* N . Jelikož je ve vzduchu rychlost světla blízká rychlosti ve vakuu, vztahuje se index lomu na vzduch. Značí se tedy jednoduše *index lomu* n . Díky tomu že, rychlost vzduchu oproti ostatním prostředím je větší, jsou indexy lomu těchto opticky hustších prostředích větší než 1. Jednoduše lze říci, že index lomu je fyzikální konstanta, kterou když spojíme s dalšími daty nám poslouží nejen k identifikaci látky, ale také k posouzení čistoty. [36]

Měření založené na indexu lomu se dají rozlišit dvě metody. První je refraktometrie, která se používá zejména pro měření kapalných případně pevných látek. Index lomu se měří přímo. Druhá metoda je interferometrie, která je určena nejčastěji pro plyny, ale také někdy pro kapaliny. Neměří se přímo index lomu, ale vyhodnocuje se rozdíl indexu lomu mezi látkou měřenou a látkou srovnávací. Tento způsob je mnohem přesnější a dovoluje změřit i velmi malé rozdíly, které jsou mezi indexem lomu pro vzorek a pro standard. Nevýhodou je však, že tato metoda je komplikovanější. [36]

Navržený detektor indexu lomu funguje na principu posunu interference vzorku. Při průchodu kolimovaného laserového paprsku holografickým optickým prvkem se tento paprsek dělí na dva souvislé paprsky. První paprsek tzv. sonda je nasměrován kanálkem. Druhý paprsek tzv. referenční neboli srovnávací paprsek prochází pouze skleněným substrátem a slouží pouze jako kontrola. Tyto dva paprsky se v dalekém poli rozcházejí a vzájemně interferují. Tím vzniká interference vzorku, které lze detekovat fotodiodovým polem. [37]

Příkladem použití této detekce může se zmínit změnu gradientu indexu lomu (RIG). RIG mezi sousedními laminárními proudy se používá jako snímač molekulové hmotnosti, jak je znázorněno na Obr. 6. Měří se gradientu indexu lomu (RIG) vychýlením diodového laserového paprsku na jednorozměrném detektoru citlivým na polohu (PSD). Proud analytu (tmavý proud) proudí ze vzorkovacího kanálu a potkává se s proudem mobilní fáze (světlý proud). Tyto dva proudy proudí společně dolů analytickým kanálem a zároveň dochází k difuzi analytu do proudu mobilní fáze. Vytváří se tak koncentrační gradient. K tomuto míchání dochází v čipu PDMS. Laserový paprsek dopadá na strukturu kanálku v tzv. detekčním době, který je kolmý jak na směr proudění, tak na koncentrační gradient. Laserový paprsek je vychýlen z výchozí pozice (čárkovaná čára) pomocí RIG mezi proudy vzorku a mobilní fáze. Úhel vychýlení neboli odměřovací signál θ se měří. Úhel vychýlení je detekován. Poměr PSD signálů získaných ve dvou detekčních bodech je snadno korelován s koeficientem difuze analytu, a tedy i molekulovou hmotností analytu pro danou třídu sloučenin. [32]



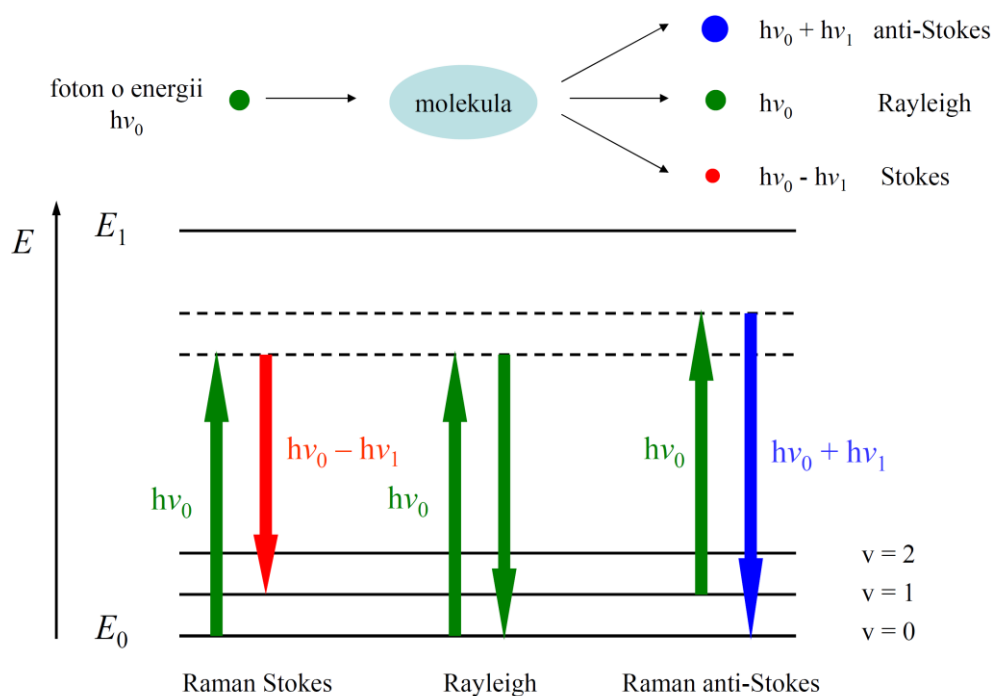
Obr. 6: Náskres měření gradientu indexu lomu (RIG) [32]

Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie se řadí mezi metody z oblasti vibrační molekulové spektroskopie, kdy základem právě této metody je neelastický optický rozptyl záření. Princip metody spočívá v ozáření měřeného vzorku zářením z laserového zdroje. Tohle záření musí být monochromatické a vlnová délka je buď z oblasti viditelného světla nebo z oblasti blízké infračervené oblasti. Odezvy vzorku, které se měří jsou nejčastěji měnící se vlnové délky, které lze přepočítávat na kmitočty a vlnočty, a rozptýlené záření. Díky těmto veličinám můžeme rozlišovat rozptyly:

- *Rayleighův* – nemění se vlnočet $\tilde{\nu}_0$ rozptýleného záření
- *Ramanův* – mění se vlnočet $\tilde{\nu}_0$, pokud je nižší, znamená to delší vlnovou délku a mluví se tedy o čarách se Stokesově oblasti. Pokud je to naopak, tak se jedná o čáry ležící v anti-Stokesově oblasti.

Díky těmto čarám se mohou přiřazovat jednotlivé vibrace v molekulách daného vzorku. Rozdíly mezi jednotlivými typy rozptylů lze vidět na Obr. 7. [38, 39]



Obr. 7: Ramanův a Rayleighův rozptyl [38]

Ramanův rozptyl lze také aplikovat pro detekci mikročipů. Vyzkoušena byla již detekce vody či určitých herbicidů na skleněných čípech. Ramanova rozptylu s povrchově zvýšenou rezonancí (SERRS) bylo také dosaženo použitím stříbrných koloidních agregátů produkovaných přímo v čipu. Stejný postup byl použit k detekci azobarviva 5-(2'-methyl-3',5'-dinitrofenylazo) chinolin-8-ol. Tohle azobarvivo je derivátem výbušniny, známé pod názvem trinitrotoluen (TNT). Tímto způsobem bylo možné detekovat 10 μl obsahující 10^{-9} M barviva. [38, 40]

Infračervená detekce

Infračervená detekce je založena na měření a následném vyhodnocení absorpčních spekter molekul. Tyto molekuly absorbují záření, které má vlnovou délku mezi 800 nm a 100 μm , to odpovídá vlnočtu 12000 až 10 cm^{-1} . Díky absorpci záření se zvyšují vibrační a rotační stavy molekul. Energetický rozdíl mezi jednotlivými stavy, ať už vibračními nebo rotačními, jsou velmi malé v porovnání s elektronovými stavy. To znamená, že pro změnu vibračních a rotačních stavů postačí absorpce záření o nízké energii, a tedy o větších vlnových délkách (infračervené záření), než má např. záření ve viditelném spektru. [36]

Na mikročipu můžeme detekovat pomocí infračervené detekce např. toluen. Problémem může být to, že substrát, ze kterého musí být čip vyroben, nesmí být v infračerveném spektru viděn. Tuto podmínku na výrobu čipu splňuje fluorid vápenatý. Do čipu byly leptány mikrokanály pomocí nasyceného roztoku $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$ při laboratorní teplotě po dobu zhruba 24 hodin. Hloubka mikrokanálů se pohybovala od 18 μm , když byl leptací roztok míchán, do 8 μm při nehybné vrstvě leptacího roztoku. Ke slepení pak byl použit fotorezistní monomer jako lepící vrstva, která byla vytvrzena zahříváním na teplotu 135 °C po dobu 30 minut. [41, 42]

2.2.2 Elektrochemická detekce

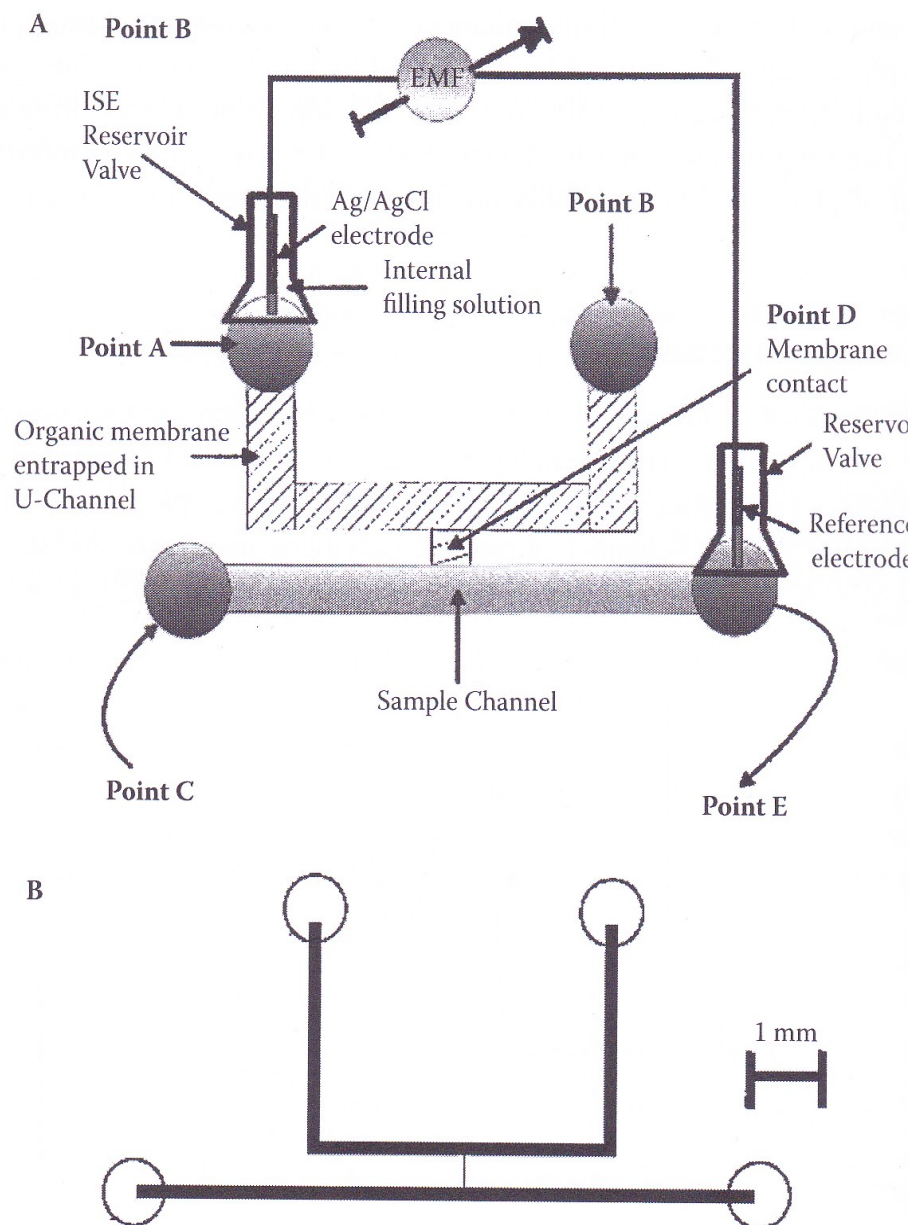
Elektrochemická detekce je další z důležitých typů detekce, která může být použita pro mikrofluidní systémy. Jak už z názvu vyplývá, měření je založeno na elektrochemických měřeních. Lze měřit buď napětí (potenciometrie), proud (amperometrie), elektrickou vodivost (konduktometrie), nebo také závislost proudu na napětí (voltametrie). Tyto typy detekcí jsou druhé nejpoužívanější vůbec. [29, 32]

Potenciometrická detekce

Potenciometrie patří mezi elektroanalytické metody, jejichž podstatou je elektrodová reakce probíhající na rozhraní elektroda-roztok, kdy se měří rovnovážné napětí galvanického článku ponořeného ve stanovovaném roztoku. Zároveň platí, že elektrický proud musí být prakticky nulový. Článek se skládá z měrné neboli indikační elektrody a srovnávací neboli referentní elektrody. Referentní elektroda má konstantní potenciál a rozdíl mezi potenciálem z referentní a indikační elektrody je rovnovážné napětí, což je míra koncentrace sledované látky. Při těchto podmínkách rozlišujeme, zda se jedná o potenciometrii (elektrodový potenciál je funkcí koncentrace stanovované látky) nebo o potenciometrickou titraci (elektrodový potenciál je funkcí objemu titračního činidla), kdy se vyhodnocuje bod ekvivalence. [29, 30]

Pro detekci na mikrofluidním čipu lze použít potenciometrickou detekci či detekci pomocí iontově selektivní elektrody (ISE). Příkladem můžeme uvést čip pro barnaté ionty, které byly detekovány pomocí ISE. Tento čip (Obr. 8) obsahuje dva kanály. První – rovný kanál obsahuje tekutý roztok vzorku barnatých iontů. Druhý kanál je ve tvaru U. Ten je vyplněn

polymerní membránou ionoforem pro baryum [*N, N, N', N'*-tetracyclohexylbis(*o*-phenylenoxyldiacetamid)]. Oba dva kanály jsou spojeny tak, aby se vzorek dostal do styku s polymerní membránou. Aby se zabránilo posunu potenciálu, zásobník A byl naplněn interním roztokem (0,1 M BaCl₂). Toto plnicí roztok obvykle u jiných typů miniaturizovaných ISE chybí. Doba odezvy na změny barnatých iontů je rychlá v řádu několika sekund. [43]



Obr. 8: ISE čip (A-schématický náčrt, B-měřítka diagramu) [32]

Pro potenciometrickou detekci dalších iontů jako jsou draselné nebo dusitanové, byly jejich ionofory zabudovány do optodové membrány na plastovém disku [44]. Optody pracují na stejném principu jako ISE, dokonce i membrána obsahuje stejné ionofory. Rozdíl je v tom, že se neměří změna potenciálu elektrody, ale změna fluorescence určitého barviva, které je v membráně obsaženo [45]. V jiném článku se mluví o použití tenké vrstvičky sulfidu měďnatého pro vytvoření ISE pro měď, kdy tato elektroda byla použita na čipu vytvořeného z kombinace křemíku a skla. [46]

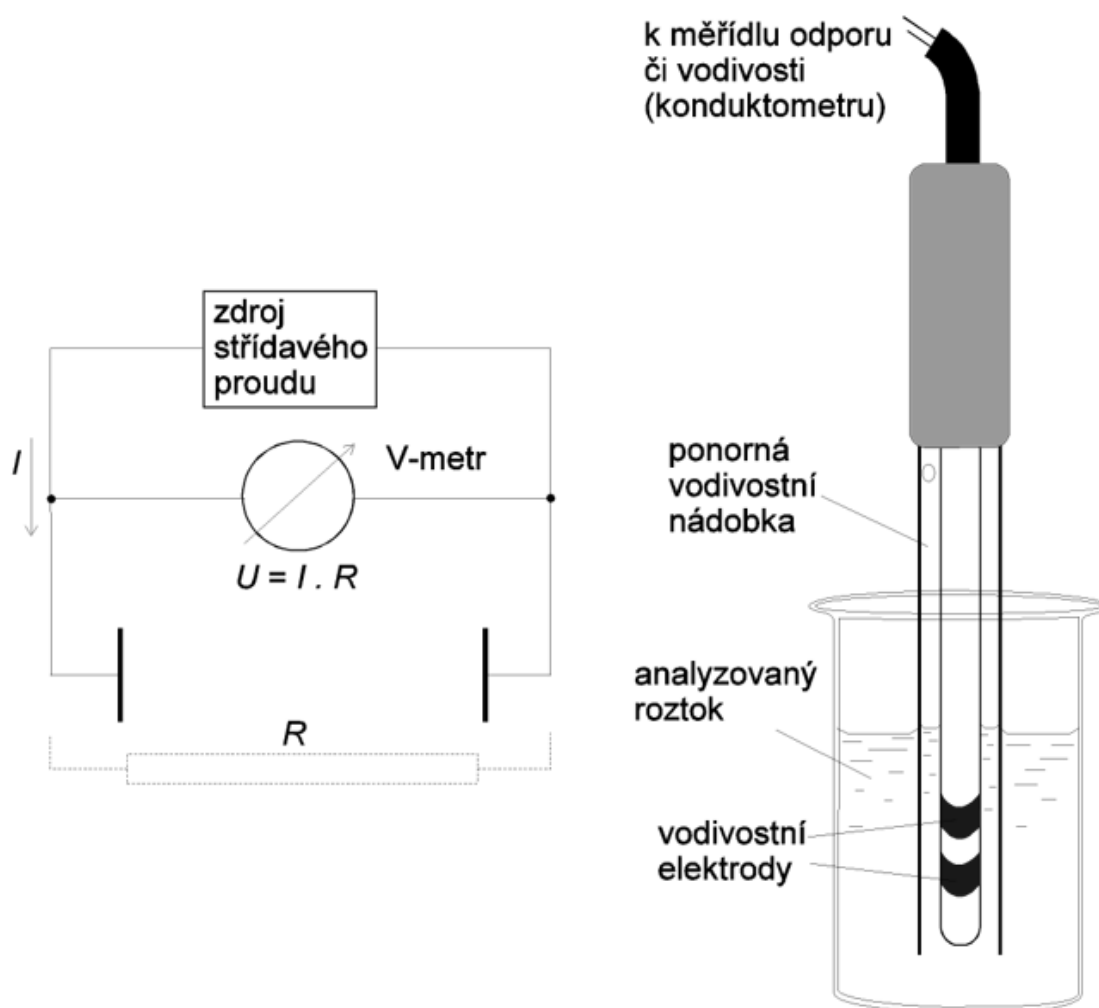
Konduktometrická detekce

Princip této metody, řadí se mezi nejstarší elektroanalytické metody založené na schopnosti daných roztoků elektrolytu elektrický proud, kdy se měří tato schopnost-vodivost (konduktance) analyzovaných roztoků elektrolytů v rozpouštědle či vodě. Podmínkou je, aby tyto rozpouštědla měla velkou relativní permitivitu. Zároveň neprobíhá žádný elektrochemický děj. Měření pak probíhá v sestavě dvou vodivých desek ponořených v měřeném roztoku. Na tyto desky je vloženo střídavé napětí a měří se elektrický proud (Obr. 9). Vodivost se pak vypočítá z Ohmova zákona podílem elektrického proudu a vloženého napětí. [29, 30, 47]

