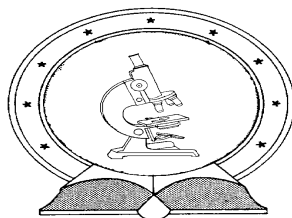


DE TTK



1949

**TÖBBCSATORNÁS MIKROFLUIDIKAI
RENDSZEREK FEJLESZTÉSE KROMATOGRÁFIÁS
ALKALMAZÁSOKHOZ**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

a szerző neve: Nagy Andrea

témavezető neve: Dr. Gáspár Attila

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Kémia Doktori Iskola
Debrecen, 2015.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola Koordinációs és analitikai kémia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2015. április 22.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Nagy Andrea doktorjelölt 2012-2015 között a fent megnevezett Doktori Iskola Koordinációs és analitikai kémia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2015. április 22.

a témavezető aláírása

**Többszörös mikrofolyadék rendszerek fejlesztése kromatográfiai
alkalmazásokhoz**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: Nagy Andrea, okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémia doktori iskolája
(Koordinációs és analitikai kémia programja) keretében
Témavezető: Dr. Gáspár Attila

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 20... .

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20... .

Tartalomjegyzék

Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke	1
1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Mikrofluidikai csipek kialakítása és analitikai alkalmazásuk	5
2.2. Kromatográfiás elválasztások módszerei	11
2.3. Kromatográfiás töltetek kialakítása mikrofluidikai csipekben..	14
2.4. Mikrofluidikai csipek kapcsolása detektálási módszerekkel.....	20
3. Kísérleti körülmények	23
3.1. Felhasznált vegyszerek és anyagok	23
3.2. Alkalmazott berendezések	24
3.2.1. A mikrocsip készítése során használt berendezések.....	24
3.2.2. A mikrocsipek alkalmazása során használt készülékek	25
3.2.3. Atomspektrométerek	26
3.3. A mikrofluidikai csipek készítése.....	27
3.4. Szimulációk COMSOL szoftverrel	31
4. Kísérleti eredmények.....	32
4.1. Kromatográfiás részecskék visszatartásának tanulmányozása ..	32
4.1.1. Átmeneti csatornaszűkület kialakítása	32
4.1.2. Szűkület kialakítása a csatorna magasságának csökkentésével.....	33
4.1.3. Szűkület kialakítása a csatorna szélességének csökkentésével.....	34
4.1.4. A zárókőhatás tanulmányozása	39
4.2. Három párhuzamos csatornát tartalmazó rendszerek	41
4.2.1. Csatornamintázatok tervezése	41
4.2.2. Kromatográfiás töltetek kialakítása mikrocsipekben	43
4.2.3. A mikrocsipben történő kromatográfiás elválasztások tanulmányozása	46
4.3. Tíz vagy több párhuzamos csatornát tartalmazó mikrofluidikai rendszerek.....	52
4.3.1. Többcsatornás mikrofluidikai rendszerek tervezése	52
4.3.2. Kromatográfiás töltetek kialakítása mikrocsipekben	54
4.3.3. A mikrocsipben történő kromatográfiás elválasztások tanulmányozása	56

4.3.3. Folyadékok áramlásának modellezése mikrofluidikai rendszerekben	58
4.4. Mikrofluidikai csipek kapcsolása atomspektrometriás detektorokkal	68
4.4.1. Kapcsolás lángatomabszorpciós spektrométerrel	68
4.4.1.1. A mikrocsipek által szolgáltatott minta térfogatának a FAAS készülék igényeihez igazítása.....	68
4.4.1.2. Cr(VI) meghatározása mikrocsip-FAAS rendszerben.	73
4.4.2. Kapcsolás lézerindukált plazma (LIBS) spektrométerhez .	77
5. Összefoglalás	81
6. Summary.....	86
7. Irodalomjegyzék	90
8. Publikációk jegyzéke.....	97
9. Köszönetnyilvánítás	103

Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

CE	kapilláris elektroforézis
CEC	kapilláris elektrokromatográfia
CN	cianopropil oldallánccal módosított szilika kromatográfiás állófázis
COMOSS	collocated monolithic stationary phase support system
C6H5	fenil oldallánccal módosított szilika kromatográfiás állófázis
C8	8 szénatom hosszúságú láncot tartalmazó szilika kromatográfiás állófázis
C16	16 szénatom hosszúságú láncot tartalmazó szilika kromatográfiás állófázis
C18	18 szénatom hosszúságú láncot tartalmazó szilika kromatográfiás állófázis
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDP	etiléndiamin és pirokatechin vizes oldata
EOF	elektroozmotikus áramlás
ESI	elektrospray ionizációs technika
E102	tartrazin (ételfesték)
E133	Brillantkék FCF (ételfesték)
FAAS	lángatomabszorpciós spektrometria
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
GC	gázkromatográfia
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
ICP-MS	induktív csatolású plazma - tömegspektrométer
LED	világító dióda
LIBS	lézerindukált plazma spektroszkópia
LIF	lézerindukált fluoreszencia
LOD	kimutatási határ
μTAS	micro total analysis system
nano-	nano-folyadékkromatográfiával kapcsolt
LC/MS	tömegspektrométer
NH2	aminopropil oldallánccal módosított szilika kromatográfiás állófázis
PDMS	poli(dimetil-sziloxán)

PEEK	poli(éter-éter-ke-ton)
PMMA	poli(metil-metakrilát)
PS	polisztirol
RP-1	metil csoporttal módosított szilika kromatográfiás állófázis
RSD	relatív standard deviáció
TBA-Br	tetrabutilammónium-bromid
TMAH	tetrametilammónium-hidroxid
UV	ibolyántúli

1. Bevezetés

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. A nagyszámú minták gyors és viszonylag olcsó folyadékkromatográfiás elemzésére irányuló egyre nagyobb igény miatt a mikrofluidikai kutatások egyik iránya az elválasztástechnikai módszerek miniatürizálása, a különböző kromatográfiás töltetek mikrocsipben való kialakítása.

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

Mindezek ellenére eddig 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 módszer kifejlesztése volt a célunk, amelynél a kromatográfiás részecskéket nem frit segítségével tartjuk vissza a csatornában. 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.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Mikrofluidikai csipek kialakítása és analitikai alkalmazásuk

A mikrofluidika az analitikai kémia egyik leggyorsabban fejlődő területe, amely nano- és pikoliternyi térfogatú folyadékok áramoltatására, elemzésére alkalmas eszközök tervezésével, előállításával, tanulmányozásával foglalkozik [1, 2]. A mikrofluidikai analitikai kutatásokhoz a fizika, a kémia, az elektronika, a mérnöki tudományok és a biotechnológia legújabb fejlesztéseit használják, ezen kutatások célja, hogy mikro- és nanofabrikációs eljárások segítségével a számítógép csipek méretével összevethető nagyságú, integrált laboratóriumokat (lab-on-a-chip) tervezzenek és készítsenek [3, 4]. Az ilyen rendszerek fejlesztése során komplett kémiai laboratóriumok eszközeinek, eljárásainak mikrocsipre való átvitele történik, annak érdekében, hogy csökkentsék a felhasznált minta- és reagensmennyiséget, az elemzések költségeit és legfőként az analízisek időtartamát.

A mikrofluidikai kutatások kezdete az 1950-es évekre tehető, amikor megalkották a ma is használatos tintasugaras nyomtatási technika alapjait [5]. Az első miniatürizált analitikai eszköz Terry nevéhez fűződik, aki 1975-ben a Stanfordi Egyetemen megalkotta az első miniatürizált gázkromatográfot [6], amely szilíciumból készült fotolitográfiás és kémiai maratási technikák alkalmazásával. A rendszer egy injektáló egységből, egy 1,5 m hosszú kolonnából, illetve hővezetőképességi detektorból állt, és néhány komponensből álló szénhidrogén elegyek elválasztására használták. Mindezen eredmények ellenére a mikrofluidikai kutatások rohamos fejlődésére csak az 1980-as évek végén, az 1990-es évek elején került sor, több kutatócsoport mikropumpákat [7, 8] és mikroszelepeket [9, 10] fejlesztett analitikai rendszerekhez.

Andreas Manz és kutatócsoportja 1990-ben közölt egy új eljárást, mely során szilíciumból készült mikrocsipben kialakított kromatográfiás oszlopot használtak analitikai elválasztásokhoz konduktometriás detektorral [11]. Ezzel egyidejűleg Manz és társai bemutatták a μ TAS (Micro Total Analysis System) technológia alapjait [12], amely a

mikrofluidikai kutatások robbanásszerű fejlődéséhez és a kereskedelmi érdeklődés növekedéséhez vezetett. A μ TAS rendszerek segítségével kis méretben végrehajthatóak a klasszikus méretű analitikai egységek által végzett műveletek. Számos előnyük miatt egyre több bioanalitikai alkalmazást fejlesztettek ki. Ma már nagyon sok területen alkalmazzák a mikrofluidikai csipeket, például környezeti és bioanalitikai elemzéseknél, immunvizsgálatoknál vagy vérminták vizsgálatra való előkészítésénél.

A mikrofluidikai csipek készítése során mikrofabrikációs eljárásokat alkalmaznak, amelyek alapjául a néhány évtizeddel ezelőtt a szilíciumalapú technológiákhoz kidolgozott módszerek és azok továbbfejlesztett változatai szolgálnak. Segítségükkel az 1 mm és az 1 μ m közötti mérettartományban készíthetünk különböző alakzatokat. A mikrofabrikációs eljárások két csoportba sorolhatóak a mikrofluidikai csipek alapjául szolgáló anyagok szerint: a szilícium-, üveg- vagy kvarcalapú kemény technológiák és az elasztomereket, műanyagokat felhasználó lágy technikák csoportjaiba [13, 14]. Ezek a mikrofabrikációs műveletek rendkívül tiszta körülményeket, úgynevezett „tisztá szobákat” (clean room) igényelnek. A „tisztá szobák” olyan helyiségek, melyek hőmérsékletét és páratartalmát szabályozzák, levegőjét szűrik és keringetik.

Az első mikrofluidikai csipek kemény módszerek felhasználásával készültek, leginkább szilícium megmunkálásával. Az ilyen eljárások alkalmazása során a mikrocsipek alapjául szilícium, üveg vagy kvarc lapokat használnak. Maratási eljárások segítségével alakítják ki a csatornák mintázataul szolgáló barázdákat, üregeket. Ezeknek az eljárásoknak két fajtája létezik: a nedves, illetve a száraz maratás [15]. A nedves maratás során folyadék fázisú kémiai anyagokkal kezelik a felület azon részeit, amelyeket nem fed a kívánt mintázatot tartalmazó maszk. (Ez a maszk készülhet fényérzékeny anyagból (fotorezisztből) fotolitográfias módszereket felhasználva. Ekkor a maratási lépések után a fotorezisztből készült maszkot acetonnal vagy más szerves oldószerrel lehet eltávolítani a szilícium vagy üveg felületről [16].) A nedves maratási eljárásoknak két fő csoportja ismert: az izotróp és az anizotróp maratási módszerek. Az izotróp maratás sebessége a tér

minden irányában azonos, végeredményeként félkör vagy trapéz alakú mélyedések keletkeznek a hordozó lapban, végrehajtásához általában savakat és azok keverékét használják [17, 18]. Abban az esetben, ha a szilícium vagy üveg hordozóban hengeres csatornák kialakítása a cél, két izotróp maratás eredményeként létrejött félkör alakú csatorna összeillesztésével kialakítható a kívánt mintázat [19]. Ezzel szemben az anizotróp maratás során a kristálytani síkok mentén történő kémiai támadás a kedvezményezettebb, így a kimart térrészt síklapok határolják, eredményeként V-alakú árkok vagy függőleges járatok keletkeznek a hordozó felületén. Az anizotróp maratáshoz leginkább KOH-ot, etiléndiamin és pirokatechin vizes oldatát (EDP), illetve tetrametilammónium-hidroxidot (TMAH) használnak [16, 20, 21]. Üveg hordozónál az anizotróp maratás nem lehetséges az üveg amorf tulajdonsága miatt.

A száraz maratás során a felületet gáz vagy plazmafázisban lévő ionos részecskékkel támadják. A kimart alakzat a nedves maratáshoz hasonlóan itt is izotróp és anizotróp lehet. Több száraz maratási eljárás is elterjedt, például a reaktív ion maratási technika [22, 23], amely során nagy energiájú ionokkal bombázzák a felületet vákuumban, ez a módszer a fizikai maratási módszerek közé sorolható. A száraz maratások kémiai módszerei közé azok az eljárások tartoznak, amelyek során a felületre elektromos térben kémiai reagenseket visznek fel, a maratás során illékony termékek keletkeznek, a hordozóban pedig kialakulnak a csatornák. Az előző két eljárás kombinációjaként létrejött fizikai-kémiai maratási módszereket használják leggyakrabban a mikrofluidikai rendszerek kialakítására [16].

A kemény módszerek hátránya a lágy módszerekkel szemben, hogy a fabrikációs lépések lassúak, a felhasznált alapanyagok törékenyek és túl drágák ahhoz, hogy eldobhatóak legyenek.

A zárt mikrofluidikai csatornák kialakításához az elkészült barázdákat, járatokat be kell fedni. A lezárás folyamata során két felületet kell tökéletesen összeilleszteni és ragasztani. Ha ez a lezárás nem tökéletes, akkor a létrejött hézagok miatt folyadékszivárgások alakulnak ki a rendszerben, vagyis az elkészült mikrofluidikai csip használhatatlan lesz [24, 25]. A lezárás legegyszerűbb formája az üveg-üveg

mikrocsipeknél alkalmazott technika, amikor is a két üveglapot összeolvasztják [26]. Az üveg-szilícium, üveg-üveg, illetve szilícium-szilícium lezárásoknál alkalmazhatnak elektromos tér által kiváltott összeolvasztásos technikákat (anódos kötés), de különböző UV fényre megkötő ragasztóanyagokat is [27].

A mikrofluidikai csipek készítésének másik lehetséges módja az ún. lágy technikák használata, amikor a mikrocsip anyagául speciális műanyagokat alkalmaznak. Kedvező tulajdonságai miatt a mikrocsipek készítéséhez legelterjedtebben használt műanyag a poli(dimetil-sziloxán) (PDMS) [28, 29].

A PDMS átlátszó, nem mérgező, nem gyúlékony, nagy viszkoelasztikuságú műanyag. Viskozitása változó a polimerizáció fokától függően (rövid láncok esetén folyékony, hosszú láncok esetén kemény, gumiszerű anyag). Mivel az ilyen mikrocsipek átlátszóak, a bennük végbemenő folyamatok könnyen megfigyelhetők. Anyaguk rugalmas, emiatt a külső behatásokkal szemben ellenállóbbak, mint az üvegből vagy szilíciumból készült mikrocsipek. A PDMS nagyon kis felületi feszültsége miatt a műanyag könnyen eltávolítható az öntőforma felületéről, amelynek mikrométeres mintázata nagy pontossággal, reprodukálhatóan készíthető el PDMS-ből. A felhasználási igényektől függően keménysége szabályozható a PDMS/térhálósító adalék arányának változtatásával. A poli(dimetil-sziloxán) hidrofób tulajdonságú anyag, de oxigénplazma alkalmazásával rövid időre hidrofíllé tehető. A plazma használatával irreverzibilisen köthető az elkészült mikrocsip üveghez, szilíciumhoz vagy műanyaghoz.

A lágy litográfias módszer elterjedése lehetővé tette a mikrocsipek gyors, egyszerű és olcsó alapanyagokból történő előállítását [30]. Ennek a technikának az alkalmazását először 1995-ben vetette fel egy kutatócsoport [31]. A lágy műanyagokból készített mikrofluidikai csipek általában háromféle eljárással készíthetők: öntőformára öntéssel (molding), préseléses öntéssel (casting), illetve mikroinjektációs öntéssel. Az öntőformába öntés során a polimer (pl. PDMS) és a térhálósító anyag keverékét egy öntőformára öntik, majd szárítószekrényben melegítik, hogy a térhálósítás végbemehessen. A

melegítés után a megkeményedett műanyagot óvatosan lehúzzák a formáról, amely alján megtalálható lesz az öntőforma mintázatának nagypontosságú másolata [32, 33]. A préseléses öntés során az öntőformát egy felmelegített deformálható műanyagba préselik. A rendszer lehűtése után az öntőformát eltávolítják az anyagról, a forma negatívja megtalálható lesz a műanyagon. Az ilyen eljárásokban leggyakrabban poli(metil-metakrilát)-ot (PMMA-t) használnak műanyagként [34], de a módszer alkalmas polisztirolból (PS) készített mikroszepek készítésére is [35]. A harmadik módszer esetén az öntőformába felmelegített, folyékony műanyagot injektálnak, amelyen lehűlés után szintén megtalálható lesz a mintázat [36, 37]. Ilyen módszerrel leginkább PMMA-ból (vagy polisztirolból) készítenek mikroszepeket, az öntőformát, melybe a műanyagot injektálják, általában szilíciumból alakítják ki nedves maratással. A mikroszepek előállítása történhet huzallenyomatos (wire imprinting) módszerrel is, amely során egy felmelegített huzalt nyomnak bele a szintén felmelegített hordozó műanyagba. A huzal eltávolítása után a műanyagban megtalálható lesz a huzal lenyomata, mint egyfajta csatorna. Az ilyen módon készített mikroszepek készülhetnek PMMA-ból [38] vagy akár plexiüvegből is [39].

Újabban a mikroszepek alapjaként szolgáló műanyag közvetlen megmunkálásával is alakítanak ki csatornahálózatokat, ekkor egy intenzív lézersugár (lézerabláció) segítségével elszublimáltatják a műanyagot, így néhány mikrométer pontossággal alakíthatóak ki a kívánt mintázatok. Az alkalmazott lézerek különböző hullámhosszakon működhetnek és az használható polimerek száma is igen széleskörű [40].

A fent említett módszerek közül az öntőformára öntést alkalmazzák leggyakrabban, leginkább az egyszerű, gyors kivitelezhetősége (rapid prototyping) miatt. A módszert, amely segítségével a PDMS-ből készült mikrofluidikai szepek kevesebb, mint 24 óra alatt elkészíthetők először Whitesides és kutatócsoportja írta le [32]. Az öntőforma ún. lágy litográfias módszer segítségével készül, vagyis egy hordozó (általában szilícium) lap felületén először egy vékony réteget alakítanak ki fényérzékeny anyagból, majd erre helyezik rá a csatornák mintázatát

tartalmazó litográfiás maszkot. Litográfiás eljárást alkalmazva a maszk mintázata átvihető a rétegre, az öntőforma pedig alkalmas a PDMS mikrocsipek készítésére. Az ilyen módon elkészített öntőformákra a műanyagok öntése egymás után többször is megismételhető, ezekről korlátlan mennyiségben készíthetők mikrocsipek.

A műanyagból készített csatornák lezárása során a mikrocsipet üvegre vagy műanyagra „ragasztják”, amely történhet reverzibilisen [41, 42] vagy irreverzibilisen [43, 44]. A reverzibilis ragasztás végrehajtható az Effenhauser és társai által bemutatott módon, amikor is az elkészített PDMS mikrocsipeket ragasztás nélkül használták DNS fragmensek és más kis molekulák elválasztására [45]. Az elkészült műanyag mikrocsipet egy vékony PDMS laphoz illesztették, a két felületet a közöttük létrejött erős hidrofób kölcsönhatások tartották össze. Ennek a módszernek az egyik fő előnye, hogy a már használt mikrocsipek újrahasznosítása megoldható, a mikrocsipek könnyen tisztíthatóak. Az irreverzibilis ragasztás (sealing) többnyire oxigénplazmával való kezeléssel történik. Ez az eljárás jól használható a PDMS-ből készült mikrocsipek esetén, viszont nem alkalmazható a PMMA-ból, a poliidmből vagy polikarbonátból készült mikrofluidikai csipek ragasztása során [32, 43].

A mikrofluidikai csipeket széles körben alkalmazzák az analitikai kémiában, ahol nagy jelentősége van az összetett minták kezelésének, elválasztásának. A mikrofluidikai rendszerek különösen alkalmasak a biológiai minták (leginkább DNS és különböző fehérjék) elemzésére [46, 47]. A legtöbb mikrofluidikai rendszert elektroforetikus elválasztások kivitelezésére tervezték. Harrison és társai üveg mikrocsipben kialakított csatornában hat, fluoreszcenccel jelölt aminosav zónaelektroforetikus elválasztását mutatták be, az elválasztott zónák azonosítására lézerindukált fluoreszcens detektálást alkalmaztak [48]. A PDMS-ből készített mikrofluidikai csipeket sikeresen alkalmazták kis molekulák (aminosavak) és nagy biológiai molekulák (fehérjék és DNS fragmensek) vizes oldatban történő elektroforetikus elválasztására [32]. Ramsey és Jacobsen egy miniatürizált CE rendszerről számoltak be, amelyben a DNS láncot restrikciós

enzimekkel hasították, majd a keletkezett termékeket választották el elektroforézissel [49].

Az elektroforetikus elválasztások mellett néhány kutatócsoport szilíciumból vagy üvegből készített mikrocipekben alkánok, metil-észterek gázkromatográfiás elválasztásával foglalkozott [6, 50, 51]. Habár ezekben a gázkromatográfiás rendszerekben sikeres elválasztásokról számoltak be, mégis viszonylag kevés kutatócsoport folytatott ilyen irányú kutatásokat, leginkább a nehéz technikai megvalósítások miatt.

Folyadékkromatográfiás elválasztások mikrocipben történő végrehajtásáról több kutatócsoport is beszámolt. A mikrofluidikai csatornában kromatográfiás tölteteket kialakításáról és az ilyen rendszerekben végzett elemzésekről a későbbiekben, a 2.3. fejezetben lesz szó.

2.2. Kromatográfiás elválasztások módszerei

A kromatográfiás módszerek egy álló- és mozgófázis között beálló megoszlási egyensúlyon alapulnak. A mozgófázissal érkező minta komponensei eltérő mértékben kötődnek az állófázishoz, így különböző ideig fognak vándorolni a mozgófázissal. Az elválasztás mechanizmusa szerint (vagyis az oldott anyag és az állófázis közötti kölcsönhatás jellege szerint) megkülönböztetünk adszorpciós, abszorpciós (megoszlásos), ioncserés, méretkizárási és affinitás kromatográfiát [52]. Az adszorpciós kromatográfiában a minta komponenseinek egymástól való szétválása az adszorbeáló képességű szilárd halmazállapotú állófázis felületén való megkötődés erősségétől és a mozgófázisban való oldékonyságtól függ. A megoszlásos kromatográfiában az állófázist egy szilárd hordozóra felvitt vékony folyadékfilm alkotja, a mozgófázis pedig egy vele nem elegyedő oldószer. Az elválasztás a komponensek két folyadékfázis közötti eltérő megoszlási hányadosán alapszik. Az ioncserés kromatográfiában az állófázishoz kovalensen kötött anionos vagy kationos funkció csoportok és a mintában lévő ionok közötti különböző mértékű elektrosztatikus kölcsönhatások miatt történik meg a szétválás. A méretkizárási kromatográfiában a minta

komponensei méretük alapján válnak szét. A kisebb részecskék képesek az állófázis pórusai közé behatolni, így több időt töltenek el azok járataiban, míg a nagyobb méretű részecskék kizáródnak a pórusokból, így gyorsabban távoznak az állófázisról. Az affinitás kromatográfia esetén pedig specifikus biológiai kölcsönhatásokon alapul az elválasztás. Ilyen kölcsönhatás például az antigén és antitest vagy enzim és szubsztrát közötti kapcsolat. Az elválasztandó elegy azon komponensei kötődnek meg az állófázison, amelyek képesek erre a specifikus kölcsönhatásra, míg a többi komponens a mozgófázissal együtt halad tovább.

A kromatográfias módszerek csoportosítása történhet a kromatográfias ág alakja, a mozgófázis halmazállapota és az elválás mechanizmusa alapján is. A kromatográfias ág alakja szerint megkülönböztethetünk oszlop- és síkkromatográfiát, utóbbinak két legfontosabb módszere a papír- illetve a vékonyréteg kromatográfia. Az oszlopkromatográfias módszerek esetén az állófázis egy csőben található, míg a síkkromatográfias technikáknál az állófázis síkban helyezkedik el. Ha az állófázis egy speciális kromatográfias papír, akkor papírkromatográfiáról, ha pedig valamilyen szilárd hordozó felületén alakítunk ki egy vékony réteget a kromatográfias szemcsékből, akkor vékonyréteg kromatográfiáról beszélünk [53]. A mozgófázis halmazállapota szerint gáz-, folyadék-, illetve szuperkritikus fluid kromatográfiát különböztetünk meg.

Napjainkban az egyik leggyakrabban alkalmazott kromatográfias módszer a folyadékkromatográfia, azon belül is a nagy teljesítőképességű folyadékkromatográfia (HPLC), amellyel a kromatográfias körülmények megfelelő megválasztása mellett sokféle vegyületcsalád elválasztása, azonosítása és mennyiségi meghatározása megvalósítható. A méréseket szobahőmérsékleten vagy annak közelében végezzük, így termikusan érzékeny anyagok vizsgálatára is alkalmas.

A módszer során kis szemcseméretű állófázison nagy nyomással nyomják át a mintát, illetve a mozgófázist. A mozgófázis minőségét nagyban meghatározzák a vizsgált minta tulajdonságai, a megfelelő elválasztás elérése érdekében oldószer keverékek használata is

elterjedt. Az állófázis szabálytalan vagy gömb alakú részecskékből áll, de napjainkban egyre inkább terjednek a porózus monolit rétegekből készült kolonnák [54].

Az állófázisok között megkülönböztetünk normál, illetve fordított fázisúakat. A normál fázisú töltetek jellemzője, hogy az állófázis polárisabb, mint a mozgófázis, különösen poláris és nem-ionos vegyületek elválasztásához alkalmazhatóak. A leggyakrabban alkalmazott normál fázisú töltetanyagok a szilikagél és az alumínium-oxid, melyek felülete rendkívül poláris és nagy mechanikai stabilitással rendelkeznek. A normál fázisú kromatográfiában alkalmazott mozgófázisok a kevés víztartalom mellett leginkább apoláris szerves oldószerekből tevődnek össze, az állófázisok csupán vizes közegben nem használhatóak, ugyanis a víz dezaktiválja a felületüket.

A fordított fázisú kromatográfia a legelterjedtebb folyadékkromatográfiás módszer, amely során a mozgófázis polárisabb az állófázisnál. A mozgófázis általában víz és valamilyen szerves oldószerelegye. Állófázisokként leginkább valamilyen alkiláncsal módosított szilikagél tölteteket alkalmaznak. A fordított fázisú állófázisok legfontosabb jellemzője, hogy apoláris komponensekkel szemben van a legnagyobb a visszatartásuk. A leggyakrabban használt fordított fázisú töltetek a C18-as (oktadecil) oldalláncsal módosított szilikagél töltetek, de ilyen típusú állófázisok még a fenil (C₆H₅) illetve az oktil (C₈) oldalláncú töltetek is. Egyes állófázisok esetén a mozgófázis összetétele határozza meg, hogy normál vagy fordított fázisként viselkednek-e, ilyenek például a cianopropil (CN) és az aminopropil (NH₂) oldalláncsal módosított szilikagél részecskékből készült töltetek [55, 56].

