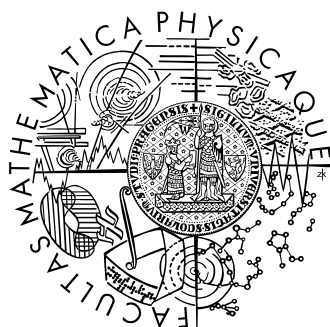


Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

# BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Vlastimil Peksa

## **Konstrukce a testování mikrofluidního zařízení pro Ramanovu mikroskopii**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc.

Studijní program: Obecná fyzika

2010

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu doc. RNDr. Peteru Mojzešovi, CSc. za trpělivost a ochotu při konzultacích, korekturách a pomoc při práci s experimentální technikou a programovým vybavením. Také bych rád poděkoval všem celému osazenstvu Oddělení fyziky biomolekul za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině a svým blízkým za podporu při sepisování této práce.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsal samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Praze dne

Vlastimil Peksa

# Obsah

<b>0. ÚVOD</b> .....	<b>5</b>
<b>1. TEORIE</b> .....	<b>6</b>
1.1 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE .....	6
1.2 POVRCHEM ZESÍLENÝ RAMANŮV ROZPTYL .....	9
1.3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	12
1.4 POUŽITÉ LÁTKY .....	12
<b>2. KONSTRUKCE MIKROFLUIDNÍHO ZAŘÍZENÍ</b> .....	<b>15</b>
2.1 SOUČÁSTI MIKROFLUIDNÍHO ZAŘÍZENÍ .....	15
2.3 MRTVÉ OBJEMY A SOUVISEJÍCÍ ARTEFAKTY .....	21
2.4 PROVOZ MIKROFLUIDNÍHO ZAŘÍZENÍ.....	24
<b>3. DYNAMIKA KAPALIN NA SOUTOKU</b> .....	<b>25</b>
3.1 MAPOVÁNÍ POMOCÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE .....	25
3.2 PŘÍMÁ POZOROVÁNÍ DYNAMIKY NA SOUTOKU .....	29
<b>4. MĚŘENÍ V ŘEČIŠTI</b> .....	<b>31</b>
4.1 MĚŘENÍ NA ČIPU SW11 .....	31
4.2 MĚŘENÍ NA ČIPU TD26.....	34
4.3 MĚŘENÍ NA ČIPU R50 .....	35
<b>5. DISKUSE</b> .....	<b>41</b>
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>43</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>44</b>

Název práce: Konstrukce a testování mikrofluidního zařízení pro Ramanovu mikroskopii

Autor: Vlastimil Peksa

Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc.

e-mail vedoucího: Peter.Mojzes@mff.cuni.cz

Abstrakt: Miniaturizace zařízení pro studium chemických interakcí kapalin vedla ke vzniku mikrofluidiky a konstrukci tzv. *lab-on-a-chip*. Náplní této práce je studium možností mikrofluidních zařízení s detekcí pomocí konfokální Ramanovy mikroskopie a povrchem zesíleného Ramanova rozptylu. Zařízení bylo sestaveno z komerčně dostupných dílů a otestováno. Byla vypracována metodika jeho provozování a stanoveny některé jeho provozní limity. Dále byla pomocí něj studována kinetika tvorby SERS-aktivních částic. Bylo demonstrováno, že mikrofluidní čipy poskytují perspektivní možnost studia chemických reakcí, hydrodynamiky kapalin na mikroskopické úrovni a konstrukce SERS-aktivních povrchů.

Klíčová slova: Mikrofluidika, Ramanova mikroskopie, lab-on-a-chip, SERS

Title: Construction and Testing of Microfluidic Device for Raman Microscopy

Author: Vlastimil Peksa

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc.

Supervisor's e-mail: Peter.Mojzes@mff.cuni.cz

Abstract: Miniaturization of devices to study chemical interactions of liquids has led to the emergence of microfluidics and construction of *lab-on-a-chip*. Present work is devoted to explore the possibility of microfluidics with detection by confocal Raman microscopy and the surface enhanced Raman scattering. The microfluidic device was assembled from commercially available components and tested. Methodology of its operation has been developed and some of its operational limits were set. Kinetics of the SERS-active particles formation was studied by its mean. It was demonstrated that the microfluidic chips provide promising opportunity to study chemical reactions, hydrodynamics of liquids at microscopic level and construction of the SERS-active surfaces.

Key words: Microfluidics, Raman microscopy, lab-on-a-chip, SERS

# 0. Úvod

Ramanova spektroskopie je metoda vibrační spektroskopie známá již přes osmdesát let. Velký vzestup a rozšíření do různých oblastí však zaznamenala až po objevení laseru, pokroku v konstrukci vysokosvětelných monochromátorů, holografických mřížek, filtrů a zejména po zavedení CCD detektorů. Od té doby se z ní stala běžná a často využívaná metoda optické spektroskopie od materiálového výzkumu až po biochemii, biofyziku a biologii. Díky své neinvazivnosti, vysokému informačnímu obsahu a možnosti zkoumat látky ve vodném prostředí, bez zvláštních požadavků na fázový stav vzorku nebo parametry okolního prostředí, představuje metodu vhodnou zejména pro studium biologicky významných molekul. Kombinace s optickým mikroskopem umožnila studovat látky v rozptylových objemech řádu  $\sim \mu\text{m}^3$ , v konfokálním uspořádání pak chemické zobrazování a mapování nejrůznějších objektů s prostorovým rozlišením až 1  $\mu\text{m}$ . Ramanova mikroskopie je vůbec nejdynamičtěji se rozvíjející oblast Ramanovy spektroskopie.

Nedávné pokroky na poli mikrotechnologií umožnily konstrukci systémů kanálek mikrometrických rozměrů v opticky propustných materiálech. Definovaná manipulace kapalnými vzorky, jejich míchání, přemísťování a separace umožnila vznik mikrofluidiky - nového odvětví zkoumání chemických reakcí nebo studia dynamiky kapalin v mikroskopickém měřítku. V této souvislosti se v analogii s pokrokem, který představovala miniaturizace pro elektroniku, mluví o laboratořích na čipu, tzv. *lab-on-a-chip*. Mikrofluidní zařízení jsou kombinována s různými detekčními metodami, například laserem indukovanou fluorescencí, hmotnostní spektrometrií, infračervenou spektroskopií, Ramanovou spektroskopií, nukleární magnetickou rezonancí a dalšími [8]. Mikrofluidní zařízení poskytují možnost studovat dynamiku reakcí dvou a více látek za dobře kontrolovaných podmínek a s minimální spotřebou zkoumaných vzorků, navíc s možností automatizace. Tyto výhody dělají z mikrofluidních zařízení perspektivní nástroj zejména pro chemický a biomedicínský výzkum. Ramanova spektroskopie v mikroskopickém konfokálním uspořádání se pro mikrofluidiku jeví jako zvlášť perspektivní detekční metoda, protože charakterizuje přítomné látky pouze na základě jejich vibračních spekter.

V naší práci jsme se zaměřili především na elementární konstrukci mikrofluidního zařízení a jeho zprovoznění v podmínkách laboratoří Oddělení fyziky biomolekul Fyzikálního ústavu MFF UK. Vzhledem k nedostatku předchozích zkušeností s mikrofluidními zařízeními bylo nutné řešit řadu technických problémů, identifikovat možné zdroje potíží a artefaktů a optimalizovat metodiku měření za použití ramanovského mikroskopu LabRam 800 HR. Úspěšné zvládnutí zadání je dokumentováno pokusem o studium dynamiky tvorby agregátů kovových nanočástic s extrémním zesílením Ramanova rozptylu (tzv. „hot-spots“) za použití mikrofluidního zařízení.

# 1. Teorie

## 1.1 Ramanova spektroskopie

Ramanův efekt byl objeven roku 1928 indickým vědcem C. V. Ramanem, který za tento objev posléze obdržel Nobelovu cenu. Jednalo se o již dříve předpovězený jev, který se podařilo Ramanovi a jeho spolupracovníkům pozorovat za použití slunečního světla a soustavy fotografických filtrů.

Celý efekt funguje na principu neelastického rozptylu světla na molekulách [7]. Každá molekula je složená z několika atomů spojených pružnými vazbami. Takto vázané atomy mohou provádět periodické pohyby kolem svých rovnovážných poloh, podobné pohybům harmonických oscilátorů. V nejjednodušším případě si můžeme představit určitý atom v molekule jako závaží o hmotnosti  $m$ , spojené nehmotnou pružinou o tuhosti  $f$  s řádově těžším zbytkem molekuly. Síla působící na závaží je pak úměrná

$$F = -f \cdot x \quad (1.1)$$

Kde  $x$  je výchylka z rovnovážné polohy. Sílu  $F$  si pak můžeme vyjádřit z Newtonova zákona.

$$F = m \frac{d^2 x}{dt^2} \quad (1.2)$$

Zkombinováním obou rovnic a vyřešením dostáváme

$$x = x_0 e^{i2\pi\nu t} \quad (1.3)$$

Kde  $\nu$  je frekvence vibrací. Tu lze vyjádřit z rovnic (1.1) a (1.2)

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{f}{m}} \quad (1.4)$$

Pokud nyní neuvažujeme spojení jednoho atomu s velmi těžkým zbytkem, ale spojení dvou atomů o hmotnostech  $m_1$  a  $m_2$ , zavádíme tzv. redukovanou hmotnost  $m$

$$\frac{1}{m} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \quad (1.5)$$

Po dosazení do rovnice (1.4) dostáváme přibližný vztah pro frekvenci vibrace dvouatomové molekuly:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{f \left( \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)} \quad (1.6)$$

Dvouatomová molekula vibruje jedinou frekvencí závislou na hmotnostech obou atomů a velikosti chemické vazby mezi nimi, vyjádřené silovou konstantou  $f$ . Klasické přiblížení neklade nijaké omezení na minimální hodnotu změny amplitudy kmitů.

V případě víceatomových molekul počet vibračních stupňů volnosti narůstá a platí, že  $N$ -atomová molekula může vykonávat  $3N-6$  různých vibračních pohybů na  $3N-6$  frekvencích. V případě lineárních molekul je z důvodu degenerace možných  $3N-5$  vibračních modů. Skutečný vibrační pohyb molekuly je komplikovaný, ale lze jej aproximovat superpozicí vibrací  $3N-6$  ( $3N-5$ ) harmonických oscilátorů kmitajících na  $3N-6$  ( $3N-5$ ) vlastních frekvencích. Každé vlastní frekvenci přísluší pohyb všech atomů ve fázi. Tento, obecně složitý pohyb, se popisuje zobecněnými tzv. normálními souřadnicemi.

Z kvantové mechaniky víme, že hodnota energie harmonického oscilátoru může nabývat pouze určitých konkrétních hodnot. Tyto hodnoty lze popsat rovnicí

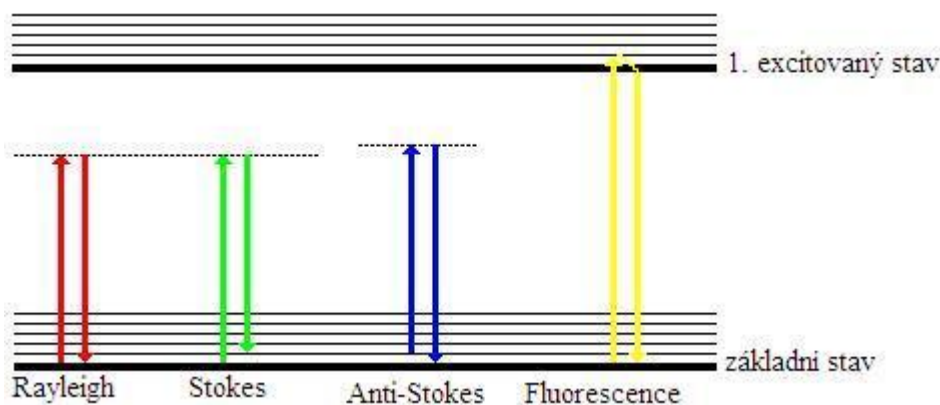
$$E_n = h\nu \left( n + \frac{1}{2} \right) \quad n = 0, 1, 2, \dots \quad (1.7)$$

Kde  $h$  je Planckova konstanta  $h = 6,626 \times 10^{-34}$  Js. V případě anharmonických oscilátorů dochází při vyšších energiích ke zkracování vzdálenosti mezi hladinami. Z rovnice (1.7) je vidět, že konkrétní vazba v molekule může přijmout jedině celistvý násobek energetického kvanta  $h\nu$ .

Z tohoto faktu vychází dvě metody vibrační spektroskopie, infračervená spektroskopie a Ramanova spektroskopie. Infračervená spektroskopie spočívá v ozařování vibrující molekuly infračerveným zářením. Pokud je energie fotonů právě  $h\nu$ , dojde k jeho absorpci, při které přechází molekula do vyššího vibračního stavu. Z absorpčního spektra je pak možno přímo určit frekvence vibračních pohybů molekuly. Ramanova spektroskopie využívá neelastického rozptylu monochromatického záření z viditelné oblasti spektra, tj. fotonů s výrazně větší energií než odpovídá vibračním přechodům. Při neelastickém rozptylu na vibracích molekuly předá foton část svojí energie molekule, takže rozptýlený foton má odlišnou energii.

$$h\nu_R = h\nu_0 \pm h\nu_v \quad (1.8)$$

Kde  $h\nu_0$  je energie původního záření,  $h\nu_v$  je energie nutná na excitaci vyššího vibračního stavu molekuly a  $h\nu_R$  je energie rozptýleného fotonu. Symbol + v rovnici (1.8) odpovídá anti-Stokesovu přechodu, kdy molekula po excitaci spadne do energeticky nižšího stavu, než v jakém začínala, symbol – pak odpovídá Stokesovu přechodu, kdy molekula po excitaci přechází na energeticky vyšší hladinu.



Obr 1.1. Ramanův rozptyl

Kromě neelastického rozptylu dochází i k rozptylu elastickému, kdy se mění pouze směr šíření fotonu, ale jeho energie zůstává stejná. Tento jev – Rayleighův rozptyl - je zhruba o šest řádů silnější než rozptyl Ramanův. Vyjádření počtu (intenzity) elasticky rozptýlených fotonů jako funkce změny frekvence (Ramanův posuv) představuje Ramanovo spektrum. Spolu s infračerveným spektrem představuje vibrační spektrum dané látky. V závislosti na rozdílném zastoupení atomů v různých molekulách, jejich hmotnostech, uspořádání, vazbách a konformacích, je vibrační spektrum pro různé molekuly obecně různé, díky čemuž lze různé molekuly odlišit. Každá chemická nebo konformační změna molekuly se pak musí odrazit ve změnách jejího vibračního spektra, což činí vibrační spektroskopii citlivým nástrojem na studium nejrůznějších kvalitativních a kvantitativních změn.

*Poznámka:*

Protože vyjadřování energií vibračních stavů pomocí vibračních frekvencí je nepohodlné, vyjadřují se tyto změny pomocí převrácené hodnoty vlnové délky odpovídající vibrační frekvenci, tj. vlnočtu vyjádřeného z historických důvodů v jednotkách  $\text{cm}^{-1}$ .

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} \quad (1.9)$$

Kde  $c$  je rychlost světla a  $\lambda$  je vlnová délka.