Tak jako u potenciometrie rozlišujeme, zda je jedná o přímou konduktometrii, nebo o konduktometrickou titraci. U přímé konduktometrie lze z naměřené vodivosti roztoku určit koncentraci stanovovaného elektrolytu, ovšem použití je dosti omezeno. Důvodem tohoto omezení je jen málo rozlišitelná vodivost iontů vyjma OH^- a H_3O^+ . Můžeme tedy říci, že vodivost je vlastností nespecifickou či aditivní. To nám určuje, že přímá konduktivita není vhodná na stanovování ve složitějších roztocích. Konduktometrie má však i svoje výhody a tím je to, že touto metodou lze stanovit velmi malé až přímo stopové množství elektrolytů přítomných ve vodě, čehož se využívá např. ke kontrole čistoty vody či jako ukazatel kvality destilované vody. [30, 47]

Konduktometrická titrace pracuje na principu měření změny vodivosti roztoku, který je titrován odměrným roztokem. Nutností je, aby docházelo před bodem ekvivalence nebo za bodem ekvivalence k výrazné změně vodivosti. Tuto podmínku splňují zejména titrace neutralizační, ale dále také např. srážecí či některé komplexotvorné titrace. Metodu nelze použít pro chelatometrické a redoxní titrace. Ve výsledku získáme konduktometrickou křivku, což je závislost měrné vodivosti či celkové vodivosti na objemu přidávaného

odměrného roztoku. Z této křivky lze pak získat bod ekvivalence průsečíkem dvou přímkových větví získaných z měření. Z průsečíku vyčteme spotřebu odměrného roztoku. [30, 47]



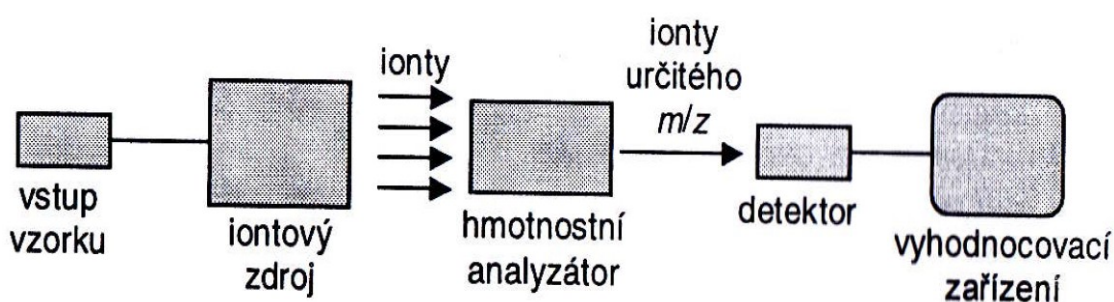
Obr. 9: Schéma měření vodivosti [47]

2.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Jedná se o separační techniku převádějící vzorek do plynné fáze v ionizované formě. Vzniklé ionty se následně dělí podle toho, jaká je hodnota jejich podílu hmotnosti ku náboji (m/z). Na počátku hmotnostní spektrometrie (MS) byl výzkum Thomsona. Ten studoval elektrické výboje za nízkého tlaku v plynech. Molekuly látky byly bombardovány elektrony, díky nimž vznikalo záření vytvořené kladně nabitými částicemi (ionty). Ionty

vznikající v daném prostoru přicházely do úzké trubice, kde byly urychlovány a následně procházely prostorem s magnetickým a elektrickým polem, které se paralelně prolínaly. Na fotografické desce vznikly série parabolických křivek vytvořené dopadajícími ionty. Každé křivce byla přiřazena jedna částice, která měla stejnou hodnotu hmotnosti ku náboji, lišila se ale různou rychlostí. Pro představu, kdybychom měli molekulu COCl_2 , získali bychom parabolické křivky, které odpovídají iontům O^+ , C^+ , CO^+ , Cl_2^+ a jako poslední COCl^+ . [30, 48]

Od té doby šel vývoj kupředu a hmotnostní spektrometrii dnes nalezneme téměř v každé laboratoři. Běžně je hmotnostní spektrometr rozdělen na oblasti vstupu vzorku, následuje iontový zdroj, hned za ním se vyskytuje hmotnostní analyzátor. Na konci se nachází detektor, který je propojený s vyhodnocovacím zařízením (Obr. 10). Detekce pomocí MS je ovlivněna nejen různými možnostmi ionizace ze styčné plochy, jako je např. ionizace pomocí elektrospreje či MALDI používané u mikrofluidních čipů, ale také volbou hmotnostních analyzátorů. Nejčastěji je ionizace vzorku způsobena nárazem rychle letících elektronů. Lze využít také chemickou ionizaci, kdy pomocí chemické reakce vznikají ionty. Hmotnostní analyzátoři mohou být např. jednoduchý kvadrupól, iontová past, trojitý kvadrupól atd. Při aplikaci na mikrofluidní čipy záleží, zda má čip pouze jednoduchý kanál nebo je tzv. multikanálový. Zároveň může být spojen s nejrůznějšími procesy zpracování vzorku jako je např. prekoncentrace nebo také separace. [30, 32, 48]



Obr. 10: Schématický náčrt hmotnostního spektrometru [30]

Hmotnostní spektrometrie poskytuje přímou, vysoce specifickou a přesnou charakterizaci a kvantifikaci požadovaných analytů. Můžeme tedy říct, že se jedná o nejvýkonnější vysokorychlostní a vysoce výkonnou detekční techniku vyvinutou doposud pro analýzu vzorku komplexního biologického původu a díky tomu získává stále větší význam jako

metoda detekce mikrofluidních čipů. Nicméně pokud bychom porovnali MS s optickými a elektrochemickými metodami, které mohou být integrovány do čipů, je ve spojování mikrofluidik s hmotnostním spektrometrem hlavním problémem konstrukce emitru. V návaznosti na úspěšnost propojení hmotnostní spektrometrie s kapilární elektroforézou (CE) se zvýšil zájem o spojení MS s mikrofluidními systémy. Ionizace elektrosprejem zůstává nejoblíbenějším módem pro propojení detekce s mikrofluidními systémy, jako je tomu v případě HPLC a CE. Několik specializovaných výzkumných skupin úspěšně prokázalo propojení mikrofluidních kapilárních elektroforetických zařízení s hmotnostní spektrometrií. [27, 49, 50]

Ionizace elektrosprejem - ESI

Jako příklad pro ionizaci elektrosprejem může uvést výzkum, kdy vědci použili na testování tetrabutylamoniumjodid jako modelovou sloučeninu. Ve článku je popsáno spojení mikrofluidního čip s hmotnostním spektrometrem, ve kterém byla jako analyzátor použita iontová past. Dodávání analytu přes mikrofluidní kanály bylo provedeno elektroosmoticky pomocí indukovaných tlaků. Elektrostatického rozprašování na konci kanálu bylo docíleno vložení potenciálu mezi mikročip a vodič, jenž byly odděleny mezerou velkou cca 3-5 mm od konce kanálu. [27, 51]

MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

Využití MALDI-TOF MS se silikonovým čipem popsala výzkumná skupina pod vedením vědce Little. Na čipu bylo vyleptáno 100 individuálních jamek pro analýzu syntetických oligonukleotidů a DNA diagnostických produktů. Nízkoanalytické podíly matrice a DNA se dávkovaly piezoelektrickou pipetou do jamek. Bodové mutace v alelách apolipoproteinu B, které jsou spojeny s abnormálním transportem cholesterolu a metabolismem, byly detekovány nadávkováním 5 nl polymerázové řetězové reakce (PCR) produktu do jamek a analýzou pomocí MALDI-TOF MS. Heterozygotní mutace v kodonu 3500 byla potvrzena přítomností druhého píku v mutantní alele ve srovnání k alele divokého typu. Mikrosatelitové genotypování bylo také prokázáno. Nejenže bylo možné identifikovat možné opakované jednotky díky prodloužení báze oligonukleotidů způsobem, který je srovnatelný s elektroforézou, ale také byla nalezena a ověřena mutace. [27, 52]

2.2.4 Ostatní typy detekce

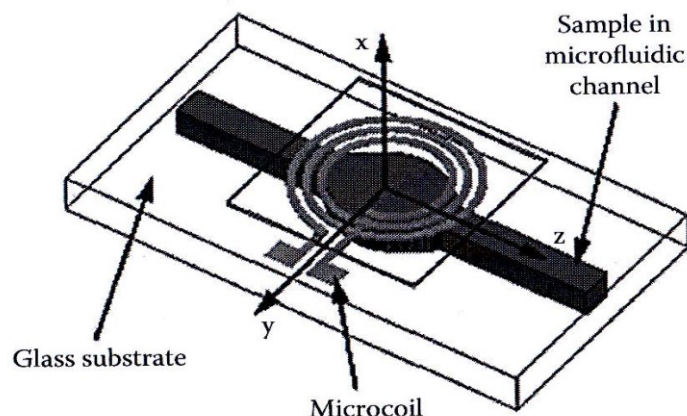
V předchozích kapitolách byly popsány nejtypičtější metody detekce, které se používají v souvislosti s detekcí na mikročipech. Existují však další typy metod, které se vymykají z tohoto členění, avšak mohou stejně tak dobře posloužit při detekci látek ve spojení s mikrofluidními systémy. Jmenovat můžeme např. detekci pomocí akustických vln, tepelnou detekci nebo nukleární magnetickou rezonanci, či využití chytrých telefonů. Poslední dvě jmenované metody jsou popsány níže v podkapitolách. [27]

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Princip této metody je založen na přechodu jádra atomů na vyšší energetické hladiny díky absorpci elektromagnetického záření. Toto záření musí mít vlnovou délku z oblasti krátkých rádiových vln, aby došlo k absorpci. Zároveň musí mít jádra atomů magnetický moment, aby se mohly ve vnějším magnetickém poli orientovat do poloh, kterým určité energetické hladiny odpovídají. [30, 53]

Pokud stejné atomy jsou v molekule vázány různým způsobem, můžeme určit tyto vazby díky tomu, že absorbují záření o různé frekvenci (kvalitativní údaj). Jelikož k absorpci přispívá každé jádro stejných atomů stejnou měrou, je možné v určité vazbě nebo skupině určit počet atomů, a to díky intenzitě absorbovaného záření (kvantitativní údaj). [30, 53]

Na obrázku (Obr. 11) je vidět schéma planární sonda, založena na základě mikro cívk, určená pro měření ^1H NMR spekter sacharózy v deuteriu. Sonda se skládá z více otáčkové elektrolytické planární mikro cívk integrované na skleněný substrát s vyleptanými mikrofluidními kanály pro zadržení vzorku. Cívka má typické rozměry 2 mm nebo méně, přičemž schopnost zadržování vzorku se pohybuje v rozmezí od několika nanolitřů do mikrolitřů v závislosti na velikosti cívk. Jako reference leží cívka v rovině yz se statickým magnetickým polem B_0 podél osy z. [32]



Obr. 11: Schéma mikrofluidního systému určeného k měření pomocí NMR [32]

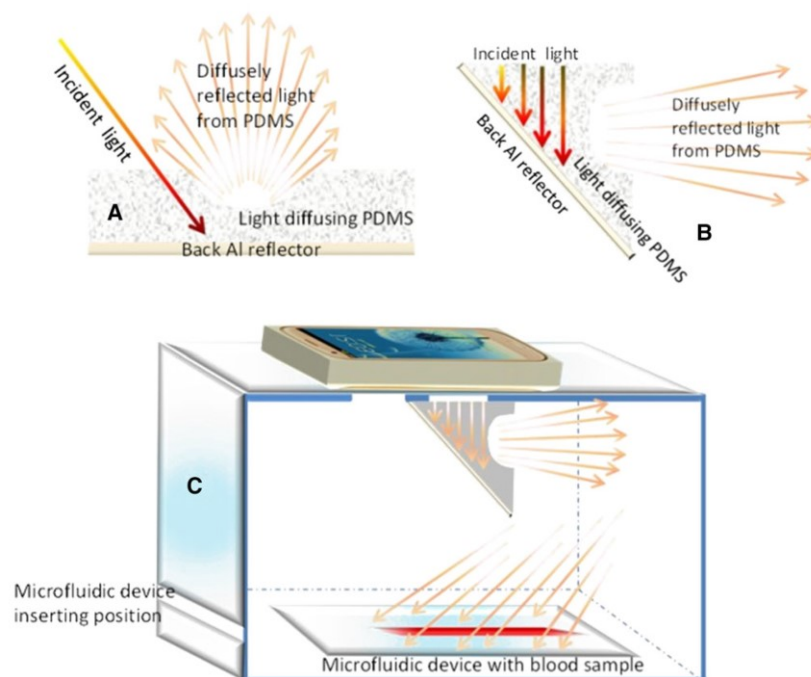
Vyhodnocení pomocí chytrých telefonů

Využití chytrých telefonů pro detekci a řízení mikrofluidních systémů se postupem času stává čím dál tím víc zajímavější. Výhodou tohoto spojení je, že může být použito v zemích třetího světa v souvislosti s péčí o pacienty, hlavně díky jejich rychlosti, dostupnosti, přenositelnosti, specifčnosti, citlivosti a uživatelsky přívětivou kontrolu výsledků. [54]

Jedná se o přenosná zařízení, které mají vestavěné fotoaparáty a interní mikroprocesory, jenž zpracovávají obraz. Telefony mohou poskytovat rychlé a přesné výsledky, díky tomu nejsou externí počítače potřeba. Konektivita chytrých telefonů navíc poskytuje možnost sdílet a poskytovat výsledky v reálném čase v případě potřeby, ať už ve zdravotnické diagnostice, monitorování životního prostředí, imunitestech nebo bezpečnosti potravin. Spojení chytrých telefonů a mikrofluidních systémů má určitě skvělou budoucnost při budování nízko nákladových a snadno ovladatelných systémů pro analýzu v terénu. [54]

Příkladem využití chytrých telefonů pro detekci lze uvést optickou platformu pro kolorimetrickou analýzu krevního hematokritu. Jak je vidět na Obr. 12, vyvinutá platforma je složena z bílého boxu, který je vyroben z PMMA, a světelného difuzoru z PDMS. Chytrý telefon se umístil na horní stranu bílého rámečku a mikrofluidní zařízení na spodní část. Princip difuze světla je znázorněno na Obr. 12–A. Efekt rozptylu Obr. 12–B a schématické znázornění celé vyvinuté platformy je znázorněno na Obr. 12–C. Snímky krve, která byla obsažena v mikrokanálech, byly pořízeny integrovanou kamerou smartphonu a analyzovány mobilní aplikací pro zpracování obrazu výpočtem relativního

GSV každého obrazového pixelu. Zkratka GSV znamená gray-scale-valuation, neboli vyhodnocení ve stupních šedé barvy, kdy se převádí barevné obrazy na stupně šedi. Hlavním důvodem, proč je zobrazování ve stupních šedi často používáno, je, že stupně šedi zjednodušují algoritmus a snižují požadavky na výpočet. [28, 54]



Obr. 12: Schéma zařízení pro kolorimetrickou analýzu krevního hematokritu pomocí chytrých telefonů [28, 54]

3 Toxikologie

Toxikologie je věda, využívající poznatků z biologie a chemie, aby popsala vlivy chemických látek na živé organismy a ekosystémy. Toxikologie se tedy částečně překrývá s farmakologií. Vlivy chemických látek mohou být pozitivní i negativní, avšak nejčastěji se zkoumají právě vlivy negativní. Obecně lze tedy říci, že toxikologie je věda o jedech. V širší rovině je jed chápán jako látka, která člověka poškozují, či dokonce zabíjí, ať už pomalu nebo rychle. Pro pojem jed se užívá několik synonym jako je škodlivina, noxa či xenobiotikum. Je tedy zřejmé, že je nutné se látkám s těmito účinky vyvarovat. Avšak již na začátku 16. století švýcarský astrolog, alchymista a lékař Paracelsus konstatoval, že jedy jsou všechny látky a pouze dávka určuje to, kdy látka přestává být jedem. [55, 56]

V toxikologii se zkoumá nejen jaký je mechanismus účinku různých škodlivých látek, ale zabývá se i analýzou těchto škodlivých látek, jejich prevencí i léčbou při jejich otravě. Toxikologii můžeme rozdělit na několik skupin neboli podoborů, a to zejména podle zaměření. Jednotlivé podobory se navzájem prolínají, a tak nelze přesně určit vymezit co přesně patří pod který podobor. Nejčastěji tyto podobory určuje škála nox, která je předmětem zájmu. [55, 56]

Obecná toxikologie se zaměřuje zejména na obecné poznatky, ale také na zákonitosti, teorie či dokonce souvislosti ohledně působení jedů na živé organismy. Zkoumá mechanismy, jakými se jedy dostávají do organismů, jak se metabolizují, ale také jak a v jaké formě jsou vylučovány.

Analytická toxikologie využívá metod analytické chemie ke zjišťování a stanovování množství toxických chemikálií, které jsou přítomny v tkáních, ať už živočišných nebo rostlinných, nebo přírodních materiálech, jako je voda či půda.

Experimentální toxikologie má hlavní úlohu stanovení toxických dávek na určité organismy a zároveň popsat nejen metabolismus toxické látky, ale také jak se projevuje otrava právě danou látkou u daného organismu. Tyto účinky toxinů se zkoumají z výsledků, které byly získány z pokusů na zvířatech provedených *in vivo* a *in vitro*.

Farmaceutická toxikologie má za úkol zkoumat, jaké jsou nežádoucí účinky jednotlivých léků.

Klinická toxikologie se nejčastěji zabývá akutními otravami, kdy se často analyzují otravy jak alkoholem, tak rozpouštědly či léčivy. Nutná je včasná diagnóza otrav a její následná léčba.

Forezní (soudní) toxikologie hraje důležitou roli často také při policejním vyšetřování, kdy dochází ke zkoumání tělesných vzorků po úmrtí člověka a hledání příčin úmrtí.

Ekotoxikologie mapuje působení látek, které jsou škodlivé pro přírodu a ekosystémy. Nejen že zkoumá pohyb různých kontaminantů v přírodě, ale také se zabývá prevencí a eliminací těchto škodlivých látek z životního prostředí. [55, 56]

Dalším členěním toxikologie můžou být obory jako např. vojenská toxikologie, potravinářská, epidemiologická, predikční, veterinární toxikologie, neurotoxikologie a další. Zejména v klinické a forezní toxikologii se využívá postupů systematické analytické toxikologie (STA). Při STA jsou analytické postupy logicky řazeny tak, aby že

pomocí prvních dílčích výsledků se volí následující postupy analýzy. Nutností je umět interpretovat získané výsledky a znát nejen různé xenobiotika, ale i jejich projevy ale i jejich metabolismus. Řešením STA je vyhledání a identifikace původně neznámé noxy potencionálně obsažené v biologickém vzorku jak už v původní formě, tak i třeba ve formě metabolitu. [55, 56]

Klinické a forenzní toxikologii se trochu více věnují následující podkapitoly, jelikož právě tyto obory také spadají pod moduly Farmaceutická analýza a Analytická chemie ve forenzních vědách, které souvisí s touto diplomovou prací.

