

TARTU ÜLIKOOL

Loodus-ja täppisteaduse valdkond

Keemia instituut

Analüütilise keemia õppetool

Heili Aavola

**Tahke faasi ja kromatograafilise eralduse kombineerimine osakestepõhisele
mikrofluidika kiibile aminohapete määramiseks**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendaja

Hanno Evard, PhD

Tartu 2023

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1 Mikrofluidika.....	6
1.1.1 Paberipõhine mikrofluidika.....	6
1.1.2 Osakestepõhine mikrofluidika	8
1.2 Siiditrükk.....	8
1.3 Analüütilised meetodid	10
1.3.1 Õhukese kihi kromatograafia	10
1.3.2 Kahemõõtmeline õhukese kihi kromatograafia.....	11
1.3.3 Tahke faasi ekstraktsioon	11
1.4 Aminohapete määramine	12
2. Meetodid	13
2.1 Reagendid	13
2.2 Seadmed.....	13
2.3 Siiditrüki meetod.....	13
2.4 Ksantaankummi lahus	15
2.5 Trükipasta	15
2.6 Aminohapete lahused.....	15
2.7 2D TLC	15
3. Tulemused ja analüüs.....	18
3.1 Tselluloosi osakeste trükkimine.....	18
3.1.1 Tselluloosi trükipasta optimeerimine	18
3.1.2 TLC plaatide trükkimise optimeerimine	21
3.1.3 TLC plaadi eraldusvõime hindamine	23
3.2 SAX ja silikageeli osakeste kombineerimine	25
3.2.1 Aminohapete elueerimine SAX-ilt.....	26
3.2.2 SAX ja silikageeli materjali kokku trükkimine.....	27
3.2.3 SAX ja silikageeli materjali toimimine aminohapete eelkontsentreerimiseks ja puhastamiseks	28

3.3	Kolme erineva materjali kokku trükkimine ühtseks kiibiks	29
	Kokkuvõte	31
	Summary	32
	Kasutatud kirjandus.....	33
	Tänuavaldused.....	36
	Infoleht	37
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	38

Kasutatud lühendid

TLC	<i>thin-layer chromatography</i> (ingl), õhukese kihi kromatograafia
2D TLC	<i>two-dimensional thin-layer chromatography</i> (ingl), kahemõõtmeline õhukese kihi kromatograafia
μPAD	<i>microfluidic paper-based analytical device</i> (ingl), paberipõhine mikrofluidika seade
Ser	<i>serine</i> (ingl), aminohape seriin
Ala	<i>alanine</i> (ingl), aminohapealaniin
Met	<i>methionine</i> (ingl), aminohapemetioniin
Leu	<i>leucine</i> (ingl), aminohapeleutsiin
SAX	<i>strong anion exchange</i> (ingl), tugev anioonvaheti
SCX	<i>strong cation exchange</i> (ingl), tugev katioonvaheti
SPE	<i>solid phase extraction</i> (ingl), tahke faasi ekstraktsioon
DI	<i>deionized water</i> (ingl), deioniseeritud vesi

Sissejuhatus

Analüütilisest keemiast on saanud oluline tänapäeva ühiskonda toetav teadusvaldkond, mis tegeleb erinevate proovide keemilise koostise määramisega. Enamasti on keemilise analüüsi teostamine keerukas protsess, milleks on analüüsiv proov vaja viia laborisse ning kasutada kalleid ning ajakulukaid meetodeid. Potentsiaalselt üheks lahenduseks on mikrofluidika seadmete kasutamine, mis võimaldavad lihtsustada analüüsi ja seetõttu ka vähendada analüüsi hinda.

Mikrofluidika seadmetel on hetkel mitmeid puuduseid, millest põhiline on vajaliku analüüsivõimekuse, näiteks selektiivsuse ja tundlikkuse, saavutamine. Kallimate, keerulisema ehitusega ja väliseid masinaid (nt pumpa ja mikroskoopi) kasutavate mikrofluidika seadmetega on võimalik hea analüüsivõimekus saavutada, kuid sellisel juhul ei saavutata seadme lihtsust ja odavat hinda.

Varasemas uurimustöös on Tartu Ülikooli Mikrofluidika uurimisgrupp välja arendanud uudse osakestepõhistest materjalidest valmistatud mikrofluidika tehnoloogia. Mikrofluidika kiip valmistatakse siiditrüki meetodiga silikageeli osakesi ja sideainet klaasile trükkides, moodustades seeläbi soovitud kujuga kiibi.

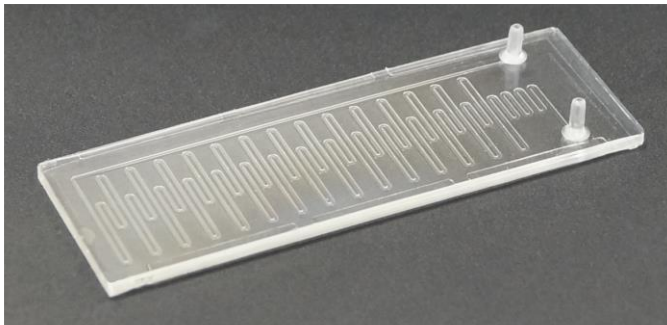
Selle töö eesmärk on tõestada, et (1) tselluloosi osakesi on võimalik siiditrüki abil trükkida ning trükitud materjali planaarkromatograafia jaoks kasutada, (2) tugeva anioonvaheti ja silikageeli osakeste kombineerimise abil on ühel kiibil võimalik aineid eelkontsentreerida ja puhastada, (3) kaks eelnevat trükitud kiibi osa on võimalik kombineerida üheks toimivaks kiibiks. Töö käigus kasutatakse erinevate etappide toimimise demonstreerimiseks aminohapete analüüsi. Ühtselt toimiva kiibi peal toimuks aminohapete eelkontsentreerimine, puhastamine segavatest ühenditest ning seejärel aminohapete üksteisest eraldamine kahemõõtmelise õhukese kihi kromatograafia abil.

Selline kiip oleks rakendatav erinevates valdkondades. Seega luuakse antud tööga alus järgnevatele uurimistöodele, kus arendatakse mikrofluidika seadmeid mitmete spetsiifiliste rakenduste jaoks: haiguste diagnoosimine ning ravi jälgimine, toidu ohutuse testimine, narkootiliste ainete tuvastamine, pestitsiidide ja muude tööstuslike jäätmete määramine keskkonnas jne. Pikemas perspektiivis on uurimissuuna eesmärk saavutada olukord, kus proove ei peaks laborisse saatma.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Mikrofluidika

Mikrofluidika on teadusharu, mis tegeleb vedelike käsitlemisega, kus vedelike kogused jäävad mõne mikrolitri suurusjärku. Selle jaoks kasutatakse spetsiaalseid kiipe (Joonis 1), mis koosnevad mõne mikromeetrise läbimõõduga kanalitest ning erinevatest vedeliku voolu kontrollivatest elementidest (näiteks pump) [1]. Mikrofluidika kiibid on enamasti valmistatud ränist, klaasist või plastikust, kuhu tehakse kanalid erinevate meetoditega nagu näiteks fotolitograafia.