## 1.2 Povrchem zesílený Ramanův rozptyl

Ramanův rozptyl je relativně slabý, zejména v porovnání s ostatními spektroskopickými projevy molekul (absorpce, fluorescence) [7]. Je obecně obtížné získat Ramanovo spektrum látek v nízkých koncentracích ( $< 100$  mM), které jsou zajímavé z hlediska biochemických a biofyzikálních aplikací. Dalším omezením je vlastní nebo příměsová fluorescence vzorků, která ztěžuje nebo znemožňuje měření Stokesova Ramanova rozptylu. Určité zvýšení intenzity Ramanova rozptylu ( $\sim 10^2 - 10^3$ ) poskytuje rezonanční zesílení, ke kterému dochází, pokud je pro excitaci použita vlnová délka spadající do oblasti elektronové absorpce zkoumané molekuly [7]. Pak se jedná o rezonanční Ramanův rozptyl. Ještě většího zesílení je dosaženo efektem povrchu některých nanostruktur kovů. V tomto případě se jedná o povrchem zesílený Ramanův rozptyl (Surface Enhanced Raman Scattering - SERS) [5, 7]. Protože u mikrofluidních zařízení lze díky malým rozptylovým objemům předpokládat problémy s celkovou intenzitou Ramanova rozptylu, naleznou zde uplatnění i techniky vedoucí k jeho zesílení [7].

Celý teoretický základ povrchem zesíleného Ramanova rozptylu není ještě zcela vysvětlen [5], nicméně hlavní faktory přispívající k zesílení signálu jsou již vysvětleny a popsány. Intenzita Ramanova rozptylu na volných molekulách je úměrná velikosti indukovaného elektrického dipólu  $p$ , který můžeme vyjádřit jako

$$p = \alpha E \quad (1.10)$$

Kde  $\alpha$  je polarizovatelnost molekuly a  $E$  je intenzita elektrického pole. Velikost indukovaného dipólu je možné zvýšit zvětšením některé z těchto složek. Prvním a nejdůležitějším ze zesilujících mechanismů je zesílení elektromagnetického pole, kterému je molekula vystavena. Bylo zjištěno, že v okolí kovových povrchů s nerovnostmi v řádu jednotek až desítek nm dochází k extrémnímu zvýšení intenzity elektromagnetického pole. Podmínkou je rezonance mezi frekvencí působícího pole a vlastní frekvencí oscilací elektrického náboje v kovových nanostrukturách. Vlastní frekvence oscilací nanostruktur závisí na jejich materiálu, dielektrické permitivitě okolí a zejména charakteristickém rozměru. Označuje se jako plazmonová absorpce (absorpce povrchových plazmonů). V případě rezonance mezi excitačním zářením a plazmonovou absorpcí se kovové nanostruktury stávají sekundárním zdrojem elektromagnetického záření. Jeho intenzita na povrchu dosahuje vysoké hodnoty a se vzdáleností od povrchu rychle klesá. Pokud je molekula adsorbovaná na povrchu nanostruktury, nachází se ve výrazně silnějším poli než v jakém by se nacházela ve volném roztoku. Ramanovsky rozptýlené záření (zejména od vibrací s nižšími vlnovky) může být ještě v rezonanci s plasmonovou absorpcí a analogickým mechanismem dochází k jeho dalšímu zesílení. Spojením obou příspěvků elektromagnetického zesílení dochází k enormnímu nárůstu intenzity Ramanova rozptylu o 4 – 7 řádů. Zesílení může být ještě větší, pokud se molekula nachází

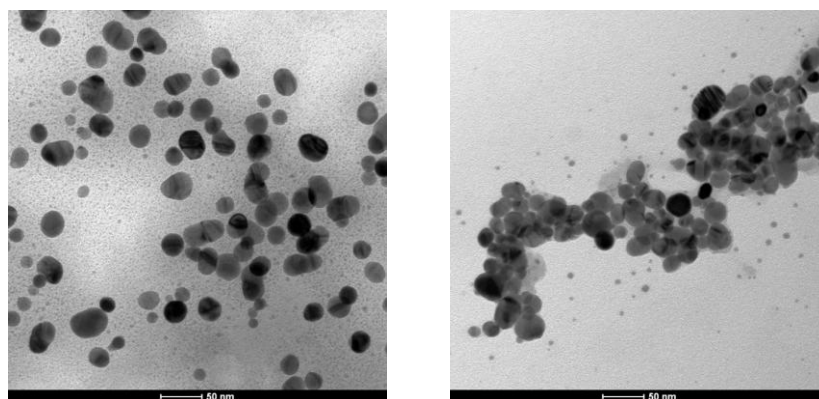
v blízkosti kontaktu dvou nanočástic [5]. Teoretické výpočty ukazují, že v těchto případech může intenzita Ramanova rozptylu narůst až o 15 – 18 řádů [5]. Při tak vysokém zesílení je možno pozorovat Ramanův rozptyl pocházející z jednotlivých molekul. Detekční limita SERS se posouvá ke koncentracím  $10^{-18}$  M a podobně jako u fluorescence se mluví o spektroskopii na jedné molekule (Single Molecule SERS, SM-SERS spektroskopie). SERS-aktivní struktury poskytující extrémně vysoké zesílení a SM spektra se označují jako „hot-spots“. Protože pro tyto struktury zatím neexistuje v češtině ustálený termín, budeme v dalším textu používat anglické označení v uvozovkách. Studiu „hot-spots“ je věnována velká pozornost, protože zvládnutí jejich kontrolované tvorby pro konkrétní analyty by zásadním způsobem změnilo způsob detekce malých koncentrací v mnoha praktických aplikacích.

Druhým zesilujícím faktorem je ovlivnění polarizovatelnosti  $\alpha$  v důsledku elektronové interakce mezi adsorbovanými molekulami a kovem. Pokud jsou si energeticky blízké prázdné elektronové orbitály adsorbované molekuly a Fermiho hladina elektronů nanočástice, může docházet k přenosu náboje mezi kovem a adsorbovanou molekulou. Vzniká komplex s přenosem náboje (CT - charge transfer complex) s charakteristickou rezonanční frekvencí, se kterou elektron osciluje mezi adsorbátem a kovem. V případě, že na tuto soustavu začne působit vnější elektromagnetické záření s frekvencí blízkou vlastní frekvenci těchto oscilací, dojde k rezonančnímu zvýšení amplitudy oscilací. Zvýšení amplitudy znamená zvětšení některých složek polarizovatelnosti molekuly díky větším oscilacím v rozložení jejího elektronového obalu. Následně dochází ke zvětšení indukovaného dipólu molekuly a zesílení Ramanova rozptylu. Tento mechanismus se označuje jako molekulární nebo chemický a k celkovému SERS-zesílení přispívá faktorem 10 – 100. Existují i další faktory, které se podílejí na povrchem zesíleném Ramanově rozptylu, například chemické perturbace molekul, jejich vliv je ale oproti prvním dvěma malý [7].

K SERS efektu dochází na nanostrukturách různých kovů a různých forem: elektrochemicky zdrsňených povrchích elektrod, kovových filmech vytvořených napařováním na pevné substráty různé topologie, vodních a nevodních koloidech i pravidelných nanostrukturách vytvořených litografickými technikami [5, 7]. Mezi nejčastěji používané patří vodní roztoky kovových koloidů mincovních kovů (Ag, Au, Pt, Pd a Cu), zejména však Ag a Au. Koloidy lze připravit chemickou redukcí nebo laserovou ablací. V případě chemické redukce jsou koloidní částice vyredukovány vhodným redukčním činidlem z rozpustné soli příslušného kovu (obvykle  $\text{AgNO}_3$  a  $\text{HAuCl}_4$ ). Pro Ag koloidy existuje v současnosti několik běžně používaných postupů, např. borohydridová, citrátová nebo hydroxylaminová redukce, které poskytují koloidy s různými distribucemi velikostí nanočástic. Výhodou chemicky redukováných koloidů je zejména jednoduchost přípravy. Nevýhodou je přítomnost chemických produktů redukce a relativně nízká reprodukovatelnost vlastností. Laserem ablované koloidy vznikají drolením terčíku

příslušného kovu ponořeného ve vhodném kapalném prostředí laserovými pulzy. Výhodou je chemická čistota a možnost přípravy v téměř libovolném rozpouštědle.

Příprava SERS-aktivního systému spočívá v přidání zkoumané látky (analytu) v určité koncentraci do příslušného koloidu. Pokud se molekuly analytu spontánně adsorbují na povrchu koloidních částic, obvykle poskytují taky SERS zesílení. Podmínkou je excitace spadající do oblasti vlastní plasmonové resonance neagregovaného koloidu. Pokud přidáním analytu dojde k agregaci koloidu, vznikají útvary s větším charakteristickým rozměrem, viz obr 1.2, které mají plazmonovou absorpci posunutou k větším vlnovým délkám. Oblast plazmonové absorpce se agregací koloidu značně rozšíří a pro excitaci SERS je možno použít větší škály vlnových délek. Agregaci koloidů je možno vyvolat i uměle přidáním vhodného agregačního činidla (např. HCl nebo KCl). Místy největšího SERS zesílení jsou oblasti styku koloidních částic, tzv. „hot-spots“, ve kterých je intenzita elektromagnetického záření maximální [5, 9]. Pokud se do těchto míst dostane zkoumaná molekula, poskytuje velký příspěvek k SERS signálu rozptylového objemu. K zachycení molekuly analytu v „hot-spotu“ dochází obvykle v procesu agregace, ale dynamika tvorby „hot-spots“ a časové změny lokalizace analytu v „hot-spotu“ jsou pořád málo prozkoumané.



Obr. 1.2. Obrázky z transmisní elektronové mikroskopie (TEM) neagregovaného borohydridem-redukovaného Ag koloidu a stejného koloidu agregovaného přidáním analytu.

Pokud je rozptylový objem relativně velký (typicky  $10^{-1}$  -  $10^{-2}$   $\mu\text{l}$  pro makroskopické vzorky) a statistické zastoupení „hot-spots“ vysoké, objemově zprůměrovaný SERS signál nemusí vykazovat výraznější časové a spektrální fluktuace. Při mikroskopických rozptylových objemech ( $\sim 10^{-8}$   $\mu\text{l}$ ) a krátkých expozičních časech (např. 1 s) však intenzitní i spektrální fluktuace nabývají na významu. Opakovaně bylo experimentálně potvrzeno, že za podmínek SM-SERS vykazují jednotlivé „hot-spots“ velké spektrální fluktuace v časové škále desítek sekund [5, 9]. Mechanismus vzniku těchto fluktuací není zcela objasněn. Předpokládá se, že se na něm může podílet spontánní i polem indukovaný pohyb

molekuly v „hot-spotu“, fotoindukovaná desorpce analytu nebo přímo jeho fotodekompozice [9]. Studium dynamiky vzniku „hot-spots“, jejich stability, četnosti a efektivního zesílení v dobře definovaných podmínkách je proto velice žádoucí [3]. Využití kombinace mikrofluidních zařízení s konfokální SERS mikroskopií pro podobné studie bylo navrženo již v r. 2003 [3], přesto zůstává tato oblast neprobádána [5] s minimem relevantních studií. Je proto pravděpodobné, že tato oblast bude předmětem intenzivního zájmu a v blízké budoucnosti dojde k větší symbióze mikrofluidních zařízení a SERS mikroskopie. K tomu by měla přispět i tato práce.

### 1.3 Experimentální část

V rámci bakalářské práce bylo sestaveno mikrofluidní zařízení z komerčně dostupných součástí. Pro detekci byl použit ramanovský mikroskop LabRam HR 800. Funkce mikrofluidního zařízení byla testována na modelovém binárním systému, kdy se v zařízení míchaly dvě rozpouštědla vhodných fyzikálně-chemických a spektroskopických vlastností. Zařízení pak bylo použito na pilotní zkoumání možnosti sledování dynamiky tvorby „hot-spots“ v Ag koloidech agregovaných kationickým metaloporfyrinem. V následujících odstavcích jsou uvedené podrobnosti experimentu.

### 1.4 Použité látky

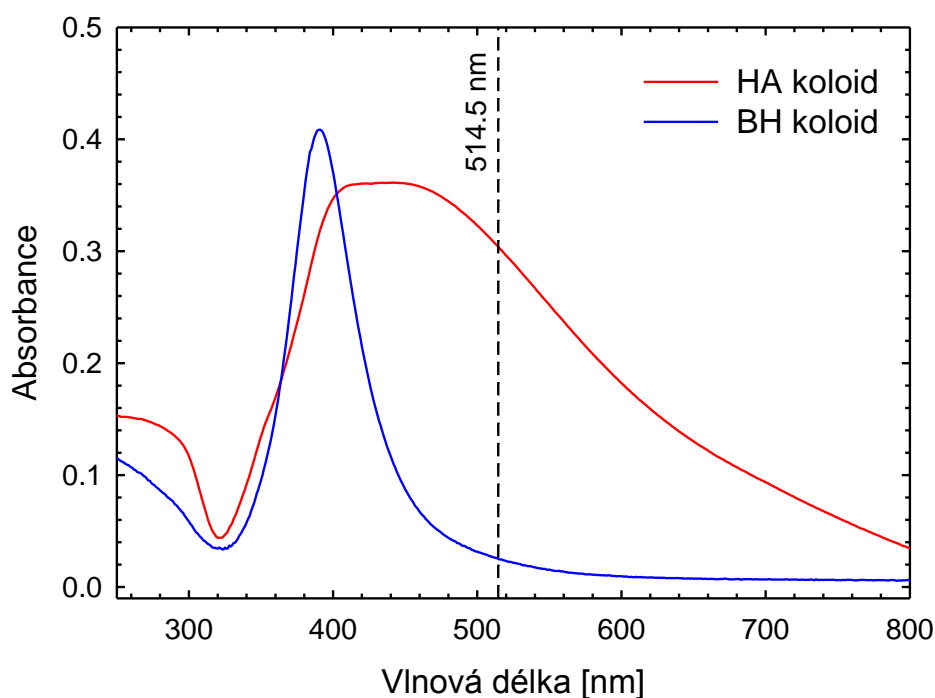
Při základním testování mikrofluidního zařízení jsme použili různé kombinace rozpouštědel poskytujících výrazná Ramanova spektra. Mapováním jejich distribuce v mikrofluidním čipu jsme ověřovali funkci nanopump, těsnění spojů a charakter proudění kapalin v různých čípech. Některé vlastnosti rozpouštědel podstatné při měření jsou shrnuté v tabulce 1.1.

látka	index lomu	viskozita (mPa s)	hustota [g/cm <sup>3</sup> ]
aceton	1,359	0,330	0,793
etanol	1,361	1,200	0,789
acetonitril	1,346	0,343	0,786
voda	1,333	1,000	1,000