3.1 Klinická toxikologie

V klinické toxikologii se vyšetřují nejen vzorky lidí, u kterých se předpokládá, že požil nějaký jed. Vyšetřují se také vzorky u lidí, u kterých se zjišťuje, jestli dodržují režim terapie nebo např. při kontrolách drogové abstinence. V takových případech je odběr materiálu zúžen jen např. na moč nebo krev. [55, 56, 57]

Pokud je podezření, že pacient byl intoxikován ať už úmyslně nebo neúmyslně, je potřeba udělat chemicko-toxikologické vyšetření, které je považováno jako jediný objektivní výsledek. Ani taková analýza však není zrovna jednoduchým úkolem. Tím, že je velice obtížné diagnostikovat otravu, nejčastěji se diagnóza opírá o anamnestické údaje. Ty však nebývají příliš spolehlivé, protože příznaky otravy nebývají specifické, dokonce mohou být zkombinované různé noxy. Nutností je tedy zjistit, nejen jaká látka otravu způsobila, ale také jaká byl příčina této otravy. Poté je největší pozornost věnována léčbě takových otrav. [55, 56, 57]

Pro dokázání nebo vyvrácení otravy u živých lidí jsou odebírány biologické vzorky jako žaludeční obsah, moč a krev. Neméně důležité jsou i tkáně, ale ty nejsou moc časté. U vzorků je nutné dodržovat správný odběr, ale také uchovávání a předúprava vzorku před samotnou analýzou. Tělní tekutiny jsou odebírány do chemicky inertních a čistých nádob určených právě pro daný vzorek. K popsání vzorku je přiložena žádanka o toxikologické vyšetření, které musí obsahovat nezbytné údaje, které mohou napomoci ke správnému nasměrování vyšetření. Žádanka obsahuje informace jako anamnestické údaje, doba odběru vzorku, léčiva, které pacient užívá, klinické příznaky, ale také např. jaká byla použita dezinfekce při odběru vzorku. [16, 55, 56, 58]

3.2 Forenzní toxikologie

Historie forenzní toxikologie sahá do 18. století. Již tenkrát Joseph Plenik prohlásil, že pro dokázání otravy musí být v orgánech dotyčného detekován a identifikován jed. Až roku 1813 bylo publikováno první celistvé dílo zabývající se jedy a soudní medicínou, jehož autorem byl Mathieu Orfila. Dalším pokrokem byl vyvinutý test roku 1836, který v tkáních dokazoval přítomnost arsenu, za což se zapřičinil James M. Marsh. Ale až v roce 1918 v New Yorku teprve vznikla první svého druhu Lékařská vyšetřovatelská kancelář a toxikologická laboratoř. [57, 59]

Forenzní věda (tedy také forenzní toxikologie) se vztahuje ke vědě, jenž je aplikována na právo, včetně vyšetřování trestných činů. Tyto výsledky jsou pak prezentovány jako důkazy u soudu. Forenzní toxikologie spadá pod forenzní chemii, což je jedna z disciplín forenzních věd. Jako další forenzní vědy můžeme jmenovat např. balistiku, daktyloskopii, forenzní antropologii, forenzní medicínu, forenzní psychologii, forenzní genetiku. Forenzní chemie se považuje za aplikaci analytické chemie (analýzy sloučenin a prvků) v právních záležitostech. Forenzní chemici mají za úkol analyzovat vzorky, které mají být použity jako důkazní materiál, z nichž musí vyvodit vhodné a přesné závěry. [56, 57, 60]

Předmětem zájmu forenzní toxikologie je vyhledávání noxy, jenž většinou není známa, její identifikace a kvantifikace. Poté mohou být vysvětleny toxikologické účinky případně příčina smrti. Kromě identifikace látek, které způsobují smrt nebo poranění jak u lidí či zvířat, jsou další aktivity forenzní toxikologie testování moči na užití léčiv, pracovní nemoci, svědectví v soudní síni, ale také konzultace týkající se otrav. [57, 60]

Rozdíl mezi klinickou toxikologií a forenzní toxikologií není v metodologii přístupu a zásad. Ty mohou být stejné, ovšem ne všechny klinické toxikologické laboratoře jsou způsobilé vykonávat funkci pro forenzní toxikologii. Stanovovat látky v biologickém materiálu, které mají být použity pro právní účely, mohou pouze vybrané toxikologické laboratoře. Jejich seznam lze najít ve Věstníku MZ ČR 2012, část 9. Zde jsou také upraveny základní metodologické postupy. [61]

4 Psychotropní a omamné látky

Jsou to převážně xenobiotika, ať už syntetizovaná, nebo přírodního původu, které vyvolávají fyziologické změny organismu. Drtivá většina působí na receptory případně na iontové kanálky, kde v důsledku ovlivnění dochází ke kognitivně-behaviorálním změnám chování. Ve většině případů vyvolávají závislost na lécích - adikci, která je vysvětlena zvýšeným počtem receptorů. Pokud mluvíme o adikci, mluvíme v podstatě o schopnosti xenobiotik způsobovat v lidském organismu fyziologické změny, které jsou nejčastěji spojené se změnou počtu receptorů nebo pozměnění metabolických cest látek. Adikce bývá psychického nebo fyzického rázu nebo kombinací obou. [62]

Co přesně omamné a psychotropní látky jsou, definuje zákon č. 167/1998 Sb. a novely č. 106/2011 a 273/2013, které obsahují seznamy návykových látek a jejich klasifikaci, jenž vychází zejména z mezinárodních úmluv. V těchto seznamech jsou přesně vymezeny a definovány chemické látky, přírodní látky či směsi mající psychoaktivní účinky. Nakládání s nimi je přísně regulováno výše psaným zákonem. [61]

Návykové látky můžeme rozdělit několika způsoby. Nejčastěji se rozdělují podle toho, jakou vyvolávají adikci. Buď se dělí na vysoce adiktivní látky, což jsou látky schopny vyvolat závislost dokonce i po první dávce, např. heroin, nebo méně návykové, kam se řadí třeba THC (cannabinoidy). Xenobiotika lze rozdělit i podle dostupnosti. Ty, které jsou dostupné k legálnímu prodeji, jsou pouze na předpis od lékaře. Další dělení je podle nejrůznějších příznaků. Příznakem lze označit i změnu, jak člověk vnímá svět. Tento příklad patří mezi psychologické příznaky. Dalším rozdělením může být např. těkavé omamné a psychotropní látky (OPL), cannabinoidy, psychostimulanty, opioidy a hypnotika. Zástupce těchto jednotlivých skupin jsou popsány v následujícím textu. [61, 62]

4.1 Těkavé OPL

Jako významné zástupce těkavých OPL v toxikologii můžeme jmenovat uhlovodíky alifatické, aromatické a halogenované, ethery, estery či dosti významné alkoholy. Pokud se jedná o otravy těkavými OPL, nejčastěji se vyskytují otravy ethanolem a methanolem. Jako další příčiny otravy mohou být další produkty kvašení různých druhů ovoce,

např. isoamylalkohol, *n*-propanol nebo *n*-butanol. Z toxikologického hlediska jsou významné také dioly (ethylenglykol, toluen či 1,3-propandiol). [61]

4.2 Opioidy

Široká skupina těchto látek je odvozena od základní látky – morfinu. Je to nejvíce zastoupený alkaloid v opiu, což je šťáva latexové konzistence z nezralých makovic máku setého. Opium je zlatavá až nahnědlá amorfni hmota získaná zaschnutím šťavy máku a následným přečištěním pomocí macerace ve vodě. Opioidy se používají zejména k tlumení bolesti, avšak jejich některé jejich deriváty vykazují i antitusické účinky. Mohou se dělit na přírodní opiáty (morfin, kodein), semisyntetické deriváty (heroin, dihydrokodein, normorfin, oxykodon) nebo přímo syntetické opioidy (methadon, pentazocin, meperidin, tramadol). U těchto látek se rychle rozvíjí závislost a díky rychle vznikající toleranci uživatelé zvyšují dávky k navození stejných účinků. Jelikož je aplikace převážně injekční, dochází často k předávkování. [61, 63]

4.3 Cannabinoidy

Tyto látky nejčastěji najdeme v rostlinách z čeledi konopovitých, rodu *Cannabis*. Jejich účinků se využívalo již zhruba 3 tisíce let př.n.l., kdy v čínské medicíně se používali zejména pro léčbu malárie nebo revmatickým bolestem aj. V indii bylo konopí dokonce zařazeno mezi posvátné byliny. Zmínka o konopí je nesčetně mnoho už z dávných dob a různých koutů světa. Avšak zneužívání se masově rozmohlo až ve 20. století, a tak bylo užívání omezeno na lékařské účely či výzkum, případně úplně zakázáno. Od roku 2015 byly v České republice stanoveny podmínky pro léčebné používání, předepisování, přípravu, distribuci a výdej nejrůznějších léčivých přípravků, které obsahují konopí. [61, 64]

4.4 Hypnotika

Hypnotické účinky nejsou jediné účinky, které tato skupina léčiv vyazuje. V závislosti na struktuře mají některé látky i jiné účinky, např. antikonvulzivní, sedativní, anxiolytické nebo myorelaxační. Dnes hypnotika podle struktury můžeme zařadit do tří

nejvýznamnějších skupin. Jako první se na trhu léčivých přípravků objevily barbituráty, a to už v roce 1903 (Veronal). Byť tato skupina léků byla dlouhou dobu nenahraditelná, u pacientů se objevovaly sebevražedné tendence, závislost a dost často také docházelo k zneužívání těchto léků. Jelikož bylo dosti snadné se barbituráty předávkovat, po uvedení na trh prvních benzodiazepinů pokleslo jejich předepisování. Až v 70. letech minulého století benzodiazepiny téměř nahradily barbituráty užívané pro hypnotické a sedativní účinky. I když tato skupina léčiv má vyšší terapeutický index než předešlá, i tak je zde časté zneužívání léčiv a potenciál vzniku závislosti dosti vysoký. To je další důvod, proč jsou benzodiazepiny a barbituráty nejčastější volbou pro úmyslné předávkování. [61, 65]

Třetí skupinou jsou Z-drugs, řadí se mezi hypnotika tzv. III. generace. Ty se řadí mezi nejmodernější hypnotika, jelikož mají vysoký terapeutický index, nízký potenciál vzniku závislosti a tolerance. Dokonce lze říci, že nejvíce zachovávají spánkovou architekturu a mají poměrně krátkou dobu působení. I tak by mělo být jejich podávání omezeno nejdéle na dobu 6 týdnů, jelikož s masovým užíváním v posledních letech jsou čím dál častěji popisovány nežádoucí účinky. Tyto látky neobsahují benzodiazepinové struktury, ale jsou to látky obsahující různé strukturní motivy, jako je pyrrol, pyridin, pyrimidin, pyrazin, nebo imidazol. Nejznámější tyto léčiva známe pod názvem Zopiclon, Zolpidem nebo Zaleplon. [61, 66]

4.5 Psychostimulanty

Jedná se o látky povzbuzující duševní funkce, jako je zvyšování pozornosti, zrychlení myšlení atd. Ovšem ve větších dávkách mohou způsobit až nespavost, třes, křeče nebo také vzrušení. Běžně se tyto látky užívají k odstranění únavy nebo také k všeobecnému povzbuzení. Každý den se téměř každý člověk setká s nejběžnějším a lehce dostupným psychostimulantem – kofeinem, který je obsažen nejen v kávě, ale taky v čaji. Oproti tomu některé z nich mohou způsobit silnou drogovou závislost (amfetamin, pervitin). Tyto látky mohou při akutních otravách vyvolat i těžké duševní poruchy. [61, 67]

Psychostimulanty jsou různorodé látky, avšak lze je rozdělit na několik typů. Z methylxanthinů lze jmenovat již zmíněný kofein, dále teofylin, teobromin. Látky amfetaminového typu můžeme rozdělit na přírodní (cathion, efedrin, pseudoefedrin) a syntetické (netamfetamin, amfetamin, methylfenidát). Mezi přírodní psychostimulanty

patří také kokain, který je produkován keřovitou rostinou, z níž může být následně izolován. [61]

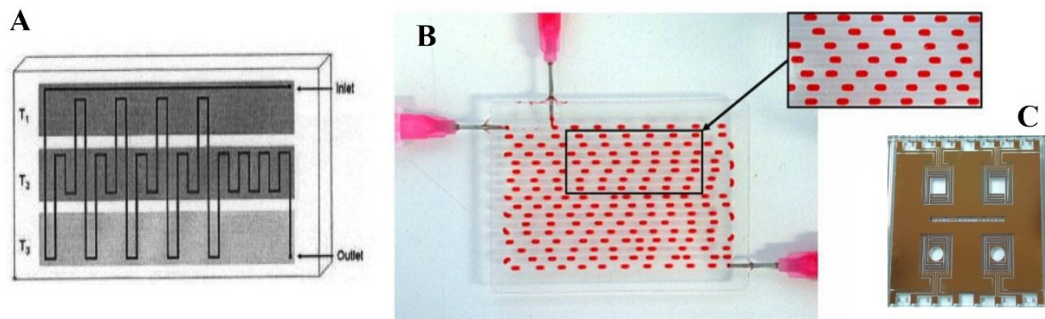
5 Využití mikrofluidiky ve forenzních vědách a medicíně

Jako první využití lze uvést z onkologického výzkumu. DNA čipy jsou schopny paralelně stanovovat míru exprese až desetitisíců genů a zároveň mezi dvěma vzorky detekovat změnu exprese těchto genů. Tyto vzorky mohou být např. tkáň nádoru vs. zdravá tkáň, dvě stádia nádoru nebo tkáň nádoru před a následně po terapii. Prozatím bylo vyvinuto několik technologií těchto DNA čipů neboli microarrays. I přesto, že se v mnoha parametrech liší, i tak zůstává jejich základní princip funkčnosti zachován. Potenciál využití v onkologii je u těchto DNA čipů obrovský a dodnes byly tyto čipy vyzkoušeny např. pro klasifikaci nádorů ledvin, prsu, či ke sledování účinnosti léčby u nádorového onemocnění prsu. Bohužel, zatím jsou čipy zkoušeny pouze v oblasti výzkumné, ovšem s rychle vyvíjející se technologií mikrofluidních zařízení a ruku v ruce jdoucí se snižující náklady, lze předpokládat, že tyto zařízení brzy budou běžnou praxí i v klinických aplikacích. [68]

Mikrofluidní čipy lze využít taky pro PCR – polymerázovou řetězovou reakci. Tato metoda by našla uplatnění nejen v medicíně, ale právě i ve forenzních vědách. Touto metodou lze vytvořit již z jedné molekuly DNA i několik milionů kopií této molekuly. Počet kopií záleží na počtu teplotních cyklů. V jednotlivém cyklu pak při různých teplotách probíhá denaturace dvojšroubovice DNA, následně hybridizace primeru na specifické místo, a nakonec pomocí DNA polymerázy probíhá syntéza komplementárního řetězce. A právě řízení tohoto teplotního režimu bývá kámen úrazu. V mikrofluidice je to však umožněno díky vysokému poměru teplostěnné plochy vůči reakčnímu objemu. [1]

Můžeme rozlišit tři typy mikrofluidních čipů pro PCR. Jako první jsou čipy pro dynamickou PCR, kdy kanálem v čipu protéká roztok obsahující DNA, primery, báze i DNA polymeráza. Kanál je navržen tak, aby střídavě procházel zónami s danou teplotou (Obr. 13–A). Abychom dosáhli zhruba 30 cyklů, bude PCR na tomto čipu trvat zhruba 30 minut. Druhým typem je dynamická PCR v zařízení se segmentovaným tokem, jenž se řadí mezi sériové kontinuální uspořádání. Amplifikace probíhá v jednotlivých červených kapkách obsahující DNA, které jsou rozděleny olejovou fází (Obr. 13–B). Posledním typem je čip pro stacionární PCR, kde se vzorek umísťuje do mikrofluidní komory. V této

komoře je díky topným tělískům přizpůsobována teplota jednotlivým fázím cyklu (Obr. 13–C). Tyto typy čipů jsou dnes již komerčně dostupné. [1]



Obr. 13: Jednotlivé typy mikrofluidních čipů pro PCR [1]

CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo vytvořit mikrofluidní čip z PDMS za pomoci 3D tisku a vyzkoušet nový způsob lepení pomocí plazmy. Následně na nových čipech s jednoduchými kanály vyzkoušet zachycení magnetických mikročástic pomocí magnetického pole, vytvořit segmentovaný tok a vyzkoušet separaci pomocí izotachoforézy. Dalším cílem bylo vytvořit stejným způsobem složitější mikrofluidní systém, na kterém by se provedla specifická analýza s kolorimetrickou detekcí.

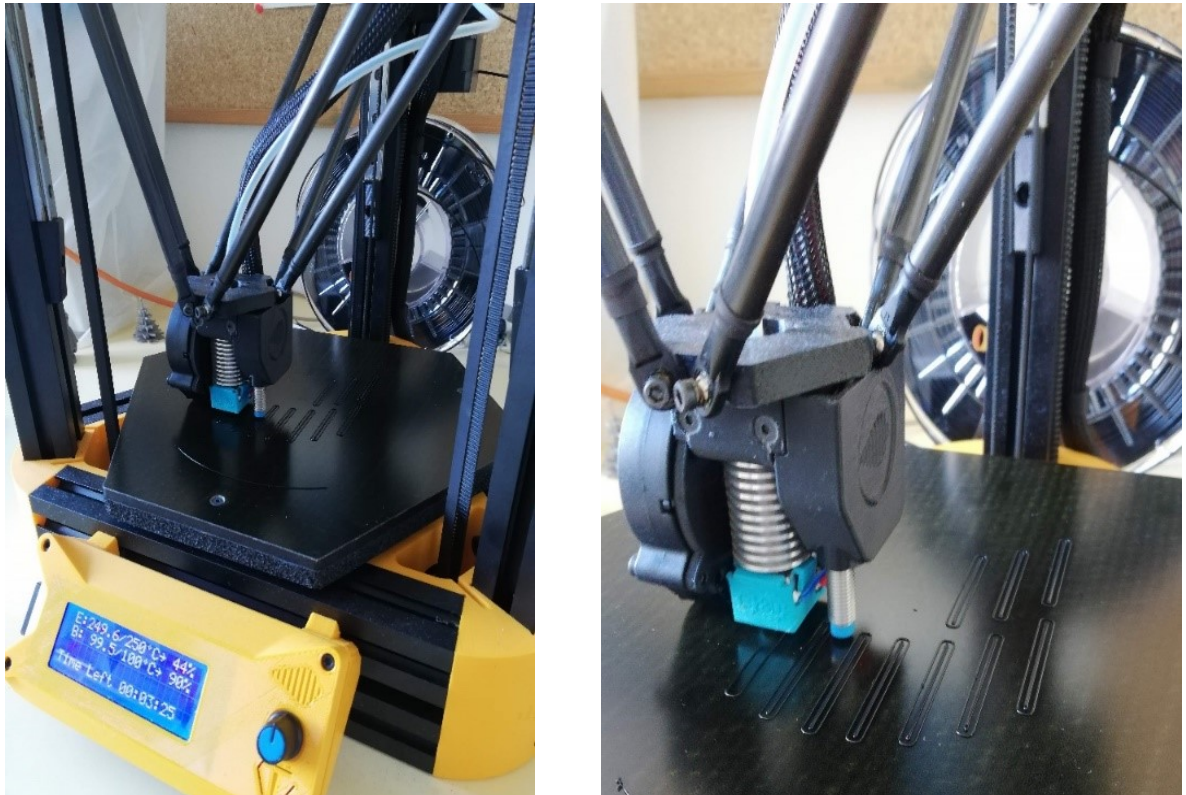
PRAKTICKÁ ČÁST

5.1 Design mikrofluidního zařízení

Cílem této práce bylo vytvořit mikrofluidní čip z PDMS za pomoci 3D tisku a to tak, že se pomocí 3D tisku vytvoří vlastní kanálek, ten se následně „odleje“ do PDMS (tak, aby kanálek buď „plaval“ na vrstvě PDMS nebo naopak byl „na dně“), vytisknutá struktura se odstraní a vytvořený PDMS čip se nalepí na sklo pomocí plazmového výboje.