Joonis 1. Näide mikrofluidika kiibist, kus on üks pikk kanal, mida saab kasutada näiteks vedeliku segamiseks või reaktsiooni läbiviimiseks. Kiibi küljepikkus on 810 mm [2]

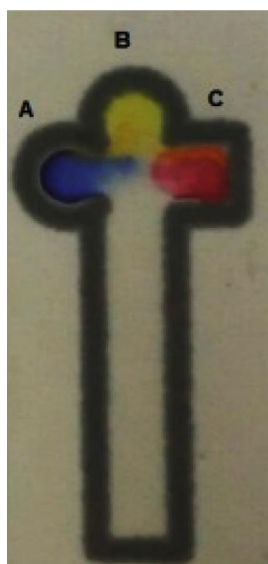
Üheks oluliseks mikrofluidika seadmete rakendusala on analüütiline keemia. Kogu keemilise analüüsi protsess on võimalik läbi viia mikrofluidika kiibil [3]. Väikesed kiibi mõõtmed võimaldavad kasutada väikeses koguses proovi, mis annab olulised eelised tavaliste meetodite ees. See väljendub näiteks rakendustes, kus olemasolev proovi kogus on väga väike.

Sellistel kanalitel põhinevate mikrofluidika kiipide põhiline probleem on madala analüüsihinna ja kõrge analüütilise võimekuse samaaegne saavutamine. Kiibiga koos kasutusel olevad välised seadmed (nt pumbad ja detektorid) tõstavad analüüsi võikemust, kuid tõstavad ka analüüsi läbiviimise keerukust ja hinda [4,5].

1.1.1 Paberipõhine mikrofluidika

Paberipõhine mikrofluidika leiutati ligikaudu kümme aastat tagasi ja see tugineb lihtsal ideel: paber on poorne materjal, milles paberikiudude vaheline tühi osa moodustab poorid, mis spontaanselt märguvad ning seetõttu pole vaja mikromeetri mõõtmetes kanalite valmistamist [6]. Paberipõhiste mikrofluidika seadmete (ingl *microfluidic paper-based analytical devices*, μ PAD) valmistamisel kasutatakse enamasti paberit, mis koosneb hüdrofiilsetest tselluloosi kiududest,

nitrotselluloosist või klaasfiiber materjalist. Materjali märgumine juhib proovi ühest seadme osast teise, ilma, et oleks vaja välist pumpa. Selleks, et kontrollida vedeliku liikumist seadmes on vajalik luua kanaleid, mis moodustatakse paberi keemilisel või mehhaanilisel töötlemisel [7–9]. Näiteks saab paberi mõned alad vaha abil hüdrofoobseks teha ning seeläbi juhtida vedelikku vaid läbi hüdrofiilsete alade (Joonis 2) [10]. Tulemusena saadakse kanalid, mis jäävad mõõtmetelt millimeetri suuruseks ja juhivad vedelikke seadme erinevate osade vahel. Tavaliselt kasutatakse μ PAD-idel kolorimeetrilist detekteerimist: paberile on lisatud reagent, mis analüüdiga kokkupuutel moodustab reaktsiooni käigus uue ühendi, põhjustades värvimuutuse. Saadud värvimuutuse põhjal on võimalik saada ka kvantitatiivseid tulemusi [8].



Joonis 2. Näide μ PAD-ist. Must joon paberil on vaha, mis on paberile prinditud ja seejärel kuumuse abil üles sulatatud, et vaha liiguks paberi kiudude vahele. Proov lisatakse kiibi alumisse osasse, mustade joontega piiratud alasse. Vaha takistab proovil piirjoontest väljapoole märgumast, seetõttu liigub proov mööda kiipi detekteerimisalade (A, B ja C) poole [10]

μ PAD-ide eelised on odav tootmine ning lihtne transport väikeste mõõtmete tõttu [11]. Võrreldes kiirtestidega on võimalik μ PAD-idega moodustada keerulisi kanalite kujusid, mis võimaldab läbi viia mitmesammulist analüüsi [12]. Selliseid paberipõhiseid diagnoosimiseks mõeldud seadmeid saab kasutada tervishoius arenevates riikides [13].

Mitmesammulised analüüsid (proovi eelkontsentreerimine, analüüdi segavatest komponentidest eraldamine ja detekteerimine) tagavad hea selektiivsuse ja tundlikkuse labori analüüside juures. Et need etapid viia μ PAD-ile on vaja erineva poorsuse ja pinnakeemiaga materjale kombineerida samale seadmele. Paberipõhistel seadmetel on aga pinnakeemia ja poorsuse kontroll piiratud, sest paberi poorsus on piiratud kommertsiaalselt kättesaadavate paberitega ning paberi pinnal olevad

hüdrosü rühmad vajavad tugevaid kemikaale pinnakeemia muutmiseks. Seetõttu on μ PAD-idel keeruline saavutada mitmesammulist analüüsi, mistõttu on analüütiline võimekus piiratud [14].

1.1.2 Osakestepõhine mikrofluidika

μ PAD-ide puuduseid saab potentsiaalselt kõrvaldada, kui kasutada osakestel põhinevaid materjale. Võrreldes paberiga on näiteks tselluloosiosakestel põhinev õhukese kihi kromatograafia (ingl *thin-layer chromatography*, TLC) parema eraldusega kui paberipõhine materjal [15]. Paberipõhises materjalis olevate pikkade kiudude tõttu on proovi komponendid rohkem asümmeetriliste piikidega, kui tselluloosi osakestel põhineva materjali puhul. Lisaks on tselluloosi osakestel põhinev materjal analüüsi teostamiseks kiirem kui paberipõhine materjal [16].