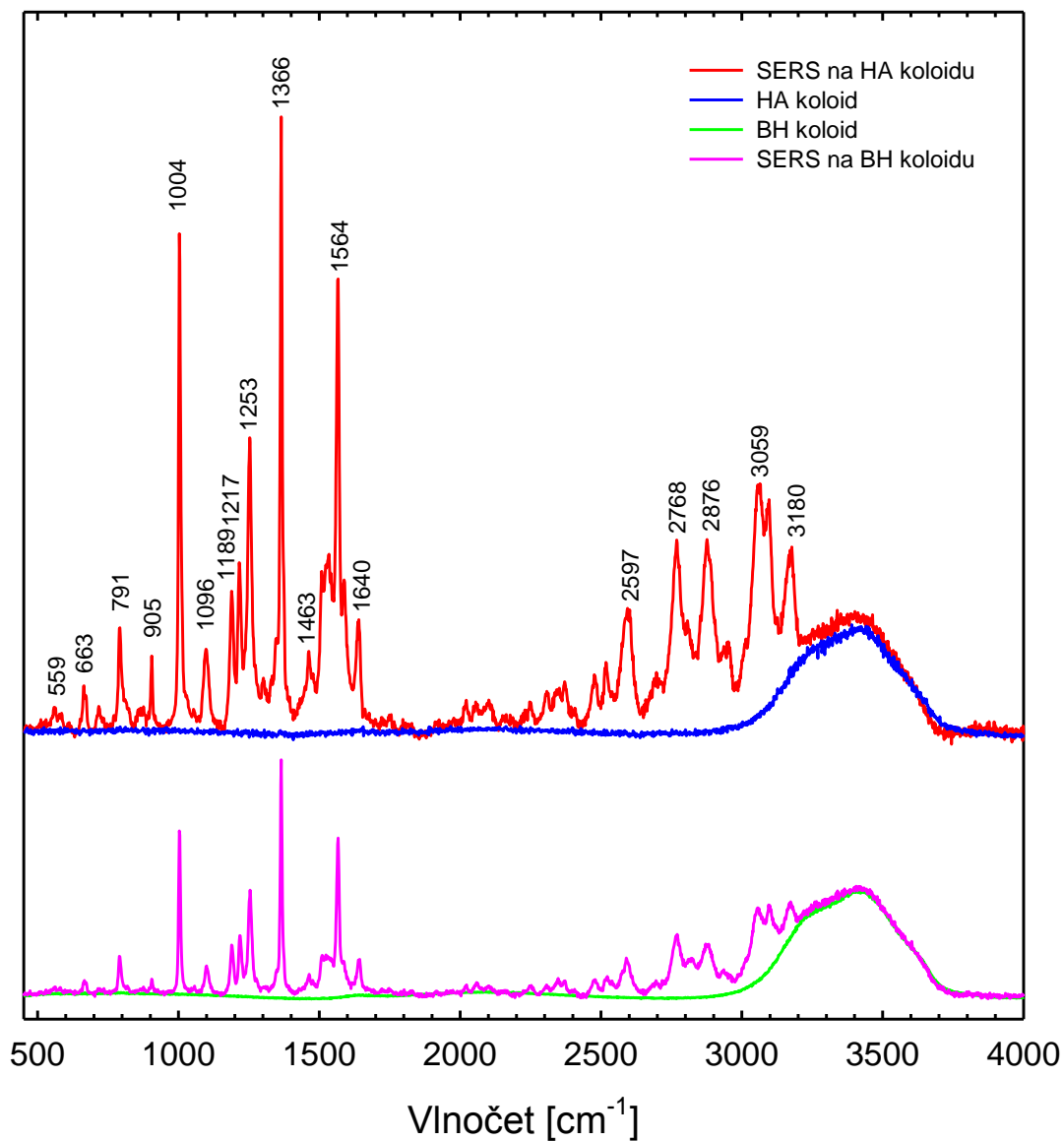
Tabulka. 1.1. Vybrané vlastnosti látek použitých při testování mikrofluidního zařízení

Pro měření povrchem zesíleného Ramanova rozptylu jsme používali dva typy Ag koloidů: borohydridem redukovaný (BH) a hydroxylaminem-redukovaný (HA). Koloidy byly připraveny a pro potřeby této práce poskytnuté Doc. M. Procházkou z OFB FÚ. Tyto koloidy jsme si vybrali s ohledem na excitační vlnovou délku 514,532 nm, která je u obou koloidů v rezonanci s plazmonovou absorpcí jejich agregátů. V neagregovaném stavu se BH koloid vyznačuje úzkou distribucí velikostí nanočástic a relativně úzkým absorpčním pásem na 390 nm (obr. 1.3), takže při excitaci 514,532 nm nedochází k výraznějšímu SERS zesílení. HA koloid vykazuje širokou distribuci a díky plazmonové rezonanci rozšířené do dlouhovlnné oblasti poskytuje SERS zesílení i v neagregovaném stavu.

SERS spektra CuTMPyP4 v obou koloidech získána z makroskopických objemů (měřeno v makroskopickém módu na LabRam HR800) jsou znázorněna na obr. 1.4. Pro srovnání jsou zde znázorněna spektra čistých koloidů a SERS-aktivního systému s příměsí kationického porfyrinu CuTMPyP4 s výslední molární koncentrací  $2,5 \times 10^{-7}$  M, ihned po přípravě. Přídavek analytu CuTMPyP4 v této koncentraci způsobuje výraznou agregaci obou koloidů a poskytuje dostatečně intenzivní SERS signál, jak je vidět ze srovnání s intenzitou valenčních vibrací H<sub>2</sub>O na 3450 cm<sup>-1</sup>.



Obr. 1.3. Absorpční spektra neagregovaných HA a BH koloidů.



Obr 1.4 - Porovnání SERS na HA a BH koloidech. Všechna spektra jsou normalizována na pás valenčních vibrací vody 3450 cm<sup>-1</sup>. SERS spektra obsahují všechny charakteristické vibrace CuTMPyP4.

## 2. Konstrukce mikrofluidního zařízení

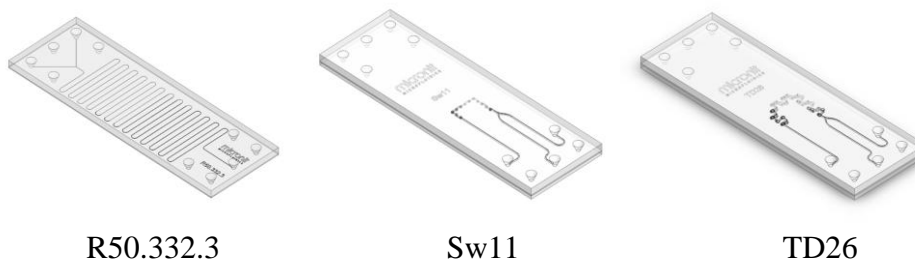
### 2.1 Součásti mikrofluidního zařízení

Pro konstrukci mikrofluidního zařízení jsou podstatné dvě části [6]. Jednou je samotný mikrofluidní čip se systémem přívodních kanálků, jejich křížení, případně mixerů. Pro spektroskopické metody detekce může být čip skleněný nebo z jiného opticky transparentního materiálu (např. PDMS, polydimethylsiloxan), případně kombinací dvou a více materiálů [6]. Obvykle bývá uchycen v plastovém nebo kovovém držáku se vstupy pro fitinky nebo hadičky. Druhou podstatnou součástí je systém pump zajišťujících dobře definované a kontrolované protlačování kapalin kanálky. Obvykle se používají peristaltické pumpy nebo mikrostríkačky (microsyringes), písty kterých jsou definovaně tlačeny krokovými motorky. Čipy a pumpy jsou propojeny vhodnými hadičkami a fitinkami. Jedná se obvykle o spojovací materiál používaný v HPLC (teflon, PEEK, křemen, nerez), případně vyráběný přímo pro použití v mikrofluidice. Všechny součásti jsou komerčně dostupné od různých specializovaných výrobců.

V této práci byly testovány skleněné čipy z nabídky firmy Micronit Microfluidics [4]. Jedná se o specializovanou firmu, která vyrábí širokou škálu čipů (včetně čipů podle vlastního návrhu) a dodává i spojovací materiál. Čipy firmy Micronit byly vybrány z těchto důvodů: (a) jsou vyrobené z borosilikátového skla vhodného pro Ramanovou spektroskopii, (b) v nabídce byly čipy s tenkým krycím sklíčkem (145  $\mu\text{m}$ ), vhodné pro konfokální mikroskopii a imerzní objektivy, (3) k dispozici byl nerezový držák pro uchycení čipu vhodný i pro přímý mikroskop. Samotný čip je uložen v plastovém pouzdře, které se před měřením vkládá do nerezového držáku. Podle informací od výrobce jsou mikrokanálky v čipech vytvořené abrazivně (pískováním). Relativně drsný povrch je u některých typů vyhlazen leptáním kyselinou fluorovodíkovou. Jednotlivé skleněné komponenty jsou spojené optickou pájkou, proto jsou čipy odolné všem rozpouštědlům a zředěným kyselinám. My jsme měli k dispozici testovací sadu čipů, jejichž parametry jsou shrnuté v tabulce 2.1 [4].

typ	$h_1$ [ $\mu\text{m}$ ]	$h_2$ [ $\mu\text{m}$ ]	V [ $\mu\text{l}$ ]	$d_1$ [ $\mu\text{m}$ ]	$d_2$ [ $\mu\text{m}$ ]	popis
R50.676.3	1100	145	0,6	50	20	lineární tok s větší hustotou kanálků
R50.332.3	1100	145	0,3	50	20	lineární tok s menší hustotou kanálků
Sw11	1100	700	1	200	150	čip s malými mixéry
TD26	1100	700	2	200	150	čip s velkými mixéry

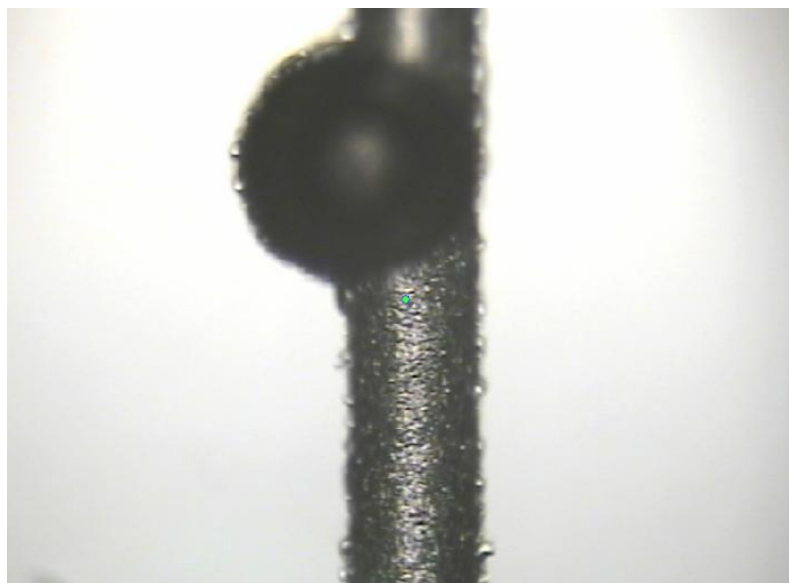
Tabulka 2.1. Parametry čipů; označení  $h_1$  odpovídá tloušťce horního krycího sklíčka, označení  $h_2$  odpovídá tloušťce podložního skla, označení V odpovídá objemu vnitřních prostor čipu,  $d_1$  je šířka kanálku v čipu a  $d_2$  je hloubka kanálku v čipu.



Obr 2.1. Testované čipy

Čipy typu Sw11 a TD26 mají mezi oběma sklíčky ještě sklíčko třetí, tlusté 170  $\mu\text{m}$ , ve kterém je vytvořen mechanismus mixérů. Díky tomu jsou výrazně odolnější vůči rozbití, což značně usnadňuje práci s nimi. Naopak velkou výhodou čipů R50 je leptaný povrch kanálků, který je daleko hladší a usnadňuje pozorování kapaliny v kanálcích. Vnitřní povrch v čipech Sw11 a TD26 je drsný, takže není možné dobře sledovat mikroskopem dění uvnitř.





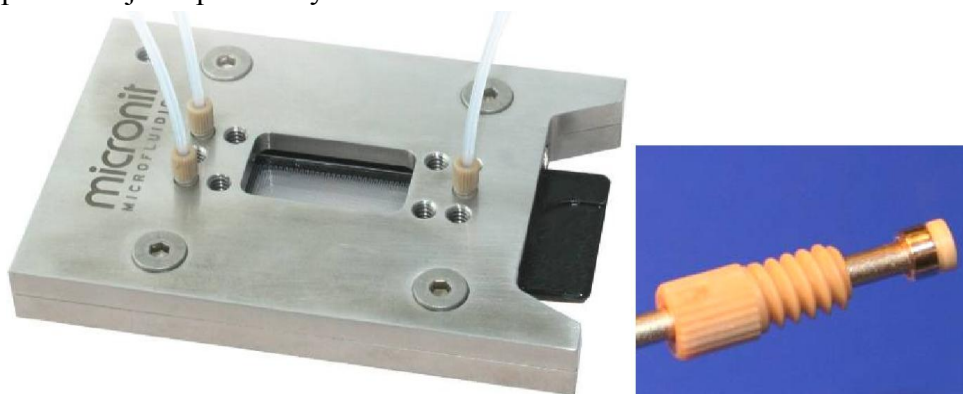
Obr. 2.2 Malý mixér na čipu Sw11

Druhou součástí je mikrostříkačka, umístěná na pumpě (KD Scientific, picoliter syringe pump, model EW-74902-60) s regulovatelnou rychlostí chodu. Použité plynotěsné mikrostříkačky (Hamilton) mají vnitřní průměr 1,7 mm a objem 50  $\mu$ l. Interval rychlosti pumpování, udávaný výrobcem, je znázorněn v tabulce 2.2

rozsah	posuv pumpy [ $\mu$ m/min]	průtok [nl/min]
minimum	0,0388	0,35
maximum	833,3	7565,70

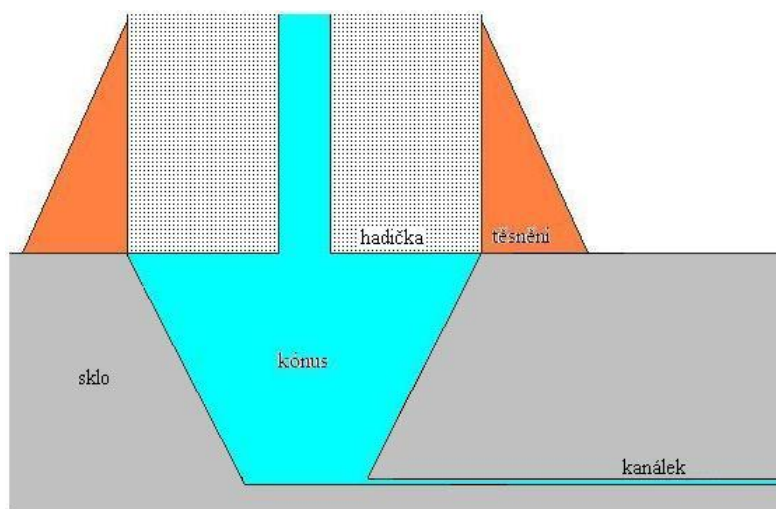
Tabulka 2.2 Teoretické rychlosti pumpování

Pumpy jsou říditelné počítačem, výrobce k nim dodává podrobný návod na jejich naprogramování. My jsme tuto možnost nevyužili, protože jsme se v našich experimentech setkali s výrazně většími omezeními a nepřesnostmi způsobenými jinými částmi aparatury, než jaké nepřesnosti přinášelo ruční ovládání pumpy. V budoucnu bude vhodné počítačové řízení pump zvládnout a využít pro komplikovanější experimenty.



Obr. 2.3. Mikrofluidní čip v nerezovém držáku s teflonovými hadičkami připojenými fitinkami. Detail fitinky s osazenou hadičkou a těsněním.

Na mikrostříkačku je připojena plastovou fitinkou (materiál PEEK) teflonová hadička s vnitřním průměrem  $d = 250 \mu\text{m}$ , dlouhá přibližně 20 cm. Tato hadička pak nasedá na vstupní kónus čipu v držáku, viz obr 2.4. Těsnost mezi skleněným čipem a hadičkou je zajištěna pouze mechanickým přitlakem těsnění z PEEK, ke kterému dochází zašroubováním fitinky do držáku a utažením speciálním klíčem. Správné utažení vyžaduje opatrnost a zkušenost, protože nadměrným tlakem může lehce dojít k rozbití čipu. Při nedostatečném utažení dochází k úniku kapaliny kolem spoje. Únik se obtížně detekuje (zejména u těkavých kapalin), protože do prostoru kolem fitinek není dobře vidět.



