

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Többcsatornás mikrofluidikai rendszerek fejlesztése kromatográfiai  
alkalmazásokhoz**

**Nagy Andrea**

Témavezető: Dr. Gáspár Attila



**DEBRECENI EGYETEM**  
Kémia Doktori Iskola

Debrecen, 2015.



## I. Bevezetés és célkitűzések

A mikrofluidikai kutatások robbanásszerű fejlődésnek indultak az utóbbi években. A lab-on-a-chip rendszerek fejlesztése, tanulmányozása és analitikai alkalmazása jelenleg is igen intenzíven folyik. Napjainkban a nagyszámú minták gyors és viszonylag olcsó folyadékkromatográfiás elemzésére irányuló egyre nagyobb igény miatt a mikrofluidikai kutatások egyik iránya a kromatográfiás elválasztástechnikák miniatürizálása, a különböző kromatográfiás töltetek mikrocsipben való kialakítása.

A mikrofluidikai csipek analitikai alkalmazásának számos előnye ismeretes. Az egymás után gyorsan elvégezhető mérésekhez nanoliternyi térfogatú mintamennyiségekre van szükség, a mérések során felhasznált reagensek, oldószerek mennyisége is jóval kevesebb, mint a hagyományos analitikai módszerek esetén. Másik nagy előnyük, hogy a mikrocsipek készítésének, működtetésének költségei lényegesen kevesebbek, mint a nagy analitikai műszereké, használatuk gazdaságos és környezetkímélő. Mostanára a mikrocsipekben nagyszámú bio- és környezetanalitikai módszert fejlesztettek ki és írtak le az irodalomban.

Mindezek ellenére viszonylag kevés mikrocsip alapú kromatográfiás rendszert fejlesztettek ki, ennek okai a kromatográfiás töltetek kialakításának nehézségeiben keresendők. Több olyan rendszer ismert, ahol a kromatográfiás töltetek mikrocsipbe integrálásához valamilyen fritet (szűrőszerű akadályt) helyeztek a csatornába, ezzel visszatartva a részecskéket. A fritek alkalmazása azonban különböző technikai jellegű problémákat okoz (kialakításuk nehézkes, buborékok képződését katalizálhatják).

Munkánk során kromatográfiás elválasztási technikák miniatürizálását, különféle kromatográfiás töltetek mikrofluidikai csipben való kialakítását és alkalmazását tűztük ki célul. Ehhez olyan reprodukálható, gyors töltési módszert szerettünk volna kifejleszteni, amelynél a kromatográfiás részecskéket nem frit segítségével tartjuk vissza a mikrocsipek csatornáiban.

További célunk volt olyan többcsatornás mikrofluidikai rendszerek kifejlesztése, amelyek párhuzamos csatornáiban több, akár különböző kromatográfiás töltet kialakítására van lehetőség, amelyeken egyidejűleg végezhetünk párhuzamos elválasztásokat.

A mikrofluidikai rendszerek jelenlegi alkalmazásának egyik hátránya a rendszerekhez kapcsolt érzékeny detektálási módszerek hiánya. Az általunk kifejlesztett mikrocsipekhez megvizsgáltuk az atomspektroszkópiás detektorok alkalmazhatóságát.

## II. Alkalmazott készülékek és módszerek

### Mikrofluidikai csipek készítése

A csatornarendszerek tervezéséhez, megrajzolásához AutoCAD szoftvert használtunk, amiket ezt követően nagyfelbontású nyomtatóval (3600 dpi) átlátszó fóliára nyomtattunk (a csatornák fekete alapon áttetsző mintázatokként jelennek meg). Az öntőforma alapjaként/hordozójaként szolgáló 7,6 cm átmérőjű szilícium lapon negatív típusú fényérzékeny anyagból (SU-8 2025, Microchem, Newton, MA, USA) vékony réteget alakítottunk ki spincoater segítségével (3000 rpm, 30 s). Erre a fényérzékeny rétegre helyeztük rá a csatornamintázatot tartalmazó fóliát (litográfias maszkot), majd UV fényvel (365 nm, Spectroline FC-100/F lámpa, Spectronics Corporation, Westbury, New York, USA) 10 percig sugároztuk be. A fényérzékeny réteg azon részeit, amelyeket nem ért fény 1-metoxi-2-propanol-acetát előhívószerrel (mr-Dev 600, Micro Resist Technology, Berlin, Németország) mostuk le a hordozóról, így a szilícium lapon a csatornák 35  $\mu\text{m}$ -nyire kiemelkedő mintázata alakult ki.