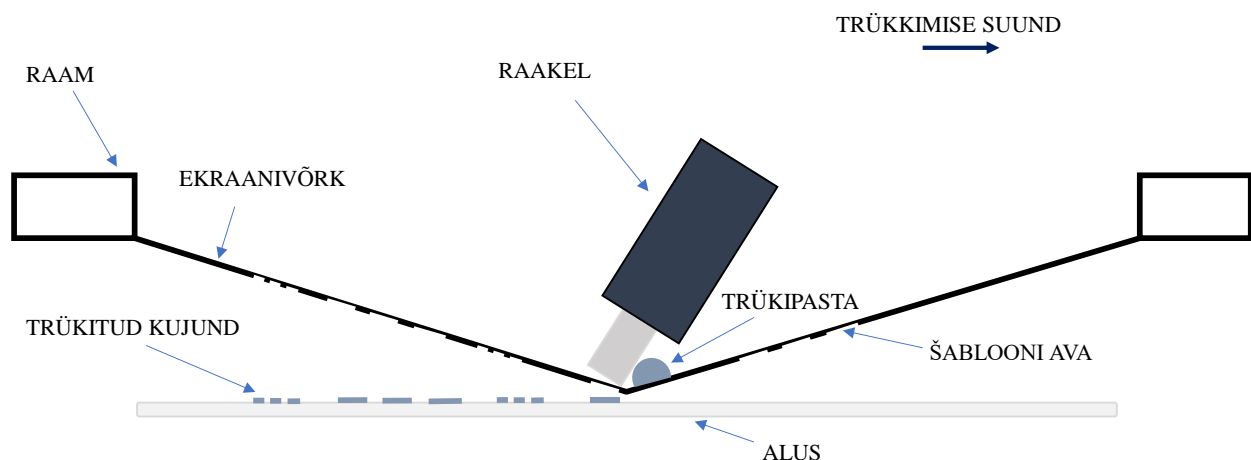
Mikrofluidika kiipide valmistamist osakestel põhinevatest materjalidest on vähe uuritud [17,18]. Varasemalt on näidatud, et 3D-printeriga on võimalik osakestepõhist mikrofluidika kiibi materjali trükkida, kuid selline lähenemine ei võimalda masstootmist [19,20].

Tartu Ülikooli Mikrofluidika uurimisgrupi varasemalt avaldatud artiklis [21] näidati, et silikageeli osakestest on võimalik teha erinevate trükkimismeetodite abil mikrofluidika kiipe. Osakestel baseerual materjalil on eelised paberi ees, kuna seda on võimalik lihtsalt kohandada vastavalt spetsiifilise analüüsi vajadustele: (1) materjali poorsust on võimalik muuta kasutades erineva läbimõõdu ja poori suurusega osakesi, (2) pinnakeemiat saab kontrollida kasutades kommertsiaalselt olemasolevaid spetsiifilise pinnakeemiaga osakesi ja (3) erinevaid osakesi saab omavahel kombineerida või lisada muid materjale osakestele. Selle töö eesmärk on tõestada, et siiditrüki abil on võimalik ühele kiibile kombineerida erinevaid alasid, mis koosnevad erinevatest osakestest, ja seeläbi oleks võimalik saavutada mitmesammuline analüüs ühel kiibil.

1.2 Siiditrükk

Siiditrükk on trükkimise meetod, mis võimaldab kanda kujutisi erinevatele materjalidele, nagu paber, kangas, puit, klaas, metall ja plastik. Siiditrüki protsess hõlmab trükipasta kandmist trükitava pinnale läbi peene siid- või nailonvõrgu, mis on paigaldatud trükiraami külge (Joonis 3). Võrgu avadega alad lasevad trükipasta läbi, samas kui ülejäänud osa võrgust on kaetud šablooniga, takistades trükipasta jõudmist aladele, kus see pole vajalik. Trükipasta kantakse ekraanivõrgule ning surutakse raakli abil läbi šabloonis olevate avade kandes trükipasta alusmaterjalile. Siiditrüki meetodis kasutatava trükipasta viskoossus peab olema sobilik

trükkimiseks, mis tähendab, et trükipasta ei või olla liiga suure ega väikese viskoossusega [22,23]. Siiditrüki protsessi saab teostada nii käsitsi kui ka masinaga automatiseeritult [24,25].

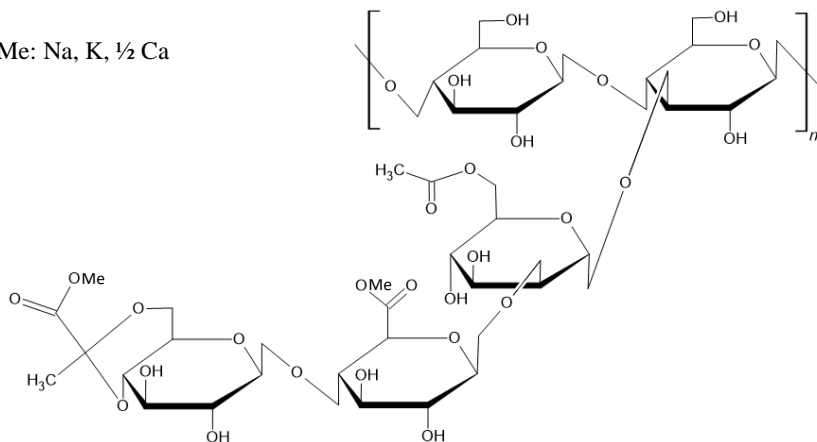


Joonis 3. Siiditrüki meetod. Trükipasta surutakse raakli abil läbi ekraanivõrgus olevate šabloonivade alusele. Seeläbi tekib alusele trükipastast šabloonivadele vastav kujund

Sideaine ei tohi tõsta trükipasta viskoossust nii kõrgeks, et trükkimist ei saaks teostada, kuid peab andma lahusele piisava viskoossuse, et osakesed ei settiks välja. Trükitud osakesed peavad pärast trükipasta kuivamist olema tugevalt seotud nii aluse kui ka üksteise külge, et moodustuks poorne materjal, mis märgudes ei laguneks. Samas peab sideainet olema nii vähe, et trükipasta kuivades oleks osakeste vahel vaba ruumi ja moodustuks poorne materjal. Selleks peab sideaine olema piisavalt tugevate osakesi siduvate omadustega. TÜ Mikrofluidika uurimisgrupis teostatud eelnevates katsetes on leitud, et sideaineks sobib ksantaankumm (Joonis 4), mis tekitab trükipastale sobiva viskoossuse ning seob pärast materjali kuivamist osakesi ning aluspinda omavahel piisaval tugevalt kokku. Need vajalikud omadused saavutatakse, kui ksantaankummi mass on alla 1% kogu tahkest ainest trükipastas.

TÜ mikrofluidika uurimisgrupis on eelnevates töodes tõestatud, et siiditrükk on üks kolmest võimalikust trükkimise meetodist osakestepõhiste mikrofluidika kiipide valmistamiseks [21]. Edasises arendustöös oleme uurimisgrupis siiditrüki tulemusi veelgi parandanud ning see meetod on parim trükkimismeetod kiipide valmistamiseks (avaldamata andmed). Seetõttu kasutatakse ka antud töös siiditrükki.