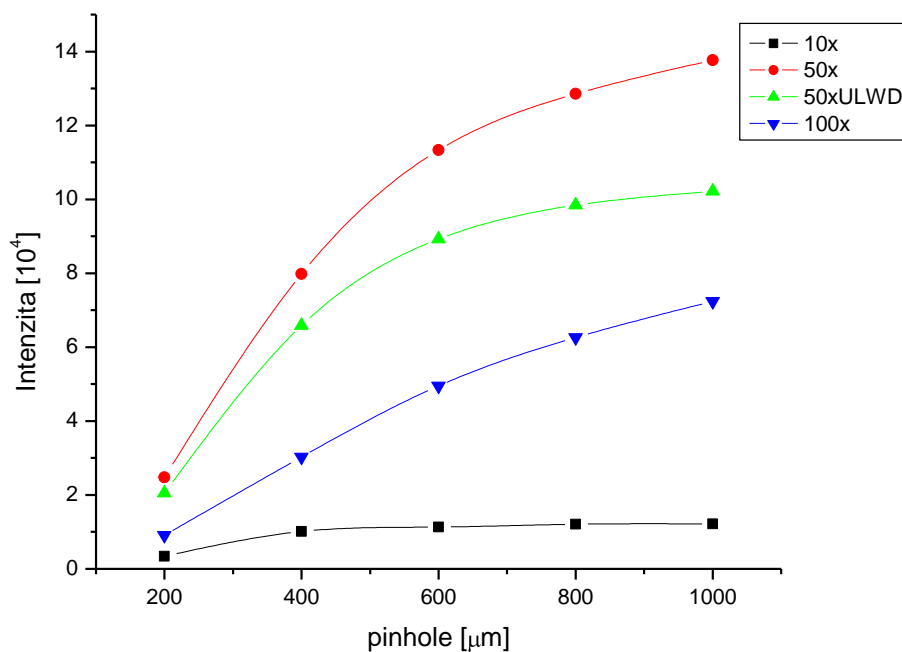
Obr 2.4. Boční pohled na kónus s odtokem a připojenou hadičkou s nasazeným těsněním.

## 2.2 Mikroskop a objektivy

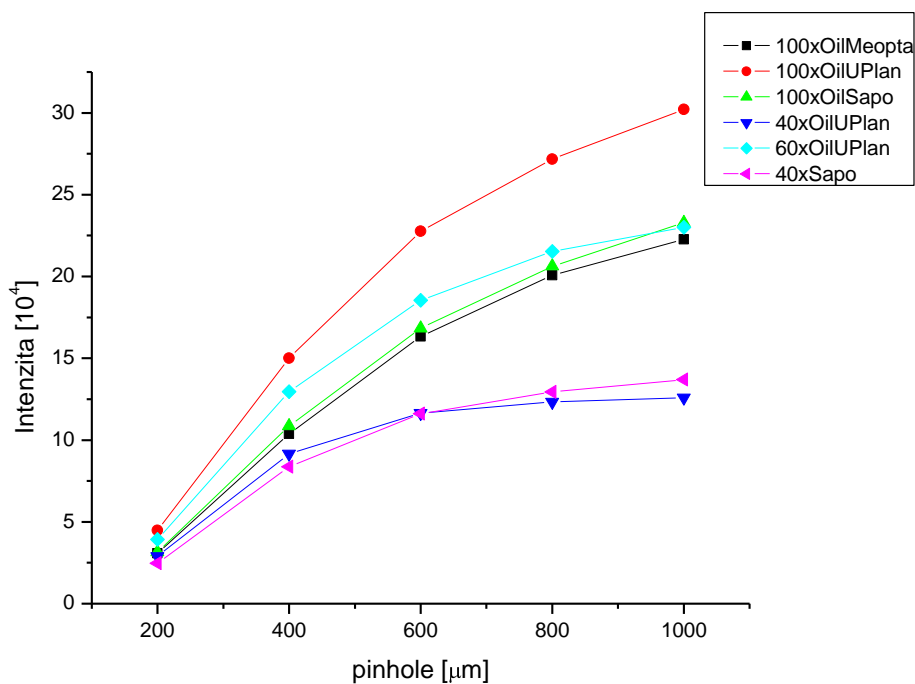
Veškerá měření proběhla na komerčně dostupném ramanovském mikroskopu LabRam 800 HR (Horiba Jobin-Yvon), za použití externího  $\text{Ar}^+$  laseru. Mikroskop disponuje dvěma difrakčními mřížkami s různou spektrální disperzí (600 vrypů/mm a 1800 vrypů/mm), konfokální clonou (pinhole) s rozsahem 0 – 1000  $\mu\text{m}$ , dále řadou filtrů pro zeslabení intenzity laseru a spektrografem s ohniskovou délkou 800 mm. Detekce probíhá pomocí CCD detektoru chlazeného kapalným dusíkem. CCD detektor (front illuminated) má rozlišení 1024  $\times$  256 pixelů. Mikroskop je vybaven stolkem s mikrometrickým XY posuvem ovládaným počítačem. Mikroskopický objektiv (dle výběru) lze doplnit piezoelektrickým posuvem, pomocí kterého lze měnit jeho axiální Z polohu v rozmezí 0 – 100  $\mu\text{m}$ . V zásadě lze tedy provádět 3D mapování. Výrobce udává přesnost mikroposuvů 0,1  $\mu\text{m}$  a reprodukovatelnost 1  $\mu\text{m}$ . Celá aparatura se ovládá programem LabSpec, který dovoluje řídit parametry sběru dat (expoziční čas, počet akumulací, počítačem ovládané řazení některých optických prvků, atd.) i lokalizaci vzorku ve všech třech souřadnicích. Pro potřeby této práce byla využívána možnost mapování v rovině XY, kdy byly měřeny chemické mapy vybraných částí mikrokanálku. Druhým typem experimentů bylo sledování časového vývoje spektra ve vybraném místě čipu v závislosti na nějakém jiném parametru (rychlost proudění, posoupnost různých vzorků, atd.).

Laser  $\text{Ar}^+$  (Melles Griot) je přeladitelný a poskytuje několik excitačních vlnových délek. Všechny experimenty v této práci byly prováděny s excitací 514,532 nm. Maximální výkon na vzorku na této vlnové délce je 7 mW. Vhodný výkon jde nastavit regulací proudu laserem a sadou šedých filtrů (optické hustoty 0,3; 0,6; 1; 2; 3 a 4).

Pro měření v mikrokanálcích bylo třeba vybrat vhodný objektiv, který by poskytoval maximální Ramanův signál vzorku s minimálním příspěvkem signálu krycího sklíčka. Mikrokanálky jsou poměrně mělké (u řady R50 pouze 20  $\mu\text{m}$ ) a z vrchní i spodní strany ohraničené skleněnou vrstvou. Bylo proto třeba vybrat objektiv, který poskytne maximum Ramanova signálu právě z kanálku a potlačí příspěvky z obou skleněných vrstev. Axiálního vymezení rozptylového objemu je možné v konfokálním uspořádání docílit zmenšováním velikosti pinholy v mikroskopu. Malá pinhola však snižuje celkovou úroveň signálu, proto optimální pinhola je kompromisem mezi oběma požadavky. Otestovali jsme proto sérii vzdušných a imersních objektivů na čipu R50.332.3 naplněného DMSO (dimethylsulfoxid) v závislosti na velikosti pinholy. Objektiv byl pokaždé zaostřen přesně na střed kanálku v polovině jeho hloubky. Posuzovanými parametry byla celková úroveň Ramanova signálu a relativní příspěvek skla. Výsledky jsou shrnuté v grafech 2.1 a 2.2.



Graf 2.1. Závislost intenzity Ramanova signálu na otevření pinhole pro různé typy vzdušných objektivů.



Graf 2.2. Závislost intenzity Ramanova signálu na otevření pinhole pro různé typy olejových imerzních objektivů.

Z těchto grafů je vidět, že maximum signálu při minimálním příspěvku skla poskytuje olejový imerzní objektiv UPlanFLN 100x. Olejová imerze se ale z prostorových důvodů dá použít pouze na čípech řady R50, kde je vrchní krycí

sklíčko dostatečně tenké. Ani na nich se však objektivy s normální pracovní vzdáleností nedají použít v oblasti soutoku dvou kanálků, protože tento soutok se nachází pod nerezovým držákem a je viditelný pouze otvorem o průměru 4 mm. Držák brání přiblížení objektivu na potřebnou vzdálenost. Držák by vyžadoval mechanickou úpravu nebo by bylo potřeba navrhnout zcela jinou konstrukci. Ze stejných důvodů nebyl univerzálně použitelný ani vzdušný objektiv MPlan 50x, který mezi posuzovanými vzdušnými objektivy vykazoval nejlepší parametry. Jako objektiv nejvhodnější k dalšímu testování jsme proto zvolili MPlan 50x ULWD (Ultra Long Working Distance) s prodlouženou pracovní vzdáleností (8.1 mm), se kterým je možné měřit i na soutoku a v čípech SW11 a TD26. Z hlediska efektivity sběru signálu je srovnatelný s MPlan 50x a je ho možno použít ve všech místech testovaných čipů.

## 2.3 Mrtvé objemy a související artefakty

Často uváděnou předností mikrofluidních zařízení je to, že pracují s malými objemy vzorků. Vnitřní objemy testovaných čipů se pohybují od 0,3 do 2  $\mu\text{l}$  (tab. 2.1). Do úvah o potřebných množstvích testovaných látek je však nutno započítat objemy přívodních hadiček a fitinek, které představují tzv. mrtvý objem mikrofluidního zařízení. Jedná se o objem celé konstrukce, který je nutné zaplnit nebo protlačit předtím, než se do samotného čipu dostane látka z mikrostříkačky. Tento objem se skládá ze tří částí, objemu plastové spojky mezi mikrostříkačkou a hadičkou, objemu teflonové hadičky a objemu kónu v čipu. Rozměry a tvary jednotlivých součástí jsou uvedeny v tabulce 2.3.

součástka	průměr [mm]	délka [mm]	tvar	objem [ $\mu\text{l}$ ]
spojka	4,0	3,5	válec	44
hadička	0,25	200	válec	9,8
kónus	dolní podstava 1,68 horní podstava 0,56	1,1	komolý kužel	1,2

Tab. 2.3. Mrtvé objemy jednotlivých dílů.

Celkový mrtvý objem vychází  $\sim 55 \mu\text{l}$ , což v porovnání s objemem mikrostříkačky 50  $\mu\text{l}$  znamená, že při protlačení celého jejího objemu projde čipem pouze obsah již zaplněných z mrtvých objemů. S tím je nutno počítat zejména při experimentech, kdy se stejným vstupem aplikují po sobě různé látky. V praxi totiž nelze vyloučit, že při nahrazování jedné látky druhou nedojde k jejich nekontrolovatelnému promíchání zejména v součástkách s větším mrtvým objemem (spojka mezi mikrostříkačkou a hadičkou, kónus). To vylučuje možnost postupných

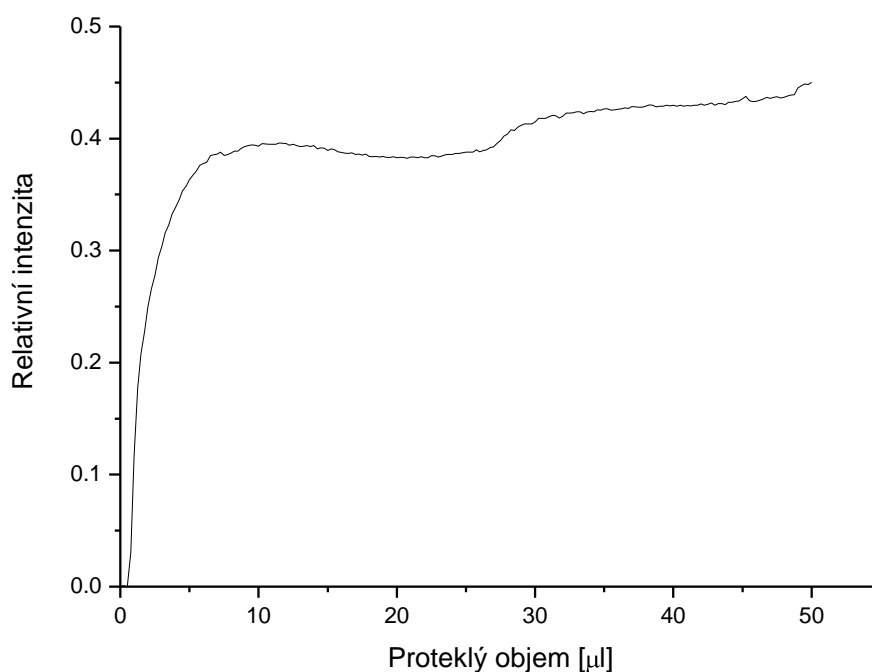
měření různých vzorků bez odpojení, kompletního promytí hadičky a spojky a zaplnění novým vzorkem.

Nebezpečí nekontrolovatelného promíchávání vzorků je také velmi podstatným faktorem při doplňování mikrostríkaček vzorkem stejného typu, které je velmi problematické. Lze ho provést dvojím způsobem: buď odpojit spojku od mikrostríkačky a dočerpát vzorek přímo do mikrostríkačky, nebo vyšroubovat hadičku z držáku a vyměnit pak obsah i ve spojce a hadičce. Přímé doplnění do mikrostríkačky vede k tomu, že při opětovném zapojování je nutné vyvinout na spojku značný tlak pro zasunutí mikrostríkačky do dostatečné hloubky a dosažení hermetičnosti. Tento tlak se sloupcem kapaliny přenesení až do čipu, kde přetlačí kapalinu z kónu s vyměňovaným vzorkem až do kónu s druhým vzorkem. Dojde tak k předčasnému a nekontrolovatelnému smíchání obou látek. Odšroubování hadičky od držáku a následná výměna není spojená s vyvíjením větších tlaků, může ale dojít k zachycení vzduchové bublinky do prostoru kónu. Tato bublinka pak vlivem tlaku kapaliny pulzuje a způsobuje nehomogenitu v rychlosti toku vzorku.

Nehomogenity v rychlosti toku vzorku byly obecně v počátcích testování velký problém. Nakonec bylo nutné použít spojovací materiály s co nejmenší pružností, protože vnitřní objem mikrokanálku je natolik malý v porovnání s mrtvým objemem dílů před čipem, že sebemenší zapružení (vyvolané například roztažností tenkostěnné hadičky nebo plastové mikrostríkačky) způsobilo velké a rychlé posuvy vzorku v kanálku.

Dalším pozorovaným jevem (artefaktem), který komplikuje nebo i znemožňuje provádět postupné měření různých vzorků na stejném čipu, je efekt „odmývání“ vzorku přilnutých k povrchům jednotlivých dílů. Z obrázku 2.3 je vidět, že poměr mezi rozměry kónu a přítokem nebo odtokem je značný. Vzorek z přítoku nevytlačuje přímo a rovnoměrně objem kónu, spíše se do něj vlévá a při protékání se s ním míchá a odmývá jinak nehybnou kapalinu přilnutou ke stěnám kónu. Pokud bychom tedy vyměnili náplň mikrostríkačky a protlačili její objem mrtvými objemy přírodní hadičky, nebudeme pozorovat kompletní vytlačení starého vzorku a skokový přechod na nový vzorek, ale promíchání starého vzorku s novým s postupně narůstající koncentrací nového vzorku.

Pro posouzení, jak významný je efekt odmývání, jsme provedli následující měření. Čip - včetně vstupního kónu - jsme zaplnili destilovanou vodou a mikrostríkačku, spojku a hadičku jsme naplnili 50% roztokem acetonu ve vodě. Poté jsme nechali propumpovat celý objem mikrostríkačky rychlostí 500 nl/min. Relativní koncentraci acetonu v mikrokanálku jsme monitorovali na základě Ramanova spektra vody a acetonu. Výsledek je znázorněn v grafu 2.3.



Graf 2.3. Relativní zastoupení acetonu v závislosti na proteklém objemu. Vyjádřeno jako relativní intenzita jeho Ramanova spektra.