A nagy teljesítőképességű folyadékkromatográfiás elemzések számos előnyös tulajdonságuk miatt terjedtek el az analitikában, gyógyszeriparban, a módszer hátránya viszont, hogy időigényes és folyamatos üzemeltetése költséges.

A kapilláris elektrokromatográfia (CEC) a kapilláris elektroforézis egyik olyan módszere, ahol az elválasztás a komponensek és az állófázis közötti kromatográfiás kölcsönhatásokon, illetve a komponensek különböző elektroforetikus mozgékonyaságán alapszik

[57]. A kapilláris elektrokratográfiás elválasztások során a kapilláris elektroforézisre jellemző nagy elválasztási hatékonyság és a nagy teljesítőképességű folyadékkromatográfiára jellemző nagy szelektivitás ötvöződik [58]. A készülékekben a HPLC-nél is használt kromatográfiás részecskékkel töltött kapillárisokat alkalmaznak, és a feszültség hatására elektroozmotikus áramlás (EOF) indul meg a kapillárisban, amely szállítja a komponenseket. Az elválasztandó minta komponensei különböző módon lépnek kölcsönhatásba az állófázissal, így különböző gyorsasággal jutnak át a tölteten. A minták és a mobilfázis feszültséggel történő áramoltatásának számos előnye jelentkezik az elektrokratográfiás mérések során. A feszültség hatására egyenletes (lapos) sebességprofil alakul ki a kapillárisban, amely csökkenti a csúcsszélesedést és nagyobb elválasztási hatékonyságot eredményez. Mivel a töltetek által kifejtett ellenállás feszültséggel történő áramoltatás hatására nem jelentkezik, a kisebb részecskékből álló kromatográfiás töltetek használata is megengedett, az elválasztási hatékonyság ezáltal is növelhető [59, 60]. Az elválasztás szelektivitása az álló és a mozgó fázis közötti megoszlástól, illetve a komponensek elektroforetikus sajátságaitól függ. Legnagyobb előnye a HPLC-vel szemben, hogy rövidebb analízis idők esetén is nagy hatékonyság érhető el.

2.3. Kromatográfiás töltetek kialakítása mikrofluidikai csipekben

Habár napjaink legelterjedtebb elválasztástechnikai módszere a folyadékkromatográfia, mégis viszonylag kevés mikrocip alapú kromatográfiás rendszert fejlesztettek eddig ki [61]. Ennek okai leginkább technikai jellegű problémák: például a töltetek kialakítása, rögzítése a mikrocip csatornáiban, megfelelően kicsi mintadugó reprodukálható kialakítása az injektálás során vagy éppen az elválasztott komponensek érzékeny detektálása a töltetek után. Ráadásul a nagy nyomást igénylő elválasztások kivitelezéséhez megfelelő kapcsolódási pontok létrehozása sem megoldott még minden esetben [62].

A kromatográfiás állófázisok mikrofluidikai csipekben való kialakítására négy fő módszer ismeretes: a nyitott csatornás rendszerek alkalmazása, a csatornák kromatográfiás részecskékkel való megtöltése, monolit oszlopok kialakítása a mikrocatornában és a kromatográfiás oszlopok mikrofabrikálással történő kialakítása [62].

A folyadékkromatográfiás módszerek miniatürizálásának legegyszerűbb módja a nyitott csatornás (azaz kromatográfiás részecskéket nem tartalmazó) rendszerek (open channel chromatography) alkalmazása. Ekkor a kialakított csatornák falát kémiaiilag módosítják, hogy elérjék a kívánt retenciós képességet. A módszer előnye a rendszerek könnyű elkészíthetősége illetve, hogy a mobilfázis áramoltatásához kis nyomás is elegendő. Kato és társai szubmikrométer átmérőjű csatornában 1-3 bar nyomással végeztek elválasztásokat [63]. Ugyan néhány példát találtunk az irodalomban ilyen rendszerek fejlesztésére, de a kialakított elválasztási egység erősen limitált kapacitása miatt alkalmazásuk nem terjedt el az analitikában.

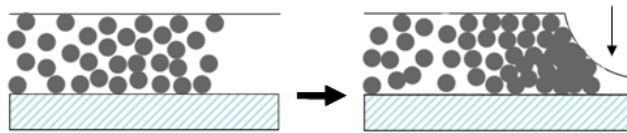
A mikrocipekben a kromatográfiás állófázisok kialakíthatóak hagyományos kromatográfiás részecskék csatornában történő visszatartásával. Ekkor azonban a csatornában valamiféle akadály, szűrőszerű membrán (frit) kialakítása szükséges, amely képes a részecskék csatornában tartásához. Folyadékkromatográfiás kolonna szilícium mikrocipbe történő integrálását Manz és társai írták le először, 5 μm -es C8-as részecskéket tartottak vissza egy 20 cm hosszú csatornában frit segítségével [64]. Andersson és kutatócsoportja DNS szekvenálásra alkalmas mikrocipet fejlesztett, amelyek csatornáiban pillérekből alakítottak ki kamrákat és tartottak vissza részecskéket [65]. Sato és társai szintén fritek segítségével állítottak meg részecskéket a csatornában, hogy felületükön immunpróbát végezhesse [66]. Találhatunk olyan módszert is, ahol PDMS-ből készített hatszög alakú oszlopokat alakítottak ki már a mikrocipek csatornahálózatának tervezésekor. Ez a réteg fritként szolgálva tartotta vissza a kromatográfiás részecskéket a csatornában. Az ilyen módon készített rendszerekben elektrokromatográfiás méréseket és semleges molekulák dúsítását végezték el [67]. A fritek használatának azonban több

hátrányos tulajdonsága ismert, például a mikrocseppek előállításukomplicáltabb, ráadásul a frit egyfajta katalizátorként szolgál a buborékok képződéséhez. Éppen emiatt több kutatócsoport is olyan módszereket fejlesztett, amelyek segítségével a kromatográfiás töltetek frit nélkül hozhatóak létre.

Szűkített kapillárisokban fritek kialakítása nélkül is készíthetőek kromatográfiás töltetek, melyek aztán alkalmasak kapilláris elektrokromatográfiás (CEC) mérések kivitelezésére [68]. Ceriotti és társai egy szűkített csatornában alakítottak ki tölteteket, ez a szűkület az állófázis részecskéit visszatartotta. A töltést vákuumban végezték, 3 μm -es átmérőjű kromatográfiás részecskéket használtak és a töltet stabilizálását a csatornában hőkezeléssel végezték el [69].

Később Jindal és Cramer olyan frit nélküli töltési módszert közölt, mely során a kromatográfiás részecskéket szol-gél módszerrel immobilizálták a szilíciumból készült mikroczip szeparációs csatornájában. A töltetek geometriáját egy csatornára illesztett PDMS lappal határozták meg, majd a gél keletkezése után ezt a réteget eltávolították a töltetről, lezárták a csatornákat és az így elkészített rendszerben dipeptideket választottak el elektrokromatográfiával [70].

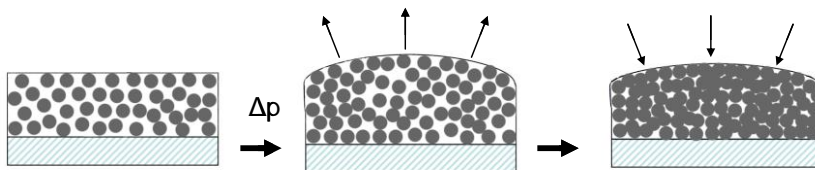
Kutatócsoportunk nemrégiben egy olyan eljárásról számolt be, ahol a hagyományos kromatográfiás állófázis (pl. C18-as oldallánccal módosított szilikagél részecskék) PDMS-ből készült mikroczipbe történő integrálása frit kialakítása nélkül lehetséges [71, 72]. A töltés során a mikroczip felületén történő nyomás hatására a csatorna magassága lecsökken és ebben az ideiglenes szűkületben megakadnak a részecskék. A részecskék visszatartásához kb. 80 %-os szűkületet kellett elérni a csatornában (a $\sim 30\ \mu\text{m}$ magas csatornát megközelítőleg 6 μm -esre kell összenyomni). A kromatográfiás részecskék mikrocscatornában történő megragadását különböző stabilizáló hatások segítik elő, ezek a zárókő-, a bilincs- és a horgonyhatás. A zárókőhatás (keystone-effect) (1. ábra) az a jelenség, amikor a szűkület felé áramoltatott viszonylag nagy koncentrációban érkező első részecskék megakadnak a náluk akár kétszer-háromszor nagyobb átmérőjű szűkület elején és ezek tartják vissza a mögöttük jövő részecskéket, egyfajta zárókő szerepét betöltve.



1. ábra

A kromatográfiás részecskék csatornában való visszatartásakor fellépő zárókőhatás [71].

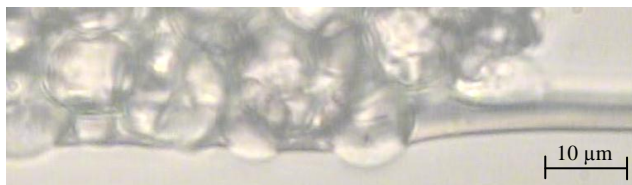
A töltetek rugalmas anyagú mikrocseppek csatornáiban való stabilitásának fő oka a bilincshatás (clamping-effect) (2. ábra). A töltés folyamán alkalmazott nagyobb (kb. 2-3 bar) nyomás hatására a csatorna rugalmas fala kiszélesedik. Ezt a megnövelt csatorna térfogatot a részecskék teljes mértékben kitöltik, így amikor a pumpanyomást leállítjuk, a csatorna fala újra összehúzódik az eredeti méretére, a töltet körül egy folyamatos összeszorító hatás, feszültség alakul ki.



2. ábra

A kromatográfiás részecskék csatornában való visszatartásakor fellépő bilincshatás [71].

A töltetek stabilitásához a hidrofób kromatográfiás részecskék és a hidrofób tulajdonságú fal között jelentkező erős kölcsönhatások is hozzájárulnak. Emellett a PDMS fal közelében lévő részecskék deformálják a rugalmas fal alakját, részlegesen behatolnak a falba (3. ábra) és ez, mint valamiféle horgony rögzíti a töltetet a csatornában (horgonyhatás). A beágyazódás mértéke nagyban függ a töltés során alkalmazott nyomás nagyságától, illetve a PDMS fal elasztikusságának mértékétől.



3. ábra

A kromatográfiás részecskék csatornában való visszatartásakor fellépő horgonyhatás [71].

A kromatográfiás töltetek frit nélküli kialakítására Hansen és kutatócsoportja többrétegű lágy litográfiás (multilayer soft lithography) eljárással készített mikrocsepkeket alkalmazott [73, 74]. Az így létrehozott rendszerben több, párhuzamos kromatográfiás töltet kialakítására volt lehetőség. A részecskéket a felső rétegben kialakított és levegővel töltött segédcsatornák (bypass channels) által az alsó rétegben létrejövő szűkületek tartották vissza. A rendszer hátránya azonban, hogy a részecskék csak addig maradnak stabilan a csatornában, míg a segédcsatornák nyomás alatt vannak.

A kromatográfiás töltetek kialakításának egy másik módszere éppen ezen töltési nehézségek kiküszöbölése érdekében fejlődött ki. Hjertén és kutatócsoportja egy folytonos polimer ágyat hozott létre a monomer töltetanyag csatornába történő polimerizáltatásával [75]. A kis viszkozitású monomer oldat könnyen bejuttatható a csatornába, ahol megtörténik a polimerizáció, így a töltet kialakítása frit nélkül is megvalósítható. A Hjertén kutatócsoportja által kifejlesztett módszer során a mikrocsepkecsatornában történő polimerizációt kémiai iniciátorok alkalmazásával indították el, de ez a térhálósodás kiváltható UV fény hatására is [76]. Az UV fénnel történő iniciálás egyik nagy előnye, hogy a polimerizáció folyamata térben kontrollálható, a monolit töltet csak a csatornák besugárzott részein keletkezik, a felesleges monomer pedig könnyedén eltávolítható a mikrocsepkecsatornából. A monolit oszlopok alkalmazásának egyik nagy előnye, hogy hidrodinamikai ellenállásuk kisebb, mint a hagyományos tölteteké, ezáltal kisebb nyomás alkalmazása mellett használhatóak, viszont figyelembe kell venni, hogy a polimerizáció során az oszlopok zsugorodhatnak, így a kialakított töltet elválhat a csatorna falától.

A kromatográfiás részecskék alkalmazása helyett Regnier és társai a mikrocip anyagában, magán a szilícium vagy a kvarc lemezen hozták létre a töltetek/hézagok bonyolult hálózátát, hogy egyfajta monolit típusú alakzatokat (COMOSS = Collocated Monolith Support Structures) alakítsanak ki mikrofabrikációs eljárásokkal [77, 78]. Mivel az ilyen szerkezetek készítése során fotolitográfiás eljárásokat alkalmaznak, a kialakítható mintázatok méreteit a litográfiás lépések során elérhető felbontás korlátozza. Az elkészült oszlopok felülete funkcionálizálható, ezáltal az így kialakított töltetek alkalmassá válnak szinte bármilyen kromatográfiás feladat végrehajtására. Ezek a monolit típusú szerkezetek nagy felületüknek köszönhetően akár jobb elválasztási hatékonyságot is eredményezhetnek, mint a hagyományos kromatográfiás töltetek [79]. Mivel a szilícium és kvarc alapú mikrocipek készítése bonyolult és az előállítási költségeik is magasak, Slentz és társai ilyen típusú monolit rendszereket (COMOSS) készítettek PDMS-ből [80]. A legújabb kutatások arra irányulnak, hogy az így kialakított oszlopok porozitását, ezáltal a létrehozott töltetek felületét megnöveljék. Ez például úgy is elérhető, hogy az oszlopokat mezoporózusos szén nanocsövekből állítják elő [81].

Ma már léteznek a kereskedelemben is kapható nano-LC/MS (HPLC-chip/MS) rendszerek, amelyek egy több rétegből álló poliimid filmből készült mikrocipet tartalmaznak. A mikrocipet lézer segítségével alakítják ki, mely tartalmazza a nano-LC/MS rendszerek részeit: egy dúsító oszlopot az online minta-előkészítéshez/dúsításhoz, egy elválasztó oszlopot a hatékony kromatográfiás elválasztások kivitelezéséhez és a tömegspektrométerhez való kapcsoláshoz szükséges nano-elektrospray interfészt [82]. A dúsító és az elválasztó oszlopok hagyományos fordított fázisú kromatográfiás részecskékkel vannak töltve, az alkalmazható áramlási sebességek 100 és 400 nl/perc között változnak. A nano-LC rendszerek mikrofluidikai rendszerekbe való integrálása lehetővé tette a komponensek elválasztását és meghatározását akár femtomólnál is kisebb detektálási érzékenységgel.

2.4. Mikrofluidikai csipek kapcsolása detektálási módszerekkel

A mérőrendszerek miniatürizálása, a lab-on-a-chip rendszerek kialakítása napjaink egyik fontos kutatási trendje. Ezen kutatások fő iránya a meghatározások idejének csökkentése és az elemzendő minták számának, az elválasztások szelektivitásának és az elemzések érzékenységének növelése úgy, hogy mindeközben a szükséges mintatérfogatok és a rendszerek előállítási és működtetési költségei csökkenjenek. A kutatások sikerességéhez az kell, hogy a kifejlesztett rendszerekhez olyan univerzális detektorokat kapcsoljanak, amelyek képesek kis mintamennyiségek valósidejű, hatékony detektálására [83]. A mikrofluidikai rendszerekben a leggyakrabban használatos detektorok a lézerindukált fluoreszcens (LIF), az elektrokémiai és a tömegspektrometriás (MS) módszerek [84].

A lézerindukált fluoreszcens detektálás során a mintában lévő fluoreszcens komponenseket egy adott hullámhosszúságú lézerfényvel gerjesztik, majd az ennek hatására emittált fény intenzitását mérik. A módszer egyik legnagyobb előnye, hogy a mikrofluidikában alkalmazott kis csatornaátmérők ellenére is nagy érzékenységű detektálást biztosít és jól alkalmazható a biológiailag aktív, fluoreszcens molekulák elemzésénél. Abban az esetben is használható, ha a mérendő komponens nem rendelkezik fluoreszkáló tulajdonsággal (például fehérjék), ugyanis megfelelő származékképzési reakciókban fluoreszcens csoportok alakíthatóak ki a molekulákon. (Például fehérjék származékképzése történhet fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) [85].) Sanders és társai három fluoreszcens fehérje izoelektromos fókuszálással történő elválasztását tudta követni lézerindukált fluoreszcens detektálással a mikrofluidikai csatorna teljes hosszában [86]. Qin és kutatócsoportja hangolható lézer segítségével kiváltott fluoreszcenciát mért mikrocipen végzett elektroforézist követően [87]. Újabban világító diódákat, LED-eket használnak a lézerek helyett, melyek olcsón beszerezhetőek, kis energiával üzemeltethetőek és nagyenergiájú, kis hullámhosszúságú fényt bocsátanak ki. Több kutatócsoport is kék LED-eket használt gerjesztő forrásként a LIF detektálás kivitelezéséhez mikrofluidikai rendszerekben [88, 89].

Az elválasztott komponensek detektálása történhet elektrokémiai módszerek felhasználásával is. Nagy előnyük, hogy a detektor és a hozzá tartozó vezérlő egységek is miniatürizálhatóak (a mérésekhez szükséges elektródok mikrofabrikációs módszerekkel alakíthatóak ki a mikrocipeken), ráadásul sok vegyület származékképzés nélkül detektálható. Az elektrokémiai detektorok között három fő típust különböztetünk meg: az amperometriás, a konduktometriás és a potenciometriás detektálási módszereket [90].

Az amperometriás detektáláskor a két elektród között átfolyó áram erősségét mérjük állandó feszültség alkalmazása mellett. Az amperometriás detektálást Schwarz és Hauser királis neurotranszmitterek elválasztására használta mikrofluidikai rendszerekben [91].

A konduktometriás mérésnél a minta komponenseinek vezetőképességét a háttéroldat vezetőképességéhez viszonyítják. Két típusú konduktometriás detektálási módszer ismeretes, amikor az elektródok közvetlen kapcsolatban állnak a mérendő oldattal és a háttérelktrolittal, illetve, amikor ezek között nincs közvetlen kapcsolat [90]. Kaniansky és kutatócsoportja olyan mikrofluidikai rendszert fejlesztett PMMA-ból, amelyben több helyen is konduktometriás mérőelektródpárt alakítottak ki, így az elválasztott komponensek a csatorna teljes hosszában, több helyen is nyomon követhetőek [92]. Az érintkezés nélküli (contactless) vezetőképesség-mérésen alapuló módszer előnye, hogy a mérőelektródokat nem kell beépíteni a mikrocipbe, hanem egyszerűen a detektor platformjára kell a mikrocipet helyezni. Emiatt egyre népszerűbbé válik a mikrofluidikai rendszerekhez kapcsolt detektálási módszerek között [93].

A potenciometriás detektálással kapcsolt mikrofluidikai rendszerekről csak néhány közleményt találhatunk az irodalomban, például a Tantra és Manz által fejlesztett üveg mikrocipet, amelyet potenciometriás szenzorként is lehet használni [94].

A mikrofluidikai csipekben kialakított elektroforetikus rendszerekhez tömegspektrometriás detektálás is alkalmazható, amely különösen alkalmas a nagy biológiai molekulák elemzésére [95]. Mikrocipekkel leginkább electrospray ionizációs (ESI) módszereket alkalmaznak,

melyek legkritikusabb pontja a két rendszer közötti kapcsolat kialakítása. Az elektropray ionizáció során a mintát egy nagyfeszültségű kapillárison keresztül porlasztják be a tömegspektrométerbe, a keletkezett folyadékcseppek felszínén töltéstöbblet keletkezik, a mintaoldat komponensei a tömeg/töltés arányuk alapján válnak szét az analizátorban. A mikrofluidikai rendszerekhez többféle porlasztó kapillárist is kifejlesztettek, Svedverg és kutatócsoportja például a polikarbonátból és PMMA-ból alakított ki mikrocip végéhez kapcsolható porlasztó egységet [96]. Tachibana és társai egy PEEK csavarral rögzíthető porlasztót fejlesztettek mikrocip elektroforézis-MS rendszerükhöz, amelyet aztán sikeresen alkalmaztak peptidek és tripszinnel emésztett fehérjék elválasztására [97]. Chiou és társai PDMS-ből készítettek mikrofluidikai rendszereket tömegspektrométerrel kapcsolva, porlasztó egységként kvarc kapillárist illesztettek a mikrocipbe [98]. A tömegspektrometriás detektálási módszer legnagyobb hátránya más eljárásokkal szemben, hogy nehezen miniaturizálható. Ugyan van néhány próbálkozás az irodalomban a tömegspektrométerek mikrocipformátumba történő átvitelére, de ezen kutatások még további erőfeszítéseket igényelnek [99, 100].

Habár a fentiekben felsoroltak a legelterjedtebb detektálási módszerek, amelyeket mikrofluidikai rendszerekhez kapcsolva alkalmaznak, több kutatócsoport dolgozik az alkalmazható detektálási módszerek körének bővítésén. Ismert az infravörös spektroszkópia [101] vagy a Raman-spektroszkópia [102] kapcsolása elektroforetikus elválasztások kivitelezésére alkalmas mikrocipekhez.

Viszonylag kevés mikrociphez kapcsolt atomspektrometriás módszer ismeretes az irodalomban. Song és társai induktív csatolású plazma tömegspektrométert (ICP-MS) mikrocip alapú kapilláris elektroforetikus rendszerekhez kapcsoltak, hogy elemspeciációs analíziseket végezzenek [103, 104]. Li és kutatócsoportja higanyspeciesszek elektroforetikus elválasztását végezte el atomfluoreszcens spektrométerrel kapcsolt mikrocipekben [105].

3. Kísérleti körülmények

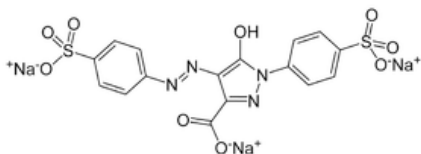
3.1. Felhasznált vegyszerek és anyagok

Az öntőformák alapjaként/hordozójaként 7,6 cm átmérőjű atomi simaságú szilícium lapot használtunk, készítésükhöz SU-8 2025 (MicroChem, Newton, MA) negatív típusú fényérzékeny anyagot, előhívószerként pedig 1-metoxi-2-propanol-acetátot (mr-Dev 600, Micro Resist Technology GmbH, Berlin, Németország) alkalmaztunk.

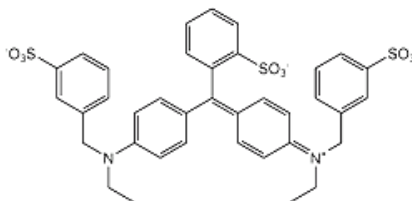
A mikrocsipek készítéséhez a poli(dimetil-sziloxán) (PDMS) és a térhálósító adalék (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA) 10:1 arányú keverékét használtuk.

A hagyományos kromatográfiás töltetek anyaga Varian (Walnut Creek, CA, USA) 5 és 10 μm átmérőjű C18-as kromatográfiás részecskék voltak, a kísérleteinkhez szükséges etanolt és metanolt a Spektrum 3D Kft.-től szereztük be. Az elkészített mikrofluidikai rendszerek tesztelésére ételfestékeket alkalmaztunk (McCormick&Co., Inc., Sparks, MD, USA).

a,



b,



4. ábra

A sárga (E102, tartrazin) (a.), és a kék (E133, Brillantkék FCF) (b.) ételfestékek szerkezeti képletei.

A méréseinkhez állófázisként szililezett, C16-os egységeket tartalmazó aerogélt is alkalmaztunk, melyet tanszékünkön, Dr. Lázár István kutatócsoportja (DE-TTK) készített.

3.2. Alkalmazott berendezések

3.2.1. A mikrocip készítése során használt berendezések

Az öntőforma készítéséhez a fényérzékeny anyagból álló vékony réteget forgótárcsa (spincoater) segítségével állítottuk elő (3000 fordulat/perc, 30 másodperc). A fényérzékeny réteget litográfias maszkon keresztül 365 nm hullámhosszúságú UV fénnel (Spectroline FC-100/F lámpa, Spectronics Corporation, Westbury, New York, USA) sugároztuk be. Az öntőformára öntött műanyagot Memmert UNB-300-as típusú szárítószekrényben térhálósítottuk. A megszilárdult műanyagon a portokat kézi lyukasztó (Schmidt Technology, Németország) segítségével alakítottuk ki. Nagyfrekvenciás, kisnyomású térben Harrick PDC-32G típusú levegő plazma (Harrick, Ithaca, NY, USA) segítségével a csatornamintázatot tartalmazó PDMS lapot irreverzibilisen üveg tárgylemezhez kötöttük. Az aerogél töltet kialakításához az aerogél szemcséket golyósmalom segítségével porítottuk.

3.2.2. A mikrocsipek alkalmazása során használt készülékek

A mikrofluidikai csipek csatornáiba a folyadékokat Ismatec IPC (Ismatec SA, Glattdurg, Svájc) perisztaltikus pumpa segítségével juttattuk be, a bennük végbemenő folyamatokat, elválasztásokat pedig Zeiss típusú Axio Observer A1 kutató, inverz mikroszkóppal (Axio Observer A1, Zeiss, Németország) figyeltük meg (5. ábra). A videók és képek készítéséhez nagyfelbontású digitális kamerát (AxioCam ICC3, Zeiss) valamint kép/video rögzítő és feldolgozó szoftvert (AxioVision 4.6.3, Zeiss) használtunk.



5. ábra

Az Axio Observer A1 típusú kutató, inverz mikroszkóp fényképe a munkasztalon a mikrofluidikai csippel és a hozzá csatlakoztatott pumpacsővel.

3.2.3. Atomspektrométerek

Lángatomabszorpciós méréseinket 240 FS típusú (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) lángatomabszorpciós készülékkel végeztük. Az atomizáláshoz levegő-acetilén lángot használtunk, melynek összetétele 13,5 l/min levegő és 2,9 l/min acetilén volt, a mérések során pedig króm üregkatód lámpát (Cathodeon) használtunk, amely 10 mA áram segítségével működött. A krómot 357,9 nm-es hullámhosszon detektáltuk, a háttérkorrekcióhoz deutérium lámpát használtunk, a jelet 30 másodpercen keresztül rögzítettük a spektrométer szoftverének segítségével (SpectrAA 5.2 Pro, Agilent, Santa Clara, CA, USA).