Me: Na, K, ½ Ca



Joonis 4. Ksantaankummi struktuur

1.3 Analüütilised meetodid

1.3.1 Õhukese kihi kromatograafia

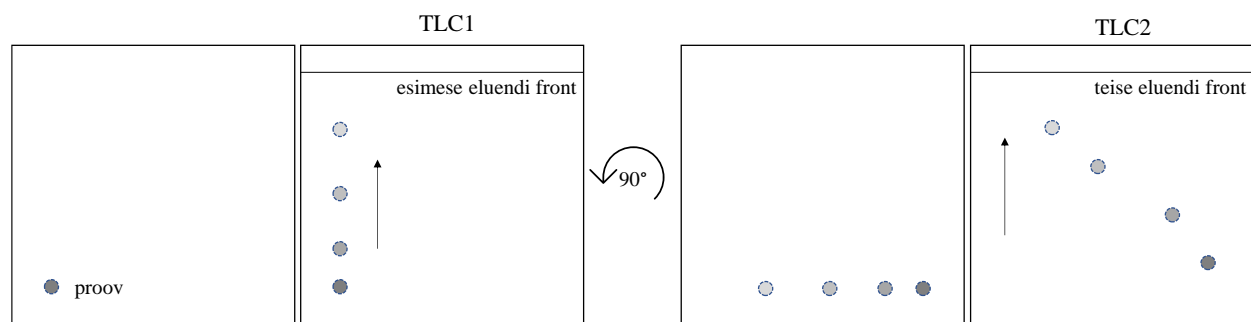
TLC on analüütilises keemias kasutatav meetod ainete eraldamiseks. Ainete eraldamine toimub klaasi-, plastiku- või alumiiniumlehtedel, mis on kaetud osakestest ja sideainest koosneva adsorbendi, ehk statsionaarse faasi, õhukese kihiga. Adsorbendina kasutatakse näiteks silikageeli, alumiiniumoksiidi või tselluloosi osakesi ning sideainena näiteks tärklist või kipsi. Sarnaselt paberile on adsorbendi osakeste vahel vaba ruum ja seega tekivad materjalis justkui kapillaarid, kuhu eluent, ehk mobiilne faas, saab liikuda ning toimub materjali märgumine [26].

TLC plaadi elueerimise käigus jaotuvad segu komponendid statsionaarse ja mobiilse faasi vahel. Komponent, millel on statsionaarse faasiga tugevam interaktsioon liigub plaadil aeglasemalt, võrreldes komponendiga, mis lahustub paremini mobiilses faasis. Proovi komponentide erineva interaktsiooni tõttu kahe faasi vahel toimub nende eraldamine üksteisest. Eraldunud komponendid saab tuvastada näiteks visuaalselt kasutades värvilisi ühendeid moodustavaid reagente [16].

TLC-d on kasutatud laialdaselt erinevates uurimisvaldkondades. Näiteks kasutatakse TLC-d sünteesi protsessi kontrollimiseks [27]. Lisaks on võimalik eraldada üksteisest erinevaid lipiide, mida leidub loomade ja taimede kudedes [28]. Samuti on võimalik eraldada terpeene, mis on taimedes olevad lenduvad ja lõhnavad komponendid [29].

1.3.2 Kahemõõtmeline õhukese kihi kromatograafia

Kahemõõtmelise õhukese kihi kromatograafia (ingl *two-dimensional thin-layer chromatography*, 2D TLC) puhul lisatakse eraldatav proov ruudukujulise TLC plaadi ühte nurka ning elueeritakse esimese solvendiga (Joonis 5, TLC1) elueerimise nõus. Järgnevalt TLC plaat eemaldatakse elueerimisnõust ja oodatakse, kuni solvent aurustub. TLC plaati keeratakse 90° ja asetatakse uude solvendi, et ained eralduksid teises suunas (Joonis 5, TLC2). Seejärel lastakse solvendil TLC plaadilt aurustuda ning plaati töödeldakse edasi, et teha analüüdid nähtavaks.



Joonis 5. 2D TLC skeem. Pärast proovi lisamist ja kuivatamist voolutatakse plaati esimese eluendiga (TLC1). Seejärel plaat kuivatatakse, keeratakse 90° ning elueeritakse teise eluendiga (TLC2)

Võrreldes tavalise TLC-ga parandab 2D TLC komponentide eraldust. Selleks kasutatakse kahte erinevat eluenti, millel on erinevad omadused. See võimaldab eraldada suurema hulga ühendeid üksteisest, mis ühte eluentu kasutades ei eralduks [30].

1.3.3 Tahke faasi ekstraktsioon

Tahke faasi ekstraktsioon (ingl *solid phase extraction*; SPE) on levinud proovide ettevalmistamise meetod, mida kasutatakse analüütide eelkontsentreerimiseks ja eraldamiseks teistest proovi komponentidest enne analüüsi [31]. Meetod põhineb analüütide selektiivsel adsorptsioonil tahkele kandjale ja elueerimisel tahkelt kandjalt [32].

Tüüpilised SPE sorbendid põhinevad silikageelil või polümeeridel. Sorbendid on kommertsiaalselt saadaval erineva pinnakeemia ja füüsikaliste omadustega (osakeste suurus ja poorsus). Näiteks on laialt levinud hüdrofoobse pinnaga SPE sorbendid ning erinevad ioonvahetuse pinnakeemiaga sorbendid: tugev katioonvaheti (ingl *strong cation exchange*, SCX), tugev anioonvaheti (ingl *strong anion exchange*; SAX), nõrk katioonvaheti ja nõrk anioonvaheti. Tugevate ioonvahetite puhul säilitab sorbendi pind laengu olenemata eluendi pH-st – SCX puhul kasutatakse näiteks

sulfoonhappe rühmaga pinda ning SAX puhul kasutatakse kvaternaarse amiini rühmaga pinda. Nõrkade anioonvahetite puhul pinna laeng muutub olenevalt eluendi pH-st – nõrga katioonvaheti puhul kasutatakse karboksüülhappe rühmaga pinda ning nõrga anioonvaheti puhul primaarse või sekundaarse amiini rühmaga pinda [33].

SPE-l põhinevad meetodid sobivad erinevate proovide eeltöötlemiseks, sealhulgas keskkonna-, toidu-, bioloogiliste ja farmaatsiaproovide jaoks.

Käesolevas töös kasutatakse SAX pinnakeemiaga sorbenti. SAX põhineb elektrostaatilistel interaktsioonidel anioonse analüüdi ja katioonse rühma vahel, mis on kinnitatud tahkele kandjale, tavaliselt polümeersele vaigule. SAX-i kasutatakse laialdaselt biomolekulide, nagu valkude, nukleiinhapete ja polüsahhariidide eraldamiseks, puhastamiseks ja analüüsimiseks .

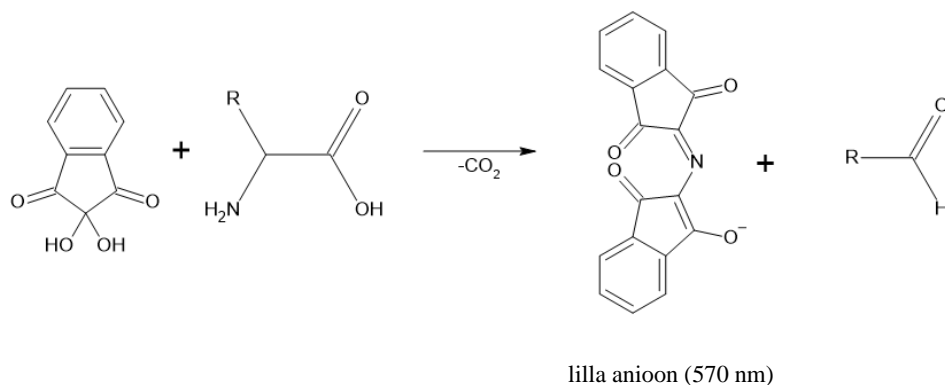
1.4 Aminohapete määramine

Aminohapete määramine on oluline paljudes valdkondades, näiteks tervishoius ning keskkonna analüüside puhul [34,35]. Selle töö puhul kasutati aminohapete määramist näitlikustava rakendusena, et demonstreerida arendatava tehnoloogia toimivust.