Na průběhu v grafu 2.3 je vidět několik důležitých věcí. Prvním je fakt, že až po propumpování cca 10 µl se relativní zastoupení acetonu už ve větší míře nemění, tj. původní náplň kanálku byla více-méně vyměněna. Nicméně, k této výměně bylo potřeba objemu (10 µl), který je ~ 30× větší než celkový objem mikročipu (0,3 µl). Dalším je pozoruhodný fakt, že i po předpokládaném nahrazení jednoho vzorku druhým dochází k poklesu integrální intenzity pásů acetonu a následně k jejímu opětovnému nárůstu. To by mohlo svědčit o kolísání koncentrace acetonu daleko za předpokládanou kompletní výměnou vzorku v čipu. Tento typ měření jsme zopakovali několikrát pro případ, že by se jednalo o náhodný jev způsobený nějakým nekontrolovatelným faktorem, ale výsledek opakovaných měření byl prakticky totožný. Kolísání koncentrace acetonu by mohlo svědčit o tom, že k odmyváání předchozího vzorku z mrtvých objemů dochází na podstatně delší škále. Kromě absolutní velikosti mrtvých objemů by určitou roli mohly hrát faktory jako jsou adhezní vlastnosti materiálů hadiček, spojek a stěn čipu, jejich smáčivost pro různé kapaliny, viskozita kapaliny, teplota. Protože se jedná o zásadní problém zejména při konsektivním střídání vzorků, měla by mu být v budoucnu věnována větší pozornost.

## 2.4 Provoz mikrofluidního zařízení

Po identifikaci těchto jevů jako možných zdrojů potíží jsme dospěli k následujícímu postupu sestavování mikrofluidní aparatury. Hadičky a spojky naplníme zkoumaným vzorkem, poté je spojíme se stejně naplněnou mikrostríkačkou a fitinky nakonec přišroubujeme do nerezového držáku na kóny čipu, které předem zakápneme vzorkem (nebo destilovanou vodou) a pod mikroskopem zkontrolujeme na možný výskyt bublinek. Poté necháme protlačit minimálně objem 10  $\mu\text{l}$ , než dojde k samotnému měření.

Při měření je důležité nezatěžovat čip nadměrně vysokými hydrostatickými ani mechanickými tlaky. Ze začátku, kdy jsme ještě neměli odhad na sílu utahování fitinek v držáku a vhodné rychlosti pumpování, jsme dva čipy typu R50.676.3 (čip s nejdelším kanálkem 676  $\mu\text{m}$  a tudíž nejvyšším hydrodynamickým odporem) rozbili tím, že jsme kvůli těsnosti příliš silně utáhli fitinku v držáku a následně začali vhnět vzorek pod příliš vysokým tlakem. To mělo za následek prasknutí tenkého krycího sklíčka. Při dalších měřeních na těchto čípech jsme proto nikdy nepřekračovali rychlost pumpování 1000  $\text{nl}/\text{min}$ .

Skleněné čipy je možno používat opakovaně, pokud se vzorek dá odstranit promýváním vhodnými rozpouštědly. Pokud vzorek obsahuje rozpuštěnou pevnou látku, je nutné jí z čipu odstranit před zaschnutí. Jinak hrozí trvalé ucpání kanálku. Ve většině případů jsme vyčištění čipu prováděli destilovanou vodou a následně acetonem. Čip je možno vysušit profukováním vzduchem. V případě měření SERS na koloidech docházelo k adsorpci koloidních částic na stěnách mikrokanálku, což se projevovalo tzv. paměťovým efektem [1]. Ten spočívá v tom, že SERS signál pozorujeme i po nahrazení koloidu neaktivním vzorkem. Zdrojem jsou agregáty koloidních částic s analytem, uchycené na stěnách čipu. Tento problém jsme zkusili vyřešit ošetřením vnitřních stěn čipu roztokem tetramethoxysilanu [2, 5], který by měl zvýšit jejich hydrofobicitu. Tento postup však nevedl s úspěchem, právě naopak, adhezi koloidních částic zesílil. Stěny hydrofobizovaného čipu se pokryly jednak tenkou vrstvou koloidních částic s naadsorbovaným analytem, která nebyla pod mikroskopem patrná, ale vydávala relativně slabý SERS signál, a dále dobře viditelnými velkými agregáty poskytujícími velké lokální zesílení, pravděpodobně z „hot-spots“ (viz obr. 4.11.). Tenkou vrstvou koloidních částic bylo možné odstranit intenzivním promýváním acetonem. Pro odstranění velkých agregátů bylo nutné naplnit čip směsí  $\text{HCl}$  a  $\text{HNO}_3$ , zahřát na  $60^\circ\text{C}$  a nechat působit alespoň 30 min. Po následném propláchnutí destilovanou vodou, acetonem a vysušení SERS signál vymizel. S paměťovým efektem a adhezí koloidních částic na stěny mikrokanálku je nutno počítat při všech SERS aplikacích.

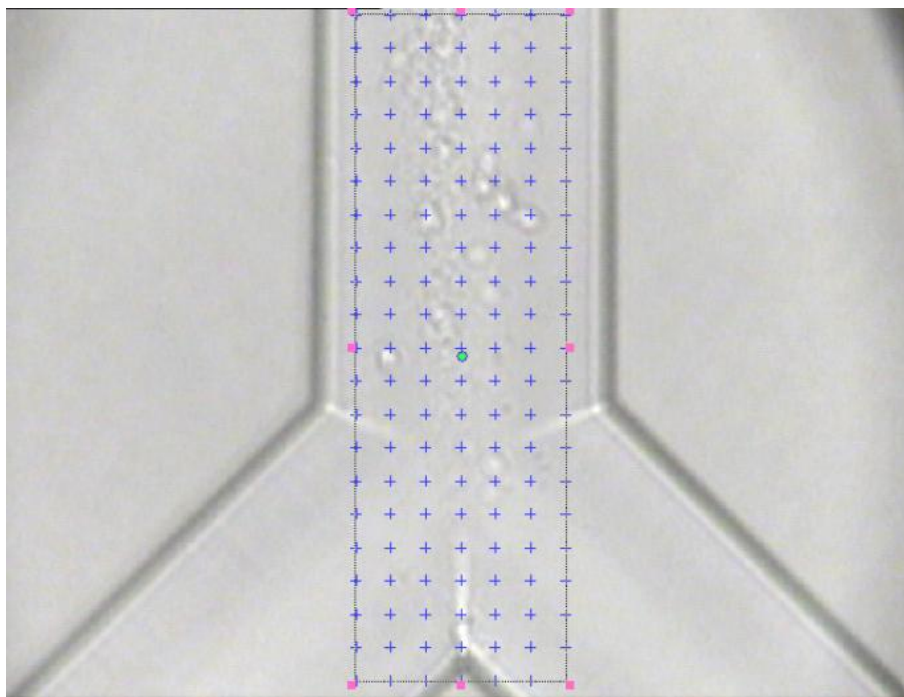


## 3. Dynamika kapalin na soutoku

### 3.1 Mapování pomocí Ramanovy spektroskopie

Předtím, než by bylo možné začít měřit průběh reakcí v kanálcích pomocí Ramanovy spektroskopie, bylo by třeba zjistit, jak v různých čípech probíhá smíchávání vzorků. Již první experimenty ukázaly, že při sledování spekter dvou neinteragujících látek v reálném čase ve fixním místě čipu, kde jsme už předpokládali jejich kompletní promíchání (promíchání mixery nebo difuzí po dlouhé dráze), byly pozorovány velké oscilace v koncentracích smíchávaných vzorků. Podobně v místech, kde jsme předpokládali laminární proudění (soutok dvou kanálků) s promícháváním difuzí narůstající se vzdáleností, docházelo ke vzájemnému přetlačování se a pulzování obou kapalin. Původně jsme se domnívali, že se jedná o posun ve fázích krokových motorků pump a rázech vznikajících diskretním charakterem jejich pohybu, ale tato domněnka byla vyvrácena poté, co jsme obě mikrostřikačky umístili na tutéž pumpu, a efekt nezmizel.

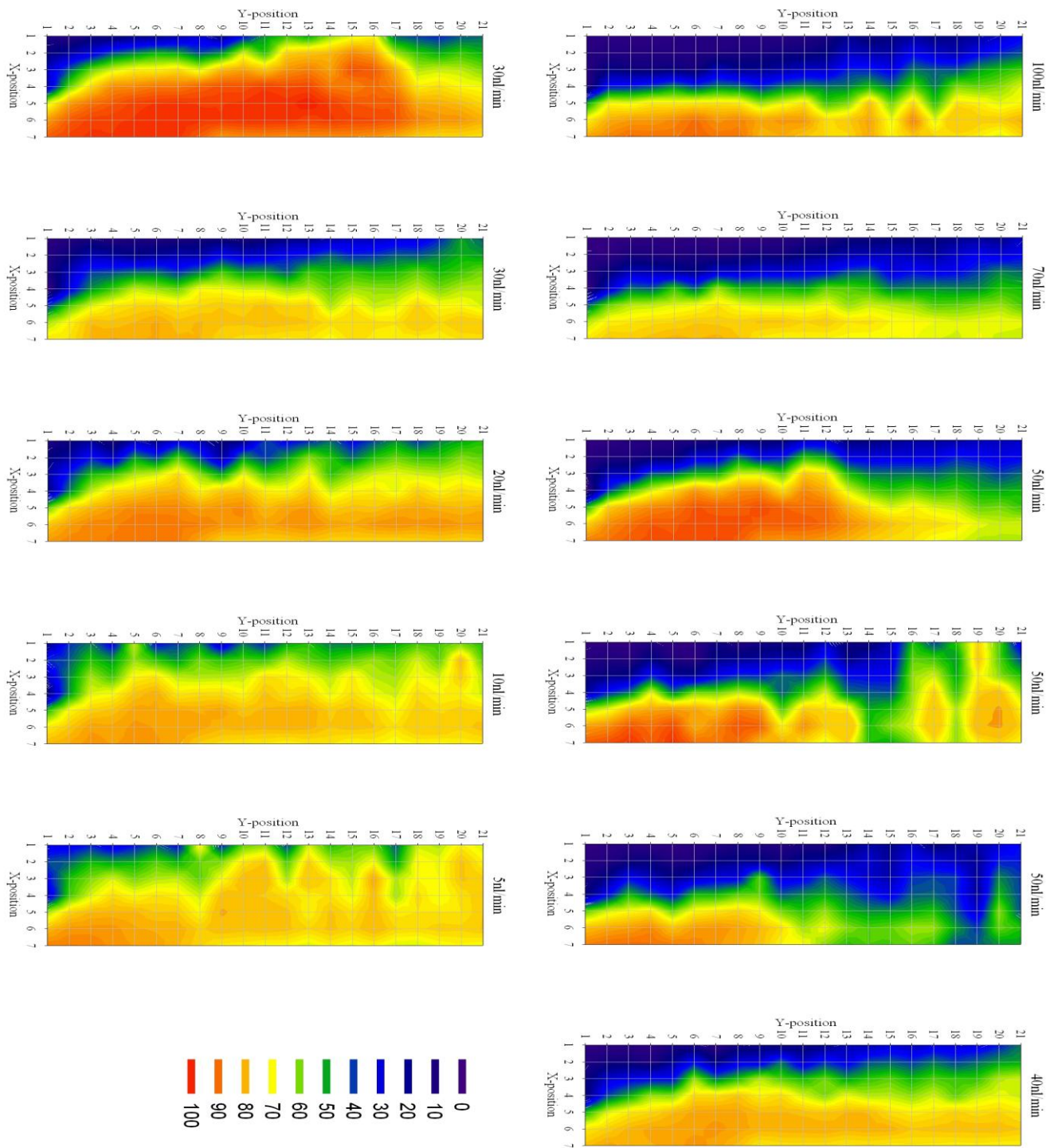
Další experimenty ukázaly, že tyto fluktuace jsou způsobené zejména rozdílnými viskozitami smíchávaných látek. Na mikroskopické úrovni totiž začaly mít daleko větší vliv kapilární jevy a děje na stěnách mikrokanálku, kde hraje viskozita použitých látek zásadní roli. Pokud měly smíchávané kapaliny výrazně rozdílné viskozity (např. aceton a etanol, viz tab. 1.1), mapováním jejich koncentrací na soutoku jsme zjistili, že etanol (vyšší viskozita) se na konci svého kanálku hromadí a čas od času se z něj odtrhne kapka, která pak postupuje celým průřezem kanálku a s acetonem se prakticky nemísí. Podobně se chovaly i další kombinace kapalin s výrazně rozdílnými viskozitami. Pro studium dynamiky smíchávání kapalin bylo nutné použít látky s podobnou viskozitou, např. aceton s acetonitrilem nebo voda s ethanolem. Dobrým modelovým systémem byly vodní roztoky jiných rozpouštědel, kdy z koncentračních důvodů viskozita převažující vody udávala viskozitu obou vzorků. Výhodou výsledného tříložkového systému byla možnost normalizace spekter na pás valenčních vibrací vody  $\sim 3450 \text{ cm}^{-1}$ .



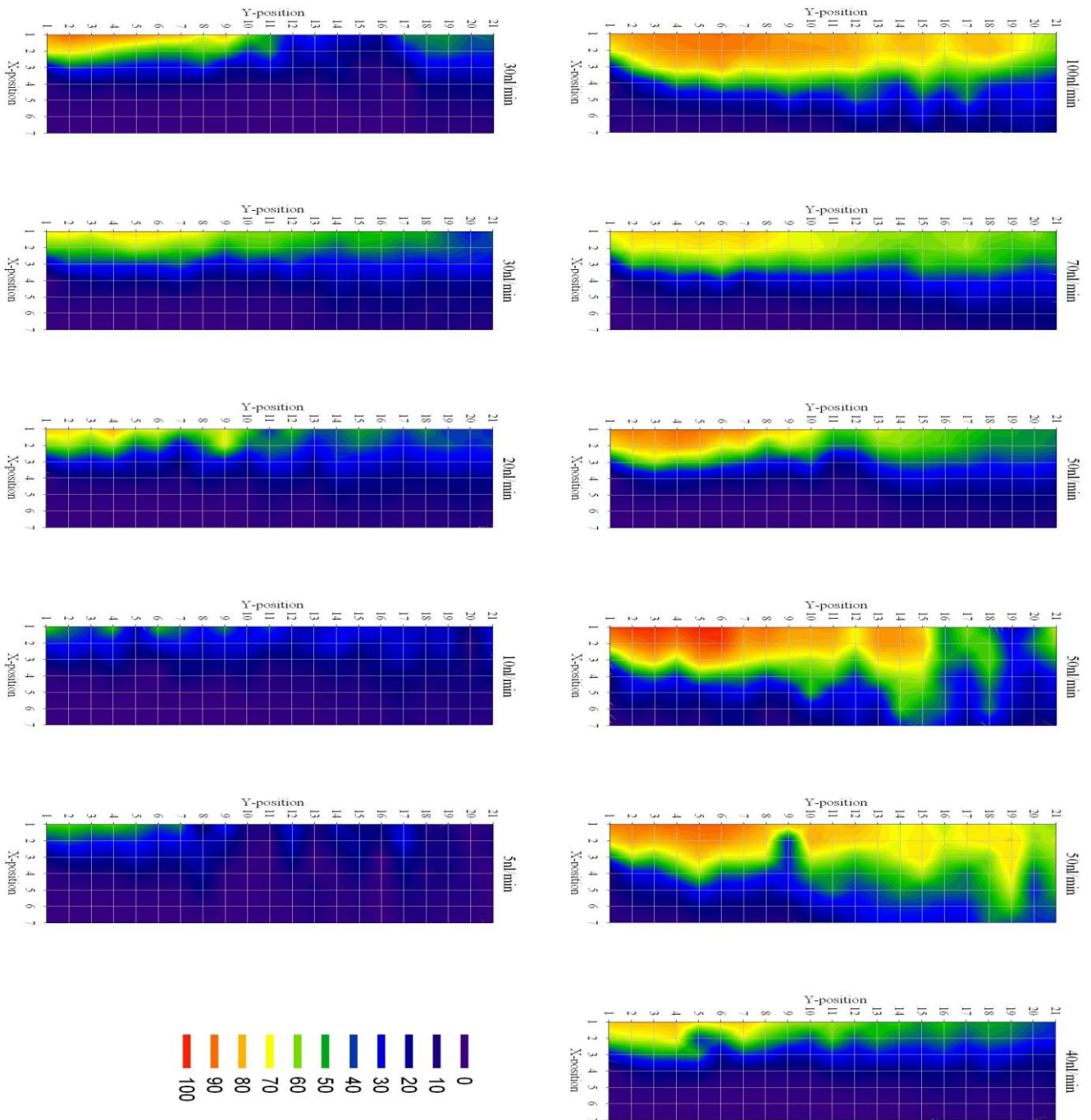
Obr. 3.1. Mapa soutoku čipu R50.332.3 za různých rychlostí pumpování, v levém kanálku je acetonitril a v pravém aceton. Mřížka vyznačuje body, ve kterých bylo měřeno Ramanovo spektrum.