Design kanálku byl vytvořen ve volně dostupném softwaru. Struktura byla nejprve nakreslena v programu Autodesk Fusion 360 a dále byla pomocí programu Autodesk Meshmixer převedena do formy „stl kódu“. Tento pak byl v programu KISSlicer v 1.5 převeden „ovládací kód“ pro 3D tiskárnu. Jako 3D tiskárna byla použita tiskárna TRILAB DeltiX Mini od firmy TriLAB Group, s.r.o. (Brno), viz Obr. 14.

Po vytištění 3D struktury byla tato struktura „odlita do PDMS“ následujícím postupem. K bázi (zalévací hmota) PDMS bylo přimícháno do kádinky polymerační činidlo v poměru 10:1 a vše bylo pořádně promícháno pipetovací špičkou nasazenou na tužce.

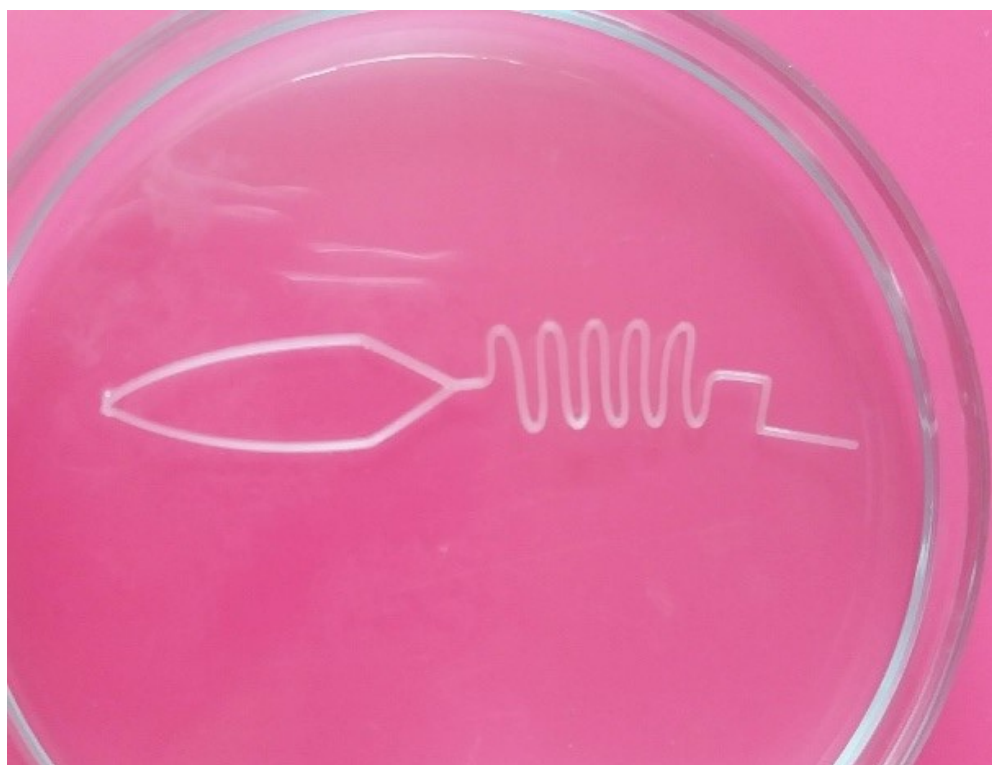


Obr. 14: 3D tiskárna a detail tisku rovných struktur kanálů

Po promíchání byla směs vložena do ultrazvukové lázně zhruba na 5 minut pro částečné odstranění vzduchových bublinek. Poté byla směs přelita do čisté a suché Petriho misky vymyté methanolem, tak aby vrstva výsledného PDMS byla zhruba 0,5 cm. Největší vzduchové bublinky byly odstraněny pomocí pipetovací špičky. Následně byla miska vložena do exsikátoru pod vakuem opět zhruba na 5 minut, poté vyjmuta a ponechána v klidu. Vložení do exsikátoru a následné kroky byly několikrát za sebou opakovány, dokud se nedocílilo výsledku, že nebyly vidět žádné vzduchové bublinky.

Po odstranění viditelných bublinek bylo možné do PDMS vložit struktury, které po zatuhnutí PDMS a vyloupnutí budou tvořit strukturu kanálu. Jakmile se PDMS se strukturami nechává ztuhnout, musí se dbát na to, aby misky byly ve vodorovné pozici.

Nejdříve se struktury zkoušely vytisknout z materiálu BVOH (butendiolvinylalkohol kopolymer), jehož velikou výhodou je rozpustnost ve vodě, což by mohlo znamenat snadné odstranění struktury z PDMS. Jelikož však po zatuhnutí PDMS bylo zjištěno, že se struktura značně zdeformovala, a to by znamenalo lepení mikroskopických skel z obou stran, bylo od tohoto materiálu upuštěno (Obr. 15).



Obr. 15: Zdeformovaná struktura z BVOH

Dalším materiálem, který se zdál být vhodným, byl ABS (akrylonitrilbutadienstyren). Tento materiál se již nedeformoval při tuhnutí PDMS. Ovšem dosti záleží z kolika vrstev je struktura vytištěna. Jestliže je vytištěna jen z několika vrstev, tato struktura zůstane plavat na PDMS a neponoří se. V tomto případě by mohl později nastat problém při lepení, kdyby při tvrdnutí PDMS s miskou někdo manipuloval a vytvořil by se tak nerovný povrch díky postupnému tuhnutí PDMS. Proto je lepší struktury tisknout z více vrstev, aby došlo k ponoření struktury ke dnu misky (Obr. 16). Dno misky tím zajistí, že povrch, který se bude lepit bude vždy rovný, a i struktura bude snadněji vyjímatelná. Pokud je struktura dosti silná, při vyjímání z PDMS se struktura nedeformuje a je tak možné ji znovu použít pro výrobu dalšího čipu, což je z pohledu životního prostředí ekologičtější. Další výhodou oproti BVOH je to, že stejné množství filamentu do 3D tiskárny stojí asi jen čtvrtinu ceny. Na druhou stranu čím více vrstev je vytisknuto, tím je kanálek v průřezu větší a méně homogenní, což může pro určité aplikace (např. analýza buněk) představovat problém.



Obr. 16: *Struktury v PDMS držící se u dna a povrchu*

Do Petriho misky s PDMS byly vloženy struktury, které byly zatlačeny až na dno misky. Opět se opakovaly kroky s exsikátorem pro odstranění veškerých bublinek. Pro objasnění, co mohou způsobit bublinky byly z jedné misky odstraněny bublinky pouze v okolí struktury, ale na okrajích misky bylo ponecháno několik drobných bublinek. Po přípravě misek se vyzkoušelo vložení do sušárny vyhřáté na 60 °C. Ukázalo se ale, že nejspíše vlivem tepla struktury se začaly pohybovat v PDMS a mohlo by tedy dojít ke zkrřížení nejen kanálků v rámci struktury ale taky mezi kanálkami dvou struktur vložených do jedné misky. Proto byly misky pouze přikryty hodinovým sklíčkem a ponechány minimálně 24 hodin do úplného ztuhnutí PDMS. Po uplynutí této doby, byl pomocí špachtle vyjmut PDMS se strukturami z Petriho misky (Obr.17).



Obr. 17: *Vzniklé kanály s PDMS po vyjmutí struktur*

Pokud struktury nešly samy lehce vyjmout, byl PDMS nad nimi lehce nařezán podél struktury. Následně šly struktury bez problému vyjmout. Takhle vzniklé kanálky v PDMS byly ořezány odlamovacím nožem na takovou požadovanou velikost, aby mohly být nalepeny bez přesahů na mikroskopické sklo. Na konce kanálů byly pro vstup a výstup vzorku vyřezány otvory kruhovým skalpelem (trepan) o průměru 3 mm. Při vyjmutí PDMS se strukturou z Petriho misky, kde byly při okrajích bublinky ponechány, byla zjištěna špatná soudržnost polymeru. Ta měla za následek lámání PDMS při vyjmutí z Petriho misky (Obr.18).



Obr. 18: *Nekompaktní PDMS*

Následně bylo provedeno „lepení“ PDMS čipu na sklo. Aby došlo k pevnému spojení obou částí (PDMS a mikroskopické sklo), musí být slepované plochy řádně očištěny. Nejdříve byly plochy očištěny buničinou namočenou v acetonu, následně v methanolu a pod stlačeným proudem vzduchu pořádně vysušeny. Nejprve lepení probíhalo na plazmovacím zařízení firmy Diener (Německo), Obr. 19.



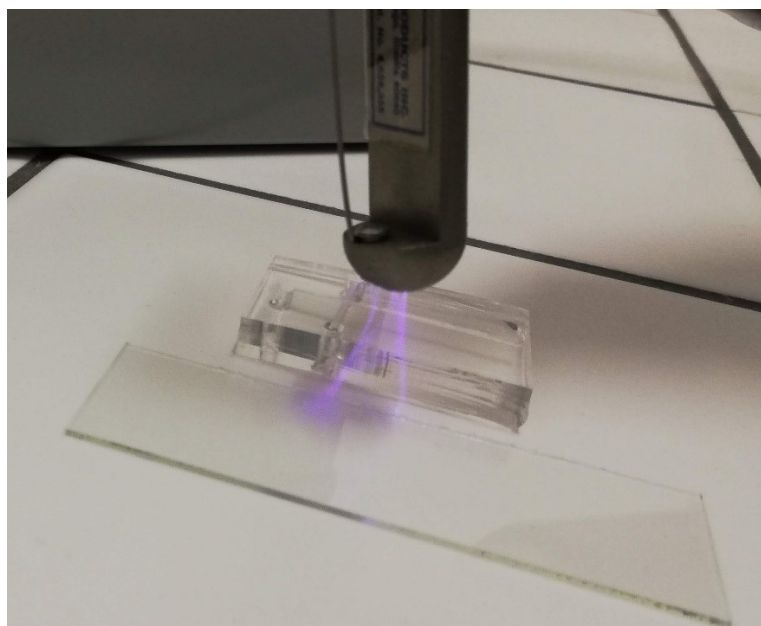
Obr. 19: Plazmovací zařízení

Jako první se oddělal hodní kryt, doprostřed se naskládaly PDMS struktury a laboratorní sklíčka nahoru stranou, která měla být lepena. Po uzavření krytu se spustila pumpa a z uzavřeného prostoru byl vyčerpán vzduch až zhruba na 0,2 mbar. Následně byl zažehnut plazmatický výboj pro ošetření povrchu, který trval zhruba minutu. Po uplynulé době byl výboj vypnut a v systému byly vyrovnány tlaky. Po sejmutí krytu byly mikroskopické sklíčka přiloženy na PDMS struktury a zatíženy, aby došlo k dobrému slepení obou částí. Při kontrole se však zjistilo, že nedošlo k dostatečnému slepení obou částí. Při dalším pokusu lepení se zjistilo, že plazmovací přístroj má technický problém, a tak byl nahrazen ručním ionizátorem BD-20AC firmy Electro-Technic Products (Obr. 20).



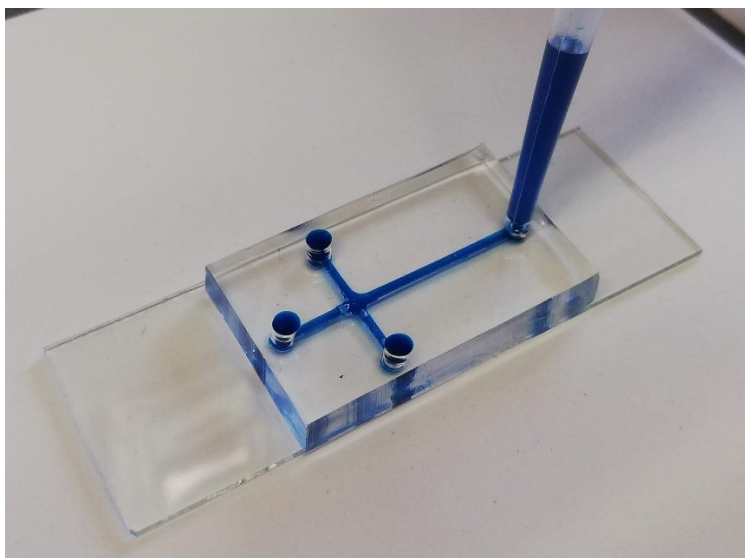
Obr. 20: *Ruční ionizátor [26]*

Obě části byly umístěny do digestoře plochami, které měly být slepeny, nahoru. Ruční ionizátor byl připojen do elektrické sítě, výkon nastaven na maximum a elektroda přiblížena k povrchům částí. Vznikal tak koronární výboj (okem pozorovatelný), který upravil plochy obou částí nábojem po dobu zhruba 1 minuty, aby po přiložení k sobě se tyto části slepily (Obr. 21).



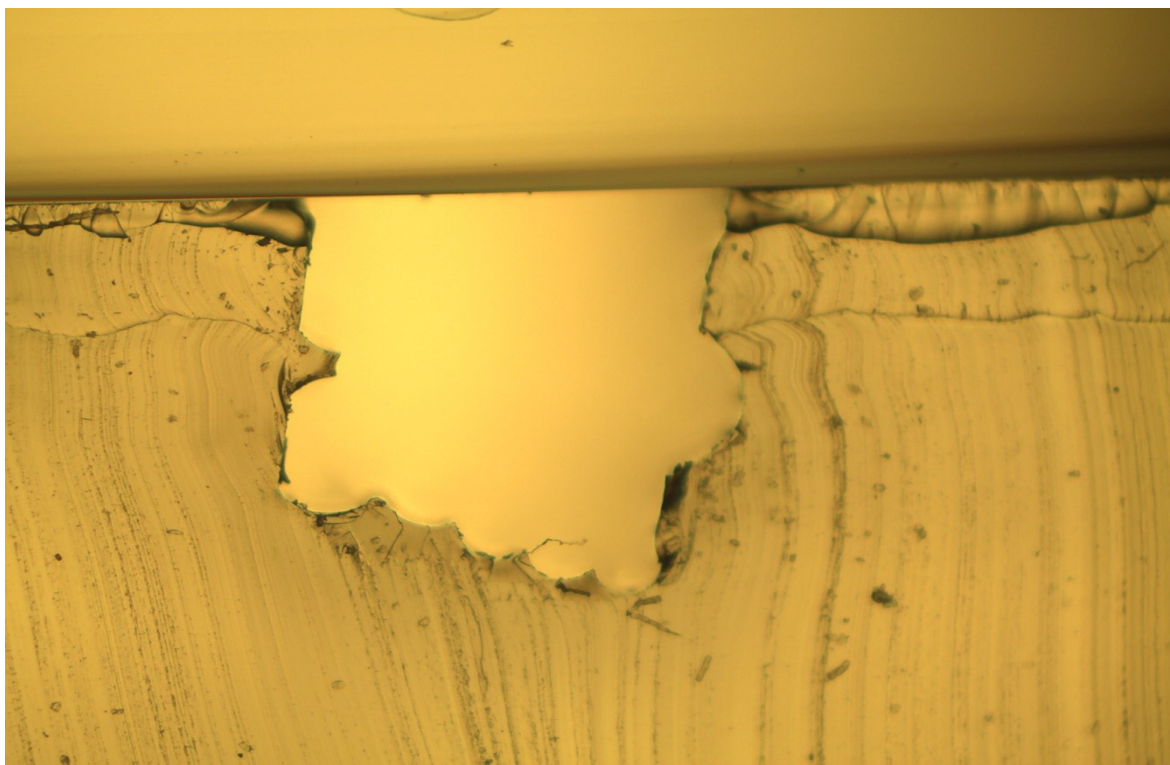
Obr. 21: *Koronární výboj upravující povrch lepených částí*

Ilhned po vypnutí ručního ionizátoru byly části k sobě přiloženy a stlačeny, aby nedocházelo ke vzniku vzduchových bublin ve slepovaném spoji. Tímto způsobem byl připraven mikrofluidní čip, jehož těsnění lepených částí a průchodnost kanálků bylo vyzkoušeno pomocí zbarveného roztoku barvivem bromfenolové modří (Obr. 22).



Obr. 22: Test průchodnosti kanálků a pevnosti spoje pomocí BFM

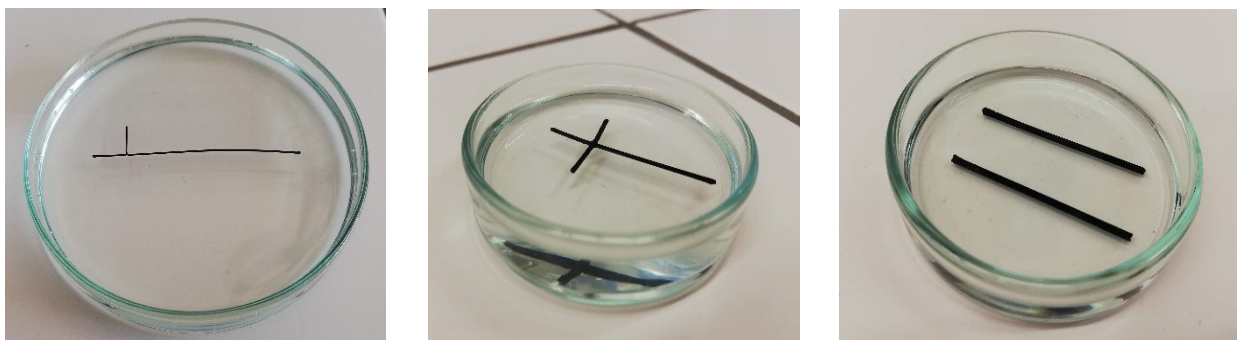
Ve výsledku byl jeden z čipů s rovným kanálem byl rozříznut napříč kanálem pomocí odlamovacího nože a keramického plátku na řezání kapilár. Takto vzniklý průřez byl vložen pod mikroskop, aby bylo možno vyfotit profil mikrofluidního kanálu (Obr. 23). Jak je vidět na obrázku, profil kanálu není pravidelný a jsou v něm vidět nerovnosti, které by mohly být omezením při různých analýzách, kdy by se stanovované látky, buňky atd. mohly na těchto nerovnostech zachytávat. Aby byl kanál pravidelný, musel by být vytvořen pouze z jedné linie. Zde už by ale nastal problém při tisku, jelikož má ABS tendenci se nadzvedávat z vyhřívané podložky při tisku a smršťovat se a praskat. Zároveň bychom nedosáhli toho, aby se struktura při zalití PDMS držela u dna.