Az így elkészült öntőformára a poli(dimetil-sziloxán) (PDMS) és a térhálósító folyadék (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA) 10:1 arányú keverékét öntöttük, majd szárítószekrényben, 65 °C-on 1 óra alatt térhálósítottuk. A megszilárdult műanyagot eltávolítottuk az öntőformáról és megfelelő méretre vágtuk, majd 0,7 mm átmérőjű portokat lyukasztottunk a csatornák végeinél. A csatornamintázatot tartalmazó PDMS lapot üveg tárgylemezhez kötöttük levegő plazma (Harrick PDC-32G, Harrick Plasma, Ithaca, New York, USA) segítségével, így zárva le a csatornákat.



**1. ábra** A három különálló csatornarendszert tartalmazó mikrofluidikai csip készítéséhez használt öntőforma (bal oldali kép) és a különböző festékekkel megtöltött üvegre ragasztott mikrocsip (jobb oldali kép).

### **Mikrocsipek vizsgálata, detektálási módszerek**

A mikrocsipekbe Ismatec IPC típusú perisztaltikus pumpa segítségével juttattuk be a folyadékokat, a bennük végbemenő folyamatokat, elválasztásokat Zeiss típusú Axio Observer A1 kutató, inverz mikroszkóp segítségével figyeltük meg. A videókat, képeket AxioCam ICC3 típusú nagyfelbontású digitális kamera és az AxioVision 4.6.3 kép és videó rögzítő program segítségével készítettük.

A mikrocsipeken elválasztott, dúsított Cr(VI)-ot 240 FS típusú lángatomabszorpciós (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) és lézerindukált plazma (LIBScan 25+, Applied Photonics Ltd., Skipton, New Yorkshire, UK) spektroszkópiás módszerrel detektáltuk.

A mikrocsipek csatornájában áramoltatott folyadékok viselkedését COMSOL Multiphysics (COMSOL, Inc., Palo Alto, CA, USA) programmal szimuláltuk.

### III. Új tudományos eredmények

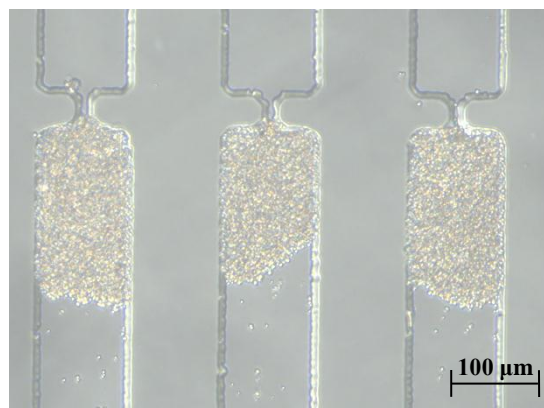
**1. Kromatográfiai tölteteket alakítottunk ki a poli(dimetil-sziloxán)-ból készített mikrofluidikai csipekben fritek nélkül a csatornában létrehozott szűkületek segítségével.**

**1.1 A csatornák magasságának megfelelő mértékű csökkentésével kialakított szűkületet használva bizonyítottuk, hogy a kromatográfiai részecskék tartósan visszatarthatóak a csatornában.**

A csatornamagasság 15-20  $\mu\text{m}$ -re csökkentése már elegendőnek bizonyult az 5  $\mu\text{m}$ -es kromatográfiai részecskék visszatartásához. Ezt a magasságcsökkentést legegyszerűbben a mikrocsip készítéséhez használt öntőformán található csatornamintázat megfelelő helyen történő elvékonyításával értük el.