Obr. 3.2. Mikrosnímek soutoku, na kterém je v pravé části (díky rozdílnému indexu lomu, přítomnosti mikrobublinek a způsobu osvětlení) viditelné posunuté rozhraní mezi oběma vzorky.



Obr 3.3. Mapy koncentrace acetonu na soutoku acetonu a acetonitrilu z obr. 3.1 za různých rychlostí pumpování.



Obr 3.4. Mapy koncentrace acetonitrilu na soutoku acetonu a acetonitrilu z obr. 3.1 za různých rychlostí pumpování.

Pomocí neinteragujícího binárního systému aceton-acetonitril jsme provedli sérii mapování soutoku pro různé rychlosti pumpování, viz obr. 3.1. Pro některé rychlosti, u kterých jsme předpokládali jejich budoucí používání, jsme měření

zopakovali. Vzniklé mapy na obr. 3.3, respektive 3.4, zobrazují procentuální koncentraci acetonu, respektive acetonitrilu. Je patrné, že pro vyšší rychlosti 70 nl/min a 100 nl/min bylo proudění přibližně laminární a obě kapaliny do sebe kousek za soutokem začínaly difundovat a míchat se. V prvním ohybu kanálku na čipu, kde bylo opět možné měřit (oblast mezitím je zacloněna držákem), byly již obě kapaliny velmi dobře promíchané. Při nižších rychlostech je z chemických map patrná časová nestabilita, pravděpodobně v důsledku výše popsaného přetlačování se vzorků a z ní plynoucí pulsace. Při rychlostech nižších než 50 nm/min se systém ukázal být náchylný k nestabilitám, kdy například dodatečné dotlačení plastové spojky na mikrostříkačce a zmenšení mrtvého objemu (do kterého mohl vzorek při přetlačení expandovat) pozorované fluktuace výrazně zmenšilo.

Pro další experimenty na čípech typu R50 jsme proto volili jako minimální rychlost pumpování 100 nl/min, abychom se vyhnuli těmto efektům. Čipy Sw11 a TD26 mají podstatně širší a hlubší kanálky, díky kterým jsou kapilární jevy a jevy spojené s viskozitou menší, takže je na nich možné používat i menší rychlosti. Navíc jsou tyto čipy vybavené mixéry, kde dochází k rychlému promíchání vzorků. Nevýhodou je opticky nekvalitní povrch kanálků, na kterém se v případě SERS experimentů navíc snadněji adsorbovaly koloidní částice.

### 3.2 Přímá pozorování dynamiky na soutoku

Situaci na soutoku, zejména míchání kapalin, jsme se pokusili pozorovat i přímo opticky (zobrazovací CCD kamerou mikroskopu), protože chemické mapování zabírá určitý čas, během kterého se situace v řečišti mění. Zkusili jsme proto jedním kanálkem pumpovat silně zbarvený roztok (zincon v ethanolu,  $C_{20}H_{15}N_4NaO_6S$ , temně rudá barva) a sledovat rozdíly v zbarvení nebo alespoň optické rozhraní v důsledku různé absorpce při míchání s bezbarevným acetonem. Tento experiment byl nespěšný. Při žádném způsobu osvětlení (různé barevné filtry) nebyla pozorovatelná ani změna zbarvení ani náznak rozhraní, ačkoliv prostorová chemická mapa potvrzovala přítomnost acetonu a ethanolu a smíchávání obou složek.

Nechtěný úspěch v zobrazování prodění kapalin mikrokanálkem se nám později podařilo při zcela jiném měření, kdy při smíchávání acetonu s acetonitrilem v čipu R50.332.3 obsahujícího zbytky vodního roztoku ethanolu, vznikalo v mikrokanálku velkého množství drobných bublinek, které ztěžovaly měření spekter. Na druhou stranu jejich přítomnost a pohyb umožnily pozorovat pohyb rozhraní mezi oběma kapalinami. Mikrobublínky a rozhraní je viditelné na obr. 3.2. Při pozorování v reálném čase bylo vidět, že rozhraní nepravidelně pulzuje. Při zvýšení rychlosti

pumpování se zvýšila četnost a poklesla amplituda těchto pulzů. Manipulace s elementy ovlivňujícími mrtvé objemy (zejména spojka na mikrostříkačce) pak vyvolávalo rázy jedné kapaliny, kompletně vytlačující druhou látku ze soutoku zpátky do jejího kanálku, odkud se záhy vrátila, a průtok na soutoku se po chvíli stabilizoval do předchozího stavu. Fotografie má sníženou kvalitu, protože rozhraní nebylo při spodním osvětlení dobře vidět. I přesto z tohoto pozorování chování kapalin na soutoku v reálném čase vyplynulo, že fitinky a plastové spojky s velkými mrtvými objemy jsou v průběhu měření citlivé na jakékoliv doteky a manipulace s nimi v průběhu měření může znehodnotit experiment. Rovněž se potvrdila správnost interpretace naměřených údajů v mapách 3.3 a 3.4, ukazujících na nepravidelnosti v toku při nižších rychlostech pumpování. To má pro budoucí experimenty na mikrofluidním zařízení klíčový vliv, protože při bezpečné rychlosti pumpování 100 nl/min z každé mikrostříkačky urazí na čipu R50.676.3 konkrétní objem vzorku celou dráhu od místa smíchání po výtok za méně než 3 minuty. Tím jsou dané maximální doby, po které je možno chemickou reakci sledovat. Jiným řešením by byly úpravy jednotlivých spojovacích komponent tak, aby došlo k minimalizaci mrtvých objemů, případně omezení jejich citlivosti na vnější faktory.

## 4. Měření v řečišti

### 4.1 Měření na čipu Sw11

Po otestování základních vlastností mikrofluidního zařízení jsme se rozhodli vyzkoušet jeho praktickou použitelnost při měření kinetiky vzniku SERS-aktivního systému. Tímto problémem na makroskopických vzorcích se zčásti zabývala diplomová práce Barbory Láskové (Studium komplexů kationických porfyrinů s nukleovými kyselinami pomocí spektroskopie povrchem zesíleného rezonančního Ramanova rozptylu, MFF UK, Praha 2008), řešená v OFB FÚ. Jedná se o sledování kinetiky objevení se SERS signálu po přidání analytu k Ag koloidu, kde měření na makroskopických vzorcích nedovolovalo sledovat tyto procesy v časech kratších než  $\sim 10$  s po smíchání. Regulováním rychlosti proudění by mikrofluidní zařízení v principu dovolovalo měřit SERS signál v podstatně kratších časech. Studium SERS signálu na koloidu proudícím mikrokanálkem by mohlo být zajímavé i pro studium tvorby „hot-spots“, jak bylo navrženo v [6, 7].

Pro tento účel se jako nejvhodnější jeví čipy Sw11 nebo TD26 opatřené mixery zajišťujícími rychlé promíchání vzorku. Předpokládali jsme, že k efektivnímu promíchání koloidu (BH nebo HA Ag koloidy) a roztoku analytu ( $\text{CuTMPyP4}$ ,  $2,5 \times 10^{-7}$  M) dojde již na prvním mixéru a reakce pak bude probíhat spojitě v celém průřezu čipu. Mixér na čipu Sw11 je znázorněn na obr. 2.2.

Rychlost pumpování v obou kanálech byla nastavena na 200 nl/min, což v čipu Sw11 odpovídá rychlosti proudění 222  $\mu\text{m/s}$ . Intenzita laseru byla snížena filtrem D2 na 70  $\mu\text{W}$ , abychom předešli případnému „spálení“ vzorku v kanálku na grafitický uhlík, které jsme již dříve pozorovali. Měřili jsme na sérii vybraných míst (na soutoku, ob dva mixéry, a na konci kanálku), na každém jsme zaznamenali časovou řadu 150 spekter akumulovaných po sobě s expoziční dobou 1 s.

Naše představa, jak by měl celý proces probíhat, byla následující: po smíchání koloidu a roztoku analytu by mělo začít docházet k adsorpci  $\text{CuTMPyP4}$  na koloidní částice a tvorbě agregátů, které by proud unášel kanálkem. Vzhledem k tomu, že excitace 514,5 nm není v rezonanci s plazmonovou absorpcí neagregovaného BH koloidu, veškerý pozorovaný SERS signál by měl pocházet pouze od agregátů, nejspíš „hot-spots“. V případě, že by takový agregát proplul excitačním objemem, došlo by při měření v tomto okamžiku k detekci výrazného SERS signálu. V případě HA koloidu, který má i v neagregovaném stavu pro excitaci 514,5 nm silnou plasmonovou rezonanci (viz obr. A), by kromě „hot-spots“ měly SERS signál poskytovat i molekuly analytu adsorbované na izolovaných

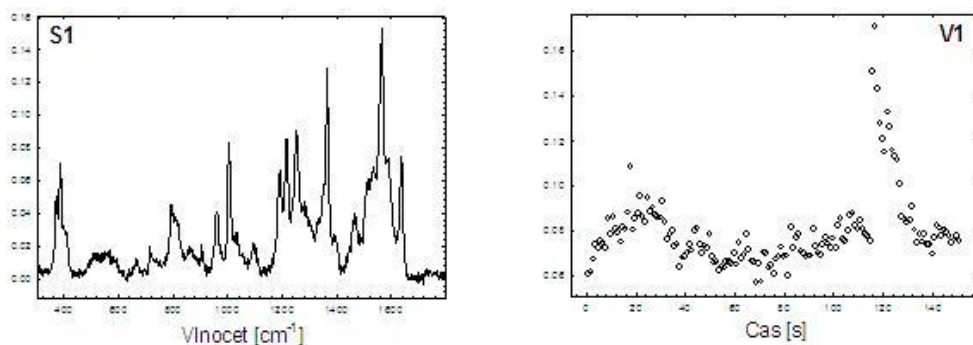
nanočásticích. Rozdíl oproti signálu pocházejícího z „hot-spots“ by měl být v intenzitě a četnosti výskytu. Při vyhodnocování signálu z různých míst čipu bychom v každé časové řadě sečetli počet spekter s výrazně vyšší integrální intenzitou. Pokud tvorba „hot-spots“ závisí na čase, četnost výskytu „hot-spots“ v rozptylovém objemu by měla narůstat se vzdáleností měřicího místa od místa smíchání. S dostatečně přesným použitím této metody a dostatečně velkými statistickými soubory by pak mělo být možné určit závislost počtu vytvořených „hot-spots“ na čase.

číslo měření	vzdálenost od soutoku [ $\mu\text{m}$ ]	čas od smíchání [s]
1	0	0.0
2	3743	16.8
3	7247	32.6
4	10623	47.8
5	13792	62.1
6	17343	78.0
7	22086	99.4
8	29269	131.7

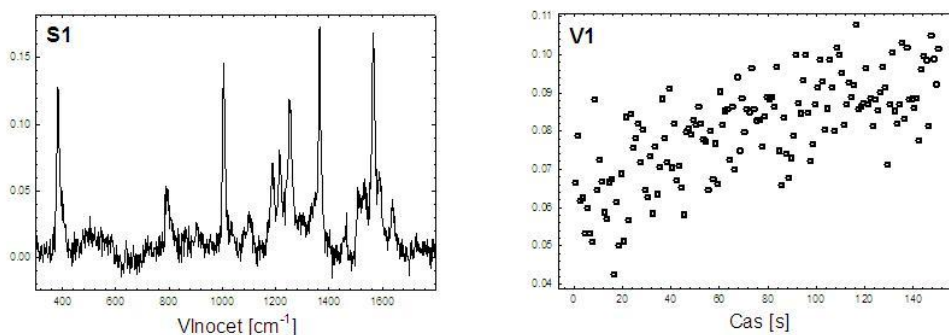
Tab. 4.1. Časová prodleva mezi okamžikem smíchání koloidu s analytem a okamžikem měření časové řady SERS spekter pro různé lokalizace.

Použitelnost popsané metodiky jsme testovali nejdříve na HA koloidu. Při statistickém zpracování výsledků měření v místech uvedených v tab. 4.1 se ukázalo, že výchozí předpoklad nezávislé dynamiky pohybu koloidu v řečišti mikrokanálku nemusí být zcela správný. Pro ilustraci uvádíme na obr. 4.1 – 4.4 výsledky faktorové analýzy časových řad z různých míst. Jsou uvedena první subspektra  $S_1$  (tj. průměrné spektrum za příslušnou časovou řadu) a odpovídající koeficienty  $V_1$  vyjadřující velikosti signálu v daném časovém okamžiku. Jak je vidět z časových fluktuací SERS signálu, některá „hot-spots“ rozptylovým objemem skutečně proplula a poskytla lokální fluktuaci ve velikosti signálu. U jiných se však zdá, že byla v rozptylovém objemu po určitý čas zachycená, pro což svědčí seskupování měření s vysokým signálem do určitých shluků, které postrádají náhodný charakter. Toto zachycení mohlo být způsobené buď světlem indukované adsorpcí koloidních částic na povrchu kanálku, nebo vytvořením optické pasti přímo v objemu proudící kapaliny efektem laserové pinzety. Oba mechanismy již byly při SERS experimentech pozorovány [5].

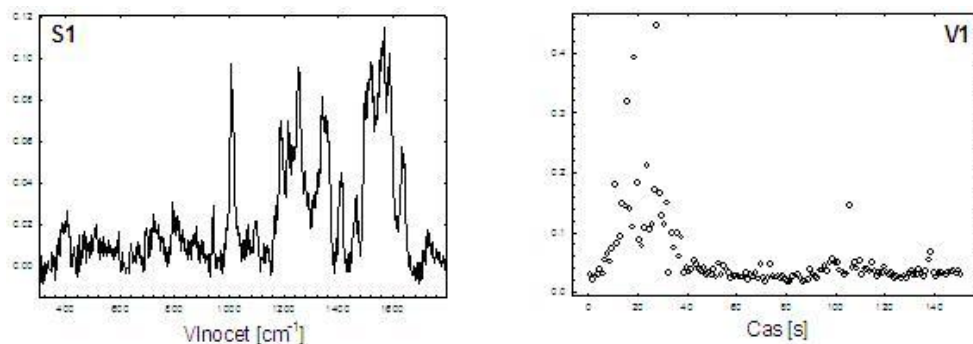




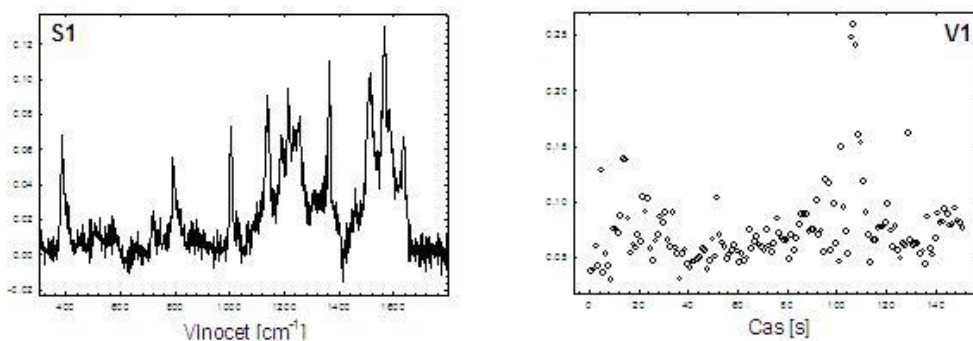
Obr. 4.1. Výsledky analýzy pro měření č. 3.



Obr. 4.2. Výsledky analýzy pro měření č. 6.