Obr. 23: Mikroskopický snímek průřezu kanálu

5.2 Proof-of-concept

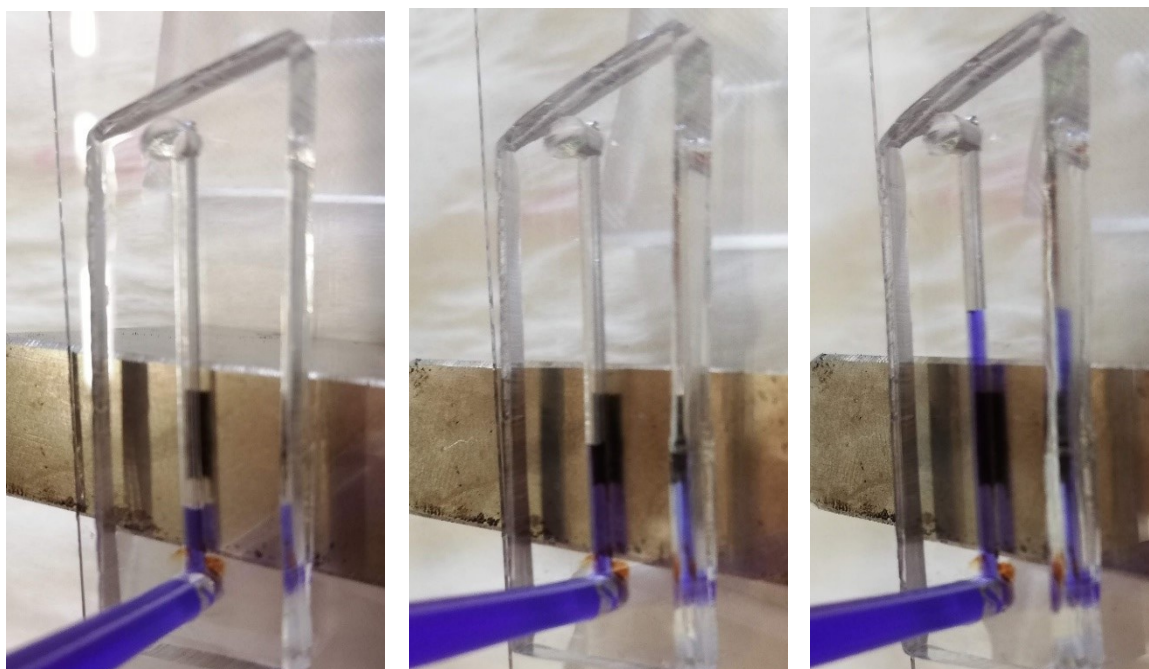
Pro ověření funkčnosti takto vyrobených čipů byly zvoleny tři designy kanálků, a to jednoduchý rovný kanálek, kanálek ve tvaru T a jako poslední byl připraven kanálek ve tvaru kříže (Obr. 24). Postup přípravy čipu byl stejný, opět byly kanálky vloženy do namíchaného PDMS v Petriho miskách. Byly odstraněny vzduchové bublinky, aby nevznikl nekompaktní PDMS, který by se lámal. PDMS bylo ponecháno minimálně 24 hodin, aby se dosáhlo požadovaného zatuhnutí. Po vyjmutí struktur z PDMS byly na koncích kanálů vyřezány trepanem otvory o velikosti 3 mm. Po důsledném očištění mikroskopického sklíčka a PDMS buničinou s acetonem a následně methanolem, byly obě části slepeny pomocí ručního ionizátoru.



Obr. 24: Tři typy kanálků – tvar T, tvar kříže a jednoduchý rovný kanál

5.2.1 Rovný kanál

Vyrobený čip s rovným kanálem byl otestován na zachycování magnetických mikročástic pomocí magnetického pole. Nejprve byl kanál promyt destilovanou vodou, následně byly do něj nadávkovány magnetické částice. Po přiložení magnetu (HN109, Neomag, přídržná síla 45 kg) byly mikročástice drženy magnetickou silou na jednom místě v kanálku, i když kanálem stále proudila voda. Aby tento pokus byl lépe viditelný, byla voda obarvena bromfenolovou modří. Na obrázku (Obr. 25) lze vidět postupný průchod vody, aniž by se magnetické mikročástice pohnuly.



Obr. 25: Průchod obarvené vody BFM přes magnetické mikročástice

Díky tomu by bylo možné použít tento typ čipu pro účely magnetického zachycení mikročástic a další experimenty např. se zachycením dalších látek na tyto mikročástice, případně na modifikované mikročástice (čip by tak bylo možné využít např. pro extrakci nebo prekoncentraci látek na magnetických mikročásticích).

5.2.2 T-kanál

Tento kanál byl vyroben za účelem otestování generování segmentovaného toku. Segmentovaný tok se vyznačuje vytvořením segmentů vodného a nevodného prostředí, kde nevodné prostředí tvoří biologicky přijatelná rozpouštědla typu perfluorohexanu. Segmentovaný tok se používá v mikrofluidice pro mnoho aplikací, nejčastěji pro aplikace, kde je do vodného segmentu uzavřena buňka, ke které je pak přidána látka, která tuto buňku ovlivňuje (farmakologicky, toxikologicky, případně biochemicky). Výhodou je, že tento test lze provést v minimálním objemu (v objemu segmentu) v několika tisících segmentech za sebou za poměrně krátký čas. Získají se tak přesná data o chování velkého množství buněk, která by jinak nebylo možné obdržet (např. kultivačními technikami). Pro tento test bylo jako vodná fáze vybráno barvivo – amarantová červeň, která byla rozpuštěna v deionizované vodě na výslednou koncentraci 10 mmol/l. Jako „olejová“ fáze byl vybrán Fluorinert. Tyto roztoky byly nasáty do injekčních stříkaček, stříkačky připevněny k mikrofluidnímu čipu a zároveň vloženy do lineární pumpy regulující průtok kapalin na 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Obr. 26). Výsledkem se stal tak segmentovaný tok, který lze vidět na obrázku na stejném obrázku vpravo.



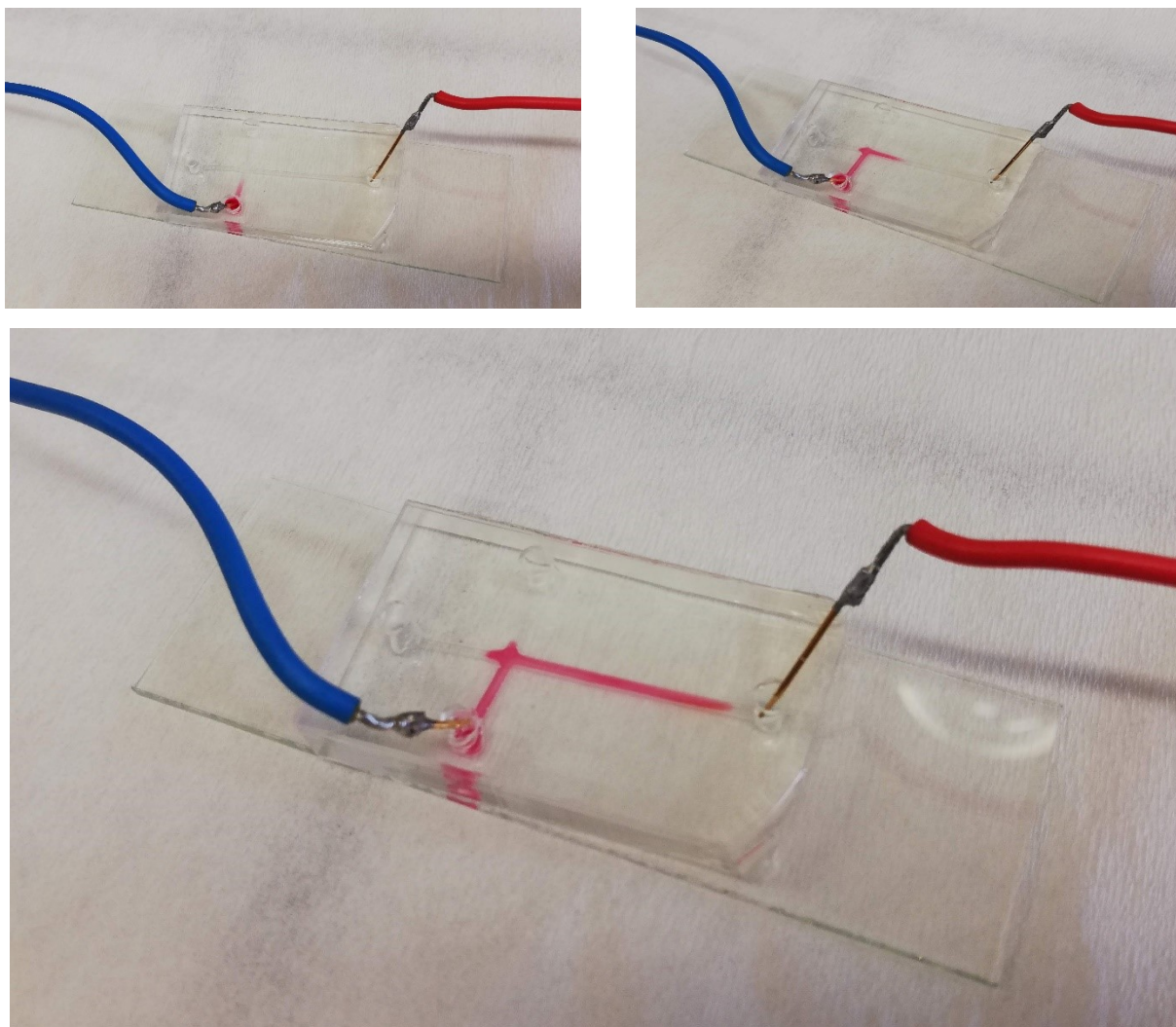
Obr. 26: Zařízení zajišťující stabilní průtok a snímek segmentovaného toku

Z obrázku 26 je vidět, že vytvořené segmenty nejsou zcela pravidelné, nicméně to je dáno především spojením čipu a externího zdroje tlaku přes injekční stříkačky. V případě standardního připojení používaného ke generování segmentovaného toku, se dá očekávat tvorba pravidelných segmentů. Díky tomu bylo dokázáno, že je možné použít tento typ výroby čipu (a samotné uspořádání čipu) i pro generování segmentovaného toku. Tím je možné ušetřit poměrně značné množství finančních prostředků, protože vlastní čipy pro generování segmentovaného toku jsou poměrně nákladné (jeden čip stojí i 50 EUR, zatímco výroba výše zmíněného čipu stála řádově jednotky Kč).

5.2.3 Křížový kanál

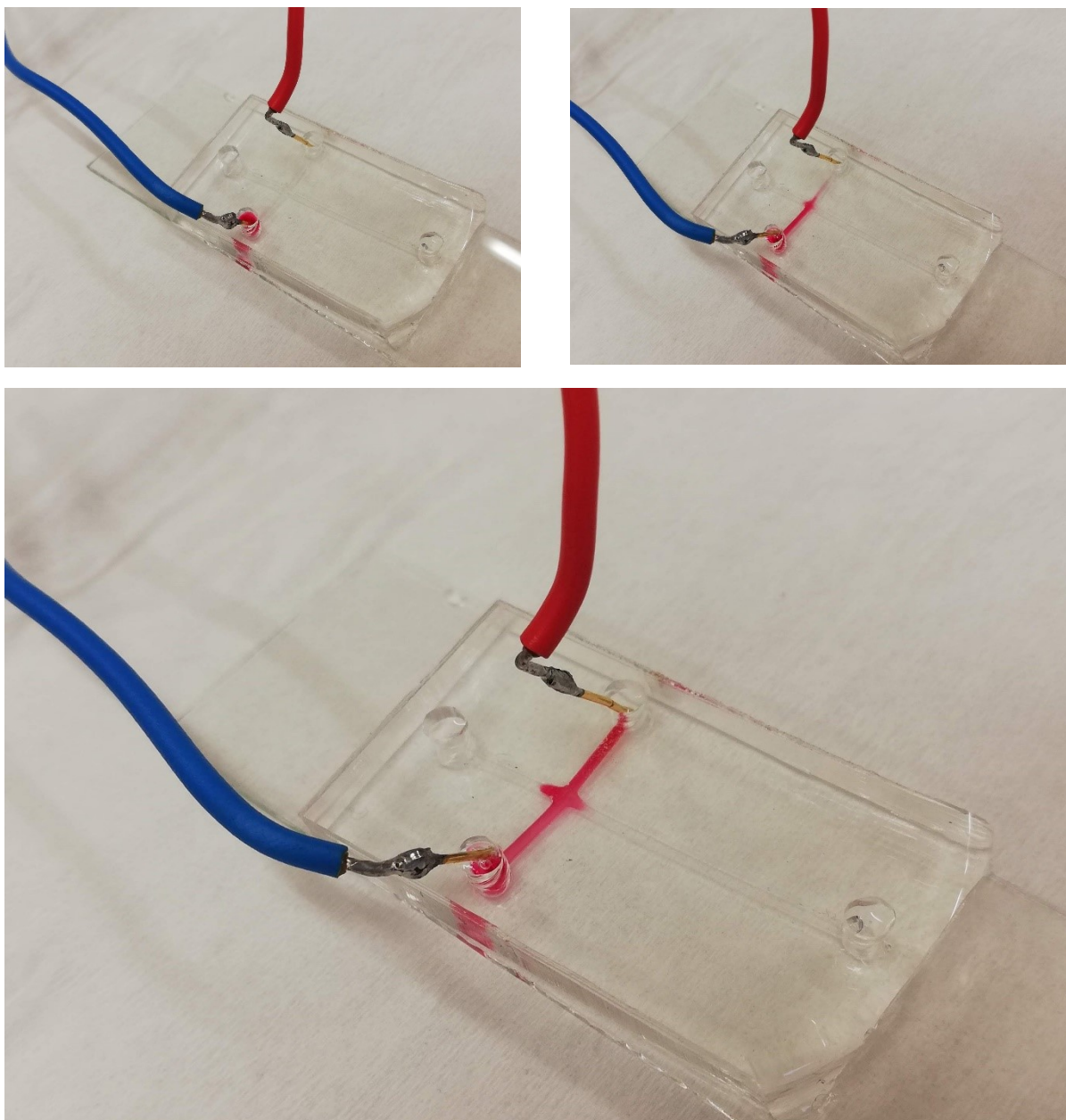
Pro poslední „proof-of-concept“ pokus byl vzat čip s kanálem do tvaru kříže. Na tomto typu kanálku byla vyzkoušena separace organických barviv pomocí izotachoforézy. Při izotachoforéze dochází k separaci buď aniontů nebo jenom kationtů, ale nikdy nejde separovat kationty a anionty zároveň. Tato separace vzorku probíhá vždy mezi dvěma elektrolyty (vedoucí a koncový), které mají odlišnou pohyblivost iontů. Jestliže separujeme anionty, je vzorek vnesen mezi vedoucí elektrolyt vykazující vyšší pohyblivost aniontů a koncový elektrolyt s nižší pohyblivostí aniontů, než je pohyblivost aniontů vzorku. [69, 70]

Pro ověření funkčnosti čipu byla vybrána separace dvou barviv – bromfenolové modře a amaranthové červeně. Jako vedoucí elektrolyt byl použit HCl/His a jako koncový elektrolyt MES/His. Nejdříve byly kanály promyty 2-hydroxyethylcelulózou (HEC) pro potlačení sorpce iontů a tím potlačení elektroosmotického toku, poté promyty vedoucím elektrolytem – HCl o koncentraci 10 mmol/l s upraveným pH na hodnotu 6 pomocí histidinu. Kanály byly naplněny vedoucím elektrolytem, zároveň byla do jednoho vstupního otvoru nadávkovaná směs barviv pomocí pipety. Tato směs obsahovala bromfenolovou modř o koncentraci 10 mmol/l, amaranthovou červeně také o koncentraci 10 mmol/l, destilovanou vodu a koncový elektrolyt (MES o koncentraci 10 mmol/l s upraveným pH na hodnotu 6 pomocí histidinu). Nejdříve byl vyzkoušen pohyb barviva elektrokineticky do kanálku ve tvaru L. Byly použity zlaté elektrody, kdy elektroda s modrou barvou představovala záporný „pól“ a elektroda s červenou barvou kladný „pól“. Mezi elektrody bylo vloženo stejné elektrické napětí 200 V. Tento pokus byl úspěšný a jeho postup lze vidět na Obr. 27.

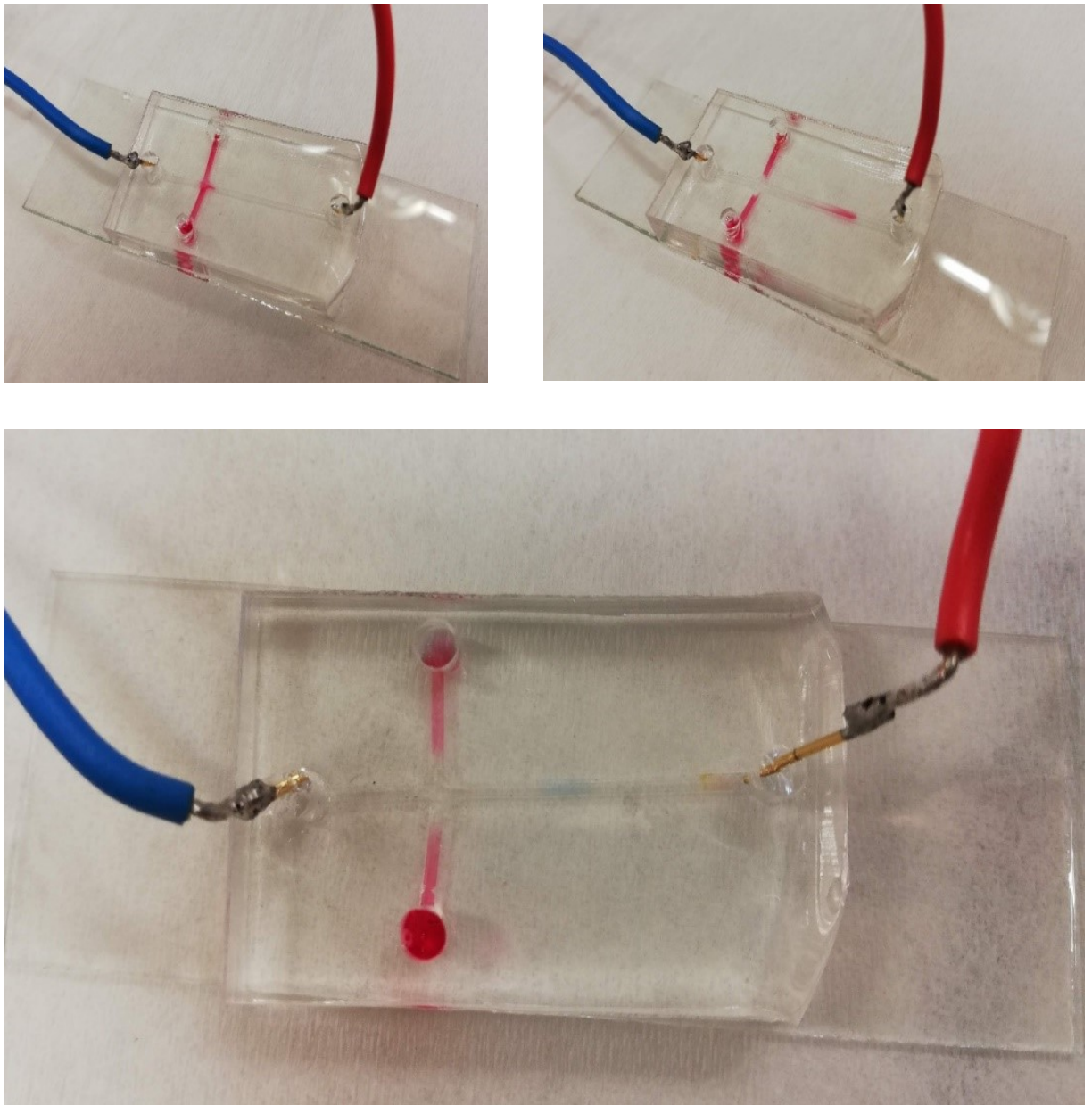


Obr. 27: Pohyb barviva elektrokineticky do tvaru L

Při druhém pokusu byla směs barviv nadávkována elektrokineticky do hlavního separačního kanálu. Došlo k migraci barviv, kdy tato směs barviv překřížila dlouhý (separační) kanál, který byl na kratší kanál kolmý (Obr. 28). Následně se zdroj napětí vypnul a předělaly se elektrody na „delší“ kanál, kde u elektrody se záporným nábojem byl v otvoru nadávkován koncový elektrolyt. Po vložení napětí 200 V se část směsi barviv, která křížila tento kanál, zafokusovala. Začal probíhat izotachforetický proces, kdy po nějaké době došlo k rozdělení jednotlivých barviv ze směsi, jak je vidět na Obr. 29.