A lézerindukált plazma spektroszkópiás mérésekhez egy LIBScan 25+ (Applied Photonics Ltd., Skipton, New Yorkshire, UK) hordozható készüléket használtunk. A készülék egy fundamentális hullámhosszú, impulzusüzemű, Nd:YAG szilárdtest lézert tartalmaz, melynek maximális impulzusenergiája kb. 50 mJ, impulzushossza pedig 4 ns. A mikroplazmát egy UV-Vis száloptikás CCD spektrométer segítségével figyeltük meg a 234-455 nm hullámhossztartományban.

3.3. A mikrofluidikai csipek készítése

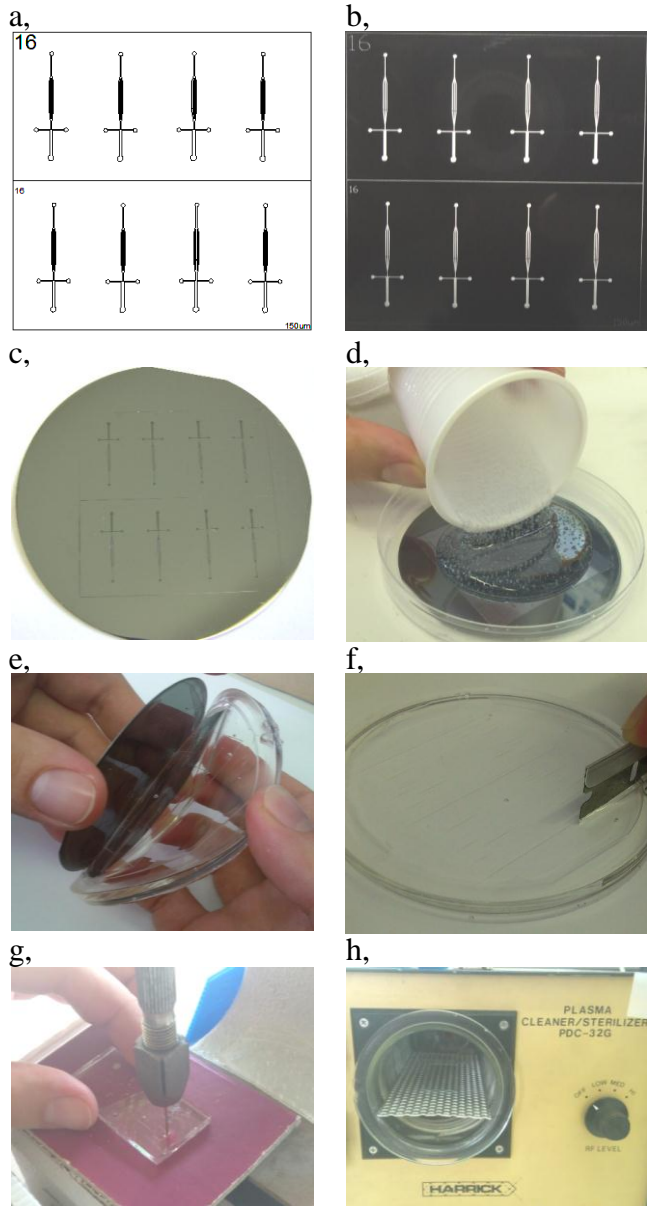
A mikrocsipek készítésekor Whitesides és kutatócsoportja által közölt eljárást [32] alkalmaztuk. Először megterveztük a csatornahálózatokat, ezt követően elkészítettük az öntőformát, amit a mikrocsipek öntéséhez használtunk fel. A lágy litográfiás módszerekkel készített mikrocsipek anyagaként a PDMS-t használtunk, amely $(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})$ - egységekből álló polimer anyag.

A mikrocsipek tervezéséhez AutoCAD számítógépes szoftvert (AutoCAD 2013, Autodesk Inc., San Rafael, CA, USA) használtunk, mellyel pontosan megtervezhetőek az 50-100 μm átmérőjű csatornamintázatok (6.a ábra). A megtervezett mintázatok nagyfelbontású nyomtató (3600 dpi, Képpont Kft., Debrecen) segítségével átlátszó fóliára nyomtatva kaptuk a fotolitográfiás maszkot (6.b ábra). Ezt a litográfiás maszkot használtuk a mikrocsipek készítéséhez szükséges öntőformák előállításához.

Az öntőforma készítésének első lépéseként a szennyeződésektől alaposan megtisztított szilícium lap felületén kb. 35 μm vastagságú réteget hoztunk létre a negatív típusú fényérzékeny anyagból (SU-8 2025). Kb. 0,5 g fényérzékeny anyagot cseppentettünk a lapka közepére, majd a forgótárcsával (spincoater) 3000 fordulat/perccel 30 másodpercig pörgetve alakítottuk ki az egyenletes vastagságú réteget. A lapot ezután 15 percre 95 °C-os szárítószekrénybe tettük (előmelegítési szakasz (prebaking)), hogy az előzőleg kialakított réteg megszilárduljon és a benne lévő szerves oldószer tartalom elpárologjon. A kemencéből kivett (és kihűlt) Si lapot a fotolitográfiás maszkon keresztül UV fényel (365 nm) sugároztuk be kb. 70 cm távolságból 10 percen át. Besugárzás után ismét 95 °C-os kemencébe került a lapka, ezúttal 5 percre (utómelegítési szakasz (postbaking)). A csatornák mintázata az előhívás után jelent meg a szilícium lapon, amely során a réteg azon részeit, amelyeket nem ért UV fény, az előhívószer segítségével távolítottuk el a hordozó lapkáról. Végezetül a kész öntőformát metanollal mostuk és néhány órán át 95 °C-os kemencében szárítottuk (6.c ábra).

Az így elkészített, majd gondosan megtisztított öntőformára a PDMS és a térhálósító adalék 10:1 arányú keverékét öntöttük. 20,0 g PDMS-t és

2,0 g térhálósító anyagot mértünk össze, majd alapos keverést követően a buborékos elegyet öntöttük az öntőformára (6.d ábra). Szárítószekrénybe helyezés előtt kb. 30 perc alatt a műanyag kitisztult, a buborékok eltűntek belőle. A műanyag térhálósodása 65 °C-os kemencében egy óra alatt történt meg. Ezután a megszilárdult műanyagot, melyen megtalálható a csatornamintázatok lenyomata, eltávolítottuk az öntőformáról (6.e ábra). A csatornák melletti felesleges műanyag részek eltávolítása érdekében egy pengével méretre vágtuk a mikrocsipeket (2,5 cm x 5 cm) (6.f ábra), majd kézi lyukasztó segítségével kialakítottuk a 0,7 mm átmérőjű portokat, amelyeken keresztül pumpacsövekkel csatlakozhatunk a csatornához (6.g ábra). A mikrocsipek készítésének utolsó lépése a csatornák lezárása, a mikrocsipek üvegre, vagy műanyagra történő irreverzibilis hozzákötése („ragasztása”) (6.h ábra). A mikrocsipeket ragaszthatjuk üveg tárgylemezhez vagy egy sima PDMS laphoz (leggyakrabban az üveg tárgylemezre történő ragasztást használtuk).



6. ábra

A mikrocipkészítés lépései: a tervezett csatornamintázatok (a.), a fotolitográfias maszk (b.), az öntőforma (c.), a nyers PDMS öntőformára öntése (d.), a műanyag eltávolítása az öntőformáról (e.), a mikrocipek méretre vágása (f.), a portok kialakítása (g.) és a csatornák lezárása levegő plazmával történő aktiválást követően.

A csatornák lezárása folyamán a PDMS lap és az üveg tárgylemez levegő plazmával történő oxidációja során a felületeken reaktív gyökök keletkeznek, így ezeket rövid időn belül (kb. 1 perc) egymáshoz illesztve új kötések épülnek ki. A levegőplazmában oxidált PDMS felületek üveghez, szilíciumhoz, illetve néhány speciális műanyaghoz irreverzibilisen ragaszthatók. A két ragasztandó felületet alapos tisztítás után 2 percre helyeztük a levegő plazmába, majd az összeillesztést követően néhány órán át 180 °C-os kemencében tartottuk a mikrocsipeket, annak érdekében, hogy a ragasztás minél tökéletesebb legyen. Ugyanis, ha a két felület nincs megfelelően összeragasztva a folyadék nemcsak a csatornában, hanem a mikrocsip más részein is fog szivárogni, így a rendszer használhatatlanná válik.



7. ábra

A kész mikrofluidikai csip fényképe.

3.4. Szimulációk COMSOL szoftverrel

A mikrocsipek csatornájában áramoltatott folyadékok viselkedését COMSOL Multiphysics 5.0 (COMSOL, Inc., Palo Alto, CA, USA) programmal szimuláltuk, amely egy végeselemes módszert alkalmazó mérnöki szimulációs szoftver.

A csatornamintázatokat az AutoCAD által generált dxf fájllokként vittük be a szimulációs szoftverbe. A számítások során feltételeztük, hogy az áramlás lamináris, a pumpa állandó sebességű és folyamatos áramlást biztosít, illetve a csatornák fala mentén a súrlódás elhanyagolható. Kezdeti sebességként a bemeneti portnál (ahol a rendszerbe juttatjuk a folyadékot) 10 $\mu\text{l}/\text{percet}$ (kb. 60 Pa) adtunk meg, a kimeneti portoknál pedig nulla nyomásértékeket állítottunk be.

A nyomás- és sebességeloszlás értékek meghatározásához a csatornarendszerre egy kb. 40 000 elemből (háromszögekből) álló hálót rajzoltunk meg, melyek átlagos mérete 25 μm volt, a legkisebb elemek 3 μm -esek voltak. A szabadsági fokok száma elérte a 10^5 értéket.

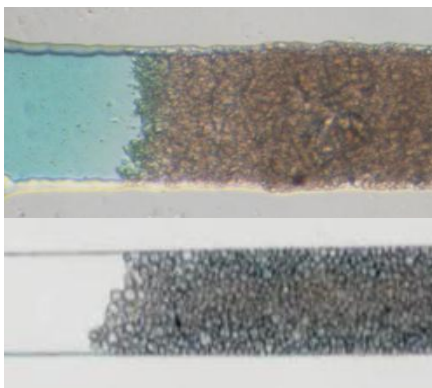
4. Kísérleti eredmények

4.1. Kromatográfiás részecskék visszatartásának tanulmányozása

4.1.1. Átmeneti csatornaszűkület kialakítása

Kromatográfiás részecskék poli(dimetil-sziloxán)-ból készített mikrofluidikai csip csatornájában történő visszatartására kezdetben a kutatócsoportunkban előzőleg kifejlesztett módszert [71, 72] használtuk. A PDMS-ből készült mikrocsip csatornájában egy átmeneti csatornaszűkületet hoztunk létre, melyet a töltés folyamán a mikrocsip felületére merőleges nyomóerővel értünk el.

A töltet anyagául használt C16-os oldallánccal módosított szilika aerogél tömböt golyós malommal porítottuk (2,5 percen át), majd a részecskékből metanolos szuszpenziót készítettünk. A töltetek kialakításához szükséges szuszpenziót ülepítéssel nyertük, a részecskék átmérője $1\text{ }\mu\text{m}$ körüli volt. Az ilyen kisméretű részecskékkel való töltéshez a mikrocsip felületén viszonylag nagy erejű nyomást kellett alkalmazni a megfelelő szűkület kialakításához, a töltés során a folyadékpumpa nyomását folyamatosan növeltük a töltet tömörítése érdekében. Mindezek ellenére a kialakult töltet nagyobb nyomással szemben instabil volt, a minta injektálása során degradálódott vagy részlegesen kimosódott.

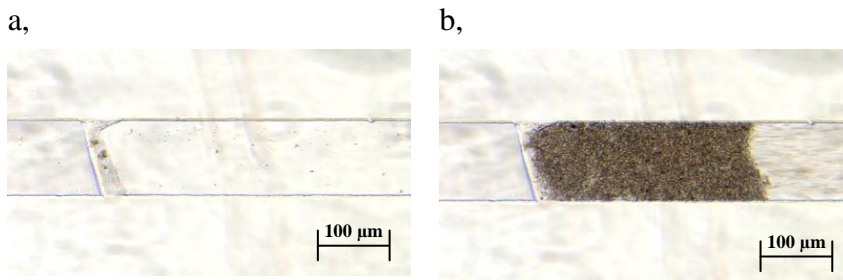


8. ábra

Átmeneti szűkület segítségével $\sim 1\text{ }\mu\text{m}$ méretű C16 szilika aerogél részecskékből (fent) és $5\text{ }\mu\text{m}$ C18 szilika (lent) részecskékből kialakított kromatográfiás töltet a $100\text{ }\mu\text{m}$ átmérőjű csatornában.

4.1.2. Szűkület kialakítása a csatorna magasságának csökkentésével

A kromatográfiás töltetek mikrocip csatornájában történő stabil visszatartásához előnyösebbnek tűnt egy állandó szűkület kialakítása, melyet először a csatornák magasságának megfelelő mértékű csökkentésével hoztunk létre. Ezt az öntőforma síkjából kiemelkedő csatornamintázat megfelelő helyen történő megkarcolásával értük el. A karcolat helyén a csatorna magassága lecsökkent, az ilyen öntőformáról készített mikrocip csatornájában egy kb. 10 μm széles fritszerű réteg alakult ki, amely a folyadék szempontjából átjárható volt, de az apróbb (kb. 1 μm átmérőjű) részecskéket már visszatartotta (9. ábra).



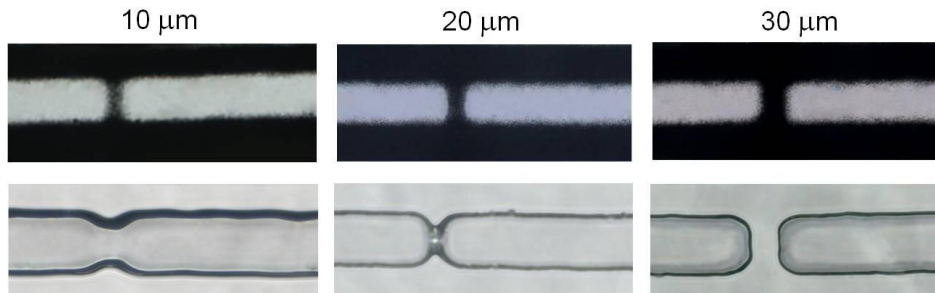
9. ábra

A megkarcolt öntőforma segítségével készített mikrocip csatornájában kialakított szűkület (a,) és az így készített töltet (b,).

Ez a módszer számos hátrányos sajátossággal rendelkezik. Az öntőforma vékony pengével történő megkarcolása nem jól reprodukálható folyamat, a kialakított szűkületek helye és nagysága szinte minden esetben különbözött egymástól. Ráadásul a sérülékeny öntőforma mintázata könnyedén lepattanhat, akár a szilícium hordozó is eltörhet a karcolás hatására.

4.1.3. Szűkület kialakítása a csatorna szélességének csökkentésével

A kromatográfiás részecskék visszatartására alkalmas módszerek közül a legjobbnak a csatornák szélességének egy adott ponton történő csökkentése (szűkületek kialakítása) bizonyult. Ezt először a tervezés során a csatornába rajzolt vonal segítségével értük el, amely a litográfiás lépések után egy szűkületet eredményezett. Az így készített szűkületek mértéke a csatornamintázatra rajzolt vonal vastagságától, a litográfiás maszk nyomtatása során alkalmazott beállításoktól, a nyomtató felbontásától és az öntőforma készítése során alkalmazott körülményektől függ. A vonal vastagságától függően különböző átmérőjű szűkületek, illetve túl vastag vonal esetén szakadások alakulnak ki a mikroszip csatornájában. Ahogy az a 10. ábrán is látható, a nyomtatás során elérhető legvékonyabb vonal alkalmazásakor csak egy minimális szűkület képződött a csatornában. A kromatográfiás részecskék visszatartására alkalmas szűkület kialakításához 20 μm vastagságú vonalra volt szükség, azonban a 30 μm -es vonal már szakadást okozott a csatornában.



10. ábra

Mikroszkópos felvételek a fotolitográfiás maszkon lévő különböző vastagságú (10 μm , 20 μm és 30 μm) vonalokról illetve az adott maszkkal készített mikroszipcs 50 μm szélességű csatornáiban létrejött szűkületekről/szakadásokról.

A megfelelő vastagságú vonal esetén a litográfiás lépések során alkalmazott körülmények is hatással vannak a kialakult szűkületek mértékére. Az ideális körülmények megtalálásához, a tervezett mintázatok megfelelő felbontással történő kialakításához először azt

kellett megvizsgálnunk, hogy a fotolitográfias lépések során elérhető felbontás mértéke milyen tényezőktől függ.

A tervezett mintázatok nagyfelbontású nyomtató segítségével nyomtattuk ki egy átlátszó fóliára. A nyomtató 3600 dpi felbontásra képes (azaz 3600 pont/2,54 cm), ez azt jelenti, hogy a nyomtatásban a fekete pontok közötti távolság kb. 7 μm , vagyis a tervezés során elvileg 7 μm -re is rajzolhatjuk egymástól a csatornákat. Viszont ez a felbontás romlik a fotolitográfias lépések elvégzése során.

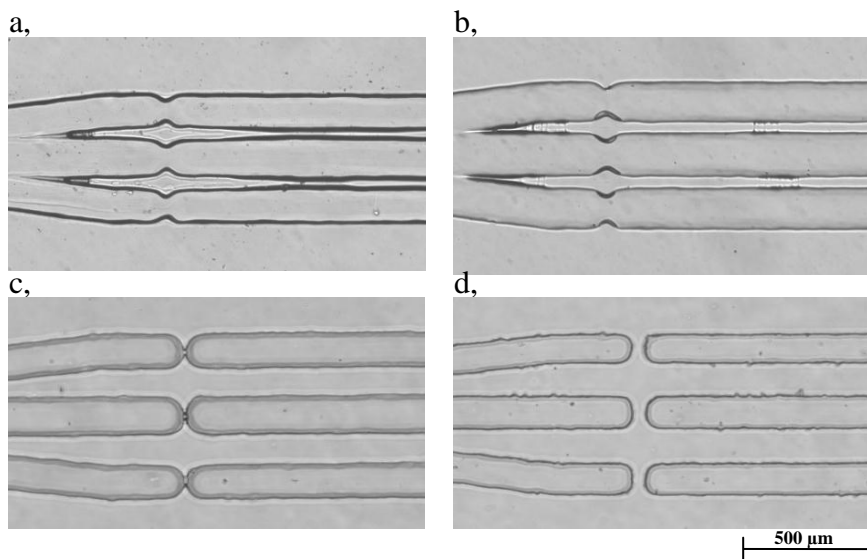
A megvilágítás során kialakuló felbontás (b) mértéke függ a megvilágító fény hullámhosszától (λ), illetve a maszk és a fényérzékeny réteg közti távolság (s) nagyságától is [106]. Az alábbi képlettel kiszámítható az esetünkben fellépő felbontás mértéke.

$$b = 1,5 \sqrt{\lambda \cdot s}$$

Az elérhető felbontás mértékét befolyásolja a megvilágítás során fellépő diffrakció mértéke, a fénysugarak rétegre történő beérkezésének geometriája (a felbontás romlik, ha a fénysugarak nem párhuzamosak és a rétegre nem merőlegesen érkeznek), sőt a mikrocsipkészítés lépései alatt is romolhat a felbontás (a PDMS réteg öntőformáról való eltávolítása, üveglapra történő „ragasztása” során).

Mindezek alapján az öntőforma-készítés lépéseinek optimalizálása során a fényérzékeny réteg vastagságának, a besugárzási idő hosszának és az UV fény intenzitásának változtatását végeztük el.

Az öntőforma-készítés során kialakított fényérzékeny réteg vastagsága (és így a mikrocsipben a csatorna magassága) a forgatás sebességétől és időtartamától függ. A forgatási sebességet állandó értéken tartva (3000 fordulat/perc) és a forgatás időtartamát változtatva különböző vastagságú rétegeket hoztunk létre. Azt találtuk, hogy a fényérzékeny réteg vastagságának csökkenésével fokozatosan alakul ki a maszkon lévő vonal helyén a szűkület, majd egy bizonyos filmvastagság alatt már szakadás keletkezik a csatornában (11. ábra). Az ilyen körülmények közötti legjobb felbontást (azaz a litográfias maszkon lévő mintázat minél pontosabb másolatának kialakítását a fényérzékeny rétegen) 30 másodpercen át történő forgatással értük el.



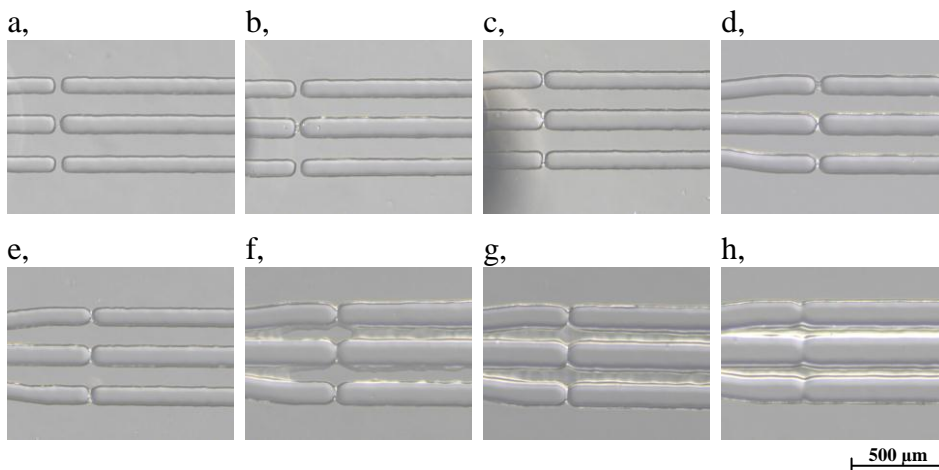
11. ábra

Az öntőformán kialakított fényérzékeny film vastagságának hatása az öntőformáról készült mikrocseppek csatornamintázatára. (A forgótárcsa (spincoater) forgatási időtartamai: a, 5 s; b, 10 s; c, 30 s; d, 60 s)

További körülmények: 3000 rpm, 10 min besugárzási idő; kb. 70 cm távolság a lámpa és a szilícium lap között.

Az öntőforma-készítés egyik meghatározó lépése a fényérzékeny réteg maszkon keresztül UV fénnel történő besugárzása, amely során több paraméter optimalizálását kellett elvégezni. A besugárzáshoz használt UV lámpa fényének intenzitása a bekapcsolás után megközelítőleg 10 perccel éri el a maximumot és ettől kezdve az intenzitás nagyjából állandónak vehető. A szilícium lap és az UV lámpa közötti optimális távolságot kb. 70 cm-nek találtuk, ekkor érte az optimális intenzitású fény a fényérzékeny anyagot.

A legjobb szűkület elérése érdekében a besugárzási időt is változtattuk, optimálisnak a 10 perces besugárzási időt találtuk. A hosszabb besugárzási idők alkalmazásával a kialakult mintázatok, ezáltal a szűkületek szélesedését figyelhettük meg (12. ábra), amelyek kevésbé stabil kromatográfiás töltetekhez vezetnek (csökken az öntőforma-készítés során elérhető felbontás mértéke).



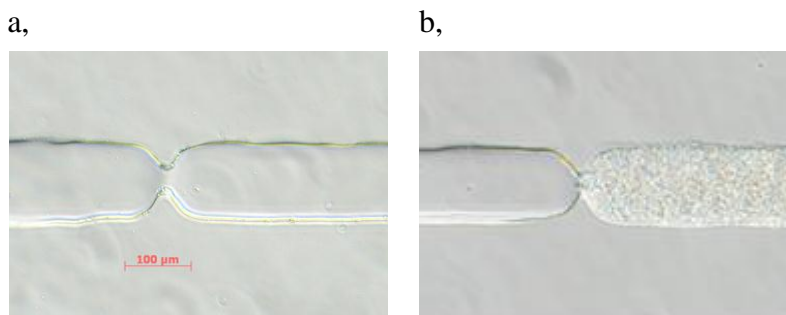
12. ábra

A besugárzási idő változtatásának hatása a kialakult csatornamintázatokra. A mikroszkópos felvételek az egyes öntőformákról készült mikrocsipek csatornarendszerének szűkületeket tartalmazó részleteit mutatják be.

Besugárzási idők: a, 7 min; b, 8 min; c, 9 min; d, 10 min; e, 12 min; f, 15 min; g, 20 min; h, 25 min.

További körülmények: 30 s x 3000 rpm; kb. 70 cm távolság a lámpa és a szilícium lap között.

Az így elkészített szűkülettel lehetőség nyílt kromatográfiás töltetek stabil visszatartására, melyek még a nagyobb nyomásokkal (2-3 bar) szemben is ellenállóak voltak (13. ábra).



13. ábra

A 100 μm szélességű csatornában létrehozott szűkület (a,) és a segítségével elkészített kromatográfiás töltet mikroszkópikus képe (b,).

Reprodukálhatóbban és egyszerűbben alakíthatóak ki a szűkületek a mikrocsipek csatornáiban, ha már a mintázatok tervezése során megrajzoljuk azokat. Ennél a módszernél is fontos, hogy az öntőforma készítése során megfelelő körülményeket alkalmazzunk.

A kb. 10-20 μm széles és 50 μm hosszú csatornákat a 100 μm széles csatornába rajzoltuk (14.a ábra), ezután a kinyomtatott litográfias maszkot (14.b ábra) felhasználva készítettük el az öntőformát, majd a mikrocsipeket (14.c ábra).



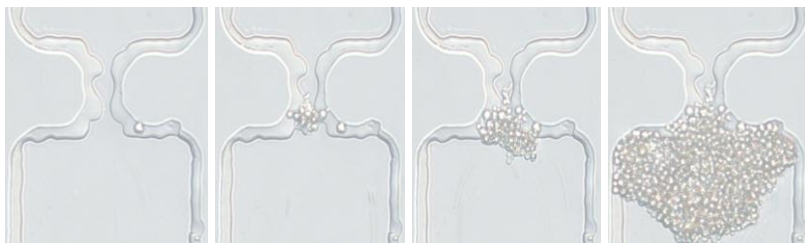
14. ábra

A 100 μm széles mikrocsatornába tervezett szűkületek az AutoCAD rajzon (a.), a litográfias maszkon (b.) és az elkészített mikrocsip csatornájában (c.).

A kromatográfias részecskékből metanolos szuszpenziót hoztunk létre (1 ml metanolban kb. 0,1 g kromatográfias részecskét oszlattunk el), melyet a részecskék azonos mérete miatt ülepités nélkül használtunk a töltés során. A töltést metanolos közegben végeztük, az elkészült szuszpenzióból perisztaltikus pumpával juttattuk be a részecskéket a csatornába, majd az áramlási sebesség folyamatos növelése után a maximális nyomás (3 bar) néhány másodpercnyi használatával tömörítettük a kialakult töltetet. A csatornák hosszát lecsökkentettük és teljes hosszában megtöltöttük őket részecskékkal, így biztosítva a töltetek közel azonos hidrodinamikai ellenállását. Az elkészült kromatográfias tölteteket desztillált vízzel mostuk és kondicionáltuk őket az analitikai mérésekhez.