Obr. 4.3. Výsledky analýzy pro měření č. 7.



Obr. 4.4. Výsledky analýzy pro měření č. 8.

Na obr. 4.1 je v oblasti kolem 120. spektra patrný prudký nárůst intenzity, která v dalších měřeních klesá. Považujeme za velmi nepravděpodobné, že by zde došlo k proplouvání řady „hot-spots“, a přikláníme se k vysvětlení, že se

v rozptylovém objemu zachytila částice vydávající extrémně velký SERS a po chvíli byla opět stržena proudem.

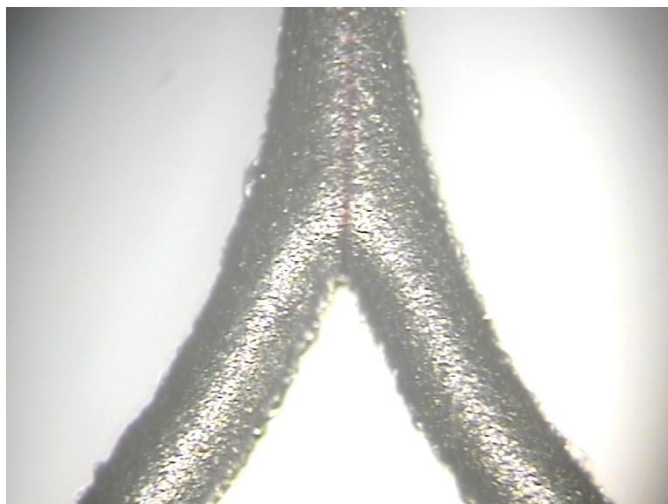
Z obr. 4.2 je patrné, že při měření v tomto místě čipu nedošlo z nějakého důvodu k zachycení žádného „hot-spot“, protože celková intenzita signálu byla poměrně malá. I přesto je z tvaru subspektra S1 patrné, že zde muselo dojít k SERS-aktivizaci, byť bez participace „hot-spots“. Bez SERS efektu by koncentrace samotného analytu ( $\sim 10^{-7}$  M) při excitaci 514.5 nm nedovolovala naměření jakéhokoliv spektra.

Na obr. 4.3 a 4.4 je možné kromě občasného proplutí „hot-spots“ možné pozorovat i jakési „balíky“ signálu. Ty se odlišují od situace na obrázku 4.1 tím, že jejich intenzita po zachycení neklesá kontinuálně, ale osciluje a někdy spadá až na úroveň šumu. Tato měření byla prováděná v místech, kam vzorek dotekl až po 99 s, respektive 131 s po smíchání, tedy po uplynutí doby, kdy podle výsledků z makroskopických měření na stejném HA koloidu a se stejným roztokem analytu bezpečně došlo k vytvoření SERS-aktivního systému se značně velkým množstvím „hot-spots“. Přesto v mikrokanálku pozorujeme dlouhé časové intervaly bez zjevné přítomnosti „hot-spots“. Z četnosti „hot-spots“ na obr. 4.3 a 4.4 tedy neplyne, že by jejich množství v mikrokanálku rostlo s časem. Důvodem by mohlo být postupné vychytávání koloidu (zejména agregátů s „hot-spots“) na stěnách mikrokanálku. Pak by prodlužující se dráha, kterou koloid urazí v mikrokanálku měla zcela opačný efekt. Ke zvýšené adsorpci koloidních částic na stěnách mikrokanálku by mohl přispívat i jeho hrubý povrch.

## 4.2 Měření na čipu TD26

Pro otestování hypotézy o adsorpci koloidu na stěnách mikrokanálků jsme provedli další experimenty, tentokrát na čerstvě nasilanovaném čipu TD26 s velkými mixéry, zajišťujícími lepší promíchávání. Místo HA byl použit BH koloid, u kterého by při excitaci 514,5 nm neměl efektivní SERS signál pocházet od izolovaných nanočástic, pouze od agregátů s posunutou plazmonovou rezonancí.

Krátce po smíchání obou složek se začaly objevovat známky adsorbce agregovaného koloidu na hydrofobizovaných stěnách čipu, co se projevovalo zejména paměťovým efektem. Adsorpce byla po chvíli viditelná i na mikroskopickém obrázku, kde se na soutoku koloidu s roztokem CuTMPyP4 objevila červená stopa kopírující rozhraní mezi oběma kapalinami, viz obr 4.5.



Obr 4.5. Mikrofotografie rozhraní se známkou adsorpce koloidu na povrchu kanálku (červená stopa).

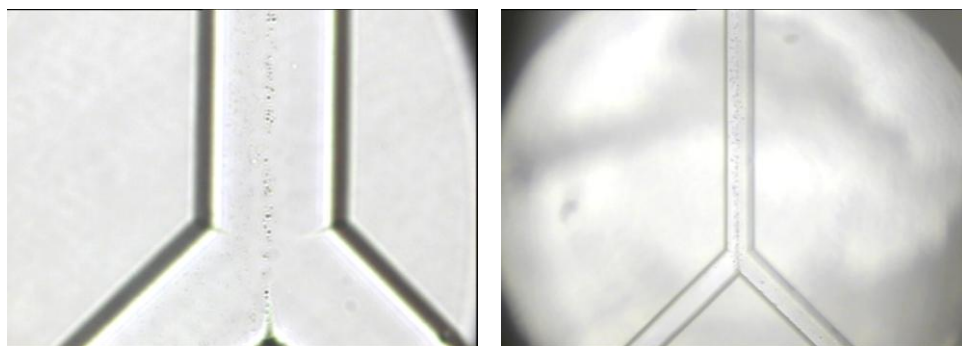
Tato barevná stopa uprostřed soutoku je pravděpodobně tvořená koloidními agregáty uchycenými na stěně kanálku v místě, kde se koloid setkává s porfyrinem. I když i samotný porfyrin CuTMPyP4 má červenou barvu, je nepravděpodobné, že by opticky viditelnou stopu mohla způsobit pouze jeho přítomnost, zejména když uvážíme výchozí koncentraci jeho roztoku ( $\sim 10^{-7}$  M). Agregovaný BH koloid se vyznačuje taky červeným zbarvením a s vysokou pravděpodobností se proto jedná o adsorpci analytem indukovaných koloidních agregátů. Tato - ze začátku ostrá stopa - se dále v kanálku rozmazává a bez kontrastu s pozadím přestává být zřetelná. Samotné agregáty sice nejsou na povrchu kanálku vidět, ale to může být důsledkem jeho drsného povrchu.

Kromě signálu z koloidu adsorbovaného na povrchu neposkytoval BH koloid téměř žádný SERS signál z objemu kanálků. Usoudili jsme proto, že BH koloid není pro tento typ experimentů vhodný. Experimenty s BH koloidem však ukázaly, že obavy s nedostatečného míchání obou složek při laminárním proudění nejsou zcela opodstatněné, protože podle rozšiřujícího se tvaru stopy se zdá, že ke smíchání difuzí dochází ještě před prvním mixérem. Usoudili jsme proto, že některé efekty při styku koloidů s roztokem analytu bude možno pozorovat i na čípech řady R50 bez mixérů. Dalším důvodem k přechodu na čipy řady R50 byl drsný povrch čipů Sw11 a TD26 znemožňující optické pozorování situace na stěnách kanálků a obavy z toho, že právě drsný povrch přispívá ke zvýšené adsorpci koloidních částic.

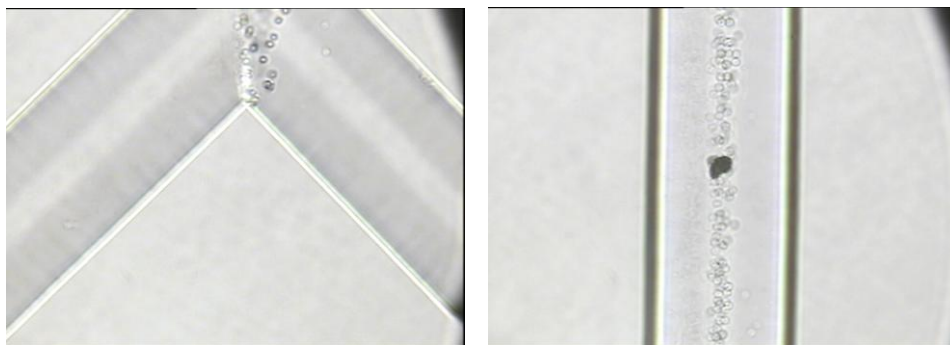
### 4.3 Měření na čipu R50

Po vyhodnocení výsledků z měření na čípech TD26 a Sw11 jsme se vrátili k tenkému čipu R50, nyní s nasilanovaným povrchem, u kterého jsme předpokládali snížení paměťového efektu díky hladšímu povrchu, hydrofobicitě a zvýšené rychlosti proudění v kanálku. Pro pilotní měření jsme použili HA koloid a roztok CuTMPyP4 s koncentrací  $2,5 \times 10^{-7}$  M.

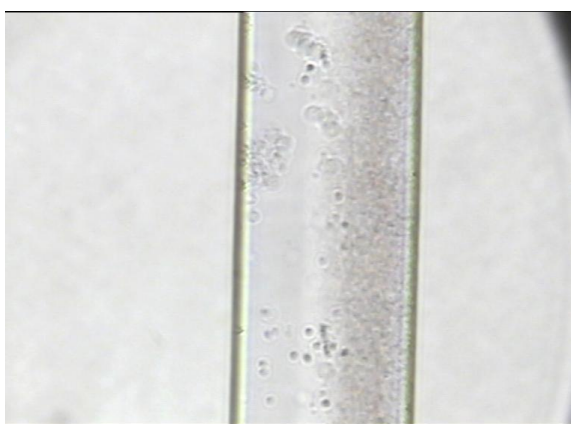
Na hladkém, opticky homogenním povrchu kanálku jsme měli možnost detailněji pozorovat adsorpci koloidních částic. Ukázalo se, že hydrofobizace povrchu tetramethoxysilanem tvorbu agregátů neomezila, spíše ji zesílila. Na mikrosnímčích nasilanovaného čipu naplněného vodou jsme pozorovali pouze čistý povrch. Když začaly kanálky proudit roztok CuTMPyP4 a koloid, pozorovali jsme postupný vznik agregátů a jejich růst v čase. Zajímavá byla zejména jejich hustota a rozdílná morfologie v různých místech čipu. První agregáty se objevovaly uprostřed kanálku, přesně na rozhraní styku obou kapalin, kde díky laminárnímu proudění ještě nemůže docházet k jejich podstatnějšímu promíchání (obr. 4.6, 4.7). Dále po proudu v kanálku pak docházelo k jejich většímu rozptýlení po celé jeho šířce. Kromě velkých agregátů na rozhraní se v té části společného kanálku, do které přitékal koloid, časem utvořila na stěně vrstva z výrazně menších agregátů. Vrstva byla dobře viditelná v kontrastu s druhou polovinou kanálku, kam přitékal roztok CuTMPyP4 (obr. 4.8). V části kanálku, kterou proudil pouze roztok analytu, se opticky viditelné agregáty netvořily.



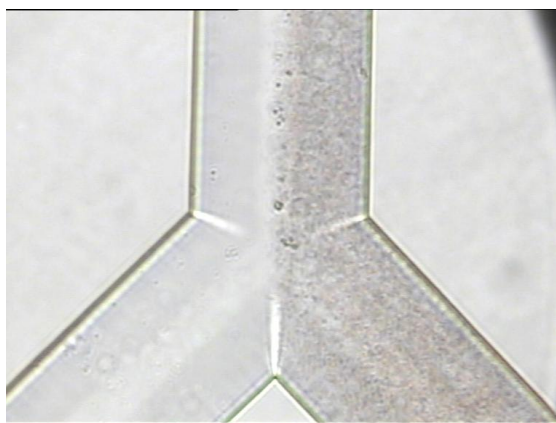
Obr. 4.6. Tvorba agregátů na styku koloidu a roztoku CuTMPyP4. Místo smíchávání zobrazeno pomocí objektivu se zvětšením  $50\times$  a  $5\times$ .



Obr 4.7. Detail tvorby agregátů na rozhraní. Pokud nedojde ke smíchání obou látek před soutokem, jsou kanálky dokonale čisté a větší koloidní agregáty se začínají tvořit až na soutoku.



Obr 4.8. Drobné agregáty tvořící se v části kanálku, do které vtéká koloid.



Obr 4.9. Agregáty na soutoku roztoku CuTMPyP4 (vlevo) a HA koloidu (vpravo). Ke smíchání látek došlo ještě před soutokem díky přetlačení porfyriu do kanálku s koloidem.

Výrazný rozdíl v adsorpci koloidních částic v jednotlivých polovinách kanálku se zachovává až do poměrně velkých vzdáleností od soutoku (desítky mm), kde je na mikrosnímcech pořád patrná rozdílná struktura povrchu kanálku, s osou

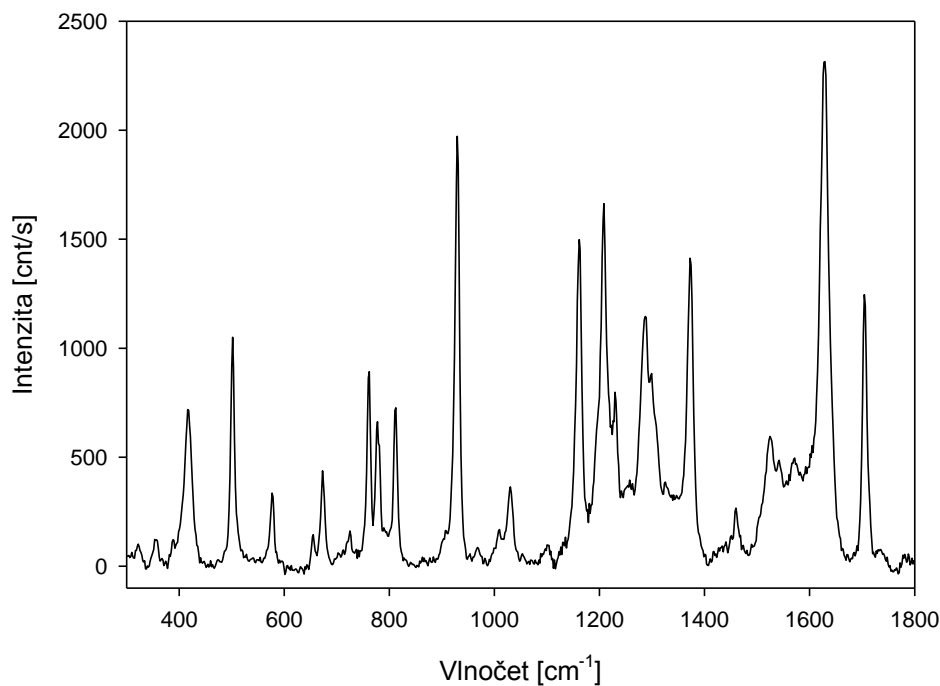
souběžnou se směrem proudění. Rozdílná adsorpce koloidu v různých částech kanálku dokazuje zachování laminárního proudění na poměrně velké vzdálenosti. Na druhou stranu, agregace i adsorpce jsou zjevně indukovány analytem, protože v částech kanálků před soutokem k nim nedochází. Vysvětlením rozporu by mohla být rozdílná difuze molekul analytu a koloidních částic. Molekuly porfyrinu velmi rychle difundují do poloviny kanálku, ve které je obsažen koloid, vyvolávají jeho agregaci a zachytávání na stěnách, Relativně velké a těžké koloidní částice naopak difundují velmi pomalu a zachovávají laminární proudění. K rovnoměrnému promíchání a homogenizaci obou kapalin tak dochází až někde kolem poloviny čipu. Ve vzdálenějších oblastech na čipu je také adsorpce výrazně slabší, snižuje se obzvláště plošné pokrytí stěny kanálku menšími agregáty.