Siiditrüki meetodil trükitud kiibil kasutatakse SPE materjalina SAX-i, mida on varasemalt kasutatud aminohapete kontsentreerimiseks [36].

Aminohapete eraldamiseks kasutatakse 2D TLC-d, kus statsionaarseks faasiks on tselluloos [37].

Pärast kromatograafilist eraldust on võimalik aminohappeid tuvastada pihustades materjalile ninhüdrüini (Joonis 6), mis reageerib aminohapetega ja moodustab lillat värvi ühendi [38].



Joonis 6. Ninhüdrüini reaktsioon aminohapetega

2. Meetodid

2.1 Reagendid

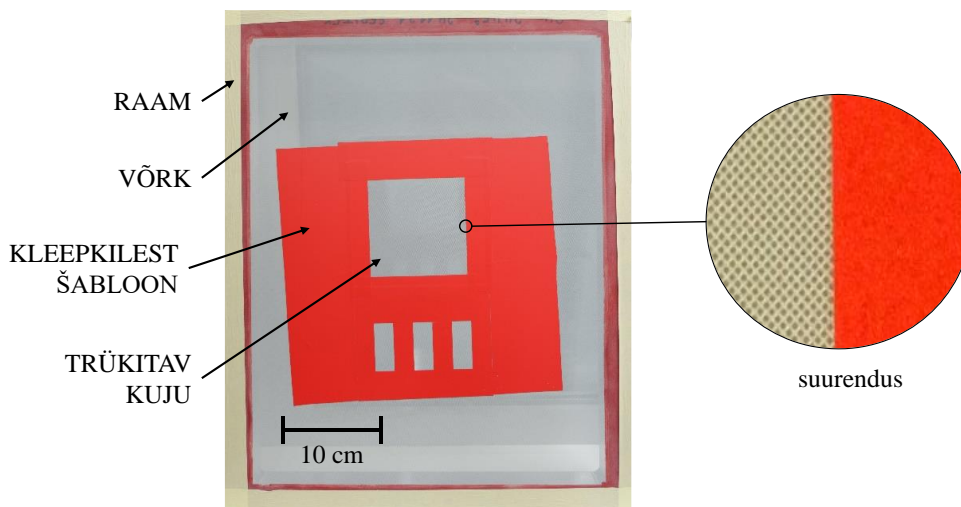
Töös kasutati järgnevaid reagente: püridiin ($\geq 99,9\%$, HPLC, Sigma-Aldrich), dioksaan ($\geq 99,9\%$, HPLC, Sigma-Aldrich), NH_4OH (kontsentratsioon 25%, Poola), n-butanool ($\geq 99,7\%$, HPLC, Sigma-Aldrich), atsetoon ($\geq 99\%$, Lach:ner), äädikhape ($\geq 99,8\%$, ACS, Sigma-Aldrich). Aminohapete vesilahuste jaoks kasutati: DL-seriin ($\geq 99\%$, NT, Fluka, Prantsusmaa), DL-alaniin ($\geq 99\%$, FCC, Sigma-Aldrich, Jaapan), L-metioniin ($\geq 98\%$, HPLC, Sigma-Aldrich, Jaapan), L-leutsiin ($\geq 99\%$, NT, Fluka, Saksamaa). Katsetes kasutati seadmega Millipore Q-POD puhastatud MilliQ-vett. Sideainena kasutati ksantaankummi (Sigma-Aldrich, *Xanthan gum from Xanthomonas campestris*, LOT #SLCD3849) ja ksantaankummi (OÜ Piprapood, GE4203/2). Happelise keskkonna saamiseks kasutati 1%-list äädikhappe vesilahust. Aluselise keskkonna saamiseks kasutati Tris-puhvrit (pH $\approx 9,5$), mille koostises oli NaCl, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ja tris. Neutraalse keskkonna saamiseks kasutati PBS-puhvrit (DPBS, 1X, kaltsiumi-ja magneesiumivaba, Corning).

2.2 Seadmed

Kõik antud töös olevad pildid on tehtud Fujifilm X-A3 kaameraga. Ainete kaalumiseks kasutati Oertling'i (YA124-1AOZM13A-A, 120 g \times 0,0001 g) kaalu. Materjalide paksuseid mõõdeti kruvikuga (Yato, $\pm 0,002$ mm). Töös kasutati kolme erinevat automaatpipetti: 1-10 ml (Eppendorf Reserach plus), 100-1000 μl (Eppendorf Research plus) ja 0,1–2,5 μl (ErgoOne starlab).

2.3 Siiditrüki meetod

Siiditrüki võrk (Joonis 7) puhastati võimalikust mustusest, milleks kasutati võrgu hooldusvahendit (MacDermid Autoprep gel). Alumiiniumraamil olevale 24T siiditrüki võrgule kanti kleepkilest (Oracal 641) šabloon. Silikageeli ja tselluloosi materjali trükkimiseks kasutati 48T (48 niiti cm^{-1} , võrgu ühe ava suurus on 149 μm) võrku ja SAX materjali trükkimiseks kasutati 24T (24 niiti cm^{-1} , võrgu ühe ava suurus on 267 μm) võrku.



Joonis 7. Siiditrüki raam, võrk ja sellele lisatud kleepkilest (punane) tehtud šabloon 2D TLC plaadi kuju trükkimiseks.

Raami alla igasse nurka asetati 3D-prinditud klotsid nii, et trükitava klaasi pinna ja võrgu vahele jääks 2,2-2,4 mm ruumi. Raam kinnitati pitskruvidega hingede külge, mis olid omakorda kinnitatud lauale. Nii sai võrku tõsta üles, et võrgu alla asetada klaas, millele hakati trükkima. Samas ei liikunud võrk (ja seega ka šabloon) raami tõstmisel õigest asendist ära. Võrgu alla asetati klaas, mille nihkumise vältimiseks kinnitati see laua külge paberteibiga.

Võrgule kanti spaatli abil šablooni küljepikkuse suurune trükipasta kogus. Esiteks kanti raakliga trükipasta üle trükkimisšablooni selliselt, et trükipasta täidaks võrgu avad, kuid trükkimist ei toimuks (võrku ei surutud vastu klaasi). Sama tegevust korrati teises suunas. Trükipasta trükkimiseks suruti raakel vastu võrku ja liiguti üle trükitava ala samal ajal võrgule jõudu rakendades. Kui trükitavast alast oli üle liigutud, vabastati võrk pinge alt, tõsteti raakel võrgu pealt üles. Võrgu avadest läbisurutud trükipasta oli võrgu all olevale klaasile trükitud.