Obr. 28: Migrace směsi barviv přes krátký kanál



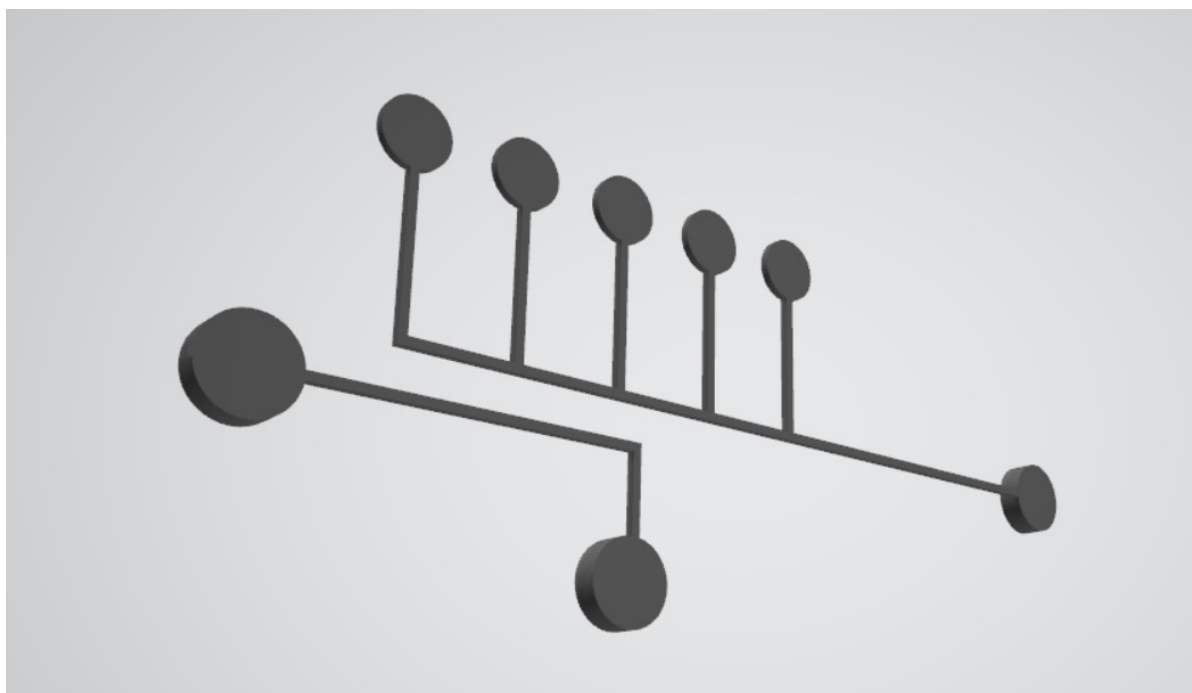
Obr. 29: Separace barviv ze směsi na dlouhém kanálku

Z obrázku 29 je vidět, že na vytvořeném čipu je možné provést elektrokinetické experimenty, rovněž je možné separovat barviva pomocí izotachofórey. Hypoteticky by tedy bylo možné tento čip využít i pro další separace, případně prekoncentrace látek včetně biologicky (případně farmakologicky či toxikologicky) významných sloučenin, případně studovat interakce těchto látek např. s DNA.

Obecně lze tvrdit, že způsob výroby těchto čipů je vhodný pro všechny zkoumané oblasti (zachycení magnetických mikročástic, generování segmentovaného toku a separace izotachoforézou) a je tedy možné výrobu těchto čipů použít i pro další složitější úkoly.

5.3 Složitější čip

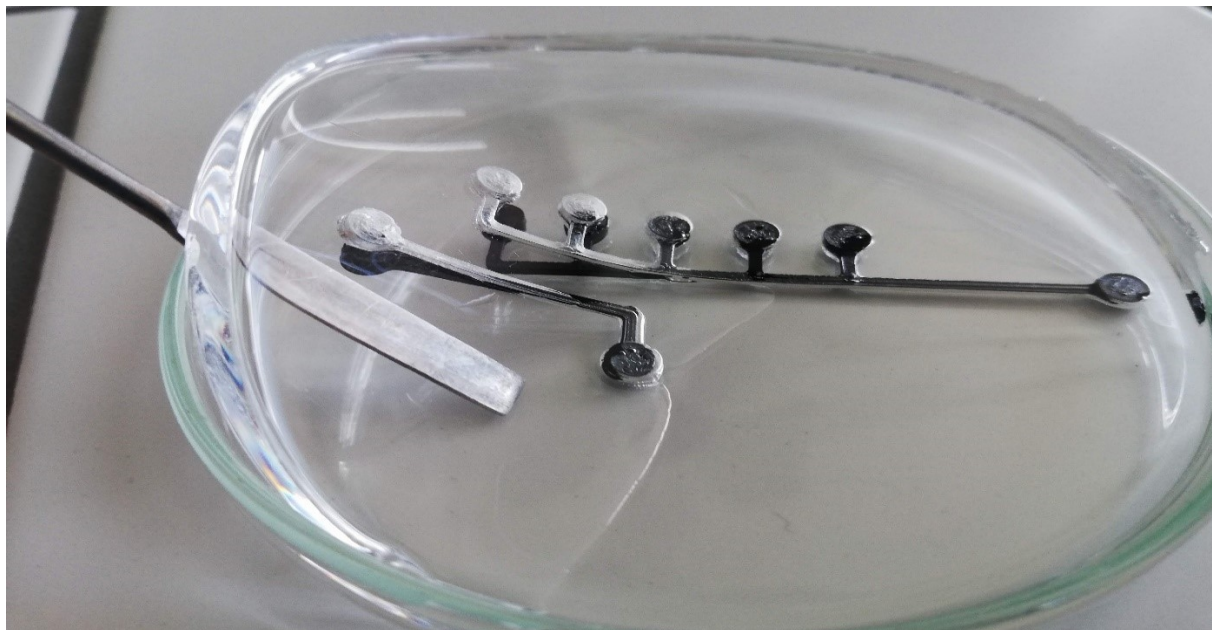
Pro ověření funkčnosti výše popsaného způsobu výroby byla navržena složitější struktura čipu. Design čipu byl navržen tak, aby bylo možné vytvořit kolorimetrickou kalibrační řadu a zároveň s ní porovnat námi požadovaný vzorek. Pro kalibrační řadu bylo navrženo pět otvorů, do kterých se nadávkuje jednotlivé koncentrace kalibrační řady od nejnižší po nejvyšší. Pro vzorek byl navržen jen jeden otvor, do kterého se daný vzorek nadávkuje. Bočními vstupními otvory pak může být dávkován reagent. Kalibranty by měly být umístěny/zachyceny na pevné fázi (stacionární fáze/papír). Schématický náčrt je pak vidět na obrázku (Obr. 30).



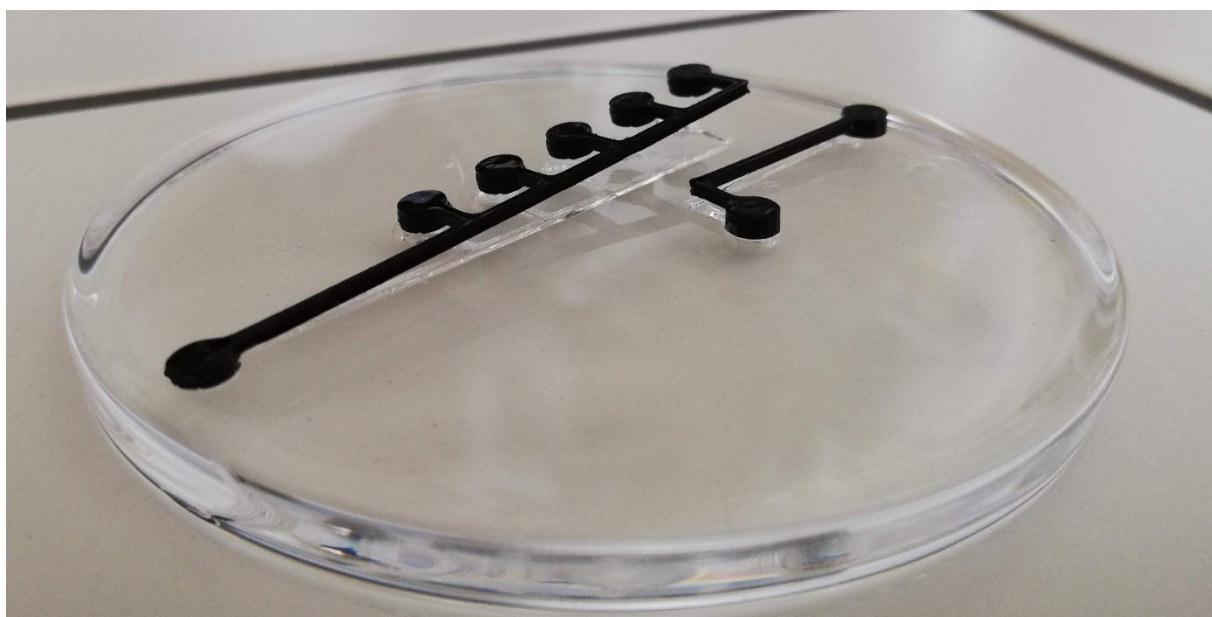
Obr. 30: Návrh struktury složitějšího čipu

Po vyjmutí prvního PDMS z Petriho misky a vyloupenutí struktur vytisklých na 3D tiskárně byly do oříznutých složitějších kanálků nedřívě vyřezány trepanem vstupní kruhové otvory

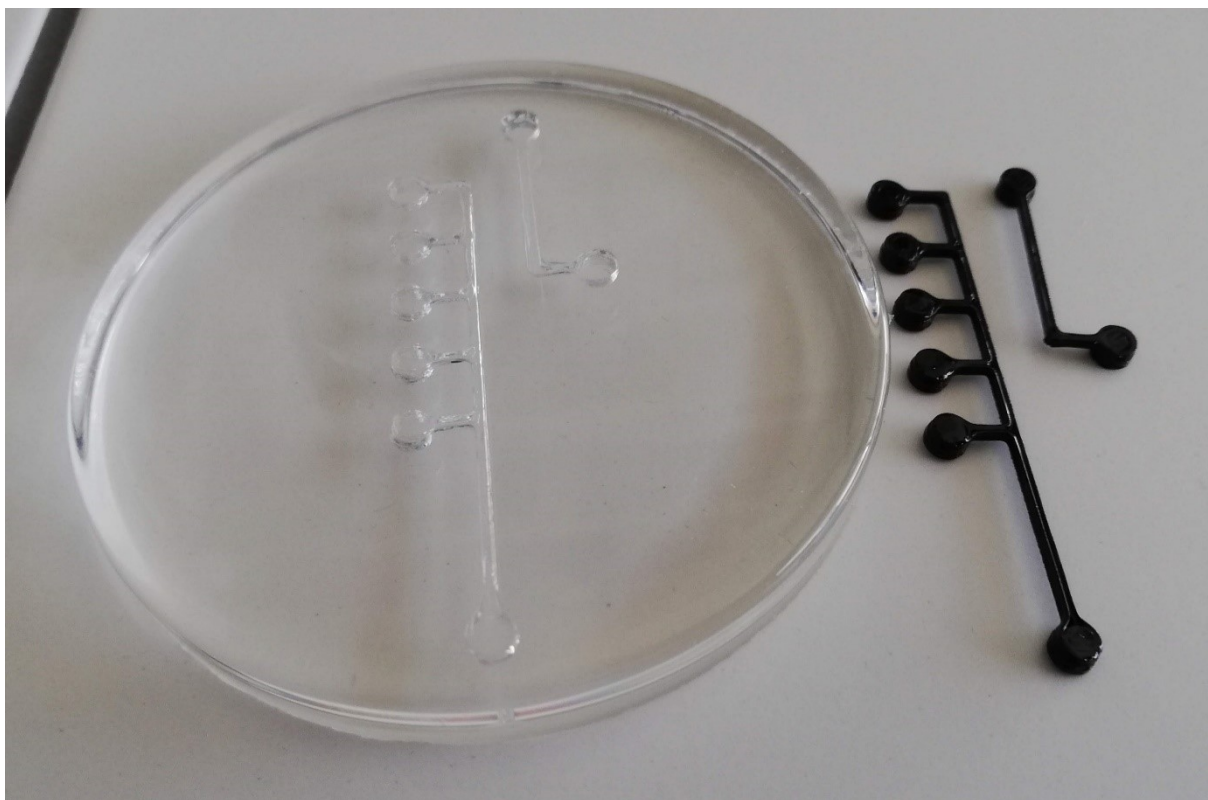
velikosti 3 mm. U konečných částí na koncích kanálu byly vyřezány kruhové otvory trepanem o velikosti 1 mm. Následně byla stacionární fáze C18 (pro SPE kolonky) smíchána s trochou methanolu a pomocí pipety byla nadávkována do konečných kruhových otvorů. Celý postup je zobrazen na Obr. 31 až Obr. 37.



Obr. 31: Vyjmutí PDMS z Petriho misky



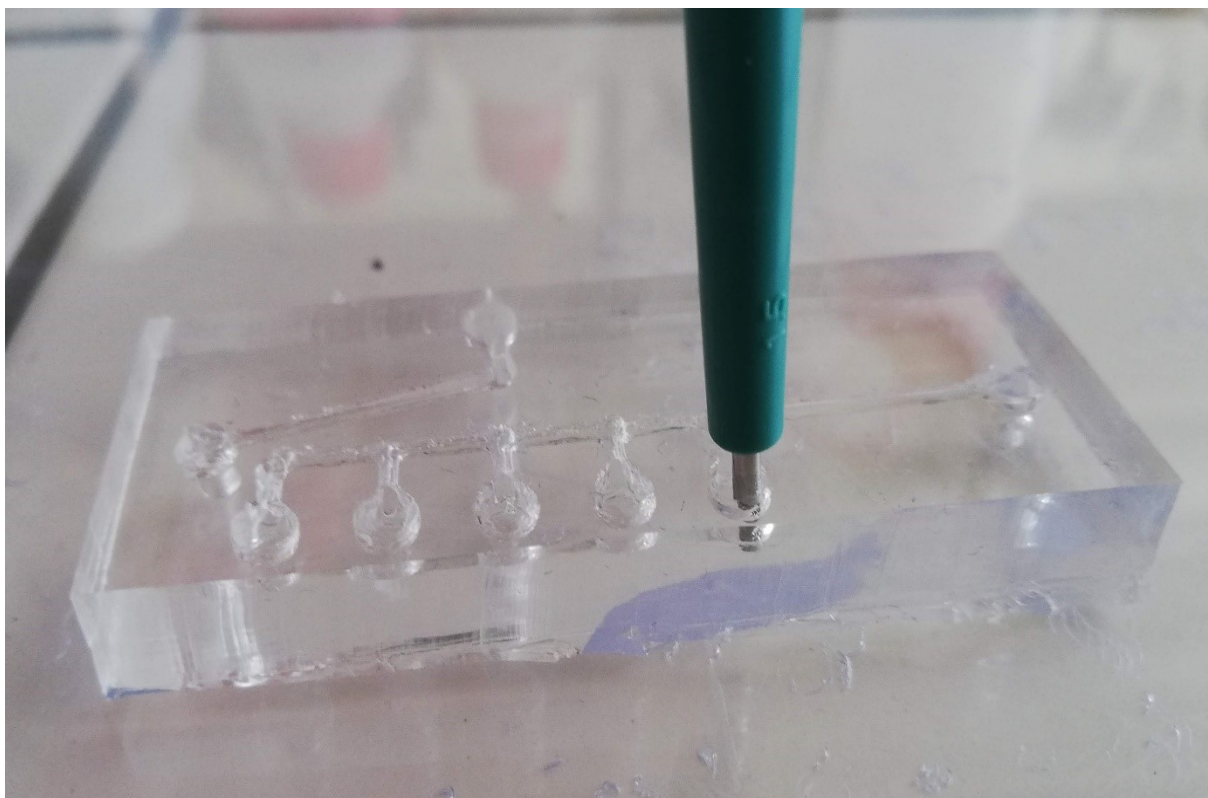
Obr. 32: Vyloupnutí struktur kanálků z PDMS