4.1.4. A zárókőhatás tanulmányozása

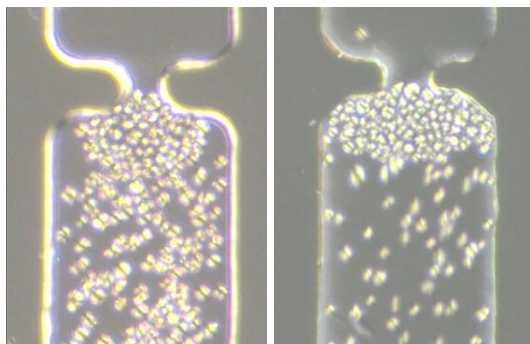
A kromatográfiás töltetek mikrofluidikai csip csatornájában történő megragadását és stabilitását az előzőekben bemutatott stabilizáló hatások segítik elő (2.3 fejezet) [71]. A zárókőhatás (keystone-effect) az a jelenség, amikor a részecskék méreténél két-háromszor nagyobb átmérőjű szűkületek elején megragadó részecskék tartják vissza a mögöttük jövő részecskéket (15. ábra).



15. ábra

A kromatográfiás töltetek kialakítása során jelentkező zárókőhatás (10 μm -es C18-as kromatográfiás részecskék, 100 μm csatornaátmérő).

A kialakult töltetek stabilitását jelentősen befolyásolják a szűkületek átmérői. Ha a csatornában kialakított szűkületek átmérője legfeljebb háromszor nagyobb, mint a kromatográfiás részecskék mérete, gyorsan tömör, stabil töltetek keletkeznek. A szűkület átmérőjének növelésével a kialakult töltetek stabilitása csökken. Abban az esetben, ha a csatornába juttatott részecskék átmérőjénél kb. ötször nagyobb a létrehozott szűkület, a részecskék időnként átjutnak a szűkületen, így ugyan kialakul a kromatográfiás töltet, de az nem stabil.



16. ábra

A különböző átmérőjű szűkületek esetén készített töltetek.
A részecskék átmérőjénél kb. háromszor (bal) és kb. ötször nagyobb (jobb) átmérőjű szűkületek.

Tehát abban az esetben, amikor 10 μm -es C18-as kromatográfiás részecskékből szeretnénk stabil töltet kialakítani, 20-25 μm -es szűkület kialakítására van szükség.

A zárókőhatás tanulmányozása során megvizsgáltuk a szűkületek hosszának hatását a kialakult töltetek stabilitására. A csatornamintázatok tervezése során különböző hosszúságú szűkületeket rajzoltunk a csatornába (50, 75, 100 és 125 μm). A kromatográfiás részecskék a szűkületek hosszától függetlenül a szűkület elején, az első 10-20 μm -es szakaszon akadnak meg. Megállapítottuk, hogy a kialakult töltetek stabilitására lényegében nincs hatással a szűkületek hossza (amennyiben legalább 10-20 μm hosszúak). Ezek alapján a mintázatok tervezése során a szűkületeket egységesen 50 μm hosszúságúnak rajzoltuk meg.

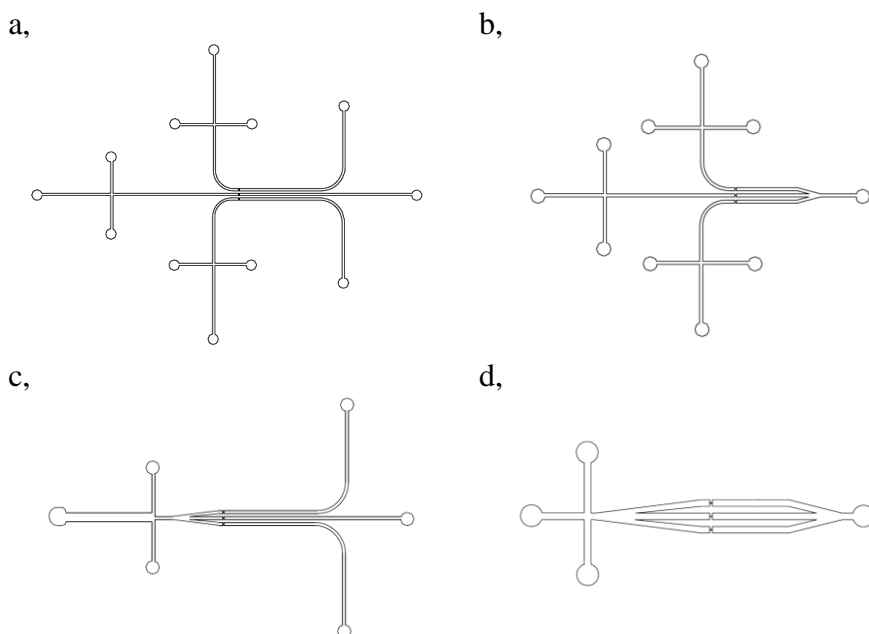
4.2. Három párhuzamos csatornát tartalmazó rendszerek

4.2.1. Csatornamintázatok tervezése

A többcsatornás mikrofluidikai rendszerek tervezése során megvizsgáltuk, hogy milyen közel kerülhet egymáshoz két (például 50 μm széles) csatorna. Figyelembe kellett vennünk, hogy a mikrosipen úgy helyezzük el a csatornákat és csatlakozási pontokat (portokat), hogy azok a későbbi mérések során használhatóak legyenek (folyadékok, minták bejuttatása a rendszerekbe). A párhuzamos csatornák nem lehetnek egymáshoz nagyon közel, mert a csatornák közötti kis távolságok már kisebb nyomás hatására is könnyen felszakadhatnak. Éppen ezért, az általunk tervezett csatornamintázatoknál minden esetben legalább 50 μm (egy csatornányi) távolság választja el egymástól a párhuzamos csatornákat. A folyadékok bejuttatására szolgáló portokat úgy helyeztük el a tervezett mintázaton, hogy a perisztaltikus pumpacsövek csatlakoztatása megoldható legyen. Ez különösen fontos azoknál a mikrosipeknél, ahol több minta egyidejű injektálására van lehetőség, hiszen a pumpacsövek kézzel történő csatlakoztatási műveletének van egy minimális hely(tér)igénye. A csatornák kivezetésének elhelyezkedése is fontos, ugyanis ezekhez a részekhez közel kell lennie a detektálási egységnek. Általános szabályként alkalmaztuk, hogy a ki/bemeneti portok egymástól legalább 4 mm távolságra legyenek. Gazdaságossági (ergonómiai) okokból az egy mikrosipen kialakított, különálló csatornamintázatok számát megnöveltük (pl. 3-6 mintázat/mikrosip).

A többcsatornás mikrofluidikai rendszerek tervezését a három párhuzamos csatornát tartalmazó mintázatok kialakításával kezdtük. A tervezett alakzatok főbb típusait a 17. ábrán foglaltuk össze. A mintázatok csoportosíthatóak az alapján, hogy a csatornarendszerek kapcsolatban állnak-e egymással vagy sem. Terveztünk három különböző kromatográfiás töltet kialakítására alkalmas csatornarendszereket, ahol a csatornák egymástól függetlenek, így a kromatográfiás részecskék egymás után juttathatóak be a párhuzamos csatornába (17.a, c ábra). A csatornarendszerek másik csoportjába

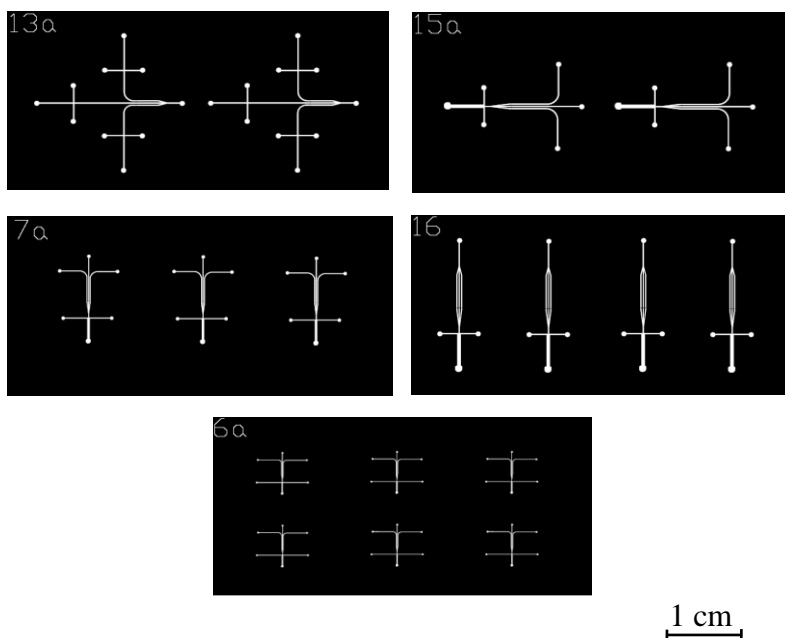
azok a mintázatok tartoznak, ahol a kromatográfiás részecskék bejuttatására szolgáló csatornarészek egymással kapcsolatban állnak, közös portban végződnek, így az azonos kromatográfiás töltetek egyidejűleg alakíthatóak ki a rendszerekben (17.b, d ábra). Mindkét típusú mintáztnál terveztünk olyan változatot, ahol három eltérő minta három különböző kereszteződésen juttatható a szeparációs csatornába (17.a, b ábra), illetve olyat is, amelynél az egyetlen mintát egyetlen kereszteződésbe áramoltatjuk, ahol aztán a bejuttatott minta egyenletesen oszlik el a párhuzamos csatornák között (17. c, d ábra).



17. ábra

Három párhuzamos csatornát tartalmazó mintázatok AutoCAD rajza.

A tervezett csatornamintázatok kis mérete miatt egy átlagos méretű mikrocipen (kb. 2,5 cm x 5 cm) több csatornarendszer is elhelyezhető. A mikrocipen lévő csatornamintázatok számát a csatornák alakja, mérete, a kivezető portok és injektáló egységek helyigénye határozza meg. Az általunk tervezett mikrocipeken 4-6 csatornarendszert tudtunk elhelyezni.



18. ábra

Három párhuzamos csatornát tartalmazó mikrocsipek készítéséhez használt litográfiás maszkok.

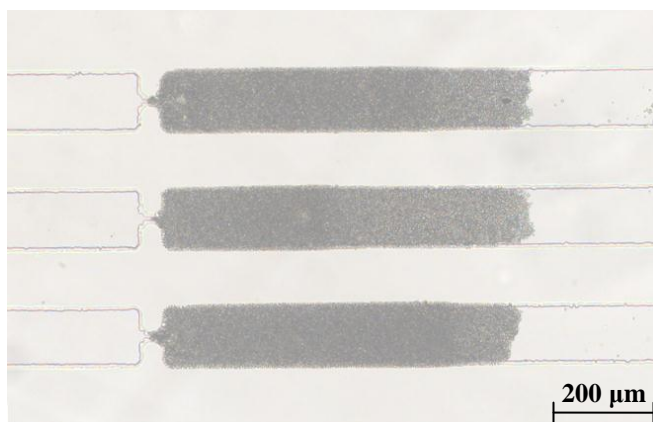
4.2.2. Kromatográfiás töltetek kialakítása mikrocsipekben

A kromatográfiás töltetek kialakítása során az 4.1.3. fejezetben bemutatott módszert használtunk, vagyis a részecskéket a csatornában kialakított szűkületek segítségével tartottuk vissza.

A kialakított kromatográfiás töltetek méreteit a tervezés során (szélesség, hosszúság) illetve az öntőforma készítésekor alkalmazott paraméterek változtatásával (vastagság) befolyásolhatjuk. Az öntőforma-készítés során kialakított fényérzékeny réteg vastagsága határozza meg a csatorna magasságát, majd a későbbiekben az elkészített töltetek vastagságát. A legkisebb elérhető csatornamagasság kb. $15\text{ }\mu\text{m}$, amely alkalmazása mellett két-három réteg kromatográfiás részecske egymásra rakódását figyelhetjük meg. Míg ha a fényérzékeny réteg vastagabb, a csatornamagasság kb. $40\text{ }\mu\text{m}$, a kialakított csatornában több, akár 8-10 réteg is egymásra rakódhat az $5\text{ }\mu\text{m}$ átmérőjű kromatográfiás részecskékből.

A párhuzamos kromatográfiás töltetek kialakítása során arra törekedtünk, hogy egyforma tömörségű és hosszúságú tölteteket hozzunk létre a csatornában. Ez különösen fontos volt a minták injektálhatóságának szempontjából.

Az egymástól független csatornarendszerek párhuzamos csatornáinak végén külön-külön csatlakoztatási pontokat alakítottunk ki (17.a és 17.c ábrák), amelyeken át a kromatográfiás részecskék egymás után juttathatóak be a csatornába, a töltetek egymás után alakíthatóak ki. Az ilyen rendszerekben különböző típusú kromatográfiás részecskékből készíthetünk tölteteket.



19. ábra

Három párhuzamos kromatográfiás töltet kialakítása 5 μm-es hagyományos C18-as részecskékből, egymástól független csatornarendszerben.

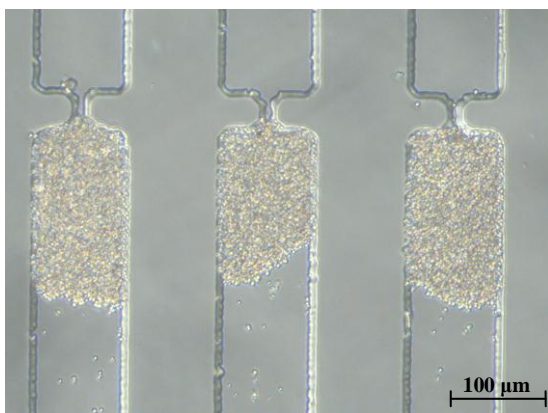
A kialakult töltetek hossza természetesen a mikrocsipbe bejuttatott részecskék mennyiségétől függ. Azonos hosszúságú kromatográfiás töltetek kialakítása, vagyis egyenlő mennyiségű részecske csatornába juttatása nagy gyakorlati tapasztalatot igénylő feladat. Ezt a töltési nehézséget küszöböltük ki azzal, hogy a csatornák hosszát lecsökkentettük és a kromatográfiás tölteteket ezek teljes hosszában alakítottuk ki. A töltési folyamat végén az elkészült tölteteket desztillált vízzel mostuk, amely után már alkalmas volt kromatográfiás elválasztások kivitelezésére.



20. ábra

A párhuzamos csatornában lévő töltetek méreteinek szemléltetése egy 20 Ft-os érme segítségével (A három töltet az *i* betű felett látható.).

Az egymással kapcsolatban álló csatornamintázatok esetén (17.b és 17.d ábrák) a kromatográfiás részecskék mikrocsonkába töltését egy közös portból tudjuk elvégezni, vagyis a párhuzamos töltetek kialakítására egyidejűleg van lehetőségünk. Ebben az esetben a rendszerbe juttatott kromatográfiás részecskék közel azonosan oszlanak el a párhuzamos csatornák között, így hasonló hosszúságú kromatográfiás töltetek készíthetők.



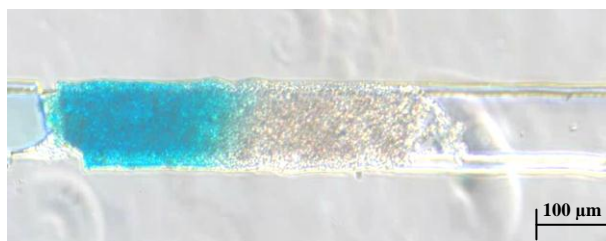
21. ábra

Egymással kapcsolatban álló csatornában lévő kromatográfiás töltetek (5 μm -es C18-as részecskék töltése a 100 μm -es csatornába).

4.2.3. A mikrocsipben történő kromatográfiás elválasztások tanulmányozása

A mikrocsipek csatornáiban kialakított kromatográfiás töltetek tanulmányozását olyan aerogél töltetek vizsgálatával kezdtük, melyeket a csatornák magasságának csökkentésével kialakított szűkületek segítségével tartottunk vissza (4.1.2. fejezet).

A mikrocsatornákba töltött C16-os oldallánccal módosított aerogél részecskékből készített töltetek kromatográfiás sajátságait ételfestékek segítségével vizsgáltuk, a hagyományos C18-as töltetekkel hasonlósági tulajdonságokat vártunk. Kb. 100 nl-nyi híg kék ételfesték oldatot vittünk fel az elkészített töltetre, ehhez kb. 300 másodpercre volt szükség.



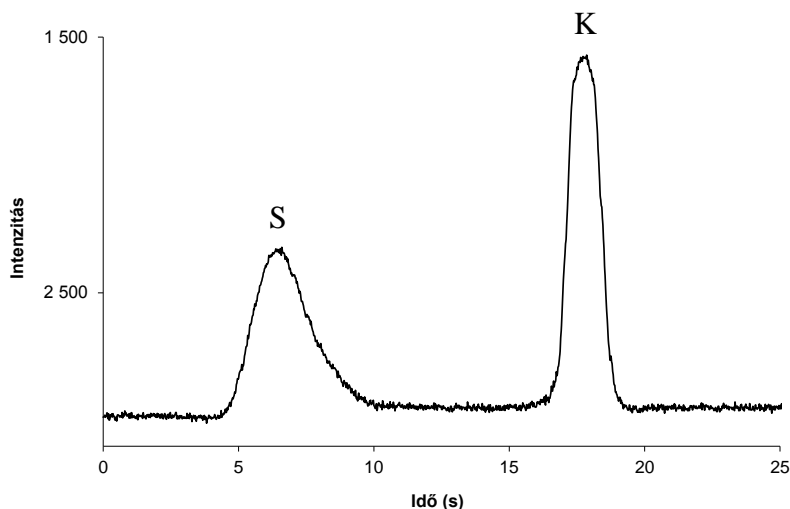
22. ábra

A C16-os oldallánccal módosított szilika aerogél tölteten megkötött kék festék.

A kék festék megkötődött és koncentrált a töltet elején, metanolos mosás hatására kb. 2 nl-nyi térfogatban, 8 másodperc alatt teljesen eluálódott a töltetről, ez nagyjából ötvenszeres dúsítási faktor értéket jelent.

A komponensek megkötése mellett a tölteten természetesen több komponens egymástól való elválasztása is lehetséges. Zöld ételfesték keveréket választottunk el az előző kísérlet során használt aerogél tölteten, amelyen a kék komponens megkötődött, míg a sárga komponens csekély retenció mellett áthaladt rajta. Az elválasztást vizes közegben végeztük, a megkötődött kék komponenst metanollal mostuk le a töltetről. A rendszerbe injektált mindössze 1 nl-nyi minta

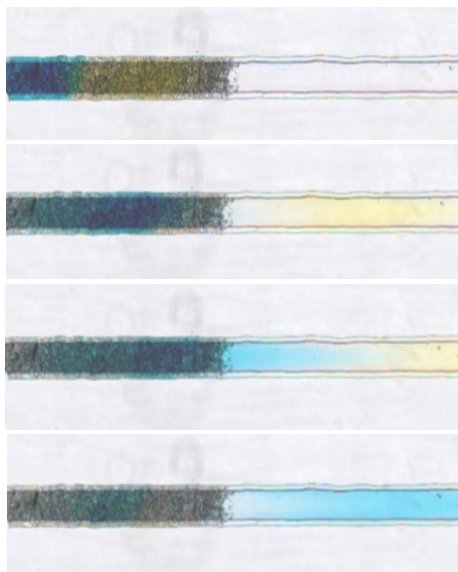
elválasztásához kb. 20 másodpercre volt szükség, a 23. ábrán látott kromatogramot a mikroszkóp szoftverébe épített modul segítségével vettük fel. (A csatorna egy kijelölt pontján mértük a színintenzitás változását az időben.) A kromatogramon látható a kék komponens elúciója során jelentkező dúsuló effektus (keskenyebb, de magasabb csúcs, mint a sárga komponens esetén).



23. ábra

A sárga (S) és a kék (K) ételfesték elválasztása során felvett kromatogram (C16-os oldallánccal módosított szilika aerogél töltet, 1 nl mintatérfogat, oldószerváltás, detektálás a töltet vége után 50 μm -rel).

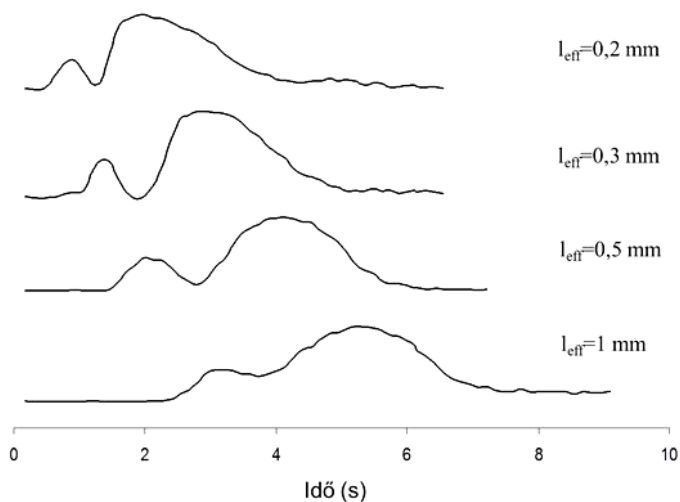
Ugyanezen elválasztást izokratikus körülmények mellett is elvégeztük, melyhez először a mozgófázis összetételét optimáltuk. A mozgófázis metanol tartalmát 15-45% között változtattuk. 35%-os metanol tartalom esetén szinte teljes alapvonali elválást kaptunk, így ilyen körülmények mellett a perisztaltikus pumpával elérhető legnagyobb nyomás (3 bar) alkalmazásával választottuk el a festékelegyet (24. ábra). Ekkor a két komponens elválasztása 10 másodpercen belül megtörtént.



24. ábra

A sárga és kék ételfesték elválasztása C16-os aerogél tölteten 100 μm átmérőjű csatornában (35% MeOH-H₂O elegy, 1 nl mintatérfogat, 3 bar nyomás, az egyes fényképek felvétele 2 másodpercenként történt).

A mikroszkóp szoftverével történő detektálás egyik nagy előnye, hogy az elválasztott komponensek nem csak a töltet után a csatornában, hanem magán a tölteten is detektálhatóak. (A kromatográfiás részecskékből kialakított vékony töltetek elég átlátszóak a színintenzitás változásának méréséhez.) A 25. ábrán 0,5 mm hosszú tölteten történő elválasztás során, a csatorna különböző pontjaiban felvett kromatogramok láthatóak. Az elválasztás hatékonysága természetesen függ a detektálás helyétől, azaz az elválasztási hosszától. A töltet elején még nem teljes az elválás a két komponens között, a legjobb elválasztást a töltet végén detektálva kapjuk, míg a töltet után, a csatornában már a diszperziós hatások érvényesülése miatt az elválasztott komponensek sávjai kiszélesednek és részlegesen összeolvadnak.



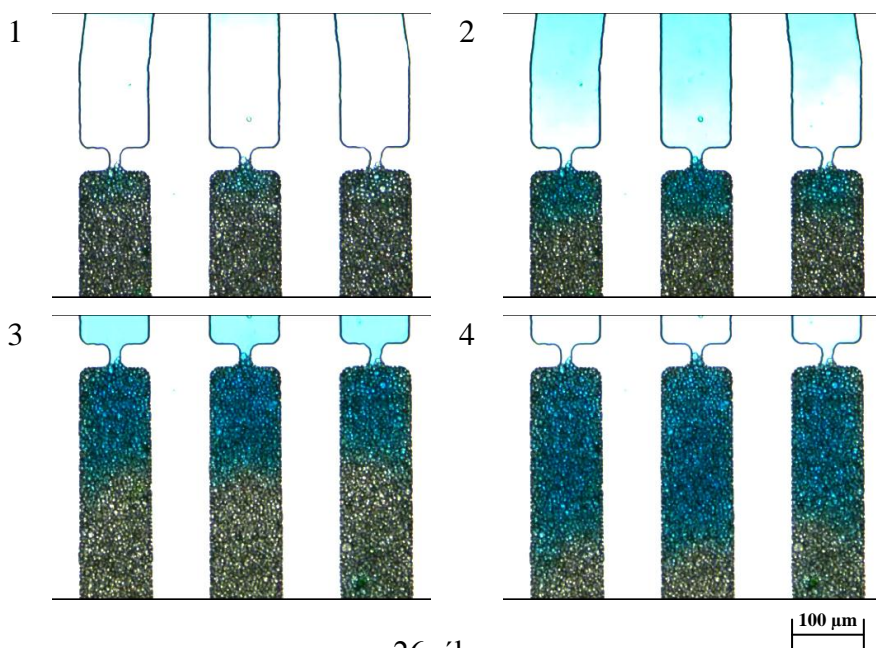
25. ábra

A szeparációs csatorna különböző pontjainál felvett kromatogramok (zöld festék, 35% MeOH-H₂O elegy, 1 nl mintatérfogat, 3 bar nyomás, 0,5 mm hosszú töltet).

A többcsatornás rendszerek egyik nagy előnye az egyidejűleg végezhető, párhuzamos elválasztások lehetősége.

Egymással kapcsolatban álló rendszerekben ugyanolyan kromatográfiás töltetek kialakítására van lehetőségünk, melyekre ugyanazt a mintát injektálva, gyorsan, többszörösen megismételt mérési eredményhez juthatunk. A csatornarendszerben hagyományos 5 µm-es C18-as részecskékből alakítottunk ki kromatográfiás tölteteket, melyeken a kétkomponensű festékelegy kék komponense megkötődött, a sárga komponens visszatartás nélkül áthaladt rajta (26. ábra).