**1.2 A csatornarendszerek geometriájának tervezése során a csatornák szélességének megfelelő mértékű csökkentésével alakítottunk ki kromatográfiai részecskék visszatartására alkalmas szűkületeket.**

A mikrocsip csatornájának szélességét 100  $\mu\text{m}$ -ról 15-20  $\mu\text{m}$ -re csökkentettük, az így elkészített csatornában reprodukálhatóan lehetett 5-10  $\mu\text{m}$  átmérőjű részecskékből kromatográfiai tölteteket kialakítani. A töltetek hossza szabadon változtatható 200  $\mu\text{m}$ -tól a több cm hosszúságig. A módszer alkalmazásával többcsatornás rendszerekben is kialakíthatóak kromatográfiai töltetek.



**2. ábra** Kromatográfiai töltetek kialakítása párhuzamos csatornában a csatorna szélességének csökkentésével kialakított szűkületek segítségével.

### **1.3 Bizonyítottuk a zárókóhatás fontosságát a mikrofluidikai csatornában az 1.1 és 1.2 tézispontokban ismertetett módszerekkel történő kromatográfiás töltetkialakítás során.**

Különböző átmérőjű szűkületek esetén vizsgáltuk a kialakított töltetek stabilitását. Meghatároztuk, hogy a részecskék átmérőjénél legfeljebb háromszor nagyobb szűkületátmérők esetén még stabil töltet alakítható ki a fellépő zárókóhatásnak köszönhetően. (Például 15  $\mu\text{m}$ -es szűkületet alkalmazva, az 5  $\mu\text{m}$ -es részecskék esetén stabil töltet keletkezik, de a szűkület átmérőjét 25  $\mu\text{m}$ -re növelve, a kialakult töltet instabillá vált, idővel annak felbomlása volt megfigyelhető.)

Megállapítottuk, hogy a kialakított szűkületek hosszának nincs hatása a töltet stabilitására abban az esetben, ha ez a hossz legalább kétszerese a visszatartandó kromatográfiás részecske átmérőjének. (Az 5  $\mu\text{m}$ -es részecskék esetén így elegendő egy 10  $\mu\text{m}$  hosszú szűkület, de a csatornarendszereinkben általában 50  $\mu\text{m}$  hosszú szűkületeket hoztunk létre.)

A mikrocseppek öntéséhez használt, fotolitográfiás eljárással készített öntőformán már eleve kialakítottuk a csatornarendszereken belüli szűkületek. E szűkületek átmérője jelentősen befolyásolható volt a kialakított fényérzékeny réteg vastagságával, illetve a litográfiás eljárás során alkalmazott besugárzási idő hosszával is. Megfigyeltük, hogy a vékonyabb fényérzékeny réteg vagy a hosszabb besugárzás idő használata szélesebb csatornákat, és így szélesebb szűkületeket eredményezett.

## **2. Olyan többcsatornás mikrofluidikai rendszereket fejlesztettünk ki, amelyek csatornáiban kialakított tölteteken egyidejűleg több kromatográfiás elválasztás is végrehajtható.**

### **2.1 A mikrocseppekben 3-12 párhuzamos kromatográfiás töltetet alakítottunk ki az 1.2 tézispontban tárgyalt módszer segítségével.**

Bemutattuk, hogy egy mikrocshipen 12 párhuzamos csatornában kialakítható kromatográfiás töltet mérete a mikrocship méreteihez képest nagyon kicsi, az egy mikrocshipen elhelyezhető kromatográfiás töltetek számát inkább a minta bejuttatására szolgáló portok száma és elrendezése határozta meg. Abban az esetben, ha egyetlen injektáló részt és kimeneti portot tartalmaz a csatornarendszer, akkor a párhuzamos csatornák, és így a kromatográfiás töltetek száma elérheti akár a 60-at is.