Opět jsme se pokusili naměřit statistiku četnosti volně plujících „hot-spots“ na konci kanálku, kde bylo pokrytí stěn minimální. Nicméně SERS signál byl překvapivě slabý, zejména v porovnání s intenzitou signálu pocházející od adsorbátů na stěnách. Provedli jsme systematické mapování profilu kanálku na místech různě vzdálených od místa smíchání kapalin. Abychom odlišili signál pocházející z objemu kanálku od signálu adsorbátů na jeho stěnách, experimenty byly prováděné na kanálku s proudícím koloidem i analytem. Obě kapaliny byly následně zaměněny vodou a mapování bylo opakováno za stejných podmínek. Ukázalo se, že v obou případech naprostá většina SERS signálu pochází z povrchu kanálku, a že promytí kanálku vodou nezpůsobí ani pokles signálu, ani výraznější změny v distribuci jeho intenzity. Signál z většiny míst evidentně pocházel od CuTMPyP4, čemuž nasvědčovala naprostá shoda spektrálních pásů. Na některých místech se však objevovaly i výrazné spektrální črty, které nelze připsat porfyrinu (obr 4.10). Domníváme se, že pocházejí z „hot-spots“, ve kterých by mohly být zachycené molekuly nečistot, nebo že by se mohlo jednat o SERS tetramethoxysilanu. Tato domněnka by měla být v budoucnu prověřena.

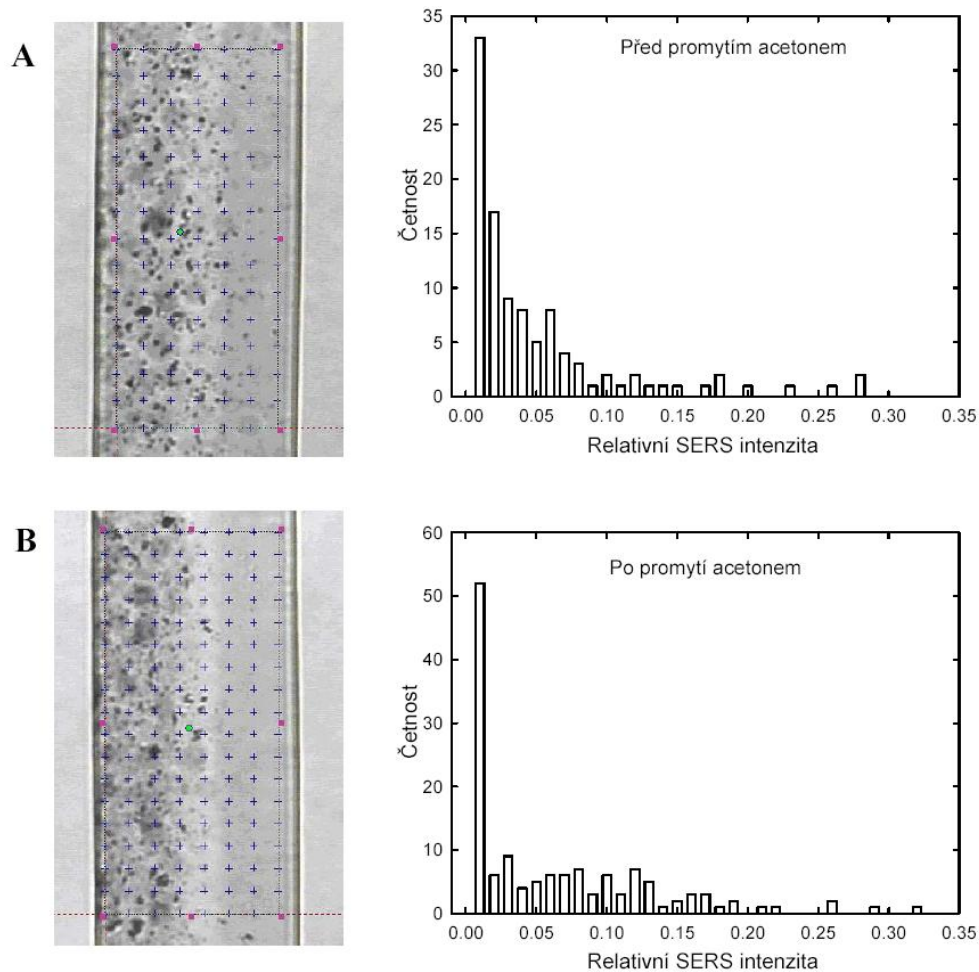
Koloidní částice adsorbované na povrchu mikrokanálku ošetřeného tetramethoxysilanem vykazovaly rozdílnou distribuci SERS signálu. V části s velkou hustotou větších agregátů se objevovala četná místa s extrémně vysokým SERS signálem, navíc s výraznými spektrálními fluktuacemi, které by mohly svědčit o tom, že se jedná o „hot-spots“. V ostatních místech byl signál slabší, s menšími spektrálními i intenzitními fluktuacemi. SERS signál byl měřitelný i z části, ve které nebyla na mikrosnímčích patrná adsorpce koloidu na povrchu. Signál pochází pravděpodobně z adsorbovaných, ale neagregovaných koloidních částic, na kterých jsou zachyceny molekuly CuTMPyP4. V tom případě dochází pouze k méně výraznému SERS zesílení plazmonovou resonancí částic vhodné velikosti, bez efektu „hot-spots“.

Pokud byl čip intenzivně promýván acetonem (po dobu 15 hodin), došlo k výraznému úbytku tohoto slabšího signálu, jak je patrné na distribucích uvedených na obr. 4.11. Distribuce a lokalizace „hot-spots“ přitom zůstala zachována. To by

mohlo znamenat, že molekuly CuTMPyP4 zachycené na těchto izolovaných částicích jsou vystavené vlivu rozpouštědla více, než molekuly v „hot-spots“. Mikrofluidní čip s koloidem s adsorbovaným na vhodně chemicky modifikovaný povrch mikrokanálek by tak mohl představovat zajímavý systém pro studium vlivu různých rozpouštědel na pevnost vazby analytu k povrchu koloidních částic, kompaktnost „hot-spots“ i SERS zesílení. Oproti jiným povrchům a konfiguracím skýtá možnost přesné lokalizace měřeného místa a spojitou, dobře kontrolovatelnou výměnu vnitřního prostředí mikrokanálku.



Obr. 4.10. SERS spektrum s odlišnou strukturou pásů.



Obr. 4.11. Mikroskopický obrázek a typické rozložení četnosti SERS signálů různé intenzity získaných mapování koloidních částic adsorbovaných na stěnách mikrokanálku hydrofobizovaného tetramethoxysilanem. Distribuce A ukazuje početnou frakci spekter s relativně slabým SERS signálem ( $< 0.05$ ). Po intenzivním promývání acetonem (15 hod) tato frakce mizí. Frakce s vyšším SERS zesílením ( $> 0.15$ ) zůstane zachována.



## 5. Diskuse

Konstrukce mikrofluidního zařízení pro detekci Ramanovou mikroskopií přineslo celou řadu zajímavých poznatků. Ukázalo se, že Ramanovou mikroskopií bude možné studovat celou řadu fenoménů, se kterými není možné se setkat v makroskopickém měřítku. Protože odvětví mikrofluidiky je poměrně nové, jsou tyto fenomény často nepopsané a jejich podstata neznámá.

Jevy, se kterými jsme se v naší práci setkali, můžeme rozdělit do dvou kategorií, na jevy spojené s mikrofluidním zařízením a jevy spojené s vlastnostmi použitých látek.

Prvním důležitým jevem (artefaktem) spojeným s provozem zařízením je setrvačnost při výměně kapalin v mikrokanálcích, se kterou je potřeba počítat. Na setrvačnosti se podílejí jak mrtvé objemy přívodů, tak hydrodynamika kapalin u pevných povrchů, která v mikroskopických rozměrech čipu nabývá významu a je nutno s ní počítat. Zatímco mrtvé objemy lze minimalizovat konstrukčně, jevy spojené s hydrodynamikou představují principiální omezení, zejména u mikrokanálek velmi malých průřezů a detekčních metod s velkým prostorovým rozlišením, ke kterým patří i Ramanova mikroskopie. Těmto efektům bude potřeba v dalším výzkumu věnovat zvláštní pozornost. Pro rutinní aplikace bude nejdříve potřeba podrobně prozkoumat závislost proudění profilem kanálku na viskozitě míchaných kapalin a vymezit tak chyby, které tento fenomén vnáší zejména do měření, kdy se předpokládá konsekvantní výměna kapalin v kanálcích.

Dalším problémem je otázka laminárního proudění, difuze a mechanického promíchávání zkoumaných látek. I když jsme se v naší práci na tuto problematiku zaměřili velmi intenzivně, výsledky, které jsme dosáhli, nejsou úplně konzistentní. Zdá se, že smíchávání kapalin v mikroskopickém měřítku je složitý proces závislý na vlastnostech smíchávaných kapalin, rozměrech a mechanických vlastnostech povrchu mikrokanálek a rychlosti proudění. Pro různé typy čipů se stejné kapaliny mohou chovat odlišně. Jako podstatné parametry těchto systémů jsme identifikovali viskozitu míchaných látek a rozdílné difuzní chování roztoků molekul a koloidních suspenzí. Fakt, že viskozita na této úrovni má velký vliv, je obecně známý. Měně prozkoumané jsou koloidní systémy, zejména na mikroskopické úrovni. Vizualizací koloidních částic adsorbovaných na stěnách silanovaného mikrokanálku jsme ukázali, že tyto koloidní částice zřejmě difundují výrazně pomaleji než molekuly porfyriu. Vzhledem k rozdílným vlastnostem různých typů koloidů není jasné, jestli se jedná o obecnou vlastnost koloidních roztoků nebo jestli v ní hraje svojí roli chemické složení. Ramanova mikroskopie v kombinaci s mikrofluidikou by mohla přinést zajímavé poznatky a přispět k lepšímu poznání v této oblasti.

Při studiu SERS-aktivních systémů se ukázalo, že jejich chování v řečišti s mikrometrickými rozměry je výrazně různorodější a složitější, než jsme původně předpokládali. Z porovnání výsledků měření na různých typech čipů jsme dospěli k závěru, že pokud chceme studovat kinetiku tvorby „hot-spots“ z jejich četnosti v objemu vzorku, bude nutné omezit všechny faktory, které vedou k adsorpci koloidu na povrch kanálku nebo k záchytu částic excitačním paprskem (efekt laserové pinzety). Pravděpodobně bude potřeba použít čipy s mixéry, aby došlo k okamžitému promíchání vzorků a preferenčnímu vyvolání vzniku „hot-spots“ v objemu. Pro tento účel bude pravděpodobně potřeba najít čipy s hladším, opticky homogenním povrchem, který nevyvolává zvýšenou adsorpci koloidních částic, a který umožňuje jednoduchou optickou inspekci jeho stavu.

Kromě efektu laserové pinzety se na záchytu „hot-spots“ ve vrstvě kolem stěn mikrokanálku se může podílet taky zdánlivý skluz (AWS – apparent wall slip effect). Jedná se o efekt, kdy proudící kapalina vytváří na stěnách kanálku nepohyblivou vrstvu, oddělenou od pohyblivé vrstvy náhodně se tvořícím skokem. Mezi proudící kapalinou a nepohyblivou vrstvou u stěn kanálku tak není postupný přechod, ale fázové rozhraní, na kterém probíhá řada komplikovaných mezifázových jevů. Rozměry nepohyblivé vrstvy a dynamika rozhraní závisí na materiálu stěn kanálků, rychlosti proudění a vlastnostech proudící kapaliny. Pokud uvažíme rozměry mikrofluidních zařízení a typické rozměry oblastí skluzových oblastí (několik  $\mu\text{m}$ ), efekt AWS může mít významný vliv na skutečné proudění kapalin profilem kanálku. Vliv AWS je v současnosti studován taky pro polymerní roztoky, koloidní suspenze, emulze a kapaliny obsahující nano nebo mikro částice (tzv. mikrodisperzní kapaliny), ke kterým patří i koloidy používané pro SERS spektroskopii.

Ačkoliv studium agregace koloidu na stěnách čipu nebylo naším původním cílem, při jeho zkoumání jsme dospěli k závěru, že se jedná o stabilní systém imobilizovaných částic, který je možné definovaně vytvořit a studovat. To otevírá celou řadu možností pro další výzkum SERS efektů na mikrofluidních čípech s chemicky modifikovanými vnitřními povrchy. Mikrokanálky dávají možnost zkoumat SERS různých analytů v dobře definovaném prostředí, které je možno průběžně měnit. Díky snadné prostorové orientaci na čipu a přesné lokalizaci je možné studovat stejná místa na čípech i po jejich vyjmutí, manipulaci a opětovném navrácení čipu do aparatury. Rovněž tak je možné studovat dlouhodobý vývoj chemických reakcí, protože vnitřní povrch čipu je vystaven pouze látce, kterou je naplněn. Kromě toho jsou mikrokanálky čipů dobře uzavíratelné a na rozdíl od SERS-aktivních systémů deponovaných na mikroskopických sklíčkách, je v nich možno i dlouhodobě ustavit stabilní chemické podmínky. Skýtá se tak možnost vytvářet definované SERS-aktivní povrchy pro analytické účely, dlouhodobě je skladovat a mikrofluidiku využít pro automatizaci měření.

## 6. Závěr

V podmínkách Oddělení fyziky biomolekul Fyzikálního ústavu UK bylo sestaveno a zprovozněno mikrofluidní zařízení s detekcí pomocí Ramanovy mikroskopie. Byla vypracována metodika měření na tomto zařízení, která zahrnuje:

- výběr vhodných objektivů pro konfokální mikroRamanovu detekci,
- stanovení vhodných provozních parametrů,
- specifikaci omezení na měřené látky v závislosti na jejich viskozitě,
- vypracování postupů pro plnění, průběžné doplňování a postupné nahrazování kapalin v mikrofluidních čípech,
- čištění a regenerace čipů.

Při následném studiu dynamiky tvorby agregátů koloidních nanočástic pomocí SERS spektroskopie bylo demonstrováno, že použití mikrofluidních zařízení v kombinaci s konfokální Ramanovou mikroskopií umožňuje zkoumat doposud jen málo známé jevy spojené s tímto procesem. Na obecné úrovni poskytuje mikrofluidika s Ramanovou mikroskopií náročnou, ale perspektivní možnost výzkumu celé řady chemických systémů, kinetiky jejich reakcí, ale také hydrodynamiky a povrchových jevů.

## 7. Literatura

- [1] Ackermann K.R., Henkel T., Popp J.: Quantitative Online Detection of Low-Concentrated Drugs via a SERS Microfluidic System, *Chem. Phys. Chem* 8 (2007), 2665 - 2670.
- [2] Docherty F. T., Monaghan P. B., Keir R., Graham D., Smith W. E., Cooper J. M.: The First SERRS Multiplexing from Labelled Oligonucleotides in a Microfluidics Lab-on-a-Chip, *Chem. Commun.* 1 (2004), 118 - 119.
- [3] Etchegoin P., Maher R. C., Cohen L. F., Hartigan H., Brown R. J. C., Milton M. J. T., Gallop J. C.: New Limits in Ultrasensitive Trace Detection by Surface Enhanced Raman Scattering, *Chem. Phys. Lett.* 375 (2003), 84 – 90.
- [4] <http://www.micronit.com>
- [5] Le Ru E. C., Etchegoin P. G.: *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*, Elsevier, Amsterdam, 2009.
- [6] Tian W.-Ch., Finehout E. (Eds.): *Microfluidics for Biological Applications*, Springer 2008.
- [7] Schrader B.: *Infrared and Raman Spectroscopy*, VCH, Weinheim, 1995.
- [8] Viskari P. J., Landers J. P.: Unconventional Detection Methods for Microfluidic Devices, *Electrophoresis* 27 (2006), 1797 - 1810.
- [9] Weiss A., Haran G.: Time-Dependent Single-Molecule Raman Scattering as a Probe of Surface Dynamics, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001), 12348 - 12354.