Trükitud TLC plaat asetati ahju kuivama (minimaalselt 8-ks tunniks temperatuuril 80 °C). Enne kasutamist trükitud plaat eemaldati ahjust ja jahutati toatemperatuurini. Pikemaajaliselt säilitati trükitud plaate laboritingimustel.

Pärast silikageeli ja SAX materjali trükkimist ja ahjus kuivamist asetati plaadid deioniseeritud (DI) veega täidetud anumasse ning jäeti minimaalselt 2-ks tunniks orbitaalsele loksutajale (Ohaus). Seejärel kuivatati plaadid ahjus uuesti (minimaalselt 8 tundi temperatuuril 80 °C). Eelnevatest katsetest on nähtud, et antud etapp on vajalik trükipastasse lisatud glütserooli eemaldamiseks (peatükk 2.4).

Trükitud materjali paksust mõõdeti kruvikuga. Mõõtmise teostamiseks asetati trükitud materjali peale klaasist slaid ning mõõdeti alusena kasutatud klaasi, trükitud materjali ja materjalile asetatud klaasi paksus. Seejärel mõõdeti klaaside paksused eraldi ning arvutati trükitud materjali paksus.

2.4 Ksantaankummi lahus

Sideainena kasutati Sigma Aldrich'i ksantaankummi. Valmistati nelja erineva kontsentratsiooniga ksantaankummi lahused: 4, 6, 8 ja 10 mg ml⁻¹. Ksantaankummi kogus kaaluti ning lisati DI vesi. Ksantaankumm lahustati magnetsegajal kuni ühtlase lahuse moodustumiseni (ligikaudu 12 tundi) ning säilitati külmkapis kuni 2 nädalat.

Silikageeli ja SAX osakeste puhul kasutati trükipastas Piprapoe ksantaankummi kontsentratsiooniga 4 mg ml⁻¹ DI vees.

2.5 Trükipasta

Trükkimisepasta valmistamisel kaaluti vajalik osakeste hulk. Ksantaankummilahusel, mida säilitati külmkapis, lasti soojeneda toatemperatuurini ning seejärel lisati automaatpipetiga osakestele. Kui kasutati silikageeli või SAX osakesi, siis lisati automaatpipetiga glütserool (75 µl ml⁻¹ ksantaankummi lahuse kohta) vee aurustumise vältimiseks. Kui trükipasta komponendid olid kokku lisatud segati trükipastat klaaspulga abil 5 minutit, mille järgselt oli trükipasta trükkimiseks valmis.

2.6 Aminohapete lahused

Antud töös kasutati nelja aminohapet: seriin (ingl *serine*, Ser), leutsiin (ingl *leucine*, Leu), metioniin (ingl *methionine*, Met) jaalaniin (ingl *alanine*, Ala). Igast aminohapest valmistati DI veega lahus. Töös kasutati aminohapete lahuseid kahel erineval kontsentratsioonil 0,02 M ja 0,2 M (välja arvatud Ser-i puhul, mille lahus on 0,13 M lahustuvuse tõttu). Aminohappeid hoiustati katsevälisel ajal külmkapis kuni 2 kuud. Kui see aeg oli möödunud valmistati värsked lahused. Katsete juures kasutati aminohapete segu, kus nelja eelmainitud aminohapet lisati samas koguses. Enne katset segati aminohappe lahuseid põhjalikult.

2.7 2D TLC

2D TLC jaoks kasutati siiditrüki meetodil trükitud tselluloosi osakestest (Macherey-Nagel Cellulose MN 301) plaati mõõtetega 10 × 10 cm ja kommertsiaalset tselluloosi plaati (Macherey-

Nagel Cellulose MN 300) mõõtmetega 11 × 11 cm. Mõlemal puhul koosneb statsionaarne faas samadest tselluloosi osakestest, mis on pärit samalt tootjalt.

2D TLC jaoks kasutati kahte erinevat eluenti. Esimene eluent koostisega püridiin : dioksaan : konts. NH₄OH : DI vesi (35 : 35 : 15 : 15 ruumala järgi) ja teine eluent koostisega n-butanool : atsetoon : konts. äädikhape : DI vesi (35 : 35 : 10 : 20 ruumala järgi) [37]. Elueerimisnõu (kõrgus 230 mm, läbimõõt 120 mm) asetati tõmbekappi ja täideti 0,5 cm kõrguse vedelikusambaga (esimene eluent) ning kaeti Petri tassiga. Elueerimisnõu aurudega küllastumiseks oodati 10 minutit, aeg-ajalt nõud loksutades (2 korda minutis). TLC plaadi nurgast 1 × 1 cm kaugusele kanti automaatpipetiga 2 µl nelja aminohappe segu. Oodati tilga kuivamiseni, seejärel asetati plaat elueerimisnõusse ja kaeti nõu Petri tassiga. Plaati elueeriti kuni front oli 0,5 cm TLC plaadi ülemisest servast. TLC plaat võeti elueerimisnõust välja ja kuivatati (üle ühe tunni) eluendi aurustumise lõpuni tõmbekapi all. Elueerimisnõust eemaldati esimene eluent, mis seejärel pesti seebi ning veega ja loputati atsetooniga. Seejärel lasti elueerimisnõul tõmbekapis kuivada.

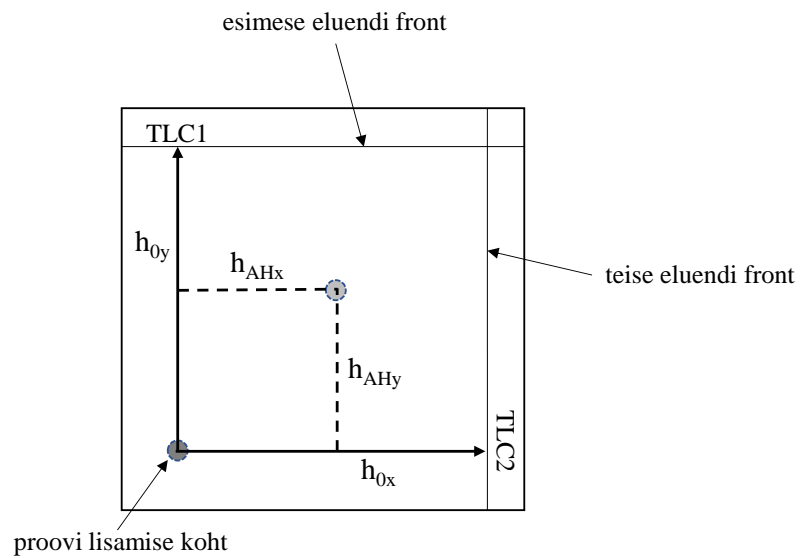
Kambrisse lisati teine eluent ning kaeti Petri tassiga, korrates esimese eluendiga tehtud toiminguid. Elueerimiskambrisse asetati TLC plaat, seda võrreldes algse asendiga 90-kraadi keerates. Plaati elueeriti teise solvendiga kuni front oli 0,5 cm TLC plaadi ülemisest servast. Plaat eemaldati elueerimisnõust ja kuivatati tõmbekapi all (üle ühe tunni).