Többcsatornás rendszereinknek két fő elrendezése lehet: egymástól független és egymással kapcsolatban álló csatornarendszerek. Az egymástól független csatornarendszerek esetén minden egyes szeparációs csatornarész külön kimeneti porttal (kivezetéssel) rendelkezik, ezért különböző kromatográfiás

töltetek kialakítására van lehetőség. Az egymással kapcsolatban álló rendszerek csatornái pedig egy közös kimeneti portba futnak össze, így a töltetek ezen porton keresztül egyidejűleg alakíthatóak ki. Mindkét rendszerben egy vagy több minta egyidejű elemzésére van lehetőség attól függően, hogy az egyes töltetekhez külön injektáló rész tartozik-e.

**2.2 Bizonyítottuk, hogy a minta injektálásához egy olyan többágú keresztvezeték szükséges, ahol az egyik ágon bejuttatott minta úgy oszlik el a többi csatorna felé, hogy a kromatográfiás töltet irányába a mintaoldatnak csupán kis töredéke áramlik.**

Például egy 1 mm hosszú, 5 µm-es hagyományos C18-as kromatográfiás részecskékből álló töltetre 1 µl mintát injektálva a töltet felé kb. 1 nl térfogatú minta áramlik a nagy hidrodinamikai ellenállás miatt. Megfigyeltük, hogy a töltet felé jutó minta térfogata nem függ az alkalmazott áramlási sebesség mértékétől, csak az eredeti mintatérfogattól.

Megállapítottuk, hogy háromtöltetes rendszerek esetén a közös mintainjektáló részen bejuttatott mintadugó egyenlő arányban oszlik el a párhuzamos töltetek között, így abban az esetben, ha a töltetek hidrodinamikai ellenállása megegyezik, minden egyes töltetre azonos térfogatú minta jut.

**3. Tanulmányoztuk a mikrocsipben kialakított különböző típusú töltetek kromatográfiás sajátosságait.**

**3.1 Kétkomponensű keveréket választottunk el mikrofluidikai rendszerekben kialakított 5 µm-es, C18-as hagyományos kromatográfiás tölteteken.**

Az elválasztáshoz kevesebb, mint 30 másodpercre volt szükség. Megállapítottuk azokat a teljesítményjellemzőket, melyek alkalmasak a kromatográfiás töltetek jellemzésére. A 2 mm hosszúságú töltetre vonatkozó elméleti tányérmagasság értéke 0,75 µm, az elméleti tányérszám 2500 (1 330 000/m) volt. A Brillantkék FCF (E133) festékre meghatározott teljes kapacitás ugyanezen a tölteten  $7,5 \cdot 10^{-12}$  mol/µm értéknek adódott.

**3.2 A mikrofluidikai csipek csatornáiban különbözőképpen funkcionális felületű aerogélekből alakítottunk ki kromatográfiás tölteteket.**

A mikrocsipbe töltés előtt az aerogél tömböt porítottuk, a részecskékből metanolos szuszpenziót készítettünk, melyet üleptettünk, hogy 1 µm körüli, viszonylag azonos méretű részecskéket kapjunk.

Az ételfestékek segítségével tesztelt aerogél tölteteken ötvenszeres dúsítást értünk el és bemutattuk, hogy két ételfesték elválasztásához mindössze 6-8 másodpercre van szükség (0,5 mm hosszú, C16 oldallánccal módosított

szilika aerogél töltet, izokratikus körülmények (35% metanol-víz tartalmú mobil fázis) 1 nl ételfesték keverék minta, 3 bar).