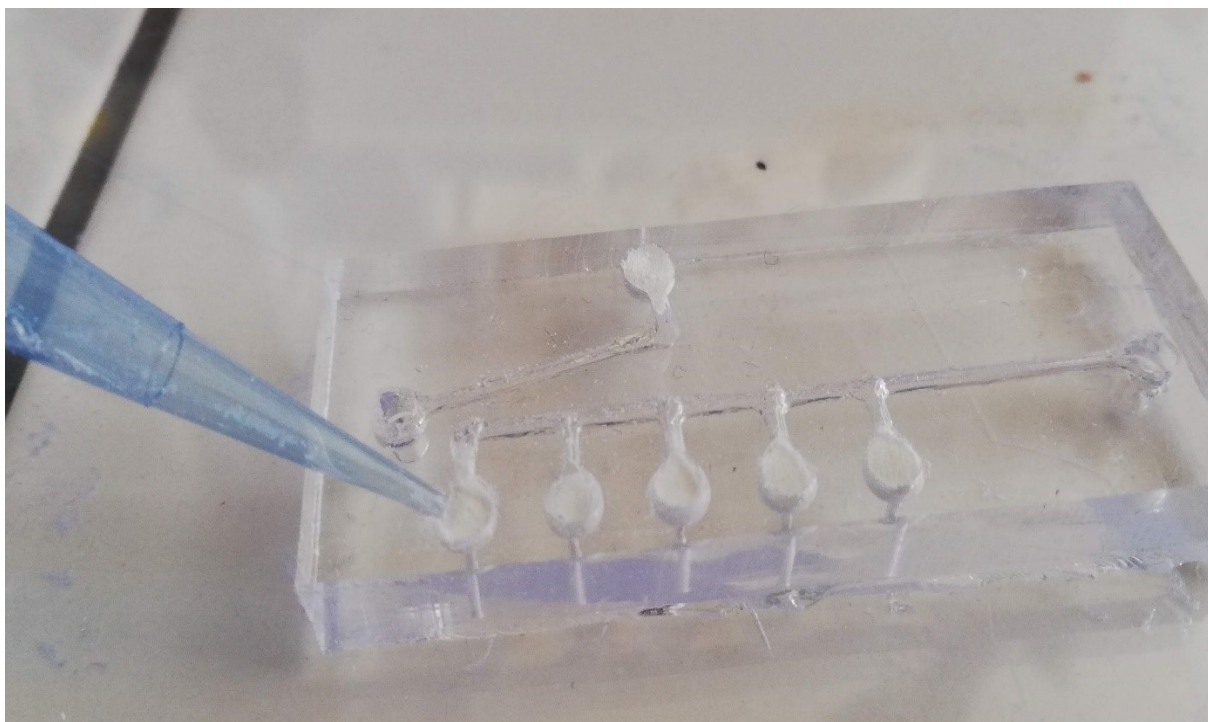
Obr. 33: *Vzniklé kanálky v PDMS a struktury nachystané k dalšímu použití*



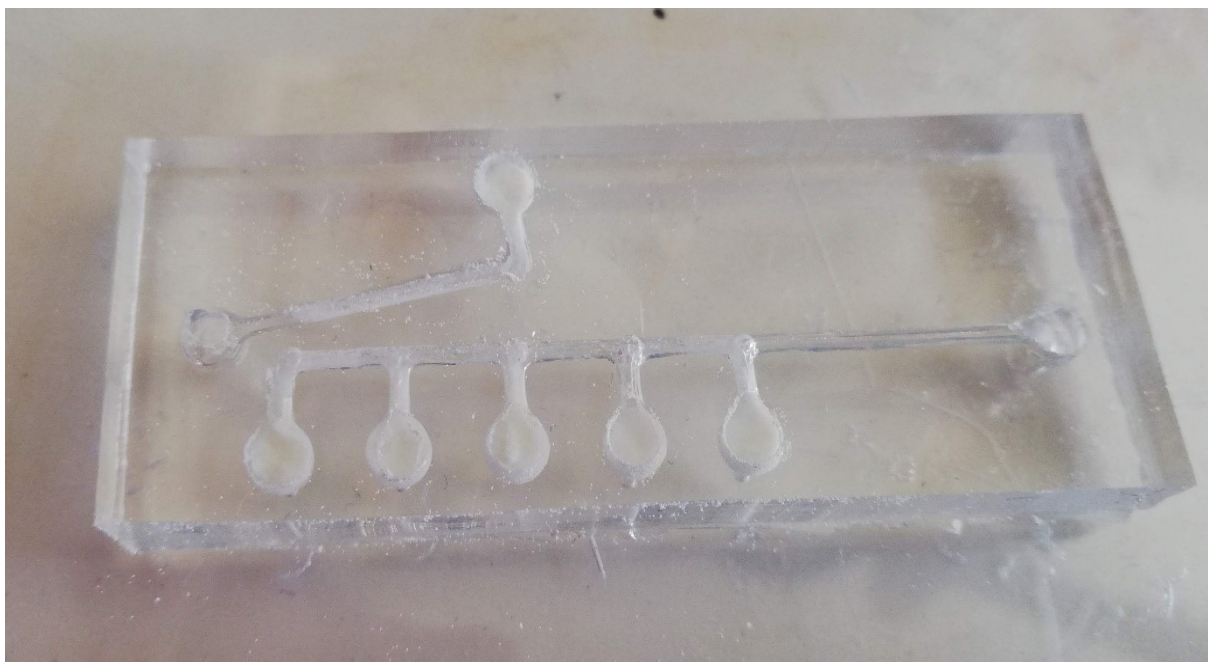
Obr. 34: *Ořezávání PSMD na požadovanou velikost pomocí odlamovacího nože*



Obr. 35: *Vyřezávání kruhových otvorů pomocí trepanu*



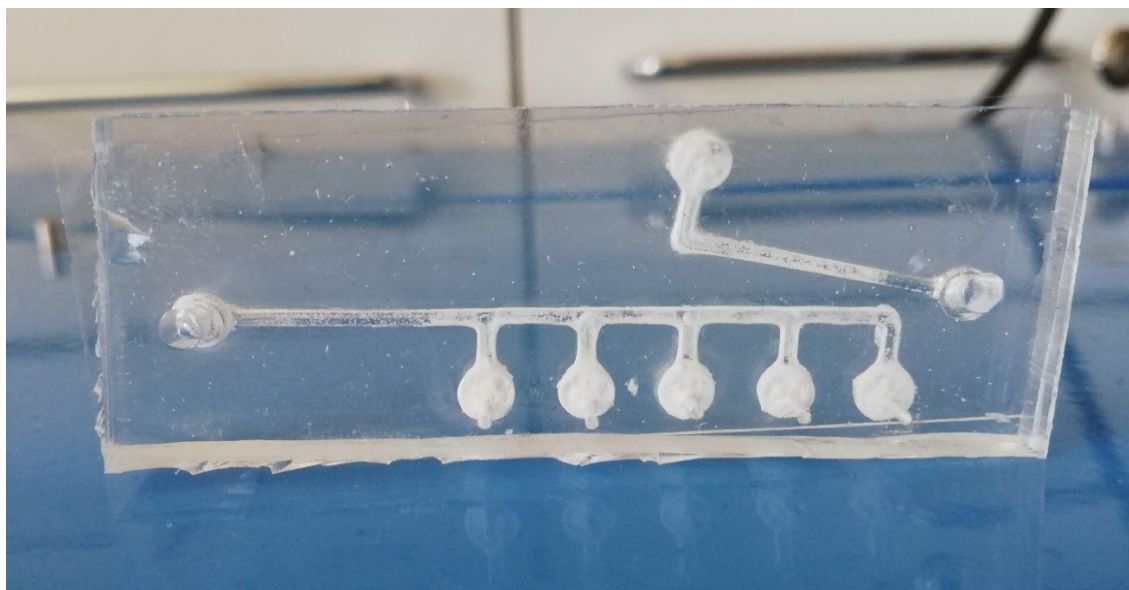
Obr. 36: *Aplikování stacionární fáze do kruhových částí kanálek*



Obr. 37: *Připravený mikrofluidní čip na slepení*

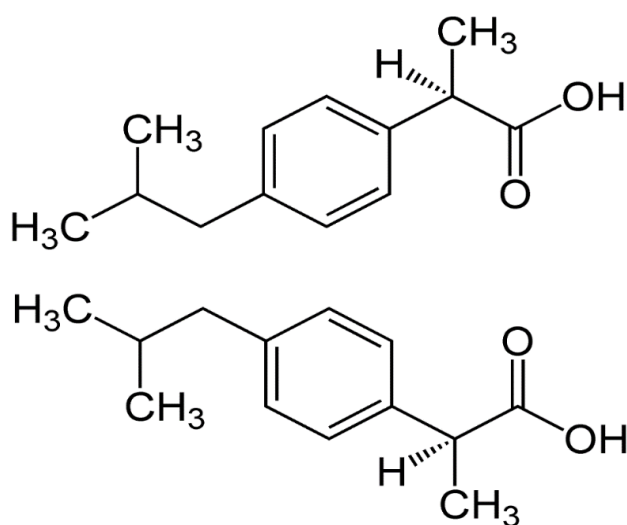
Jakmile se ale zkoušela tato struktura přilepit na sklo pomocí ručního plazmovacího přístroje, začal methanol hořet. Když methanol vyhořel, zůstala v kanálcích pouze sypká stacionární fáze, která nejspíše získala z ručního ionizátoru statický náboj a rozkukávala se po celé ploše, která měla být lepena. Díky tomu bylo znemožněno slepení obou ploch.

Aby nedocházelo z rozfoukávání stacionární fáze a aby výpary z methanolu se nezažihaly, byl do těchto kruhových částí kanálku vložen ještě filtrační papír (Obr. 38). Zbytek plochy, která měla být slepena, byla očištěna methanolem. Slepení se podařilo, avšak problém nastal při dané reakci s kolorimetrickou detekcí.



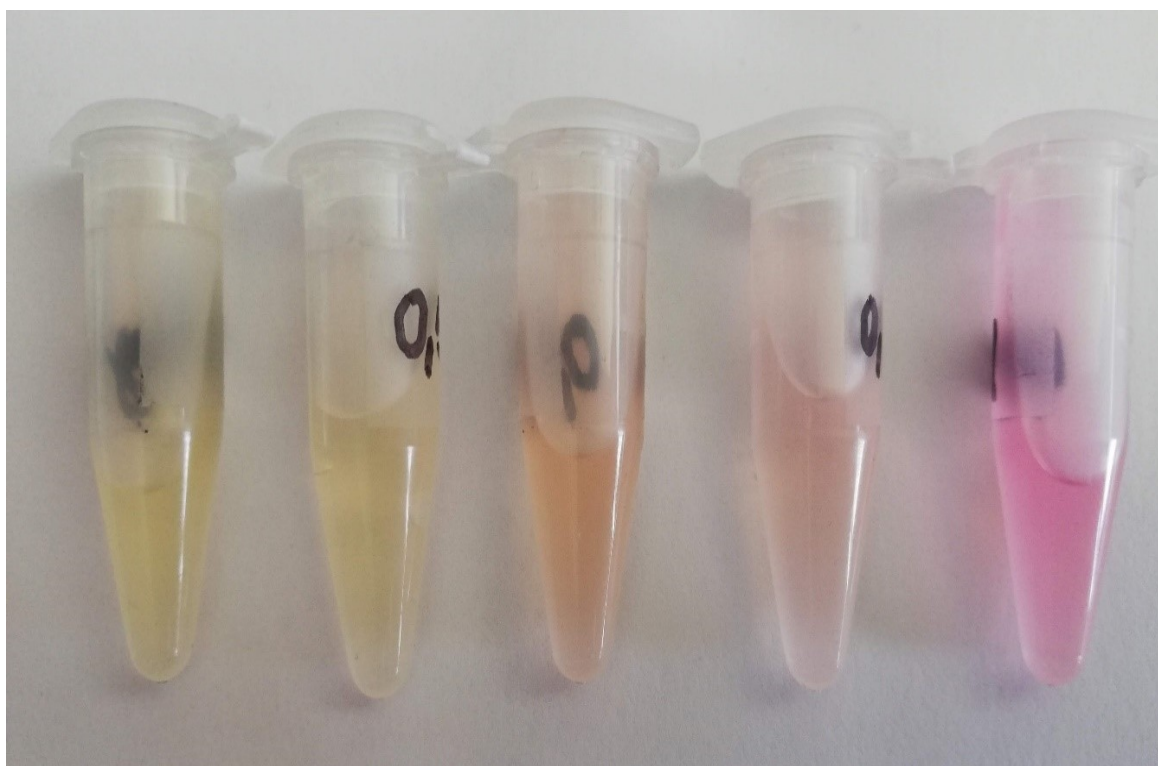
Obr. 38: Splený mikrofluidní čip se stacionární fází a filtračním papírem

Jako látka, která měla být kolorimetricky detekována, byl zvolen ibuprofen (Obr. 39). Tato účinná látka se nachází v léčivech jako je Ibalgin, Brufen, Apo-Ibuprofen či Nurofen. Jedná se o protirevmatické a nesteroidní protizánětlivé léčivo. Účinek spočívá v inhibici cyklooxygenázy a tím významně snižuje syntézu prostaglandinů, které zvyšují citlivost k bolesti daných nervových buněk. Díky snižování této syntézy dochází zhruba za půl hodiny k úlevě od bolesti, horečky a zánětu. [71]



Obr. 39: Struktura ibuprofenu [72]

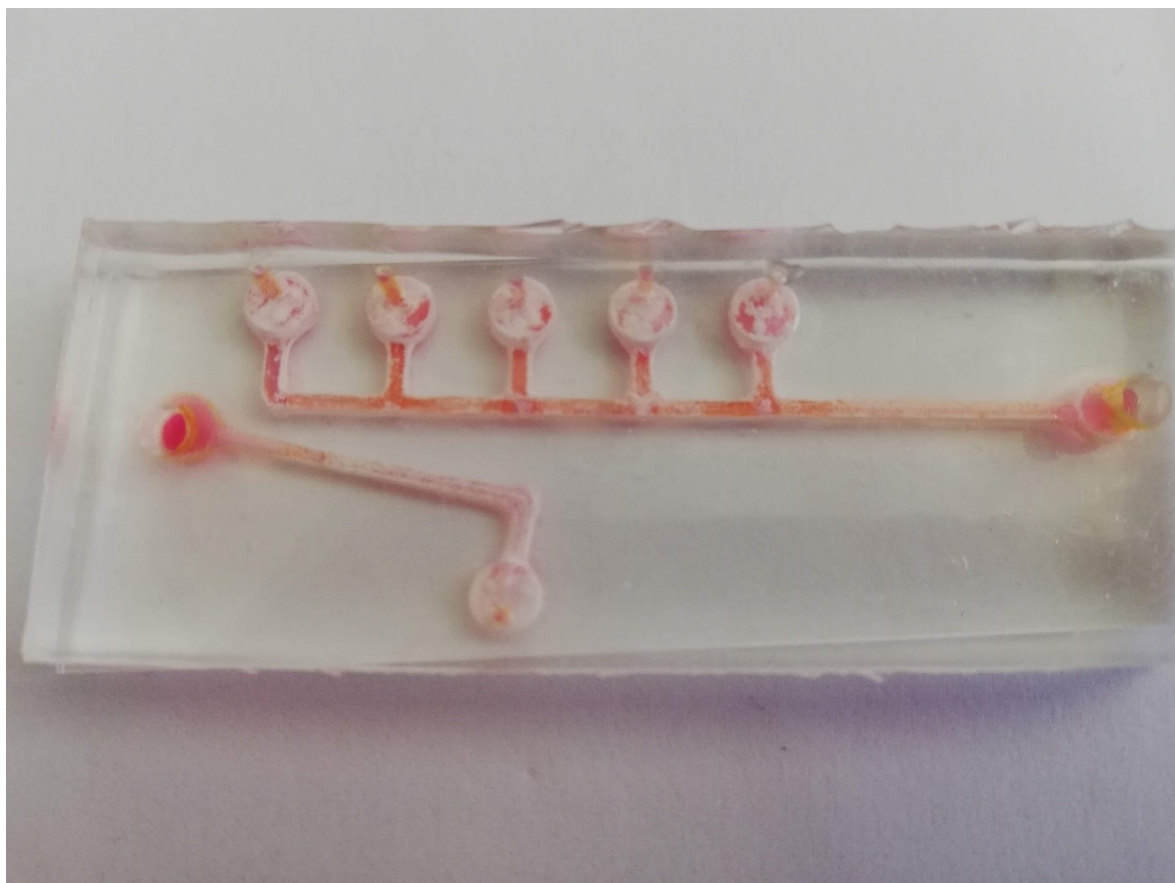
Nejdříve bylo odváženo 5 mg ibuprofenu do vialky a rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Z tohoto roztoku byla pak připravena kalibrační řada. Pro koncentraci 1 mg/ml bylo odpipetováno 200 μ l a opět doplněno 1 ml destilované vody. Podobným postupem ředění byla připravena kalibrační řada o koncentracích 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml a 0,01 mg/ml. Tato řada byla do vialek připravena celkem dvakrát, kdy do druhé řady byl přidán i reagent pro lepší porovnání této barevné škály (Obr. 40).



Obr. 40: Připravená kalibrační řada ve vialkách

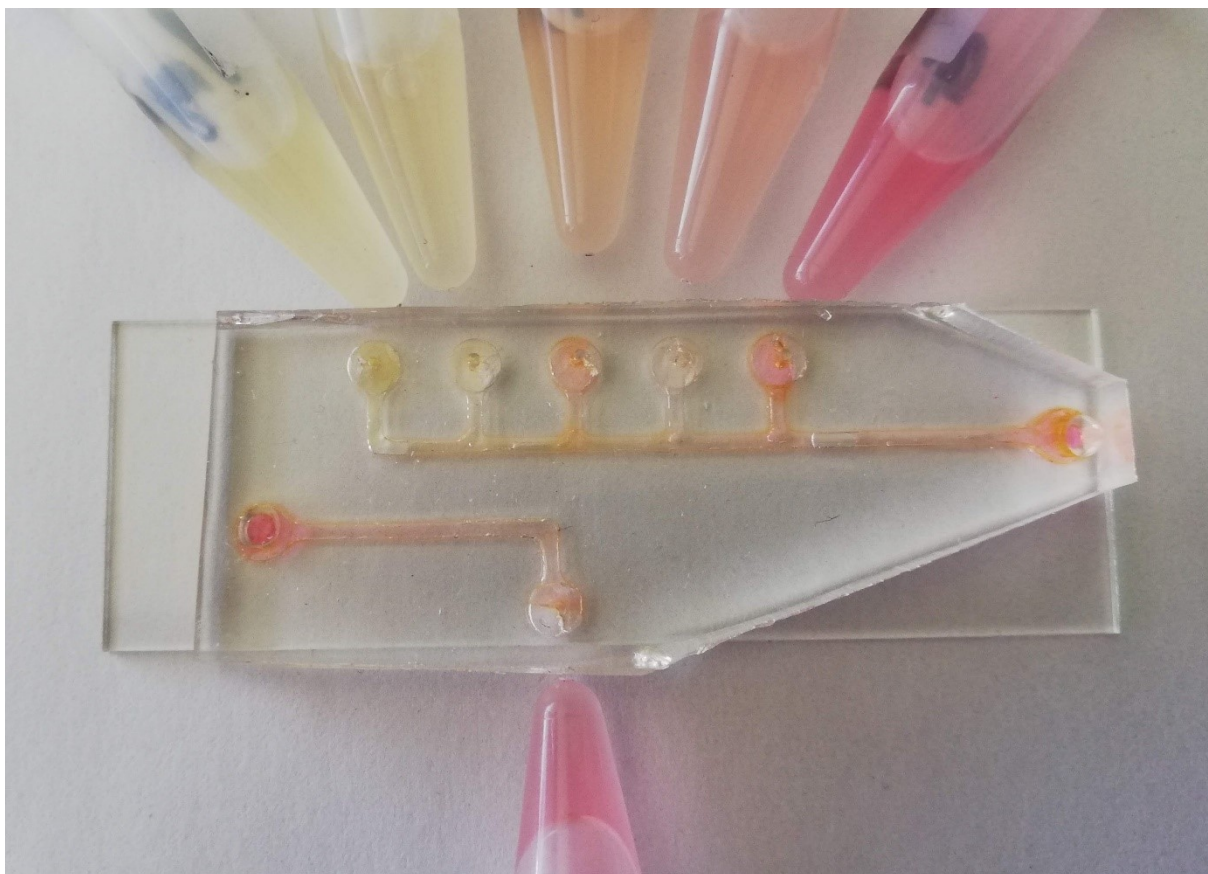
Roztok reálného vzorku byl připraven rozdrčením tablety Ibalginu v porcelánové třecí misce s tloučkem. Následně bylo přilito 5 ml destilované vody a směs se homogenizovala. Homogenní směs byla přefiltrována pomocí injekční stříkačky s mikrofiltrem o velikosti pórů 0,45 μ m. Do každého otvoru v čipu bylo nadávkováno 10 μ l daného roztoku. Jako reagent byla použita methylová červen (0,1 % roztok), kdy se smíchala 1 kapka s 1 ml destilované vody.