TLC plaati pihustati 0,3% ninhüdrini lahusega butanoolis ja asetati ahju (temperatuuril 80 °C 10-ks minutiks) kuni ninhüdrin reageeris aminohapetega ning moodustus silmaga nähtav lilla värv.

2D TLC tulemuste iseloomustamiseks arvutati tekkinud lillade laikude põhjal ainete suhtelised retentsioonifaktorid:

$$R_f = \frac{h_{AH}}{h_0}$$

kus h_{AH} on aminohappe laigu keskkoha kaugus proovi lisamise punktist ning h_0 on proovi lisamise punkti kaugus eluendi frondist pärast elueerimist. Kuna teostati 2D TLC siis need mõõtmised tehti kahes suunas (Joonis 8).



Joonis 8. 2D TLC R_f väärtuste arvutamise suuruste skeem

3. Tulemused ja analüüs

Eksperimentaalne töö teostati kolmes etapis: (1) tselluloosi osakeste trükkimine ja siiditrüki meetodil trükitud TLC plaadi kasutamine, (2) SPE ja silikageeli kiibi trükkimine aminohapete puhastamiseks ja eelkontsentreerimiseks ning (3) eelnevate etappide ühendamine ühtseks kiibiks.

3.1 Tselluloosi osakeste trükkimine

3.1.1 Tselluloosi trükipasta optimeerimine

Trükipasta puhul optimeeritakse kahte parameetrit: ksantaankummi vesilahuse kontsentratsiooni ja tselluloosi osakeste kontsentratsiooni ksantaankummi vesilahuses. Esialgsete katsete käigus leiti ligikaudsed sobilikud parameetrid ning seejärel optimeeriti trükipasta koostis vastavalt trükkimistulemustele.

Esmases katses valmistati erinevad Sigma Aldrich-i ksantaankummi lahused kontsentratsioonidega 4, 6, 8 ja 10 mg ml⁻¹ ning lisati tselluloosi osakesi nii, et nende kontsentratsioon oleks 250 mg ml⁻¹. Eelneva kogemuse põhjal oli selgelt aru saadav, et 4, 6 ja 8 mg ml⁻¹ puhul oli lahuste viskoossus liiga madal heade trükkimise tulemuste saavutamiseks. Liiga madala viskoossusega trükkimispasta hakkab lusikalt valades tilkuma sarnaselt veega ning hakkab siiditrüki ekraanile asetades ja ekraani kallutades ise voolama. 10 mg ml⁻¹ lahuse puhul leiti, et valmistatud trükkimispasta on trükkimiseks selgelt liiga viskoosne, sest trükipastat ei olnud võimalik trükkimise käigus raakliga läbi võrgu suruda.

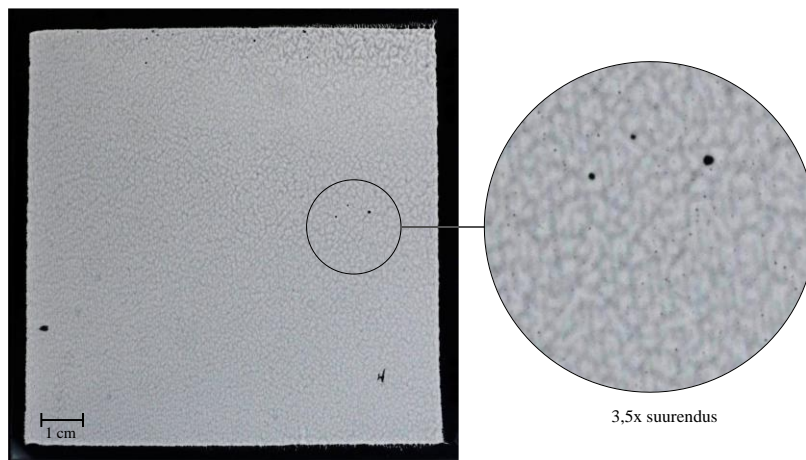
Edasisteks katsetusteks valiti välja ksantaankummi lahuse kontsentratsiooniga 8 mg ml⁻¹. Et liiga madalat trükkimispasta viskoosust kompenseerida, katsetati erinevate tselluloosi osakeste kontsentratsioonidega. Tselluloosi osakeste kontsentratsiooni varieeriti vahemikus 200-350 mg ml⁻¹ ning 25 mg ml⁻¹ sammuga. Sarnaselt eelneva katsega hinnati esiteks varasema kogemuse ning kirjeldatud parameetrite põhjal, millised trükkimispastad on sobilike trükkimise omadustega. Katsetest oli näha, et 250 mg ml⁻¹ ja madalama kontsentratsiooniga trükkimispastad olid liiga madala viskoossusega (Joonis 9, pilt A) ning 325 mg ml⁻¹ ja kõrgema kontsentratsiooniga trükkimispastad olid liiga kõrge viskoossusega (Joonis 9, pilt B). Saadud tulemuste põhjal kitsendati trükkimiseks sobiva tselluloosi osakeste kontsentratsiooni vahemikku.



Joonis 9. Madala viskoossusega trükipastast kiip (A), tselluloosi osakeste kontsentratsioon 200 mg ml^{-1} . Kõrge viskoossusega trükipasta kiip (B), tselluloosi osakeste kontsentratsioon 325 mg ml^{-1}

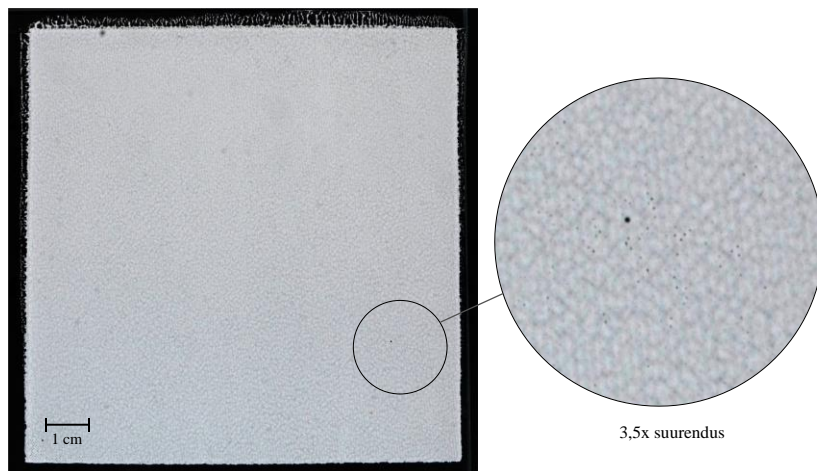
Et neid esialgseid katsetulemusi kontrollida, katsetati siiditrüki meetodil trükkimist trükkimispastadega, kus tselluloosi osakeste kontsentratsioon jäi $250\text{-}300 \text{ mg ml}^{-1}$ vahele. Katsete käigus trükiti $10 \times 10 \text{ cm}$ suuruses 2D TLC plaate.