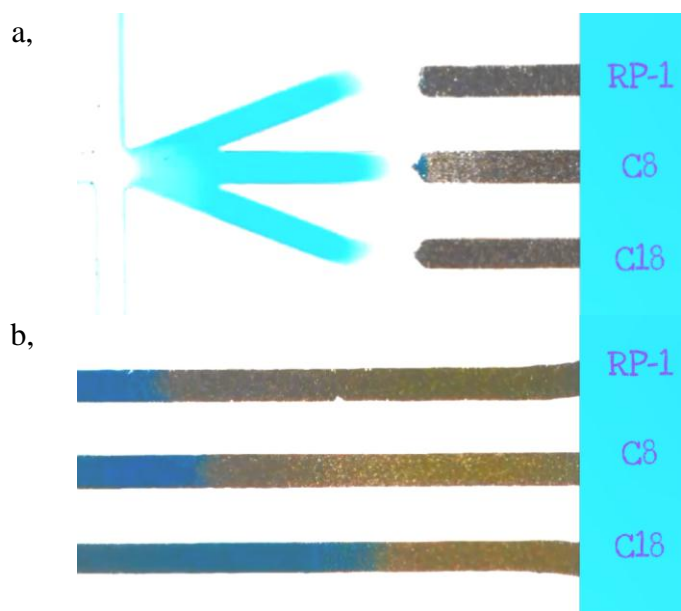
Ezekre a rendszerekre analitikai teljesítményjellemzőket is meghatároztunk. Két mikrofluidikai rendszerben összesen 6 kromatográfiás tölteten végzett egyidejű elválasztás (26. ábra) alapján a kék komponensek elúciós idejének relatív standard deviációja 3,6%-nak adódott. Amennyiben a kék festéket tizenháromszor (N=13) injektáltuk ugyanazon kromatográfiás töltetre, a csúcsmagasságokra 5,6%-os, a retenciós időkre 5,1%-os relatív standard deviáció értékeket kaptunk.



26. ábra

Kétkomponensű ételfesték keverék egyidejű elválasztása három egyforma kromatográfiás (10 µm, C18) tölteten.

Az egymástól független rendszerekben három különböző kromatográfiás töltetet (5 µm-es RP-1, C8 és C18 oldallánccal módosított szilikagél részecskékből) alakítottunk ki. Ezekre zöld ételfesték keveréket injektáltunk, ami közel azonos mennyiségben oszlott el a csatornák között (27.a ábra). A kék festék retenciója az RP-1-es tölteten volt a legerősebb, ezért a kék komponens retenciósideje itt volt a legnagyobb, 25% metanol-víz mobilfázis alkalmazása mellett a leggyorsabban elérhető teljes elválasztást a C8-as oldallánccal módosított szilikagél részecskékből készült tölteten kaptuk (27.b ábra).



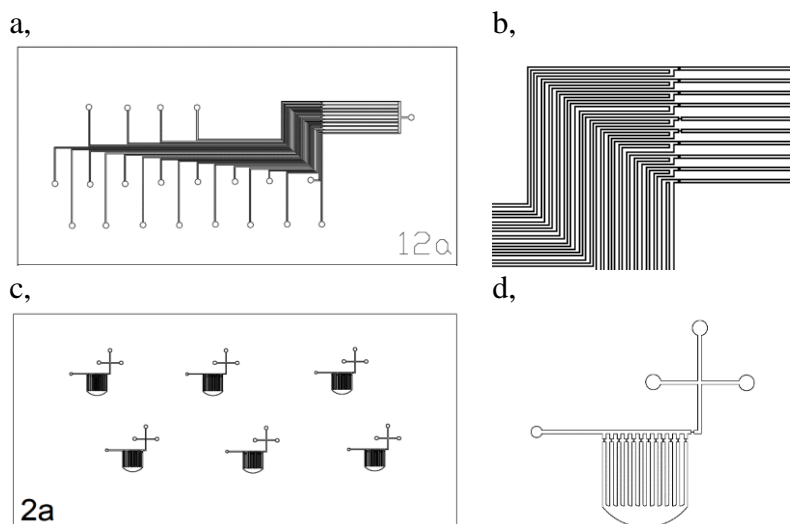
27. ábra

Zöld ételfesték keverék egyidejű elválasztása három különböző (RP-1, C8, C18) kromatográfiás tölteten 100 μ m széles csatornában. A beinjektált mintadugó egyenlően oszlott el a párhuzamos töltetek között (a.), az ilyen körülmények között (25% metanol-víz elegy) elérhető legjobb elválasztást a C8-as tölteten érték el (b.).

4.3. Tíz vagy több párhuzamos csatornát tartalmazó mikrofluidikai rendszerek

4.3.1. Többcsatornás mikrofluidikai rendszerek tervezése

A tíz vagy több párhuzamos csatornát tartalmazó mikrofluidikai rendszerek tervezése során hasonlóképpen jártunk el, mint a háromcsatornás rendszerek esetén. Terveztünk olyan tíz párhuzamos csatornát tartalmazó mikrocsipet, ahol azonos kromatográfiás tölteteket kialakítására van lehetőségünk, viszont a mintát a töltetekre egymástól függetlenül injektálhatjuk (28.a, b ábra). Ez azt jelenti, hogy egyidejűleg akár tíz párhuzamos elemzés is elvégezhető tíz különböző mintából.



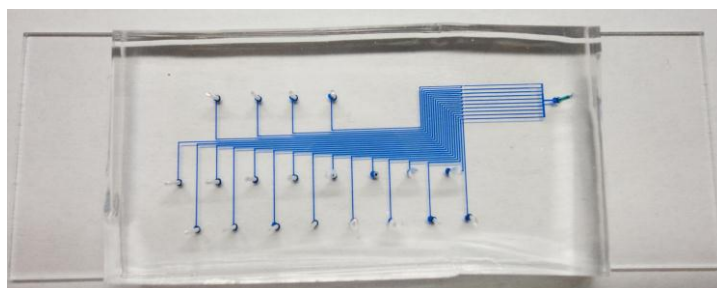
28. ábra

Egy mikrocsipen több kromatográfiás töltet készítésére alkalmas csatornamintázatok AutoCAD rajzai.

(Tíz párhuzamos csatornát tartalmazó mintázat (a,) és a szűkületeket tartalmazó csatornarész nagyított rajza (b,). 6 darab, tizenkét párhuzamos csatornát tartalmazó mintázat (c,) és egy ilyen mintázat nagyított rajza (d,).)

A tizenkét párhuzamos csatornát tartalmazó mikrocsip mintázata is azonos kromatográfiás töltetek kialakítására ad lehetőséget, de itt az

injektált minta tizenkét részre oszlik, így ugyanazon mintából végezhető tizenkét párhuzamos mérés egyidejűleg (28.c, d ábra). A tizenkét csatornás rendszer esetén, ahogy a fenti ábrán is láthatjuk, még a csatornarendszerek sokszorosítására is volt lehetőség. Egy mikrocsipen hat csatornahálózat egymástól zavartalanul alakítható ki. A tíz párhuzamos csatornát tartalmazó maszkról öntőforma, majd mikrofluidikai csip is készült, melynek csatornáit - a jobb szemléltetés érdekében - kék ételfestékkel töltöttük (29. ábra).

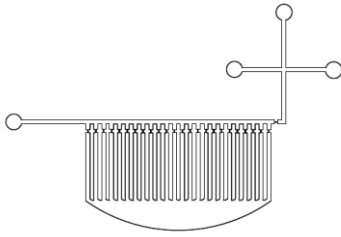


29. ábra

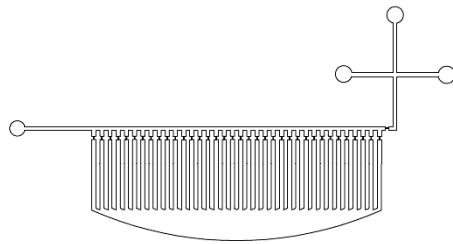
Többcsatornás mikrofluidikai csip csatornáit festékkel töltve.

A párhuzamos csatornák száma növelhető mindaddig, míg a további csatornarészek megfelelő elhelyezkedésére lehetőség van (például a portok és az injektáló egységek megfelelő távolságban kell legyenek egymástól). A tizenkét párhuzamos csatorna sokszorosítását követően, terveztünk 24, 36 illetve 60 párhuzamos csatornát tartalmazó rendszereket is, amelyek közös kivezető porttal rendelkeznek, így azonos kromatográfiás töltetek kialakítására alkalmasak (30. ábra).

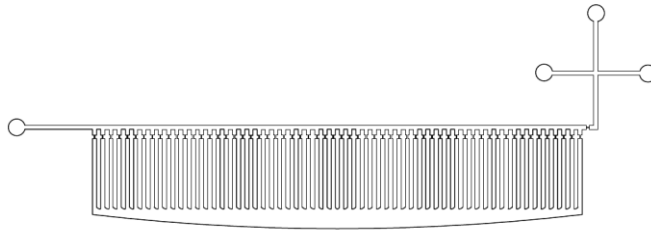
a,



b,



c,



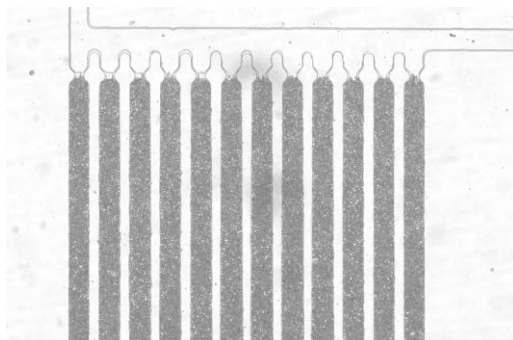
30. ábra

Sokcsatornás mikrofluidikai rendszerek AutoCAD rajzai.
(24 párhuzamos csatornát (a.), 36 párhuzamos csatornát (b.) és 60
párhuzamos csatornát (c.) tartalmazó rendszerek.)

4.3.2. Kromatográfiás töltetek kialakítása mikrocseppekben

A sokcsatornás rendszerekben is a korábban (4.1.3. és 4.2.2. fejezet) bemutatott módszerrel alakítottuk ki a kromatográfiás tölteteket, vagyis a párhuzamos csatornák tervezése során létrehozott szűkületek segítségével tartottunk vissza kromatográfiás részecskéket.

A tizenkét párhuzamos csatornát tartalmazó rendszerbe a közös kivezető porton keresztül bejuttatott kromatográfiás részecskék, hasonlóan a háromcsatornás rendszerekben lejátszódó folyamatokhoz, eloszlottak a csatornák között és gyorsan, tömör töltetek keletkeztek (31. ábra).



31. ábra

Tizenkét párhuzamos csatornában kialakított 100 μm széles kromatográfiás töltet 5 μm átmérőjű, hagyományos C18-as kromatográfiás részecskékből.

Valószínűsíthető, hogy nagy számú (>10) kromatográfiás töltet egyidejű kialakítása viszonylag könnyen megvalósítható úgy, hogy a részecskéket közös porton keresztül a szűkületek felé áramoltatjuk. Az ilyen sok csatornás rendszerekben azonban gyakorlatilag csak egyféle minta injektálására van lehetőségünk, a tervezés során a mintabejuttatáshoz kialakítható egyetlen csatornakereszteződés miatt (30. ábra).

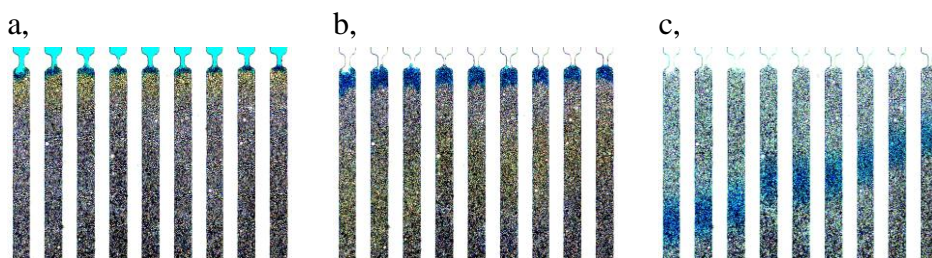


32. ábra

Tizenkét kromatográfiás töltet méretének szemléltetése egy gyufaszál segítségével.

4.3.3. A mikrocsipben történő kromatográfiás elválasztások tanulmányozása

Az előző fejezetben bemutatott, tizenkét párhuzamos kromatográfiás tölteten egyidejűleg végezhető kromatográfiás elválasztások hatékonyságának teszteléséhez szintén ételfestékek keverékét használtuk. A sárga és kék ételfesték keverékének mindössze 1 μl -ét injektáltuk a rendszerbe, amely egyenlően oszlott el a tizenkét párhuzamos kromatográfiás töltet között (33.a ábra). A keverék sárga komponense visszatartás nélkül haladt át a C18-as oldallánccal módosított részecskékből álló tölteteken (33.b ábra), a megkötődött kék komponens metanolos mosással oldottuk le róluk (33.c ábra). Az elválasztásához mindössze 30 másodpercre volt szükség.

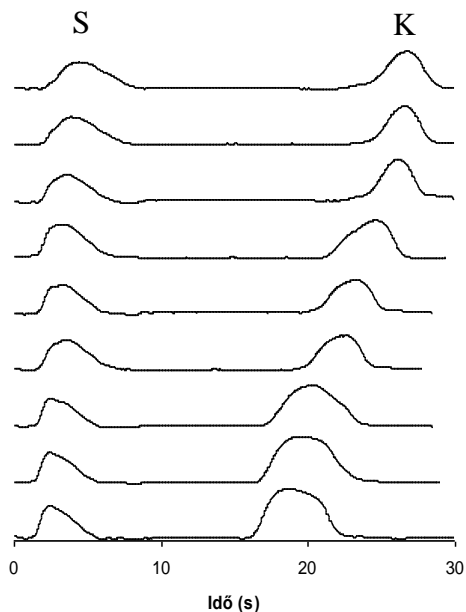


33. ábra

Zöld ételfesték keverék egyidejű elválasztása tizenkét párhuzamos 100 μm széles kromatográfiás tölteten.

Az elválasztott komponensek detektálása itt is a mikroszkóp szoftverébe épített modul segítségével, a tizenkét csatornában a színintenzitás változásának egyidejű mérésével történt. A detektálás a kromatográfiás tölteteken, a szűkületektől kb. 0,5 mm távolságra történt, az ilyen módon kapott kromatogramok a 34. ábrán láthatóak. Meghatároztunk több, a kromatográfiás töltetek jellemzésére szolgáló teljesítményjellemzőt. A 2 mm hosszúságú töltetre vonatkozó elméleti tányérmagasság értéke 0,75 μm -nek adódott (0,0176 mm/s, vagyis 4,2 nl/perc áramlási sebesség esetén), az elméleti tányérszám 2500 (1 330 000/m) volt. A

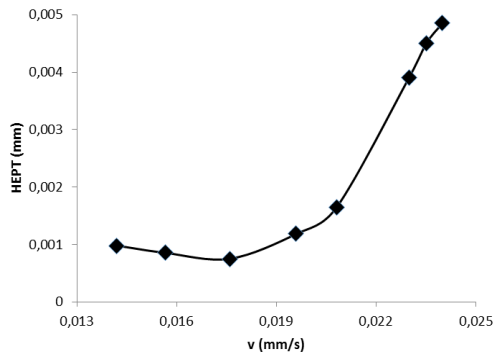
Brillantkék FCF (E133) festékre meghatározott teljes kapacitás ugyanezen a tölteten $7,5 \cdot 10^{-12}$ mol/ μm értéknek adódott.



34. ábra

A sárga (S) és kék (K) ételfesték tizenkét kromatográfiás tölteten történő kromatográfiás elválasztása során kapott kromatogramok.

A párhuzamos csatornában az áramlási sebességek nem azonosak, folyamatosan csökkentek, a csatornában mért legnagyobb áramlási sebesség több mint kétszerese a legkisebb áramlási sebességnek. A csatornákbeli különböző áramlási sebességek a kromatográfiás elválasztások összehasonlíthatósága szempontjából problémát okoznak, ugyanakkor lehetőséget adnak egy érdekes alkalmazásra is. A csatornában jelentkező különböző áramlási sebességeket felhasználva egyetlen mérés alapján megalkotható a van Deemter diagram. A diagram görbéjének minimumát meghatározva a hatékony kromatográfiás elválasztáshoz szükséges optimális áramlási sebesség egyszerűen meghatározható (35. ábra), esetünkben ez 4,2 nl/perc-nek (0,0176 mm/s) adódott.



35. ábra

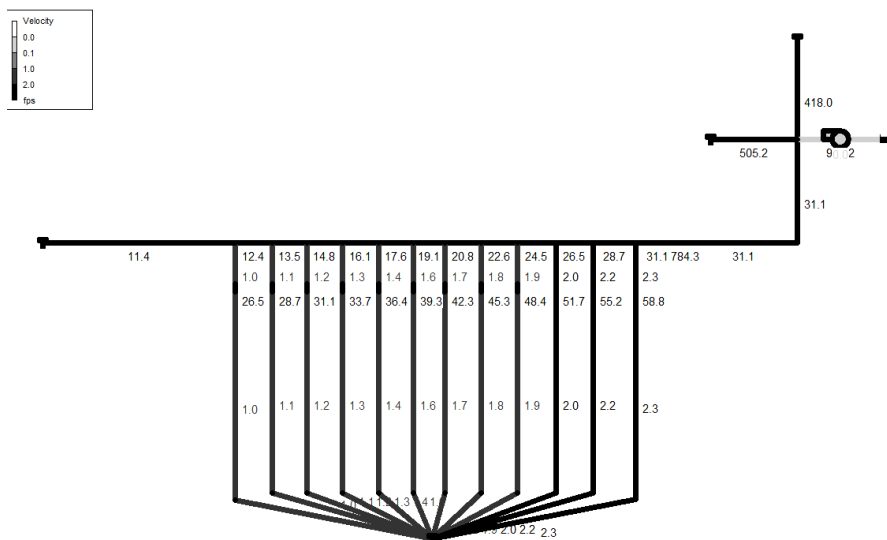
A tizenkét párhuzamos kromatográfiás töltetet tartalmazó rendszerben történő elválasztás során mért különböző áramlási sebességekből meghatározott van Deemter diagram.

4.3.3. Folyadékok áramlásának modellezése mikrofluidikai rendszerekben

A bonyolult mikrofluidikai rendszerekben, amelyek sok kereszteződést, szerteágazó csatornákat, ki- és bevezető portokat tartalmaznak, a folyadékok áramlásának irányát, sebességét, a fellépő nyomás mértékét nehéz megjósolni. A szimulációs szoftverek lehetőséget nyújtanak a mikroszkópikus rendszerek modellezésére és így hatékonyabb tervezésére.

Az előző fejezetben bemutatott, a párhuzamos csatornában különböző áramlási sebességekkel jellemezhető mikrofluidikai rendszerünkben szoftveresen modelleztük a folyadékáramlásokat. A modellezéshez először a vízvezeték hálózatok szimulálására használható, viszonylag egyszerű szoftvert, az EPANET-et (www.epa.gov) használtuk, mely működése a Hazen-Williams összefüggésen alapul.

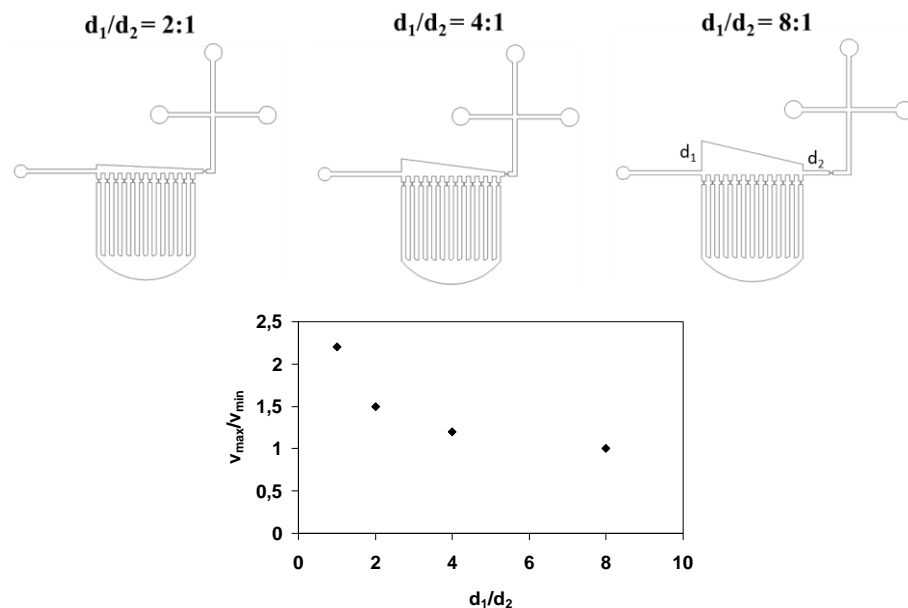
A csatornarendszerünkön lefuttatva az EPANET szimulációt, azt az eredményt kaptuk, hogy az első és az utolsó csatorna között az áramlási sebességek aránya nagyobb mint kettő, vagyis az első csatornában több mint kétszer akkora sebességgel áramlik a folyadék, mint a tizenkettedikben (36. ábra). Ez megfelel a kísérleteinkben tapasztalt eredményeinknek.



36. ábra

Az áramlási sebességek modellezése a tizenkét párhuzamos csatornát tartalmazó rendszerben EPANET segítségével. A csatornaszakaszokhoz számolt értékek mértékegysége fps, azaz láb/s.

A szoftver segítségével szimulációkat végeztünk az áramlási sebességek kiegyenlítésének érdekében. A legjobb eredményeket a párhuzamos csatornák feletti vízszintes csatornarész paramétereinek módosításával értük el. Növeltük a csatorna kezdeti és végpontjában mért átmérők arányát, melynek hatására a csatornában az áramlási sebességek aránya csökkent (37. ábra). Abban az esetben, amikor a párhuzamos csatornák végpontjában nyolcszor nagyobb volt az átmérő, mint a kezdőpontban, már közel azonosak voltak a sebességek a párhuzamos csatornában.



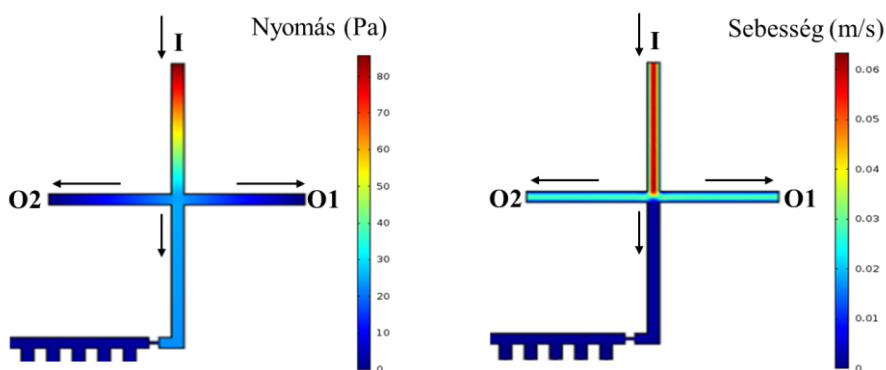
37. ábra

A számított sebességarányok alakulása különböző d_1/d_2 átmérőarányok esetén.

Mivel az EPANET nem a mikrorendszerek modellezésére kifejlesztett szoftver, ezért a későbbiekben a COMSOL Multiphysics szoftvert alkalmaztuk a mikrocsipek csatornáiban fellépő áramlási viszonyok szimulálására. A COMSOL egy olyan mérnöki szimulációs szoftver, amivel folyadékok áramoltatását/áramlását tudjuk modellezni mikrofluidikai rendszerekben.

A szimulációkat üres csatornákat feltételezve készítettük el, ugyanis a párhuzamos csatornában kialakított kromatográfiás töltetek által kifejtett ellenállások beépítése az áramlási szimulációs kísérletekbe igen nehéz folyamatnak bizonyult. A kromatográfiás részecskékkel töltött csatornában az áramlási sebességek jóval kisebbek lesznek, a nagyobb ellenállás miatt, de arányaikban nem fognak változni. Ugyanakkor a párhuzamos csatornákat tartalmazó csatornarész hossza és bonyolultsága miatt még üresen is bizonyos mértékű ellenállást okoz a csatornában, ami a minták injektálása során a megfelelően kis mintadugó kialakulásában is szerepet játszott. A minták injektálásához

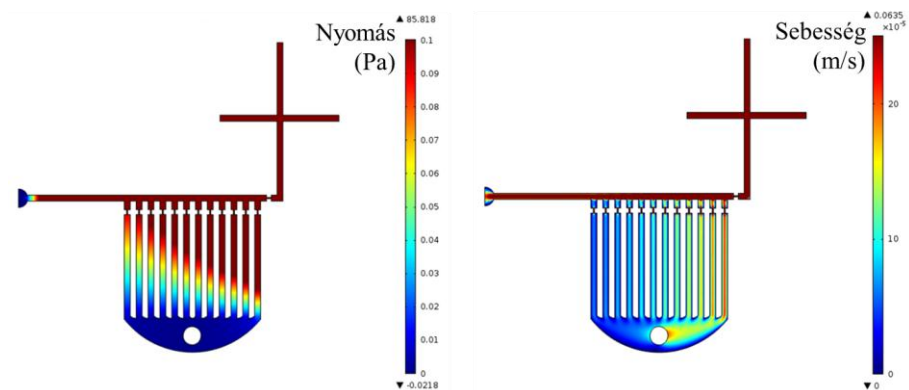
a tervezés során kialakított kereszteződést használtuk, a mintadugó ez után keletkezett (38. ábra). A mintát az *I* porton keresztül juttattuk be a rendszerbe 10 $\mu\text{l}/\text{perc}$ sebességgel (kb. 60 Pa nyomással), a párhuzamos csatornák felé 0,32 $\mu\text{l}/\text{perc}$ sebességgel áramlott a folyadék, míg az *O1* és *O2* portok felé 9,57 $\mu\text{l}/\text{perc}$ -es sebességet határoztunk meg.



38. ábra

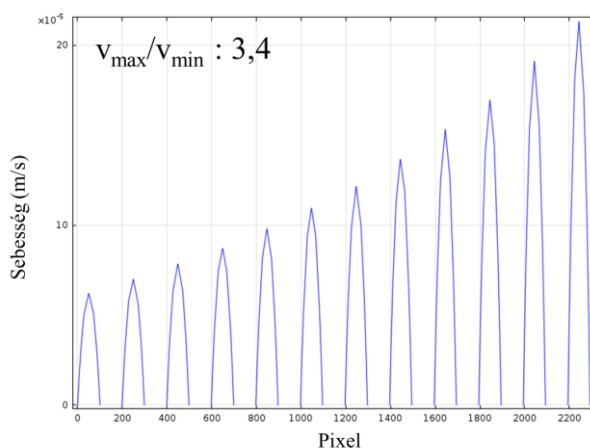
A csatornarendszer kereszteződésének COMSOL modellje, nyomáseloszlás (bal) és sebességeloszlás (jobb) diagramok.

Modelleztük a tizenkét párhuzamos csatornát tartalmazó rendszerben (28.d ábra) történő folyadékáramlásokat is. A 39. ábrán látható nyomás- és sebességeloszlás görbéken nagy különbségek figyelhetők meg a párhuzamos csatornában számított áramlási sebességekben. Az így meghatározott legnagyobb és legkisebb áramlási sebességek aránya több mint kettő, amit a 4.3.3. fejezetben leírt kísérlet során is tapasztaltunk. Ez a különbség még inkább látható volt az ún. "vonalminti" sebességeloszlás diagramon (40. ábra), amelyet akkor kaptunk, amikor a párhuzamos csatornákat azokra merőlegesen egy vízszintes vonallal elmetsettük. Ezen vonal mentén mértük az áramlási sebességeket a csatornában.