### **3.3 Három különböző kromatográfias töltetet tartalmazó rendszerben párhuzamosan végeztünk kromatográfias elválasztásokat.**

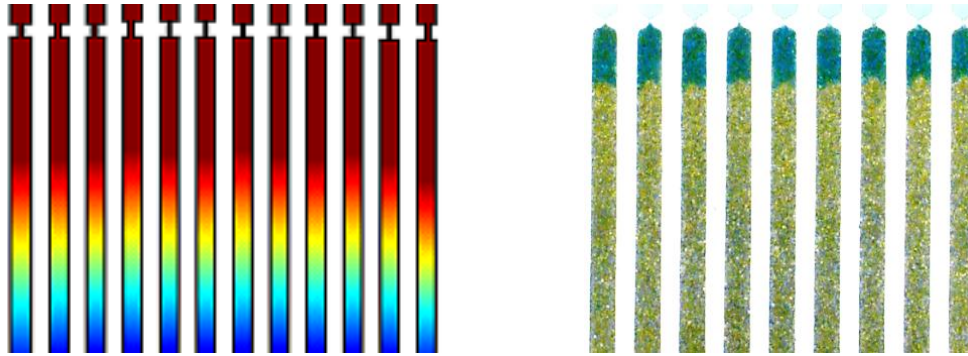
A három különböző (RP-1, C8 és C18), azonos méretű (5  $\mu\text{m}$ ) kromatográfias részecskékből álló tölteten ételfestékeket választottunk el izokratikus körülmények között (mozgó fázisként 25% metanol-víz elegyet alkalmaztunk). A mikrocshipbe injektált minta térfogata a töltetek jelenléte által kifejtett hidrodinamikai ellenállás következtében töredékére csökkent (lásd 2.2 tézispont), a bejuttatott mintadugó a kereszteződést követően egyenlően oszlott el a három kromatográfias töltetet tartalmazó párhuzamos csatorna között. Ezzel megmutattuk, hogy a többszörös mikrofluidikai rendszerek alkalmasak kromatográfias töltetek gyors összehasonlítására, a megfelelő töltet kiválasztására.



**3. ábra** Ételfesték keverék egyidejű elválasztása három különböző kromatográfias tölteten.

### **3.4 Demonstráltuk, hogy a szimulációs szoftverek alkalmasak a többszörös mikrofluidikai rendszerekben történő áramlások modellezésére, a csatornarendszerek geometriájának optimalizálására.**

Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a 12 mikrotöltetet tartalmazó csatornarendszerekben a párhuzamos csatornáknál mért áramlási sebességek különbözőek (0,014-0,024 mm/s), a kivezető portok felé folyamatosan csökkentek (az áramlási sebességek maximumának és minimumának aránya 2,2 volt). Az áramlási sebességek kiegyenlítésére COMSOL Multiphysics szimulációk segítségével terveztünk mintázatot, a csatornarendszer módosításával a párhuzamos csatornáknál mért legnagyobb és legkisebb áramlási sebesség arányát 1,05-re csökkentettük. A szimulációkkal optimalizált csatornarendszerekben kialakult áramlási sebességek jól egyeztek a módosított mintázatú mikrocshipben kísérletesen mért áramlási sebességekkel.



**4. ábra** A párhuzamos csatornában mért áramlási sebességek kiegyenlítése szimulációk segítségével (bal oldali kép) és a kísérletesen mért áramlási sebességek a módosított csatornamintázatban (jobb oldali kép).

#### **4. A kromatográfiás tölteteket tartalmazó mikrofluidikai rendszerekhez atomspektrometriás detektálási módszereket alkalmaztunk.**

##### **4.1 Igazoltuk, hogy a mikrofluidikai csipek lángatomabszorpciós spektrométerrel (FAAS) történő kapcsolása megvalósítható, ha a mikrocsipek tölteteinek/csatornáinak módosításával megnöveljük az atomspektrométerbe juttatott minta térfogatát.**

Meghatároztuk, hogy 30  $\mu\text{l}$  az a minimális injektálási térfogat, amely a még megfelelő reprodukálhatóságú és érzékenységű FAAS méréshez szükséges. Az ilyen térfogatú minta biztosításához a mikrocsipben 20 mm hosszú, 1 mm széles és 0,1 mm vastag 5  $\mu\text{m}$ -es C18 kromatográfiás tölteteket alakítottuk ki. Igazoltuk, hogy a kifejlesztett módszerrel Cr(VI) elválasztása/dúsítása és meghatározása végezhető el. A Cr(VI) kimutatási határa 80  $\mu\text{l}$  minta mikrocsipbe juttatásakor 0,0031  $\mu\text{g/ml}$ -es értéknek adódott.