Ve výsledku však kolorimetrická detekce nebyla vidět, jelikož reagent přednostně zabarvil stacionární fázi v kanálcích čipu, a tak pokud nějaká reakce s ibuprofenem proběhla, nebyla na čipu vidět (Obr. 41). Proto byla tato reakce vyzkoušena na dalším čipu, na kterém už nebyla stacionární fáze ani filtrační papír.



Obr. 41: Kolorimetrická analýza na čipu se stacionární fází a filtračním papírem

U dalšího připraveného čipu se složitou strukturou byly vyřezány vstupní kruhové části trepanem velikosti 3 mm a reakční otvory velikostí 1 mm. Lepení proběhlo stejným způsobem jako u předešlých čipů. Do reakčních otvorů bylo celkem nadávkováno 40 μ l roztoků obsahující ibuprofen. Reagentem byla opět methylová červeň. V tomto případě už vznikla kalibrační řada, u které byly vidět barvy v odstínech žluté pro nejvíce koncentrovanější roztok před oranžovou barvou až po růžovou pro nejméně koncentrovaný roztok (Obr. 42).



Obr. 42: Provedená reakce ibuprofenu na čipu

Jak je z obrázku (Obr. 42) vidět, koncentrace vzorku by mohla odpovídat zhruba barvě mezi nejnižší (0,001 mg/ml) a druhou nejnižší koncentrací (0,005 mg/ml). Nevýhodou je, že když docházelo k naplňování kanálků reagentem, měly kalibrační roztoky tendenci se vytlačovat z čipu. Tím by se mohlo zabránit buď zvětšením otvorů z 1 mm na 3 mm, nebo ibuprofen rozpouštět v methanolu. Po nadávkování by se mohl nechat methanol odpařit a v otvorech by tak zůstala jen požadovaná koncentrace ibuprofenu.

I přesto, že tento experiment nevedl k tvorbě finálního čipu pro vlastní kolorimetrické stanovení ibuprofenu, lze říct, že vzniklý problém nebyl v tvorbě čipu jako takovém. Technologie výroby čipu se ukázala jako spolehlivá a opakovatelná. Problém nastal až v oblasti detekce, která ale nebyla cílem této diplomové práce. Díky tomu můžeme říct, že by obecně tato technologie výroby čipů našla uplatnění jak ve forenzních vědách, tak i ve farmaceutickém průmyslu.

ZÁVĚR

Závěrem této práce je to, že se podařilo připravit mikrofluidní čip z PDMS a skla, kdy kanály byly vytvořeny pomocí struktur vytisknutých na 3D tiskárně. PDMS a sklo byly k sobě přilepeny pomocí ručního ionizátoru. Na takhle připravených čipech byl otestován segmentovaný tok, zadržení magnetických mikročástic pomocí magnetického pole a izotachoforické rozdělení směsi organických barviv. Závěr praktické části se věnoval vytvoření složitějšího mikrofluidního čipu, na kterém byla provedena detekce ibuprofenu pomocí vizuální kolorimetrie. Díky výsledkům této práce lze říct, že popsaná technologie výroby PDMS čipů využívající 3D tisk a lepení na sklo, je úspěšná, levná a může být velice zajímavou alternativou ke klasické výrobě mikrofluidních čipů. Díky tomu může jistě najít uplatnění ve všech odvětvích analytické chemie, a to jak ve forenzních vědách, tak i ve farmaceutickém průmyslu.

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obr. 1: 3D tisk pomocí slinování písku [12] | 16 |
| Obr. 2: Návrh 3D tiskárny na stavbu domů od společnosti ICON Vulcan [13]..... | 17 |
| Obr. 3: 3D tisk domu – nanášení jednotlivých vrstev na sebe [14]..... | 18 |
| Obr. 4: Jablonského diagram [35] | 24 |
| Obr. 5: Schématický náčrt fluorescenčního detekčního systému LIT [32]..... | 25 |
| Obr. 6: Náčrt měření gradientu indexu lomu (RIG) [32] | 27 |
| Obr. 7: Ramanův a Rayleighův rozptyl [38] | 28 |
| Obr. 8: ISE čip (A-schématický náčrt, B-měřítka diagramu) [32]..... | 30 |
| Obr. 9: Schéma měření vodivosti [47]..... | 32 |
| Obr. 10: Schématický náčrt hmotnostního spektrometru [30] | 33 |
| Obr. 11: Schéma mikrofluidního systému určeného k měření pomocí NMR [32] | 36 |
| Obr. 12: Schéma zařízení pro kolorimetrickou analýzu krevního hematokritu pomocí chytrých telefonů [28, 54]..... | 37 |
| Obr. 13: Jednotlivé typy mikrofluidních čipů pro PCR [1] | 45 |
| Obr. 14: 3D tiskárna a detail tisku rovných struktur kanálů | 47 |
| Obr. 15: Zdeformovaná struktura z BVOH | 48 |
| Obr. 16: Struktury v PDMS držící se u dna a povrchu | 49 |
| Obr. 17: Vzniklé kanály s PDMS po vyjmutí struktur | 50 |
| Obr. 18: Nekompaktní PDMS | 50 |
| Obr. 19: Plazmovací zařízení..... | 51 |
| Obr. 20: Ruční ionizátor [26]..... | 52 |
| Obr. 21: Koronární výboj upravující povrch lepených částí | 52 |
| Obr. 22: Test průchodnosti kanálků a pevnosti spoje pomocí BFM | 53 |
| Obr. 23: Mikroskopický snímek průřezu kanálu | 54 |
| Obr. 24: Tři typy kanálků – tvar T, tvar kříže a jednoduchý rovný kanál | 55 |

| | |
|---|----|
| Obr. 25: Průchod obarvené vody BFM přes magnetické mikročástice | 55 |
| Obr. 26: Zařízení zajišťující stabilní průtok a snímek segmentovaného toku | 56 |
| Obr. 27: Pohyb barviva elektrokineticky do tvaru L | 58 |
| Obr. 28: Migrace směsi barviv přes krátký kanál..... | 59 |
| Obr. 29: Separace barviv ze směsi na dlouhém kanálku | 60 |
| Obr. 30: Návrh struktury složitějšího čipu | 61 |
| Obr. 31: Vyjmutí PDMS z Petriho misky..... | 62 |
| Obr. 32: Vyloupenutí struktur kanálků z PDMS | 62 |
| Obr. 33: Vzniklé kanálky v PDMS a struktury nachystané k dalšímu použití | 63 |
| Obr. 34: Ořezávání PSMD na požadovanou velikost pomocí odlamovacího nože..... | 63 |
| Obr. 35: Vyřezávání kruhových otvorů pomocí trepanu | 64 |
| Obr. 36: Aplikování stacionární fáze do kruhových částí kanálků..... | 64 |
| Obr. 37: Připravený mikrofluidní čip na slepení | 65 |
| Obr. 38: Slepěný mikrofluidní čip se stacionární fází a filtračním papírem | 66 |
| Obr. 39: Struktura ibuprofenu [72]..... | 66 |
| Obr. 40: Připravená kalibrační řada ve vialkách | 67 |
| Obr. 41: Kolorimetrická analýza na čipu se stacionární fází a filtračním papírem | 68 |
| Obr. 42: Provedená reakce ibuprofenu na čipu | 69 |

SEZNAM LITERATURY

- [1] J. Hřava, 3D tisk a jeho využití v technickém vzdělání, bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice 2015.
- [2] <http://www.o3d.cz/3d-tisk/%C5%A1t%C3%ADtky/historie-3d-tisku/>, staženo 9. září 2018.
- [3] <https://www.cad.cz/component/content/article/3738.html>, staženo 29. března 2019.
- [4] <http://www.jprint3d.cz/aktuality/3d-tisk-v-medicine>, staženo 29. března 2019.
- [5] <https://www.hairlosscure2020.com/category/3d-bioprinting/?fbclid=IwAR2HndVjzgxBxLJG6OsnMoLjDTZtzpnwC6Jry-FZnvwF0Elw4nmTd4t9zyk>, staženo 29. března 2019.
- [6] <file:///C:/Users/AI%C4%8Da/Downloads/OT2-8.-Aditivn%C3%AD-metody.pdf>, staženo 29. března 2019.
- [7] <https://www.3dhubs.com/knowledge-base/introduction-metal-3d-printing>, staženo 29. března 2019.
- [8] <https://www.mobilmania.cz/bleskovky/stahni-si-a-vytiskni-veceri-vedci-predstavili-3d-tiskarnu-na-jidlo/sc-4-a-1335924/default.aspx>, staženo 29. března 2019.
- [9] https://www.idnes.cz/technet/technika/3d-tiskarna-natural-machines-lynette-kucsma.A141104_151119_tec_technika_nyv, staženo 29. března 2019.
- [10] <https://3dprintingindustry.com/news/elon-musk-shows-3d-printing-powers-mission-colonize-mars-96417/>, staženo 29. března 2019.
- [11] <https://essay.utwente.nl/69808/1/Design%20of%20a%20solar%20sand%20printer.pdf>, staženo 25. března 2019.
- [12] <https://kayserworks.com/#/798817030644/>, staženo 25. března 2019.
- [13] <https://all3dp.com/2/concrete-3d-printing-how-to-do-it-and-application/>, staženo 28. března 2019.
- [14] <http://www.totalkustom.com/gallery.html>, staženo 28. března 2019.

- [15] P. Smejkal, F. Foret, Mikrofluidika v bioanalytické instrumentaci, Chem. Listy 106 (2012) 104–112.
- [16] L. Hárendarčíková, Vývoj miniaturizovaných nízkonákladových testů pro klinickou a forenzní analýzu, diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc, 2014.
- [17] S. K. Sia, G. M. Whitesides, Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies, Electrophoresis 24 (2003) 3563–3576.
- [18] P. A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyes, A. Manz, Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standards Operations and Applications, Anal. Chem. 74 (2002) 2637–2652.
- [19] J. C. McDonald, G. M. Whitesides, Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices, Acc. Chem. Res. 35 (2002) 491–499.
- [20] D. J. Beebe, G. A. Mensing, G. M. Walker, Physics and applications of microfluidics in biology, Annu. Rev. Biomed. Eng. 4 (2002) 261–286.
- [21] Y. Xia, E. Kim, X. M. Zhao, J. A. Rogers, M. Prentiss, G. M. Whitesides, Complex Optical Surfaces Formed by Replica Molding Against Elastomeric Masters, Science 273 (1996) 347–349.
- [22] Y. Xia, G. M. Whitesides, Reduction in the Size of Features of Patterned SAMs Generated by Microcontact Printing with Mechanical Compression of the Stamp. Adv. Mater. 7 (1995) 471–473.
- [23] Y. Xia, G. M. Whitesides, Extending Microcontact Printing as a Microlithographic Technique, Langmuir 13 (1997) 2059–2067.
- [24] M. Chaudhury, Self-assembled monolayers on polymer surfaces, Biosens. Bioelectron. 10 (1995) 785–788.
- [25] G. S. Ferguson, M. K. Chaudhury, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides. Monolayers on disordered substrates—Self-assembly of alkyltrichlorosilanes on surface-modified polyethylene and poly(dimethylsiloxane), Macromolecules 26 (1993) 5870–5875.
- [26] J. Koštejn, Nízkonákladová mikrofluidika pro analýzu biologicky aktivních látek, diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2016.
- [27] S. Ahuja, S. Scypinski, Handbook of modern pharmaceutical analysis, Academic Press, San Diego, CA 2001, ISBN 01-204-5555-2.
- [28] S. C. Kim, U. M. Jalal, S. B. Im, S. Ko, J. S. Shim, A smartphone-based optical platform for colorimetric analysis of microfluidic device, Sensors Actuators B: Chemical, 239 (2017) 52–59.

- [29] R. Karlíček, *Analytická chemie pro farmaceuty*, čtvrté nezměněné vydání, Karolinum, Praha 2013, ISBN 978-80-246-2202-6.
- [30] P. Klouda, *Moderní analytické metody*. druhé upravené a doplněné vydání, Ostrava 2003, ISBN 80-863-6907-2.
- [31] <http://www.sc-brno.cz/blog/kolorometrie>, staženo 25. března 2019.
- [32] P. C. H. Li, *Fundamentals of microfluidics and lab on a chip for biological analysis and discovery*, Boca Raton, FL 2010, ISBN 14-398-1855-X.
- [33] app.evim.cfme.net/default.aspx?id=674&dwn=138, staženo 25. března 2019.
- [34] <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/542-zaklady-kolorimetrie>, staženo 25. března 2019.
- [35] N. Cibiček, J. Vacek, *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2014, ISBN 978-80-244-3951-8.
- [36] I. Němcová, P. Rychlovský, L. Čermáková, *Spektrometrické analytické metody*, druhé vydání, Karolinum, Praha 2004, ISBN 80-246-0776-X.
- [37] N. Burggraf, B. Krattiger, N. F. de Rooij, A. Manz, A. J. de Mello, Holographic refractive index detector for application in microchip-based separation systems, *Analysis*, 123 (1998) 1443–1447.
- [38] https://web.vscht.cz/~koplikr/7_FA_IR_Raman_2014.pdf, staženo 22. února 2019.
- [39] <http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>, staženo 22. února 2019.
- [40] R. Keir, E. Igata, M. Arundell, W. E. Smith, D. Graham, C. McHugh, J. M. Cooper, SERRS, In situ substrate formation and improved detection using microfluidics, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 1503–1508.
- [41] P. Hinsmann, J. Frank, P. Svasek, M. Harasek, B. Lendl, Design, simulation and application of a new micromixing device for time resolved infrared spectroscopy of chemical reactions in solution, *Labchip*, 1 (2001) 16–21.
- [42] T. Pan, R. T. Kelly, M. C. Asplund, A. T. Woolley, Fabrication of calcium fluoride capillary electrophoresis microdevices for on-chip infrared detection, *J. Chromatogr.*, 1027 (2004) 231–235.

- [43] R. Tantra, A. Manz, Integrated potentiometric detector for use in chip-based flow cells, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2875–2878.
- [44] I. H. A. Badr, R. D. Johnson, M. J. Madou, L. G. Bachas, Fluorescent ion-selective optode membranes incorporated onto a centrifugal microfluidics platform, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 5569–5575.
- [45] http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics_czechrepublic/cs_CZ/documents/Labor_Aktuell/LA2002/LA0302/opti.pdf, staženo 21. února 2019.
- [46] J. Hüller, M. T. Pham, S. Howitz, Thin layer copper ISE for fluidic mikrosystém, *Sensors Actuators*, 91 (2003) 17–20.
- [47] <http://www.kompy.info/konduktometrie--m-se-elektrick-vodivost-roztoku-migrace-iont-d.html>, staženo 1. března 2019.
- [48] V. Stučka, *Instrumentální metody chemické analýzy*, třetí vydání, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 1996, ISBN 80-706-7613-2.
- [49] X. Wang, L. Yi, N. Mukhitov, A. M. Schrell, R. Dhumpa, M. G. Roper, Microfluidics-to-mass spectrometry: A review of coupling methods and applications, *J. Chromatogr. A*. 20 (2015) 98–116.
- [50] S. L. S. Freire, H. Yang, A.R. Wheeler, A practical interface for microfluidics and nanoelectrospray mass spektrometry, *Electrophoresis*, 29 (2008) 1836–1843.
- [51] R. S. Ramsey, J. M. Ramsey, Generating electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1174–1178.
- [52] D. P. Little, T. J. Cornish, M. J. O'Donnell, A. Braun, R. J. Cotter, H. Koster, MALDI on a chip: analysis of arrays of low-femtomole to subfemtomole quantities of synthetic oligonucleotides and DNA diagnostic products dispensed by a piezoelectric pipet, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4540–4546.
- [53] <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/im-nmr-2010-1288706869.pdf>, staženo 31. března 2019.
- [54] L. Hárendarčíková, J. Petr, Smartphones & microfluidics: Marriage for the future, *Electrophoresis*, 39 (2018) 1319–1328.

- [55] A. Panáček, A. Balzerová, *Základy toxikologie a Ekotoxikologie*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2013, ISBN 978-80-244-3913-6.
- [56] M. Balíková, A. Balzerová, *Forenzní a klinická toxikologie: laboratorní toxikologická vyšetření*, druhé doplněné vydání, Galén, Praha 2017, ISBN 978-80-7492-304-3.
- [57] R. Vrzal, *Základy toxikologie*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2014. ISBN 978-80-244-4103-0.
- [58] S. Caroli, G. Záray, *Analytical techniques for clinical chemistry: methods and applications*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken 2012.
- [59] B. Levine, *Principles of forensic toxicology*, fourth edition, AACC Press, Washington, DC 2013, ISBN 978-1-59425-158-0.
- [60] B. Stuart, *Forensic analytical techniques*, Chichester, West Sussex, United Kingdom 2013, ISBN 978-047-0687-284.
- [61] T. Gucký, *Toxikologie omamných a psychotropních látek*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2015, ISBN 978-80-244-4537-3.
- [62] J. A. Lieberman, A. Tasman, *Handbook of psychiatric drugs*, John Wiley & Sons Chichester, England, 2006.
- [63] <https://www.substitucni-lecba.cz/opioidy>, staženo 24. března 2019.
- [64] <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2015-236>, staženo 23. března 2019.
- [65] <https://www.prevcentrum.cz/informace-o-drogach/benzodiazepiny/>, staženo 24. března 2019.
- [66] <https://www.psychiatriepropraxi.cz/pdfs/psy/2009/05/10.pdf>, staženo 24. března 2019.
- [67] <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/psychostimulacni>, staženo 23. března 2019.
- [68] <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/dna-cipy-microarrays-a-jejich-vyuziti-v-onkologicke-diagnostice/>, staženo 1. dubna 2019.
- [69] https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/C6250/um/itp_1.pdf, staženo 2. dubna 2019.
- [70] http://knihy.pavko.cz/userFiles/mam_soubory/elektomigr.pdf, staženo 2. dubna 2019.
- [71] <https://www.linkos.cz/slovnicek/ibuprofen-ucinna-latka/>, staženo 2. dubna 2019.

[72] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/95/Ibuprofen-Enantiomere_Strukturformeln.png, staženo 2. dubna 2019.