39. ábra

A COMSOL szimulációk eredményei: nyomáseloszlás (bal) és sebességeloszlás (jobb) diagramok.



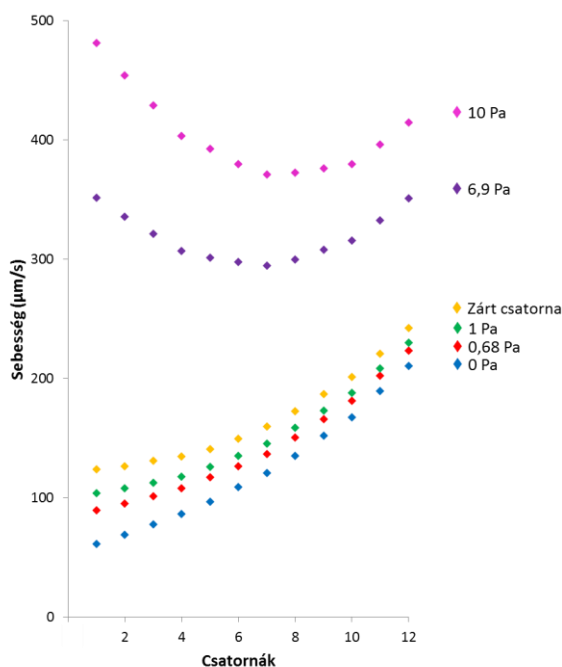
40. ábra

A tizenkét párhuzamos csatornában számított áramlási sebességek a csatornákra merőleges vízszintes vonal mentén mérve.

Annak érdekében, hogy meghatározzuk az áramlási sebességek különbözőségének okait és kiegyenlítsük ezeket a sebességeket a párhuzamos csatornáknban, szimulációs kísérleteket végeztünk. Megvizsgáltuk a folyadékok rendszerbe juttatása során alkalmazott áramlási sebességek hatását a párhuzamos csatornáknban kialakuló sebességekre. Az injektálási sebesség széles skálán történő változtatása

(0,1-100 $\mu\text{l/perc}$) csak nagyságrendileg okozott változásokat a párhuzamos csatornák sebességeiben, azok arányaiban jelentős különbségeket nem találtunk. A Reynolds-számok folyamatosan növekedtek az injektálás során alkalmazott sebességek növekedésével, de a legnagyobb érték is csak 0,2-nek adódott (100 $\mu\text{l/perc}$ injektálási sebesség esetén), ami jelzi, hogy ezekben a rendszerekben a folyadékok áramlása erősen lamináris. Ez a lamináris jelleg teszi lehetővé a szimulációs szoftverek alkalmazását a mikrofluidikai rendszerekben.

A mikrocsipek készítése során kézi lyukasztó segítségével alakítjuk ki a portokat, melyeken keresztül a folyadékok bejuttathatóak a rendszerekbe. A folyamat során kisebb szűkületeket hozhatunk létre a portoknál, amik egyfajta ellennyomásnak felelnek meg a mikrocsipek használata során. Szimulációk segítségével vizsgáltuk, hogy egy ilyen kisebb ellennyomásnak milyen hatása van a csatornában kialakult áramlási sebességekre.



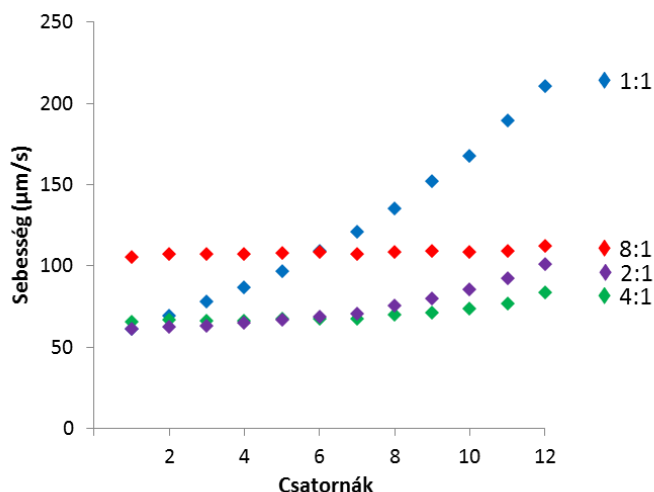
41. ábra

A portokban kialakuló ellennyomások hatására létrejövő áramlási sebességek a párhuzamos csatornában.

A párhuzamos csatornák feletti vízszintes csatorna végén lévő (outlet) port esetén különböző mértékű ellennyomásokat állítottunk be (0 és 10 Pa között) és számítottuk ki a párhuzamos csatornákon belüli áramlási sebességeket (41. ábra). Az ellennyomás növelésével a sebességek közötti különbségek egyre csökkennek, 2 Pa nyomásérték esetén a monoton növekedés helyett azt tapasztaltuk, hogy a nagyobb értékek a külső csatornáknál, a kisebbek pedig a középen lévő csatornáknál jelentkeztek. Amennyiben 6,9 Pa ellennyomást alkalmaztunk a vízszintes csatorna végén lévő portnál, a két szélső csatornában egyenlő áramlási sebességekhez jutottunk. Ekkor a legnagyobb és legkisebb áramlási sebesség aránya is 1,2 körüli volt, ami az ilyen módon elérhető legjobb eredmény a csatornabeli sebességek kiegyenlítése érdekében. 0,68 Pa ellennyomás használatával valószínűleg pontosan modellezni tudtuk az általunk kialakított portok állapotát (geometriáját, hidrodinamikai ellenállását), illetve azok hatását a rendszerben kialakult áramlási viszonyokra. A 0,68 Pa ellennyomás alkalmazása mellett teljesen visszakaptuk a kísérletesen meghatározott sebességprofilokat.

A párhuzamos csatornák áramlási sebességeinek kiegyenlítésére több módszert is találtunk. Elzártuk, illetve kinyitottuk a csatornarendszer egyes portjait, nyomást vagy vákuumot alkalmaztunk a csatornarendszer egyes pontjainál. Ezekkel a módszerekkel ugyan kiegyenlítettük a csatornabeli sebességeket, de ezek a módosítások kísérletesen nehezen valósíthatóak meg.

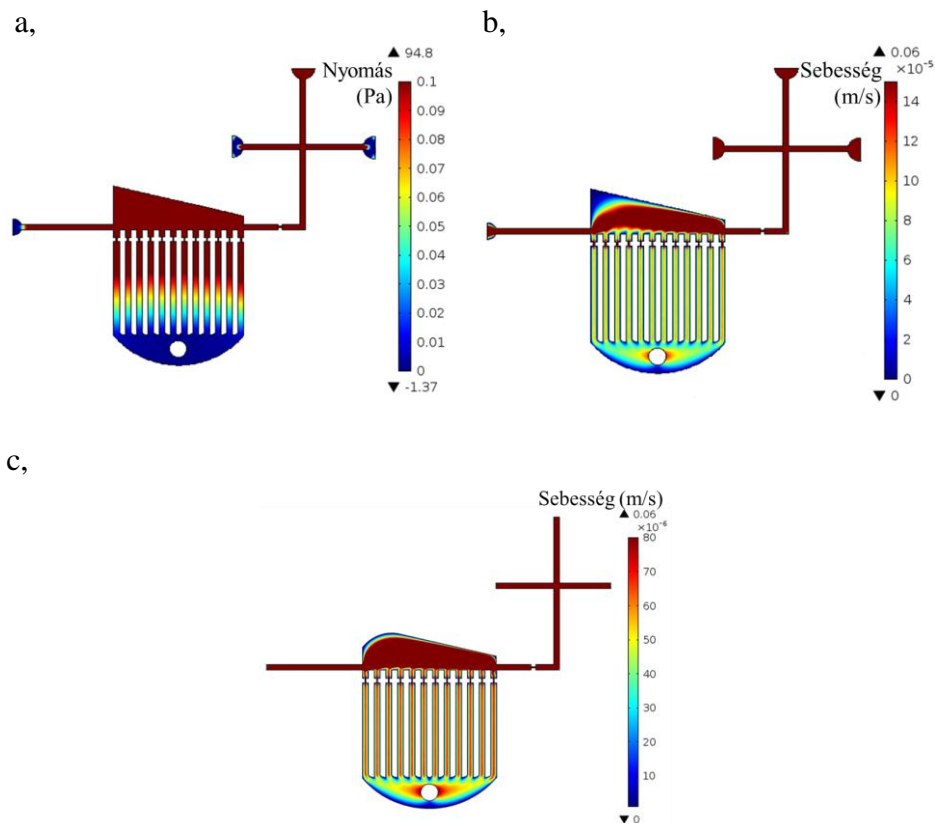
Az EPANET szoftverrel történő szimulációk során már megmutattuk, hogy a sebességek kiegyenlíthetők a csatornamintázatok megváltoztatásával. Számításokat végeztünk a COMSOL szoftverrel is a már előzőleg bemutatott mintázatokon (lásd 37. ábra). A párhuzamos csatornák feletti vízszintes csatornarész kezdeti, illetve végpontjában a csatornaátmérők változtatásával, különböző arányok esetén vizsgáltuk a tizenkét párhuzamos csatornabeli áramlási sebességek közti különbségeket (42. ábra).



42. ábra

A párhuzamos csatornák feletti vízszintes csatornarész átmérőinek különböző arányai esetén a tizenkét csatornában számított sebesség.

A COMSOL szimulációk szinte azonos párhuzamos csatornákbeli sebességeket eredményeztek abban a módosított csatornarendszerben, ahol a párhuzamos csatornák feletti vízszintes csatorna végpontjában a csatorna átmérője nyolcszor nagyobb volt, mint a kezdőpontban (csatornaátmérők aránya 8:1) (42. ábra). Az erről a mintázatról készült szimulációk eredményei a 43.a ábrán látható nyomáseloszlás és a 43.b ábrán látható sebességeloszlás diagramok, melyeken jól megfigyelhetők a párhuzamos csatornákon belüli azonos sebességek. A párhuzamos csatornák fölé illesztett háromszög alakú csatornarész csúcsában a szimulációk alapján a folyadék áramlási sebessége szinte nulla, így ez a rész, csak a rendszer holttérfogatának növelésére szolgál. A holttérfogat csökkentésének érdekében ezt a csatornarészt lekerekítettük és szimulációkkal igazoltuk a módosítás eredményességét (43.c ábra).

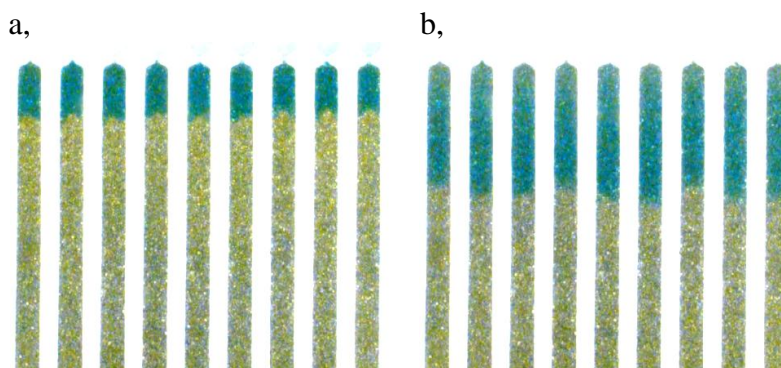


43. ábra

A módosított csatornamintázat szimulációjának eredményei: nyomáeloszlás (a.) és sebességeloszlás (b.) diagramok a háromszög alakú módosítást tartalmazó csatornarendszerben. Sebességeloszlás diagram (c,) a holtterfogat csökkentése érdekében a módosított csatornarész csúcsának lekerekítésével kapott mintázat esetén.

Elkészítettük a szimulációs kísérletek által javasolt csatornamintázatu mikrosipeket, majd a párhuzamos csatornákbán tölteteket hoztunk létre 10 μm -es C18-as kromatográfiás részecskékből. A töltetekre zöld ételfesték keveréket injektáltuk, az elválasztás során az oldószert vízről metanolra cseréltük, mely hatására a kék festék is lemosódott a töltetről (44. ábra). Az áramlási sebességek nagyon hasonlóak voltak a párhuzamos csatornákbán, a csatornákbán mért legnagyobb és

legkisebb áramlási sebesség aránya 1,05 volt. Ezen elválasztás kivitelezésével bizonyítottuk, hogy a szimulációs szoftverek segítségével a mikrocsipek tervezése nagymértékben egyszerűsíthető, gyorsítható.



44. ábra

Ételfestékek elválasztása a módosított, szimulációs kísérletek által javasolt csatornamintázatú mikrocsipben készített 100 μm szélességű kromatográfiás tölteteken (10 μm , C18-as részecskék, zöld ételfesték keverék, oldószerváltás: vízről metanol)

4.4. Mikrofluidikai csipek kapcsolása atomspektrometriás detektorokkal

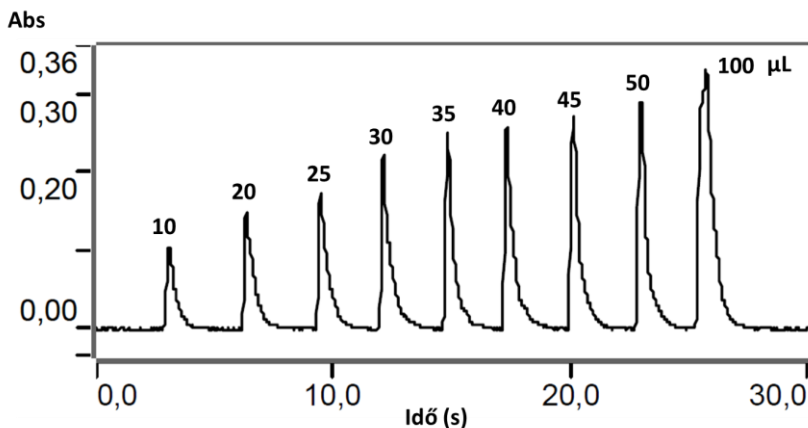
4.4.1. Kapcsolás lángatomabszorpciós spektrométerrel

Az analitikai rendszerek miniatürizálásának egy kritikus pontja a kis mintamennyiségek kellően érzékeny detektálására képes módszer fejlesztése. Az általunk tervezett többcsatornás, soktöltetes mikrofluidikai csipeknek lángatomabszorpciós spektrométerhez való kapcsolásával ezen problémára kerestünk megoldást.

4.4.1.1. A mikrocsipek által szolgáltatott minta térfogatának a FAAS készülék igényeihez igazítása

A lángatomabszorpciós készülékekben a minta egy pneumatikus porlasztó segítségével juttatható be a lángba, ahol atomizálódnak a komponensek. Az általános gyakorlat szerint a pneumatikus porlasztóval mintánként néhány ml oldattérfogatot juttatnak a készülékbe. A folyamatos analitikai jel eléréséhez már 5-10 másodpercnyi porlasztás elegendő lehet.

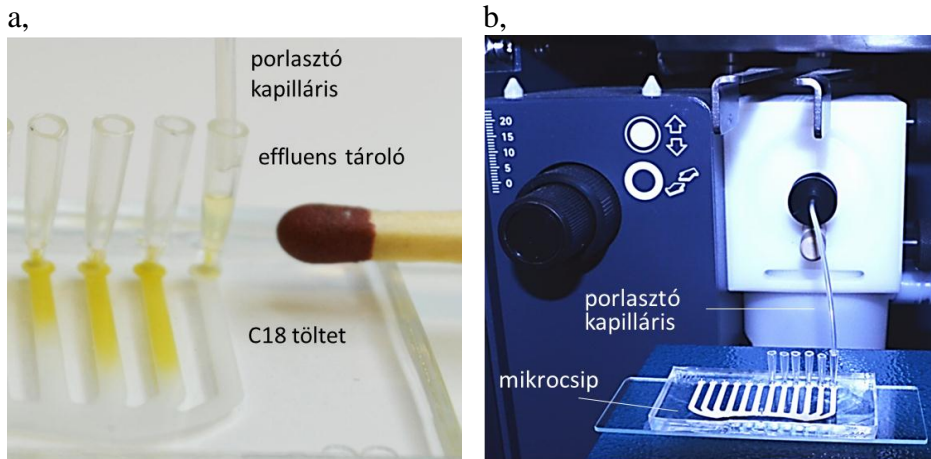
Megvizsgáltuk, hogy mennyi lehet az a legkisebb mintatérfogat, ami még elfogadható érzékenységgű FAAS detektáláshoz szükséges. Egyre növekvő térfogatú, 5 µg/ml koncentrációjú Cr(VI) oldatot juttattunk a FAAS készülék lángjába kis mintatérfogatok injektálására alkalmas teflon lapkán kialakított félgömb alakú mélyedésekből (ún. „mikroinjektálási technika”). A mintadugókat egy mérési ablakban detektáltuk és megállapítottuk, hogy a beinjektált mintákra kapott jel 30-35 µl térfogatig dinamikusan nő, majd ettől kezdve a növekedés üteme csökken és a 100 µl beinjektált mintára kapott jel magassága már gyakorlatilag a folyamatos porlasztás eredményeként elért jelmagassággal megegyező (45. ábra). A 30 µl minta porlasztásakor tapasztalt, meglepően jó érzékenység oka a FAAS készülék porlasztójának működési elvére vezethető vissza, mely szerint a kisebb oldattérfogatok esetén a porlasztási hatásfok nő.



45. ábra

A különböző térfogatú Cr(VI) minták FAAS készülék lángjába történt porlasztásával kapott jelek.

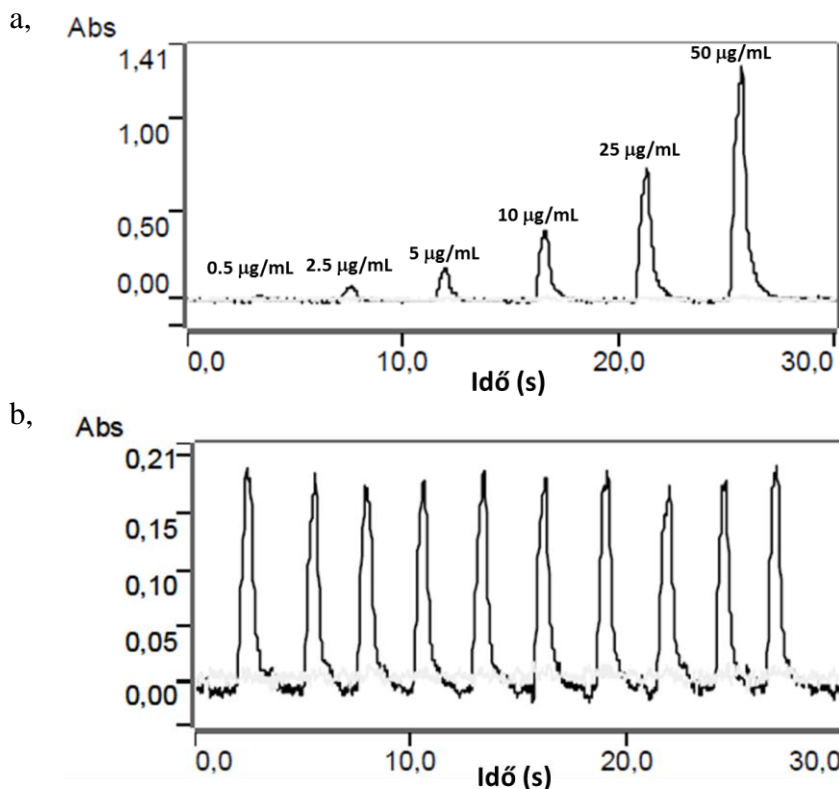
Az analitikai jel magassága az injektált térfogat és a folyadék áramlási (porlasztási) sebessége mellett a mintatartó edény és a porlasztó kapilláris felületének a minta oldattal történő nedvesedésétől is függ. A mikrocsipekben végzett méréseink során az eluátumokat ~40 µl térfogatú, műanyag pipettahegyből készült hidrofób edényekbe (0,1 ml-es pipettahegyek 5 mm hosszú alsó része) gyűjtöttük, amelyeket a megkötött komponensek elúciója előtt csatlakoztattunk a csatornák végén kialakított portokhoz (46.a ábra). Ezek az edények könnyen és szorosan, szivárgásmentesen illeszthetők a rugalmas anyagú mikrocsip portjaiba, szivárgás körülöttük nem volt megfigyelhető. Mivel a tölcsér alakú edény belső átmérője fokozatosan csökken 3 mm-ről 0,4 mm-re, a lángatomabszorpciós spektrométer porlasztójának teflon kapillárisa egyszerűen beilleszthető az edény legaljára, melyen keresztül a minta teljes térfogatát (~30 µl), pillanatszerűen szippantottuk fel a spektrométer lángjába (diszkrét mikroinjektálás) (46.b ábra). A kapilláris hosszát 10 cm-re csökkentettük, hogy a minta diszperzióját a kapilláris felületén minimalizáljuk a mikrocsip és a porlasztó között.



46. ábra

Az effluensek összegyűjtésére készített tároló edények mikrocsiphez csatlakoztatása (a.), illetve a mikrocsip és az FAAS készülék összekapcsolása (b.).

A különböző koncentrációjú Cr(VI) mintákból 30-30 μl -eket porlasztottunk a lángba az előzőekben leírt módszerrel, a jeleket ugyanazon mérési ablakban detektáltuk (47.a ábra). Az eredmények alapján 0,0089 $\mu\text{g/ml}$ kimutatási határt és 0,2-50 $\mu\text{g/ml}$ lineáris detektálási tartományt határoztunk meg. Ismételt injektálásokat (N=12) végezve a 4 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú Cr(VI) minta felhasználásával (47.b ábra), a jelmagasságok és jelterületek relatív standard deviációi 2,9%-nak és 3,8%-nak adódtak. Természetesen jobb reprodukálhatósági értékeket értünk el nagyobb térfogatú, például 0,5 ml minta beporlasztásával (jelmagasságokra 0,9 RSD% és jelterületekre 1,1 RSD%). Ezek az analitikai teljesítőképességi adatok igazolták, hogy a 30 μl térfogatú minta felhasználásával nyert érzékenységi adatok csak kb. 30%-kal rosszabbak, mint a minta folyamatos porlasztása esetén. A mintatérfogatok 30 μl alá csökkentése a kimutatási határ (LOD) és a precizitás adatok drámai romlásához vezetett.

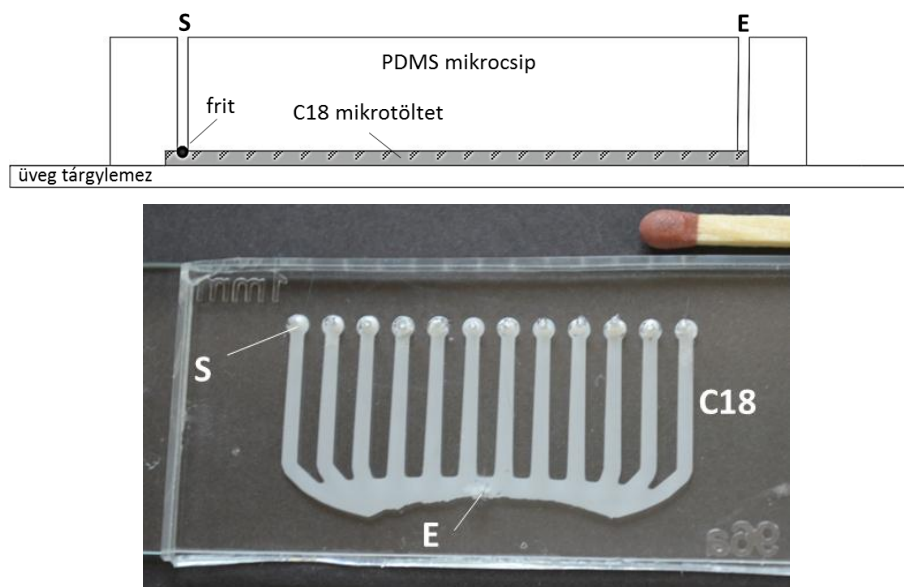


47. ábra

Az analitikai teljesítőképességi adatok meghatározása. Különböző koncentrációjú Cr(VI) minták 30 µl-einek FAAS elemzése (a.), és a 4 µg/mL-es koncentrációjú Cr(VI) minta 30 µl-ének többszöri lángba porlasztásával kapott jelek.

Az előzőekben meghatározott, FAAS-el elfogadható érzékenységet és reprodukálhatóságot biztosító 30 µl-nyi mintatérfogat azonban még mindig nagyon nagy folyadéktérfogat a tipikus mikrofluidikai alkalmazásokhoz. A mikrocsip alapú kromatográfiás rendszerek esetében általában kevesebb, mint 0,1 µl mintatérfogat eluálható le a mikrooszlopokról. Ezért az eluált térfogatok növelése érdekében megnöveltük a mikrotölteteink dimenzióit. A mikrocsipek készítéséhez alkalmazott lágy litográfiás eljárás [32] használatával 0,1 mm maximális csatornamagasság érhető el. A mikrooszlopok szélességét 1 mm-re növeltük, míg a csatornák hosszát a mikrocsipek hordozójaként használt üveg tárgylemezek szélessége határozta meg.

Ezek alapján a mikrocsipben kialakított kromatográfiás töltetek méretei 20 mm x 1 mm x 0,1 mm voltak, amelyek alkalmasnak bizonyultak 10-30 μ l-nyi effluens szolgáltatására (a mintakomponensek elválasztása vagy dúsítása után), és így megfelelőek a mikroinjektálásos FAAS mérésekhez.



48. ábra

Kromatográfiás tölteteket (C18) tartalmazó mikrocsip sematikus rajza (fent) és felülnézeti fényképe (lent) a minta beinjektálására használható S portokkal és a közös E (elúciós) porttal.