##### **4.2 Demonstráltuk, hogy a mikrofluidikai csipekben kialakított kromatográfiás tölteteken megkötött Cr(VI) lézerindukált plazma spektroszkópia (LIBS) segítségével detektálható.**

A kromatográfiás töltetéről a mikrocsip kimeneti portjába eluált Cr(VI) oldatot gyors beszáradását követően a spektrométer lézersugarával közvetlenül elemeztük. Bizonyítottuk, hogy a kromatográfiás töltetek kisebb lézer (50 mJ) impulzusok hatására csak kevésbé roncsolódnak, így a megkötött Cr(VI) detektálása történhet az átlátszó PDMS-en keresztül, akár magán a kromatográfiás tölteten is.

#### **IV. Az eredmények hasznosításának lehetőségei**

Napjainkban a mikrofluidika az analitikai kémia egyik legintenzívebben kutatott területe, mely magában hordozza a kifejlesztett analitikai eljárások, mikrocsipek alkalmazhatóságát a legkülönbözőbb ipari, orvosdiagnosztikai és környezetanalitikai területeken, így az eredmények hasznosítási lehetőségei is széleskörűek.

Bár a mikrofluidikai csipekkel kapcsolatos kutatások jelenleg inkább alapkutatás jellegűek, sok hasznos lehetőséget rejtjenek magukban. Megfigyelhető, hogy a nagy műszergyártó cégek több olyan analitikai rendszert vezettek be piacra az elmúlt években, melyekben mikrofluidikai csipeken történt az analitikai elemzés. Az ipari alkalmazások szempontjából fontos követelmény a nagyszámú minták gyors, olcsó meghatározása. Az általunk fejlesztett mikrocsipek csatornáiban több (3, 12 vagy akár ennél is több) kromatográfiás töltet alakítható ki a párhuzamos csatornában. Ezekben a tölteteken több, párhuzamos elválasztás végrehajtására van lehetőségünk, mellyel nagymértékben csökkenthető az analitikai vizsgálatokhoz szükséges idő és a meghatározások költsége.

A párhuzamos csatornákat tartalmazó mikrocsipekben lehetőségünk van különböző töltetek kialakításával kromatográfiás töltetek gyors összehasonlítására vagy az adott analitikai feladathoz megfelelő töltet kiválasztására, így az új módszerek kifejlesztése lényegesen felgyorsulhat. A kromatográfiás részecskékkel töltött PDMS mikrocsipek gyorsan, viszonylag reprodukálhatóan készíthetőek, előállítási és működtetési költségeik csekélyek.

Mivel a gazdasági fejlődéssel egyre több és minél olcsóbb analitikai meghatározás elvégzésére van szükség a jövőben a mikrofluidikai csipeken történő analitikai elemzések széleskörű elterjedése várható.



Nyilvántartási szám: DEENK/88/2015.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy Andrea  
Neptun kód: GC83MV  
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10048170

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemény(ek) külföldi folyóiratban (3)

1. **Nagy, A.**, Baranyai, E., Gáspár, A.: Interfacing microfluidic chip-based chromatography with flame atomic absorption spectrometry for the determination of chromium(VI).  
*Microchem J.* 114, 216-222, 2014. ISSN: 0026-265X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.01.008>  
IF:3.583 (2013)
2. **Nagy, A.**, Gáspár, A.: Packed multi-channels for parallel chromatographic separations in microchips.  
*J. Chromatogr. A.* 1304, 251-256, 2013. ISSN: 0021-9673.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.065>  
IF:4.258





3. Gáspár, A., Nagy, A., Lázár, I.: Integration of ground aerogel particles as chromatographic stationary phase into microchip.

*J. Chromatogr. A.* 1218 (7), 1011-1015, 2011. ISSN: 0021-9673.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.091>

IF:4.531

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,372**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
12,372**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.04.22.