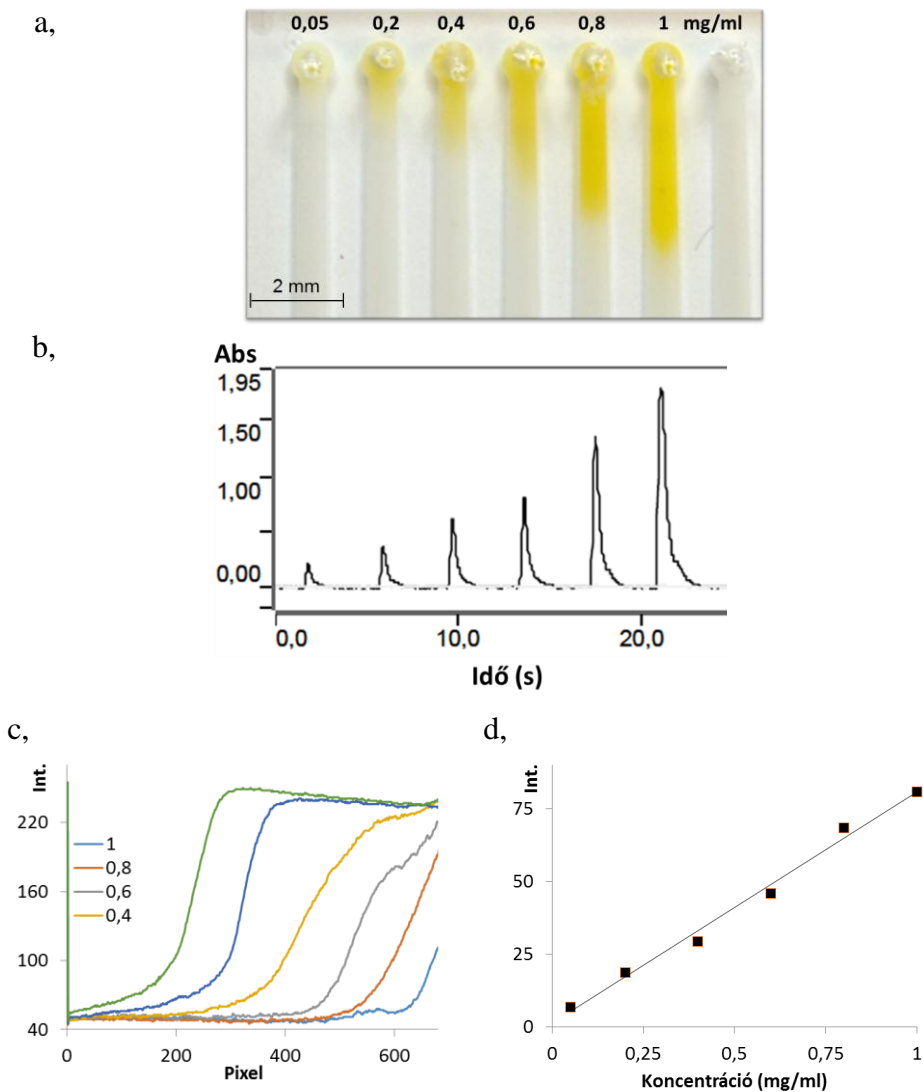
A kromatográfiás tölteteket egyidejűleg alakíthattuk ki a párhuzamos csatornában az E jelű közös, elúciós porton keresztül. A részecskéket az S jelű portokban fritként elhelyezett kis vattacsomó (<1 μ g) segítségével tartottuk vissza a csatornában (a töltés a 4.1.3. fejezetben leírtak alapján történt). Ezekre a töltetekre külön-külön vihetők fel a meghatározandó minták, akár tizenkét különböző minta injektálására is lehetőségünk van az S portokon keresztül (pl. többcsatornás perisztaltikus pumpa segítségével). A minták egyes komponenseinek megkötődése után, a töltetek készítésére is használt E portból egyidejűleg eluálható az összes minta (48. ábra).

4.4.1.2. Cr(VI) meghatározása mikrocsip-FAAS rendszerben

A rendszer tesztelésére ionpár kromatográfiás módszerrel Cr(VI)-ot kötöttünk meg a csatornákban kialakított fordított fázisú tölteteken, majd az eluált komponenseket juttattuk a FAAS készülékbe. Az elválasztás/dúsítás során az irodalomból ismert körülményeket alkalmaztuk [107].

Az 5 μm átmérőjű C18-as oldallánccal módosított szilikagél részecskékből készült kromatográfiás tölteteket a minták injektálása előtt 0,05 mol/dm³ koncentrációjú ecetsavas tetrabutylammónium-bromid (TBA-Br) (pH 3) oldattal kondicionáltuk. Az injektálást követően a mintában lévő Cr(III) ionok és más ionos komponensek visszatartás nélkül áthaladtak a tölteten, míg a Cr(VI) ionpárt képezve a TBA-ionokkal megkötődött a C18-as szilikagél részecskék felületén. A Cr(VI) megkötődését az átlátszó, PDMS-ből készült mikrocsipben szabad szemmel is követhettük a Cr(VI) intenzív sárga színe miatt. A megkötődött Cr(VI) minták metanollal moshatóak le a töltetről, a festékeknél tapasztalt dúsuló effektus mellett.

Különböző koncentrációjú (0,05-1 mg/ml) Cr(VI) minták 10-10 μl -ét vittük fel a párhuzamos csatornákban kialakított töltetekre. A króm megkötődését az intenzív sárga szín megjelenése jelezte (49.a ábra). A mikrocsipről készített fénykép szoftveres kiértékelésével (pl. CP Atlas 2.0, vékonyréteg kromatográfiás kiértékelő program, www.lazarsoftware.com), azaz a színintenzitások mérésével is kaphatunk információkat a minták Cr(VI) tartalmáról. Az így elkészített denzitogramok a 49.c ábrán láthatóak. A megfelelő görbék területeinek integrálásával, illetve kalibrációs görbe segítségével az ismeretlen minták Cr(VI) koncentrációja megadható volt (49.d ábra). Ezzel a módszerrel nagyobb koncentrációjú (> 20 $\mu\text{g/ml}$) minták Cr(VI) tartalma lángatomabszorpciós mérések nélkül is meghatározható. Azonban ha a minták kevesebb, mint 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban tartalmazznak krómot, akkor az érzékenyebb FAAS mérés kivitelezésére van szükség.

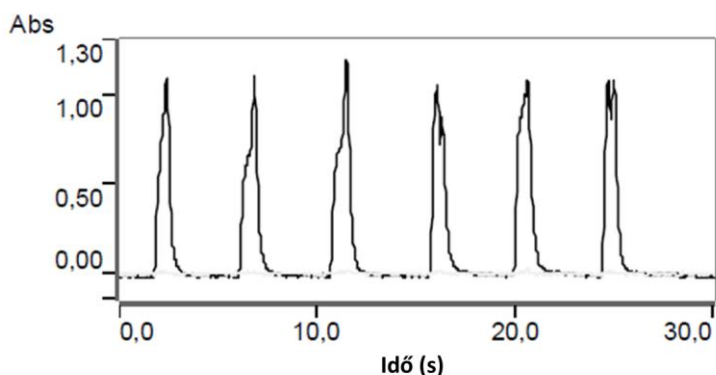


49. ábra

Mikrocsipben kialakított fordított fázisú ($5\ \mu\text{m}$, C18) kromatográfiás töltetekről készített fénykép, melyen szabad szemmel is látható a különböző koncentrációjú Cr(VI) minták intenzív sárga színe (a.). A mikrocsipről metanollal eluált Cr(VI) minták FAAS elemzése során kapott atomabszorpciós jelek egy mérési ablakban (b.). A töltetekről készült fénykép szoftveres kiértékelésével (színintenzitás-változásainak mérésével) készített denzitogram (c.). Az FAAS mérések alapján készített kalibráló egyenes (d.).

Ekkor a megkötődött Cr(VI) teljes mennyiségét a pipettahegyekből kialakított tölcsérekben fogtuk fel, melyeket aztán az FAAS készülék porlasztójának segítségével juttattuk be a lángba (49.b ábra). A detektált atomabszorpciós jelek integrált területei jó egyezést mutattak a képen (49.a ábra) és a denzitogramokon (49.c ábra) látott eredményekkel.

Megvizsgáltuk, hogy a króm megkötése és elúciója mennyire reprodukálható a mikrocsipben kialakított párhuzamos tölteteken. 30 μ l 0,1 mg/ml koncentrációjú Cr(VI)-oldatot vittünk fel tizenkét párhuzamos kromatográfiás töltetre. A megkötött krómot egyidejűleg mostuk le a töltetekről 30 μ l metanol segítségével, az effluenseket pedig lángatomabszorpciós spektrométerrel mértük mikroinjektálós technika alkalmazásával (50. ábra). Hat minta egy mérési ablakban való elemzéséhez mindössze 30 másodpercre volt szükség.



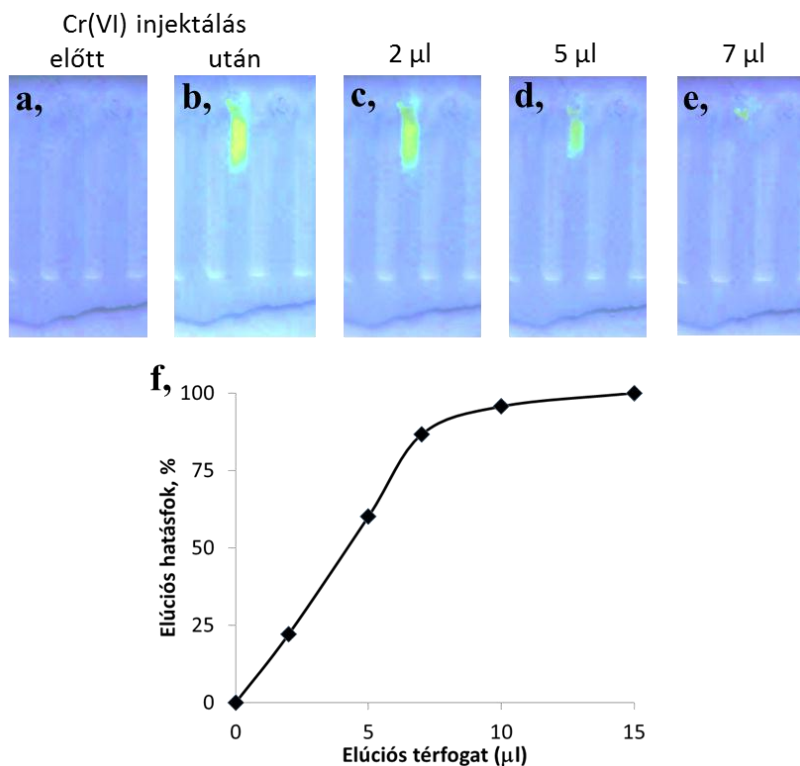
50. ábra

Kromatográfiás töltetes (5 μ m, C18) mikrocsipben 30 μ l 0,1 mg/ml koncentrációjú oldatokból megkötött, majd 30 μ l metanolos Cr(VI) tartalmú effluensek mikroinjektálós lángba juttatásával kapott atomabszorpciós jelek.

A tizenkét effluens lángatomabszorpciós mérése esetén a csúcsmagasságokra és csúcs alatti területekre számított relatív standard deviációk értéke 3,7 RSD% és 5,8 RSD% volt.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy mennyi az a legkisebb, az eluáláshoz használt metanol térfogata, amellyel a megkötődött

komponensek teljes mértékben lemoshatóak a töltetről. Arra a következtetésre jutottunk, hogy 10 μl metanol a megkötött króm több mint 95 %-át lemosta a töltetről (51. ábra). Habár a rendszereinkben a megfelelő elúciós térfogat 15 μl lenne, az érzékenyebb és pontosabb FAAS mérések érdekében az effluens mintáink térfogatát 30 μl -ben állapítottuk meg.



51. ábra

A króm elúciós hatásfokának vizsgálata C18-as mikrotölteteken.

Fényképek a töltetről a Cr(VI) rávitel előtt (a,) és után (b,) 2 μl (c,) 5 μl (d,) és 7 μl (e,) térfogatú metanollal történő mosás után. Az elúciós hatásfok értékek ábrázolása az elúciós térfogatok függvényében (f.).

Rendszereink néhány analitikai teljesítőképességi paramétereit is megvizsgáltuk. A töltetek (5 μm , C18, 20 mm x 1 mm x 0,1 mm) teljes kapacitás értékére 0,45 $\mu\text{g}/\text{mm}$ -t határoztunk meg. A Cr(VI) ionpár kromatográfiás megkötése fordított fázisú tölteteken nem elég erős

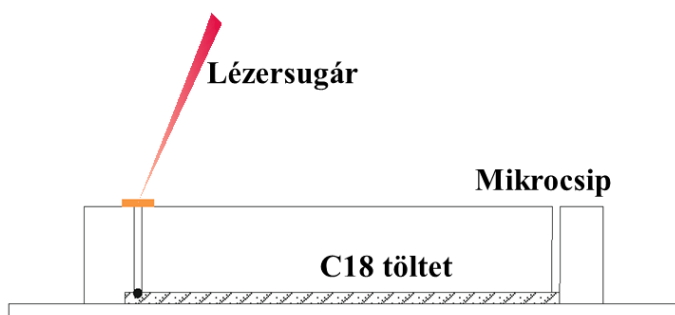
ahhoz, hogy nagy dúsítási faktor értékeket érjünk el. A 20 mm hosszú tölteten maximum 80 μl minta köthető meg, ezt követően a további mintafelvétel a már megkötött Cr(VI) lassú immobilizálódásához vezetett. Éppen emiatt a legnagyobb dúsítási faktor, amit az így készített tölteteken határoztunk meg kb. nyolcszoros volt (80 μl mintatérfogat tölteten való megkötése, majd 10 μl metanollal való elúciója). 80 μl Cr(VI) mintaoldat töltetre vitelével és a metanolos 30 μl térfogatú effluens FAA spektrométerbe porlasztásával 0,0031 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kimutatási határt értünk el.

A bemutatott lángatomabszorpciós spektrométerrel kapcsolt mikrofluidikai rendszerek egyik legnagyobb előnye, hogy tizenkét kromatográfias elválasztáshoz/dúsításhoz és FAAS detektáláshoz mindössze 5 percre volt szükség.

4.4.2. Kapcsolás lézerindukált plazma (LIBS) spektrométerhez

A lézerindukált plazma spektrométer detektorként való használatának nagy előnye a mikrocip és a LIBS készülék közötti kapcsolat kialakításának egyszerűsége.

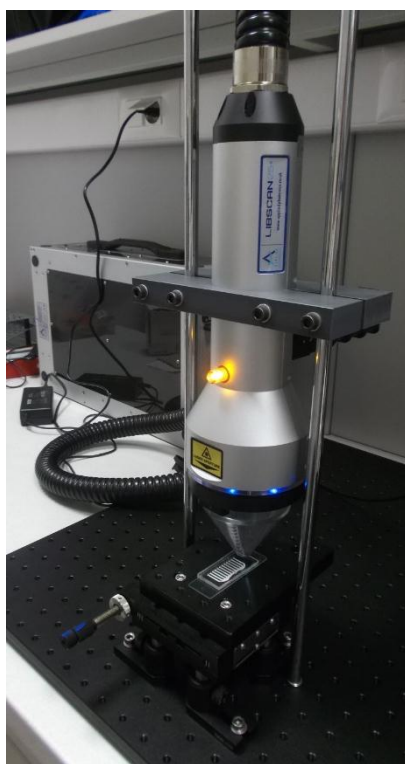
A LIBS mérések során nagyenergiájú lézer sugárral löttük meg a mikrocipet. A lézer hatására mikroplazma alakul ki a lövés helyén, amely atomizálja és gerjeszti a jelen lévő anyagokat. Az emittált spektrum felvételével, majd az atomvonalak azonosításával minőségi meghatározást végezhetünk.



52. ábra

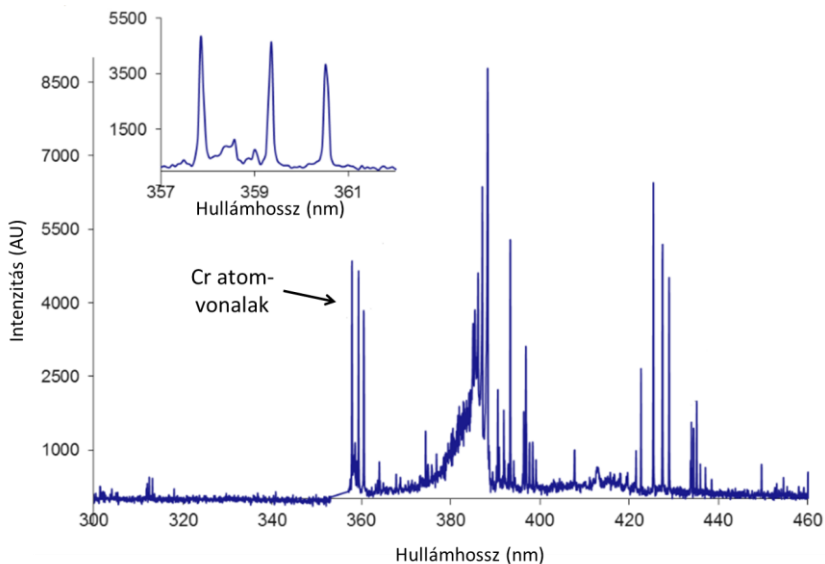
A LIBS mérésekhez használt mikrocip sematikus ábrázolása.

A LIBS mérésekhez az előző fejezetben bemutatott mikrocsipet használtuk, melynek csatornáiban a tizenkét kromatográfiás töltet kialakítására van lehetőségünk. A megnövelt méretű (20 mm x 1 mm x 0,1 mm) csatornában fordított fázisú kromatográfiás tölteteket (5 μ m, C18) alakítottunk ki (52. ábra), a rendszerek tesztelésére a már előzőekben használt, ionpár kromatográfián alapuló módszert használtuk. A megkötött Cr(VI) minták elemzése, lézerrel való meglövése történhetett magán a kromatográfiás tölteten, vagy metanolos elúciót követően a csatorna portja körül beszáradt rétegen.



53. ábra

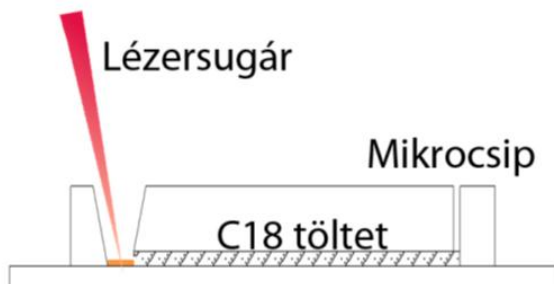
Lézerindukált plazma spektrométer és a kromatográfiás tölteteket tartalmazó mikrofluidikai csip elrendezése.



54. ábra

A mikrofluidikai csipben egyik portja körül beszáradó eluátum meglövése után felvett emissziós spektrum, benne a krómra jellemző atomvonalakkal.

Az érzékenység növelése érdekében módosítottunk a mikrocship mintázatán. A kromatográfiás töltetek végén 10 μl minta felfogására alkalmas tartályokat alakítottunk ki, melyek aljára a metanolos, illékony effluensek Cr(VI) tartalma az elúciót követően néhány perc alatt a beszáradt (55. ábra). Ezt a beszáradt, kristályos réteget löttük meg a lézerrel.



55. ábra

A módosított csatornamintázatú mikrocship sematikus rajza.

A lézersugár hatására keletkező mikroplazma emissziós spektrumát spektrofotométerrel detektáltuk, a króm jellemző, intenzív vonalait 357,869 nm, 359,349 nm és 360,533 nm hullámhosszaknál figyeltük meg (54. ábra). Krómra nézve $28,9 \text{ ng/mm}^2$ kimutatási határt (LOD) határoztunk meg a 359,349 nm-es vonalnál.

5. Összefoglalás

Munkánk során többcsatornás mikrofluidikai rendszereket fejlesztettünk és tanulmányoztunk kromatográfiás alkalmazásokhoz.

Az általunk tervezett és poli(dimetil-sziloxán)-ból készített mikrofluidikai csipekben kromatográfiás töltetek kialakítására alkalmas frit nélküli töltési eljárásokat dolgoztunk ki, melyek során a csatornában létrehozott szűkületek segítségével tartottuk vissza a részecskéket.

A csatornák magasságának megfelelő mértékű csökkentésével kialakított szűkületet használva bizonyítottuk, hogy a kromatográfiás részecskék tartósan visszatarthatóak a csatornában. A csatornamagasság 15-20 μm -re csökkentése már elegendőnek bizonyult az 5 μm -es kromatográfiás részecskék visszatartásához. Ezt a magasságcsökkentést legegyszerűbben a mikrocip készítéséhez használt öntőformán található csatornamintázat megfelelő helyen történő elvékonyításával értük el.

A módszer továbbfejlesztéseként a csatornarendszerek geometriájának tervezése során a csatornák szélességének megfelelő mértékű csökkentésével hoztunk létre kromatográfiás részecskék visszatartására alkalmas szűkületeket. A mikrocip csatornájának szélességét 100 μm -ról 15-20 μm -re csökkentettük, az így elkészített csatornában reprodukálhatóan lehetett 5-10 μm átmérőjű részecskékből kromatográfiás tölteteket kialakítani. A töltetek hossza szabadon változtatható 200 μm -tól több cm-es hosszúságig. A módszer alkalmazásával többcsatornás rendszerekben is készíthetők kromatográfiás töltetek.

A mikrocipek öntéséhez használt, fotolitográfiás eljárással készített öntőformán már eleve kialakítottuk a csatornarendszereken belüli szűkületeket. 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.

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 záróköhatásnak köszönhetően. (Például 15 μm -es szűkületet alkalmazva, az 5 μm -es részecskék esetén stabil töltet keletkezik, de a szűkület átmérőjét 25 μm -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 μm -es részecskénél így elegendő egy 10 μm hosszú szűkület, de a csatornarendszereinkben általában 50 μm hosszú szűkületeket hoztunk létre.)

A mikrocseppekben 3-12 párhuzamos kromatográfiás töltetet alakítottunk ki. Bizonyítottuk, 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 párhuzamos elemzésére van lehetőség attól függően, hogy az egyes töltetekhez külön injektáló rész tartozik-e. A minta injektálásához egy olyan többágú kereszteződés 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. Megfigyeltük, hogy a töltet felé jutó minta térfogata nem függ

az alkalmazott áramlási sebességtől, csak az eredeti mintatérfogattól. Háromtöltetes rendszerek esetén a közös mintainjektáló részen bejuttatott mintadugó egyenlő arányban oszlik el a párhuzamos töltetek között, így minden egyes töltetre azonos térfogatú minta jut, abban az esetben, ha a párhuzamos csatornában kialakított kromatográfiás töltetek hidrodinamikai ellenállása azonos.

Kétkomponensű keveréket választottunk el mikrofluidikai rendszerekben kialakított 5 μm -es, C18-as hagyományos kromatográfiás tölteteken. Az elválasztáshoz kevesebb, mint 30 másodpercre volt szükség. 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. A mikrofluidikai csipek csatornáiban különbözőképpen funkcionalizált felületű aerogélekből alakítottunk ki kromatográfiás tölteteket. A mikrocsipbe töltés előtt az aerogél tömböt porítottuk, a részecskékből metanolos szuszpenziót készítettünk, melyet üleptítettünk, hogy kb. 1 μm -es, 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). A három különböző (RP-1, C8 és C18), azonos méretű (5 μm) kromatográfiás részecskékből álló tölteten ételfestékeket választottunk el izokratikus körülmények között (mozgófázisként 25% metanol-víz elegyet alkalmaztunk). Az ilyen mikrofluidikai rendszerekben, melyekben különböző kromatográfiás töltetek alakíthatóak ki, lehetőségünk van kromatográfiás töltetek gyors összehasonlítására vagy az adott analitikai feladathoz megfelelő töltet kiválasztására, így az új módszerek kifejlesztése lényegesen felgyorsulhat.

A többcsatornás mikrofluidikai rendszerekben történő áramlások modellezésére, a csatornarendszerek geometriájának optimalására szimulációs szoftvereket alkalmaztunk. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a tizenkét mikrotöltetet tartalmazó

csatornarendszerekben a párhuzamos csatornában 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 szimulációk segítségével terveztünk mintázatot, így a csatornarendszer módosításával a párhuzamos csatornában mért legnagyobb és legkisebb áramlási sebesség arányát sikerült 1,05-re csökkenteni. A szimulációkkal optimált csatornarendszerekben kialakult áramlási sebességek jól egyeztek a módosított mintázatú mikrocsipben kísérletesen mért áramlási sebességekkel.

A kromatográfiás tölteteket tartalmazó mikrofluidikai csipeket lángatomabszorpciós spektrométerrel (FAAS) kapcsoltuk, melynek első lépéseként a mikrocsipek tölteteinek/csatornáinak módosításával megnöveltük az atomspektrométerbe juttatott minta térfogatát. A még megfelelő reprodukálhatóságú és érzékenységgű FAAS méréshez szükséges minimális mintatérfogatot 30 μ l-nek találtuk. Az ilyen térfogatú minta biztosításához a mikrocsipben 20 mm hosszú, 1 mm széles és 0,1 mm vastag 5 μ 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 μ l minta mikrocsipbe juttatásakor 0,0031 μ g/ml-es értéknek adódott.

A mikrofluidikai csipekben kialakított kromatográfiás tölteteken megkötött Cr(VI)-ot lézerindukált plazma spektroszkópia (LIBS) segítségével is detektáltuk. A kromatográfiás töltetekről a mikrocsip kimeneti portjába eluált Cr(VI) oldatot gyors beszáradását követően a spektrométer lézersugarával közvetlenül elemeztük. Krómra nézve 28,9 ng/mm² kimutatási határt (LOD) határoztunk meg. 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.

Bemutattuk, hogy a kromatográfiás részecskékkel töltött PDMS mikrocsipek gyorsan, viszonylag reprodukálhatóan készíthetők el, 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.

6. Summary

In our work multichannel microfluidic systems were developed and studied for chromatographic applications. The microfluidic chips were designed and then prepared from polydimethylsiloxane. We developed a new packing process for the preparation of chromatographic packings, which does not require any frit. During this procedure the particles were permanently retained by a bottleneck in the channels.

This bottleneck was created by the reduction of the channel height. (Decreasing the channel height to 15-20 μm was enough for the retainment of the 5 μm diameter chromatographic particles.) It was achievable by the tapering of the channel pattern at the proper location.

On the other way, the bottlenecks were created by the appropriate reduction of the channel width. It was reduced from 100 μm to 15-20 μm , which allowed the reproducible preparation of chromatographic packings from the 5 μm diameter particles. The length of the packings was freely variable from 200 μm to more centimeters. Using of this process it was possible to prepare chromatographic packings in multichannel systems.

We found that a suitable bottleneck can be created even if the contour of the bottleneck (a 10 μm wide and 50 μm long channel) was drawn directly onto the photolithographic mask and proper lithographic conditions were applied.

The diameter of these bottlenecks was impressible with the thickness of the photosensitive layer and the period of the exposure time. We observed that the use of a thinner photosensitive layer or a longer exposure time resulted wider channels and bottlenecks. The stability of the prepared chromatographic packings was investigated by the application of different bottleneck diameters. Stable chromatographic packings were prepared with the use of a maximum three times bigger bottleneck than the retainable particles, due to the keystone-effect. (For example, a bottleneck with 15 μm diameter was able to retain the 5 μm diameter chromatographic particles, but when the diameter of the bottleneck was increased to 25 μm the packing became instable.) The length of the bottleneck has not got effect for the stability of the packings when the length was minimum two times longer than the

diameter of the chromatographic particles. (In our systems a 10 μm long bottleneck would be enough but we designed our channel systems with 50 μm long bottlenecks.)

In our microfluidic systems 3-12 parallel chromatographic packings were prepared. The number of these parallel chromatographic packings is ultimately limited by the number and the position of the outlet and injection ports. If the system contains only one injection part the number of the chromatographic packings can be increased even to 60. These multichannel systems can contain independent or merged channels. In the independent channel systems different parallel chromatographic packings can be created, while in the merged channels the packings can be formed at the same time through a common outlet port. In both type of microchips we have the possibility to measure one or more sample at the same time. For the sample injection a multiple cross section was necessary, the injected sample distributed between the channels and only a small part of the liquid flowed to the direction of the packings.

In those systems where the parallel channels were packed the injected sample can be split to several equal parts before the packings, because the hydrodynamic resistance of the parallel packings was equal.

We separated two component food dye mixture on chromatographic packings prepared from 5 μm diameter particles. The two components could be separated within 30 s. The smallest theoretical plate height was 0.75 μm , the obtained highest plate number value was 2500 (1330000/m). The overall capacity of a packing was calculated to be $7.5 \cdot 10^{-12}$ mol/ μm for the Brilliant Blue FCF (E133) dye.

Different modified aerogel chromatographic packings were prepared in our microfluidic systems. Before the packing procedure the aerogel bulk was grinded, a methanolic suspension was made from the particles and after sedimentation the diameters of the particles were around 1 μm . The aerogel packings were tested with food dyes, the enrichment factor was around 50, the separation of the two component food dye mixture took only 6-8 seconds (0.5 mm length C16 modified ground silica aerogel packing, isocratic conditions (35% methanol-water mixture), 1 nL food dye mixture, 3 bar).

Three different types of chromatographic packings (from 5 μm diameter RP-1, C8 and C18 particles) were made in microfluidic systems. Parallel chromatographic separations of food dye mixtures were made in these systems (the mobile phase was 25% methanol-water mixture). These systems were suitable for the fast comparison of chromatographic packings or the selection of the appropriate chromatographic packing for the analytical problem, thus the development of the new methods can be faster.

Simulation softwares were applied for the modeling of the flows in our multichannel systems. During our experiments we observed that the flow rates in the parallel channels were different (0.014-0.024 mm/s), reduced towards the outlet ports (the ratio of the maximum and minimum velocity was 2.2). For equalizing of the flow rates in the system we designed a new channel pattern, where this flow rate ratio was reduced for 1.05. The results of the simulations agreed well with the experimental results.

Interfacing the flame atomic absorption spectrometer (FAAS) with our microfluidic systems containing chromatographic packings were demonstrated. In this work the first step was the increasing of the sample volume with the modification of the microfluidic channels/packings dimensions. The minimal sample volume was 30 μL , this was enough for the reproducible and sensitive FAAS detection. In the modified channel systems the 5 μm C18 packings were 20 mm long, 1 mm wide and 0.1 mm thick. With the developed method preconcentration and separation of the chromium(VI) were demonstrated. The limit of the detection value for the Cr(VI) was 0.0031 $\mu\text{g/ml}$ with the injection of 80 μL sample into the microchip.

The absorbed Cr(VI) on the packings were analyzed with laser induced breakdown spectroscopy (LIBS), too. After the elution of the Cr(VI) to the outlet port of the microchip, the dried sample was determined with the laser beam of the spectrometer. The obtained limit of detection value was 28,9 ng/mm^2 for chromium. The detection of the Cr(VI) can be directly performed on the chromatographic packings, too.

These PDMS microchips packed with chromatographic particles can be prepared in a fast and reproducible way, the costs of the preparation

and operation are inexpensive. With the economic development there will be a high demand for the performance of more and cheaper analytical determinations, the widespread distribution of the microfluidic systems for analytical analysis can be expected.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Whitesides G. M.: *Nature*, 442 (**2006**) 368-373.
- [2] Lee A.: *Lab Chip*, 13 (**2013**) 1660-1661.
- [3] Reyes D. R., Iossifidis D., Auroux P-A., Manz A.: *Anal. Chem.*, 74 (**2002**) 2623-2636.
- [4] Haeblerle S., Zengerle R.: *Lab Chip*, 7 (**2007**) 1094-1110.
- [5] Le H. P.: *J. Imaging Sci. Technol.*, 42 (1) (**1998**) 49–62.
- [6] Terry S. C., Jerman J. H., Angell J. B.: *IEEE Trans. Electron. Devices*, 26 (**1979**) 1880-1886.
- [7] van Lintel H. T. G., van de Pol F. C. M., Bouwstra S.: *Sens. Actuators*, 15 (**1988**) 153-167.
- [8] van de Pol F. C. M., Wonnink D. G. J., Elwenspoek M., Fluitman J. H. J.: *Sens. Actuators*, 17 (**1989**) 139-143.
- [9] Esashi M.: *Sens. Actuators*, A21-A23 (**1990**) 161-167.
- [10] Smits J. G.: *Sens. Actuators*, A21-A23 (**1990**) 203-206.
- [11] Manz A., Miyahara Y., Miura J., Watanabe Y., Miyagi H., Sato K.: *Sens. Actuators*, B1 (**1990**) 249-255.
- [12] Manz A., Graber N., Widmer H. M.: *Sens. Actuators*, B1 (**1990**) 244-248.
- [13] Ewing's Analytical Instrumentation Handbook. *Marcel Dekker* **2005**.
- [14] Tabeling P.: Introduction to Microfluidics, *Oxford* **2005**.
- [15] Ziaie B., Baldi A., Lei M., Du Y., Siegel R. A.: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56 (**2004**) 145-172.
- [16] Ziaie B., Baldi A., Atashbar M.: Introduction to micro-nanotechnology, Springer Handbook of Nanotechnology, *Springer*, **2007**.
- [17] Jacobson S. C., Hergenröder R., Koutny L. B., Warmack R. J., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.*, 66 (**1994**) 1107-1113.
- [18] Jacobson S. C., Hergenröder R., Koutny L. B., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.*, 66 (**1994**) 1114-1118.
- [19] Hasselbrink E. F. Jr., Sheppard T. J., Rehm J. E.: *Anal. Chem.* 74(19) (**2002**) 4913-4918.
- [20] Murakami Y., Takeuchi T., Yokoyama K., Tomiya E., Karube I.: *Anal. Chem.*, 65 (**1993**) 2731-2735.

- [21] Stemme G., Kittilsland G.: *Appl. Phys. Lett.*, 53 (**1988**) 1566-1568.
- [22] Jeong Y. W., Kim B. H., Lee J. Y., Park S. S., Chun M. S., Chun K., Kim B. G., Chung D. S.: *Micro Total Analysis Systems 2000, Springer, 2000.*
- [23] Wilding P., Pfahler J., Bau H. H., Zemel J. N., Kricka L. J.: *Clin. Chem.*, 40 (**1994**) 43-47.
- [24] Burns M. A., Johnson B. N., Brahmasandra S. N., Handique K., Webster J., Krishnan M., Sammarco T. S., Man P. M., Jones D., Heldsinger D., Mastrangelo C. H., Burke D. T.: *Science*, 282 (**1998**) 484-487.
- [25] Kamholz A. E., Weigl B. H., Finlayson B. A., Yager P.: *Anal. Chem.*, 71(23) (**1999**) 5340-5347.
- [26] Baldwin R. P., Roussel T. J., Crain M. M., Bathlagunda V., Jackson D. J., Gullapallo J., Conklin J. A., Pai R., Naber J. F., Walsh K. M., Keynton R. S.: *Anal. Chem.*, 74 (**2002**) 3690-3697.
- [27] Schmidt M. A.: *Proc. IEEE*, 86 (**1998**) 1575-1585.
- [28] Schrott W., Svoboda M., Slouka Z., Pribyl M., Snita D.: *Microelectron. Eng.*, 87 (**2010**) 1600-1602.
- [29] Ng J. M. K., Gitlin I., Stroock A. D., Whitesides G. M.: *Electrophoresis*, 23 (**2002**) 3461-3473.
- [30] Unger M. A., Chou H-P., Thorsen T., Scherer A., Quake S. R.: *Science*, 288 (**2000**) 113-116.
- [31] Kim E., Xia Y., Whitesides G. M.: *Nature*, 376 (**1995**) 581-584.
- [32] Duffy D. C., McDonald J. C., Schueller O. J. A., Whitesides G. M.: *Anal. Chem.*, 70 (**1998**) 4974-4984.
- [33] Duffy D. C., Schueller O. J. A., Brittain S. T., Whitesides G. M.: *J. Micromech. Microeng.*, 9 (**1999**) 211-217.
- [34] Becker H., Dietz W., Dannberg P.: *Micro Total Analysis System '98, Proceedings μ TAS '98 Workshop, Banff, Canada, 13-16 Oct. (1998) 253-256.*
- [35] Soper S. A., Murphy M. C., McCarley R. L., Nikitopoulos D., Liu X., Vaidya B., Barrow J., Bejat Y., Ford S. M., Goettert J.: *Micro Total Analysis Systems 2001, Springer (2001) 459-461.*

- [36] McCormick R. M., Nelson R. J., Alonso-Amigo M. G., Benvegnu D. J., Hooper H. H.: *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2626-2630.
- [37] Sjölander S., Urbaniczky Cs.: *Anal. Chem.*, 63 (1991) 2338-2345.
- [38] Martynova L., Locascio L. E., Gaitan M., Kramer G. W., Christensen R. G., MacCrehan W. A.: *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4783-4789.
- [39] Chen D., Hsu F-L., Zhan D-Z., Chen C.: *Anal. Chem.*, 73 (2001) 758-762.
- [40] Bianchi F., Wagner F., Hoffmann P., Girault H. H.: *Anal. Chem.*, 73 (2001) 829-836.
- [41] Martin R. S., Gawron A. J., Lunte S. M.: *Anal. Chem.*, 76 (2000) 3196-3202.
- [42] Takayama S., McDonald J. C., Ostuni E., Liang M. N., Kenis P. J., Ismagilov R. F., Whitesides G. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 96 (1999) 5545-5548.
- [43] Linder V., Verpoorte E., Thormann W., de Rooij N. F., Sigrist H.: *Anal. Chem.*, 73(17) (2001) 4181-4189.
- [44] Seong G. H., Zhan W., Crooks R. M.: *Anal. Chem.*, 74 (2002) 3372-3377.
- [45] Effenhauser C. S., Bruin G. J. M., Paulus A., Ehrat M.: *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3451-3457.
- [46] Ohno K., Tachikawa K., Manz A.: *Electrophoresis*, 29 (2008) 4443-4453.
- [47] Li P. C. H.: Microfluidic lab-on-a-chip for chemical and biological analysis and discovery, *CRC Press.*, 2005.
- [48] Harrison D. J., Fluri K., Seiler K., Fan Z., Effenhauser C. S., Manz A.: *Science*, 261 (1993) 895-897.
- [49] Jacobsen S. C., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.*, 68 (1996) 720-723.
- [50] Hannoe, S., Sugimoto, I., Katoh, T.: Micro Total Analysis Systems '98, *Proceedings μ TAS '98 Workshop*, (1998) 145–148.

- [51] Frye-Mason, G., Kottenstette, R., Mowry, C., Morgan, C., Manginell, R., Lewis, P., Matzke, C., Dulleck, G., Anderson, L., Adkins, D.: Micro Total Analysis Systems, *Proceedings 5th μ TAS Symposium, Monterrey, CA, Oct. 21–25, (2001)* 658–660.
- [52] Rouessac F., Rouessac A.: Chemical Analysis, Wiley, **2007**.
- [53] Harvey D.: Modern Analytical Chemistry, *McGrow-Hill Companies Inc*, **2000**.
- [54] Ko J. H., Baik Y. S., Park S. T., Cheong W. J.: *J. Chromatogr. A*, 1144 (2007) 269-274.
- [55] Vámos E., V. Vigyázó L., Földvári I., Kerényi E., Szepeszy L.: Kromatográfia, *Műszaki Könyvkiadó* **1959**.
- [56] Harris D. C.: Quantitative Chemical Analysis, *W. H. Freeman and Company*, **2010**.
- [57] Eeltink S., Kok W. T.: *Electrophoresis*, 27 (2006) 84-96.
- [58] Rocco A., Fanali S.: *J. Chromatogr. A*, 1191 (2008) 263-267.
- [59] Engelhardt H., Beck W., Schmitt T.: Capillary Electrophoresis *Vieweg*, **1996**.
- [60] van den Bosch S. E., Heemstra S., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr. A*, 755 (1996) 165-177.
- [61] de Mello A.: *Lab. Chip*, 2 (2002) 48N-54N.
- [62] Kutter J. P.: *J. Chromatogr. A*, 1221 (2012) 72-82.
- [63] Kato M., Inaba M., Tsukahara T., Mawatari K., Hibara A., Kitamori T.: *Anal. Chem.*, 82 (2010) 543-547.
- [64] Ocvirk G., Verpoorte E., Manz A., Grasserbauer M., Widmer H. M.: *Anal. Methods Instrum.*, 2 (1995) 74-82.
- [65] Andersson H., van der Wijngaart W., Enoksson P., Stemme G.: *Sens. Actuators B*, 67 (2000) 203-208.
- [66] Sato K., Tokeshi M., Odake T., Kimura H., Ooi T., Nakao M., Kitamori T.: *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1144-1147.
- [67] Ro K. W., C W-J., Kim H., Koo Y-M., Hahn J. H.: *Electrophoresis*, 24 (2003) 3253-3259.
- [68] Lord G. A., Gordon D. B., Myers P., King B. W.: *J. Chromatogr. A*, 768 (1997) 9-16.
- [69] Ceriotti L., de Rooij N. F., Verpoorte E.: *Anal. Chem.*, 2002, 74: 639-647.

- [70] Jindal R., Cramer S. M.: *J. Chromatogr. A*, 1044 (2004) 277-285.
- [71] Gáspár A., Piyasena M. E., Gomez F. A.: *Anal. Chem.*, 79 (2007) 7906-7909.
- [72] Gáspár A., Hernandez L., Stevens S., Gomez F. A.: *Electrophoresis*, 29 (2008) 1638-1642.
- [73] Huft J., Haynes C. A., Hansen C. L.: *Anal. Chem.*, 85 (2013) 1797-1802.
- [74] Huft J., Haynes C. A., Hansen C. L.: *Anal. Chem.*, 85 (2013) 2999-3005.
- [75] Ericson C., Holm J., Ericson T., Hjertén S.: *Anal. Chem.*, 72 (2000) 81-87.
- [76] Throckmorton D. J., Sheppard T. J., Singh A. K.: *Anal. Chem.*, 74 (2002) 784-789.
- [77] He B., Tait N., Regnier F.: *Anal. Chem.*, 70 (1998) 3790-3797.
- [78] Regnier F. E.: *J. High Resolut. Chromatogr.*, 23 (2000) 19-26.
- [79] Knox J. H.: *J. Chromatogr. A*, 960 (2002) 7-18.
- [80] Slentz B. E., Penner N. A., Regnier F.: *J. Chromatogr. A*, 984 (2003) 97-107.
- [81] Mogensen K. B., Chen M., Molhave K., Boggild P., Kutter J. P.: *Lab Chip*, 11 (2011) 2116-2118.
- [82] Yin H., Killeen K., Brennen R., Sobek D., Werlich M., van de Goor T.: *Anal. Chem.*, 77 (2005) 527-533.
- [83] Viskari P. J., Landers J. P.: *Electrophoresis*, 27 (2006) 1797-1810.
- [84] Uchiyama K., Nakajima H., Hobo T.: *Anal. Bioanal. Chem.*, 379 (2004) 375-382.
- [85] Fu J-L., Fang Q., Zhang T., Jin X-H., Fang Z-L.: *Anal. Chem.*, 78 (2006) 3827-3834.
- [86] Sanders J. C., Huang Z., Landers J. P.: *Lab Chip*, 1 (2001) 167-172.
- [87] Qin J., Fung Y., Zhu D., Lin B.: *J. Chromatogr. A*, 1027 (2004) 223-229.

- [88] Chabinye M. L., Chiu D. T., McDonald J. C., Stroock A. D., Christian J. F., Karger A. M., Whitesides G. M.: *Anal. Chem.*, 73 (2001) 4491-4498.
- [89] Uchiyama K., Xu W., Qiu J. Hobo T.: *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371 (2001) 209-211.
- [90] Vandaveer W. R., Pasas-Farmer S. A., Fischer D. J., Frankenfeld C. N., Lunte S. M.: *Electrophoresis*, 25 (2004) 3528-3549.
- [91] Schwarz M. A., Hauser P. C.: *Anal. Chem.*, 75 (2003) 4691-4695.
- [92] Masar M., Dankova M., Olvecka E., Stachurova A., Kaniansky D., Stanislawski B.: *J. Chromatogr. A*, 1026 (2004) 31-39.
- [93] Tanyanyiwa J., Hauser P. C.: *Anal. Chem.*, 74 (2002) 6378-6382.
- [94] Tantra R., Manz A.: *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2875-2878.
- [95] Smith R. D., Shen Y., Tang K.: *Acc. Chem. Res.*, 37 (2004) 269-278.
- [96] Svedberg M., Petterson A., Nillson S., Bergquist J., Nyholm L., Nikolajeff F., Markides K.: *Anal. Chem.*, 75 (2003) 3934-3940.
- [97] Tachibana Y., Otsuka K., Terabe S., Arai A., Suzuki K., Nakamura S.: *J. Chromatogr. A*, 1011 (2003) 181-192.
- [98] Chiou C-H., Lee G-B., Hsu H-T., Chen P-W., Liao P-C.: *Sens. Actuators B*, 86 (2002) 280-286.
- [99] Darlin R., Chen T-C., Schiedemann A., Yager P., Bhat K.: *Proc. SPIE*, 5062 (2003) 863-872.
- [100] Sillon N., Baptist R.: *Sens. Actuators B*, 83 (2002) 129-137.
- [101] Kulka S., Kaun N., Baena J. r., Frank J.: *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 1735-1740.
- [102] Connatser R. M., Riddle R. A., Sepaniak M. J.: *J. Sep. Sci.*, 27 (2004) 1545-1550.
- [103] Song Q. J., Greenway G. M., McCreedy T.: *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 1-3.
- [104] Song Q. J., Greenway G. M., McCreedy T.: *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 883-887.

- [105] Li F., Wang D. D., Yan X. P., Lin J. M., Su R. G.: *Electrophoresis*, 26 (**2005**) 2261-2268.
- [106] Thompson L. F., Wilson C. G., Bowden M. J.: Introduction to Microlithography, *American Chemical Society* **1994**.
- [107] Posta J., Berndt H., Luo S. K., Schaldach G.: *Anal. Chem.*, 65 (**1993**) 2590-2595.

8. Publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

1. Attila Gáspár, Andrea Nagy, István Lázár
Integration of ground aerogel particles as chromatographic stationary phase into microchip
Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 1011-1015.
(Impakt faktor (2011): 4,531)
2. Andrea Nagy, Attila Gáspár
Packed multi-channels for parallel chromatographic separations in microchips
Journal of Chromatography A, 1304 (2013) 251-256.
(Impakt faktor (2013): 4,258)
3. Andrea Nagy, Edina Baranyai, Attila Gáspár
Interfacing microfluidic chip-based chromatography with flame atomic absorption spectrometry for the determination of chromium(VI)
Microchemical Journal, 114 (2014) 216-222.
(Impakt faktor (2013): 3,583)
4. Andrea Nagy, Eszter Tóth, Kristóf Iván, Attila Gáspár
Simulation of microfluidic systems with COMSOL Multiphysics
Microchemical Journal, 2015, közlésre beküldve.

Az értekezés témakörében tartott előadások:

1. Attila Gáspár, Andrea Nagy, István Lázár
Integration of ground aerogel particles as chromatographic stationary phase into microchip
10th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, CEEPUS, 2010. július 7-14. Zágráb, Horvátország

2. Attila Gáspár, Andrea Nagy, István Lázár
Integration of ground aerogel particles as chromatographic stationary phase into microchip
6th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, CECE-2010, 2010. október 14-17. Pécs, Magyarország

3. Nagy Andrea
Aerogéltöltetek kialakítása mikrofluidikai csipekben kromatográfiás alkalmazásokhoz
Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar Őszi Tudományos Diákköri Konferencia, 2010. november 25. Debrecen, Magyarország

4. Nagy Andrea
Aerogéltöltetek kialakítása mikrofluidikai csipekben kromatográfiás alkalmazásokhoz
XXX. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, 2011. április 27-29. Pécs, Magyarország

5. Péter I. Koczka, Andrea Nagy, Attila Gáspár
Developing microfluidic chips for electrophoretic and chromatographic separations
46. Komplexkémiái Kollokvium, 2012. május 21-23. Mátrafüred, Magyarország

6. Attila Gáspár, Andrea Nagy
Designing and fabrication of microchips with multicapillary systems
12th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, CEEPUS, 2012. július 4-14. Kolozsvár, Románia

7. Nagy Andrea, Gáspár Attila
Többszatornás mikrofluidikai rendszerek fejlesztése kromatográfiás alkalmazásokhoz *XXXV. Kémiai Előadói Napok*, 2012. október 29-31. Szeged, Magyarország

8. Attila Gáspár, Andrea Nagy
 Designing and preparation of multiple chromatographic packings
 in microchip
10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, CECE-2013, 2013. április 25-28. Pécs, Magyarország

9. Andrea Nagy, Attila Gáspár
 Designing and preparation of multiple chromatographic packings
 in microchip
13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, CEEPUS, 2013. június 27. – július 7. Debrecen, Magyarország

10. Metzinger Anikó, Palicskó Krisztián, Nagy Andrea, Gáspár Attila,
 Márton Zsuzsanna., Galbács Gábor
 Poli(dimetil-sziloxán) anyagú mikrofluidikai eszközök optikai és
 lézer ablációs jellemzőinek vizsgálata
*"Környezetbarát anyagok és technológiák" konferencia és 56.
 Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés*, 2013. július 1-3., Veszprém,
 Magyarország

11. Nagy Andrea, Gáspár Attila
 Többcsatornás mikrofluidikai rendszerek fejlesztése
 kromatográfiás alkalmazásokhoz
XXXVI. Kémiai Előadói Napok, 2013. október 28-30. Szeged,
 Magyarország

12. Metzinger Anikó, Nagy Andrea, Gáspár Attila, Márton Zsuzsanna,
 Galbács Gábor
 PDMS elasztomer lézer ablációs jellemzőinek vizsgálata XXXVI.
Kémiai Előadói Napok, 2013. október 28-30. Szeged,
 Magyarország

13. Nagy Andrea, Gáspár Attila
Többcsatornás mikrofluidikai rendszerek fejlesztése
kromatográfiás alkalmazásokhoz
Tavaszi Szél 2014, 2014. március 21-23. Debrecen, Magyarország
14. Andrea Nagy, Edina Baranyai, Anikó Metzinger, Gábor Galbács, Attila Gáspár
Miniaturization efforts for atomic spectrometry
14th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, CEEPUS, 2014. június 28. – július 6. Pozsony – Szomolány, Szlovákia
15. Nagy Andrea, Baranyai Edina, Metzinger Anikó, Galbács Gábor, Gáspár Attila
Mikrofluidikai csipek fejlesztése atomspektrometriás detektorokhoz
57. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, 2014. július 7-9. Veszprém, Magyarország
16. Attila Gáspár, Andrea Nagy
Parallel chromatographic separations in chip
30th International Symposium on Chromatography, 2014. szeptember 14-18. Salzburg, Ausztria
17. Andrea Nagy, Eszter Tóth, Kristóf Iván, Attila Gáspár
Simulation of microfluidic systems with COMSOL Multiphysics
11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, CECE-2014, 2014. október 20-22. Brno, Csehország

Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek:

1. Andrea Nagy, Attila Gáspár, István Lázár
Packing ground aerogel particles into PDMS microchip for chromatographic separation
10th International Symposium and Summer School on Bioanalysis,
2010. július 7-14. Zágráb, Horvátország
2. Andrea Nagy, Attila Gáspár, István Lázár
Integration of ground aerogel particles into PDMS microchip for chromatographic separation
11th International Symposium and Summer School on Bioanalysis,
2011. szeptember 18-28. Graz, Ausztria
3. Andrea Nagy, Attila Gáspár
Designing and fabrication of microchips with multicapillary systems
12th International Symposium and Summer School on Bioanalysis,
2012. július 4-14. Kolozsvár, Románia
4. Andrea Nagy, Attila Gáspár
Designing and fabrication of microchips with multicapillary systems
Lab-on-a-Chip European Congress, 2013. március 5-6. Barcelona, Spanyolország
5. Andrea Nagy, Attila Gáspár
Fabrication of microchips with multichannel systems
10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, CECE-2013, 2013. április 25-28. Pécs, Magyarország
6. Andrea Nagy, Attila Gáspár
Fabrication of microchips with multichannel systems
13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, CEEPUS, 2013. június 27. – július 7. Debrecen, Magyarország

7. Andrea Nagy, Eszter Tóth, Kristóf Iván, Attila Gáspár
Simulation of microfluidic systems with COMSOL Multiphysics
14th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, CEEPUS, 2014. június 28. – július 6. Pozsony – Szomolány, Szlovákia
8. Andrea Nagy, Eszter Tóth, Kristóf Iván, Attila Gáspár
Simulation of microfluidic systems by using COMSOL Multiphysics software
30th International Symposium on Chromatography, 2014. szeptember 14-18. Salzburg, Ausztria
9. Anikó Metzinger, Dávid Palásti, Andrea Nagy, Attila Gáspár, Éva Kovács-Széles, Tibor Ajtai, Zoltán Bozóki, Gábor Galbács
Analysis of liquid and aerosol samples by laser-induced breakdown spectroscopy
European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 2015. február 22-26., Münster, Németország

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Gáspár Attila egyetemi docensnek, a munkám során nyújtott segítségével, megértéséért és sok türelméért.

Köszönöm Dr. Andrási Melindának, Koczka Péter Istvánnak és a D501-es labor minden dolgozójának, hogy munkám során bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért.

Köszönöm Dr. Fábián István tanszékvezető egyetemi tanárnak, a Koordinációs és analitikai kémia doktori program vezetőjének, hogy lehetővé tette a dolgozat megírását a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Továbbá megköszönöm Dr. Lázár István egyetemi docensnek és Bereczki Helgának, hogy kísérleteinkhez biztosították a szükséges aerogéleket. Külön hálás vagyok Dr. Gyémánt Gyöngyinek és Dr. Lázár Istvánnak a sok szakmai segítségért és tanácsért.

Szeretnék köszönetet mondani a szimulációs számítások kivitelezéséért Dr. Iván Kristóf egyetemi docensnek és Leelóssyné Tóth Eszternek (Pázmány Péter Katolikus Egyetem, Információs Technológiai és Bionikai Kar).

A lézerindukált plazma spektrométerrel történt mérésekért hálával tartozom Dr. Galbács Gábor tanszékvezető egyetemi docensnek és Metzinger Anikónak (Szegedi Tudományegyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék).

A lángatomabszorpciós mérések során nyújtott segítségét köszönöm Fehérné Baranyai Edinának és Nagy István tanszéki mérnöknek.

Végül külön hálával tartozom családomnak, kedvesemnek, barátaimnak türelmükért, biztatásukért.