Tselluloosi 250 mg ml^{-1} trükkimis pasta osutus trükkimiseks liiga vedelaks. Trükiti kahekordne kiht, kuid TLC plaati jäid sisse tühimikud ning pinna katvus oli ebahühtlane. Plaadil oli näha ka ekraani võrgu mustrit, mis tekitas väikesed vaod materjali pinnale (Joonis 10). Kuna materjali kiht on ebahühtlane, siis seda plaati TLC-ks ei kasutatud. Selle katse tulemuse põhjal tuli tselluloosi osakeste hulka trükipastas suurendada.



Joonis 10. Siiditrükiga valmistatud TLC plaat tselluloosi osakeste sisaldusega 250 mg ml^{-1}

Tselluloosi 275 mg ml^{-1} trükkimis pasta oli trükkimiseks sobiva konsistentsiga. Trükiti kahekordne kiht, mis andis parema pinna katvuse. Ekraani mustrit on TLC plaadi pinnalt endiselt näha ning märgata materjalis väiksemaid tühimikke (Joonis 11).



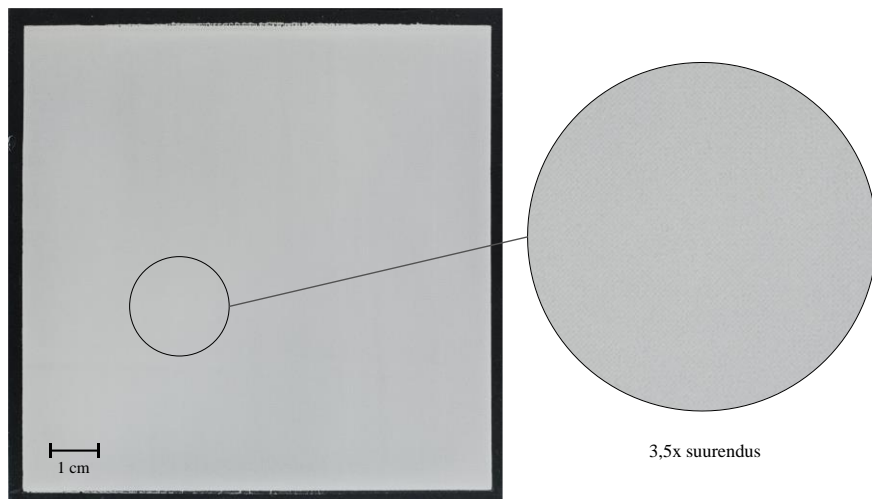
Joonis 11. Siiditrükiga valmistatud TLC plaat tselluloosi osakeste sisaldusega 275 mg ml^{-1}

Tselluloosi osakeste 300 mg ml^{-1} trükkimispasta trükkimine osutuks keeruliseks, kuna trükipastat oli trükkimise käigus keeruline raakliga läbi võrgu suruda ning mitme kihi trükkimise jooksul trükipasta viskoossus veelgi suurenes. Lisaks hakkas trükipasta tugevalt kinni jääma võrgu avadesse. Ahjus kuivamise järgselt tuli trükitud poorne materjal klaasi küljest lahti, mistõttu selline TLC plaat on analüüsikõlbmatu (Joonis 12). Materjali klaasi küljest lahti tulemist võib seletada liiga vähesel ksantaankummi sisaldusega tselluloosi osakeste kohta – mida rohkem osakesi trükkimispastas kasutada seda rohkem on tarvis ksantaankummi, et neid osakesi siduda.



Joonis 12. Siiditrükiga valmistatud TLC plaat tselluloosi osakeste sisaldusega 300 mg ml^{-1}

Eelnevate katsete põhjal otsustati proovida tselluloosi osakeste sisaldust trükipastas kontsentratsioonil 290 mg ml^{-1} ksantaankummi 8 mg ml^{-1} vesilahuse kohta. Trükiti kahekordne kiht. Tulemustest on näha, et plaadi materjal on senistest tulemustest ühtlaseim ja väikeseid tühimikke materjalis ei ole (Joonis 13). Seega kõigis järgnevates katsetes kasutati tselluloosi osakeste trükkimiseks sellise sisaldusega trükipastat.

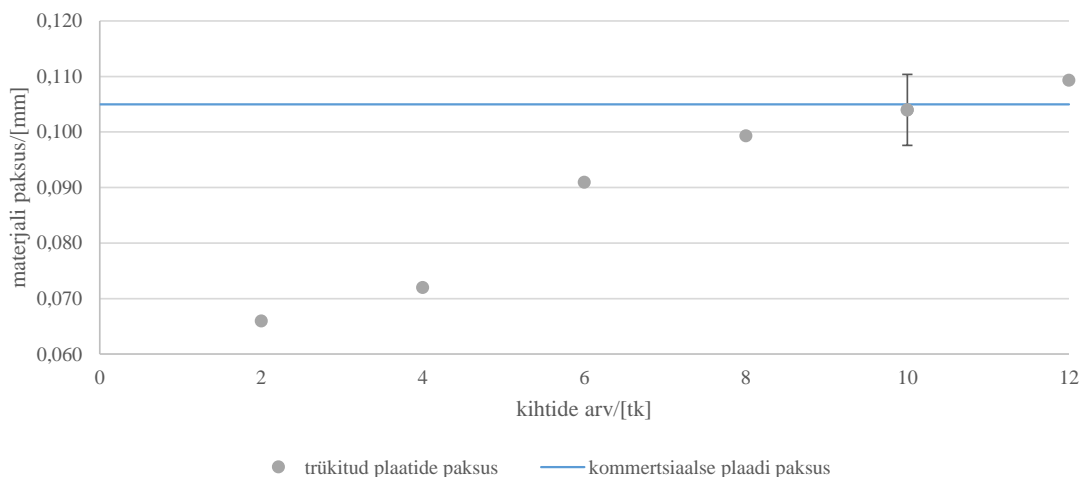


Joonis 13. Siiditrükiga valmistatud TLC plaat tselluloosi osakeste sisaldusega 290 mg ml^{-1}

3.1.2 TLC plaatide trükkimise optimeerimine

Järgnevalt optimeeriti TLC plaadi trükkimise käigus trükitavate kihtide arvu ühele plaadile. Sama plaati mitu korda järjest trükkides (trükkimiste vahepeal materjali kuivatamata), saab suurendada saadud plaadi paksust. Selle katse eesmärk oli saavutada trükitud plaadi puhul sarnane TLC plaadi materjali paksus kui kommertsiaalse plaadi puhul.

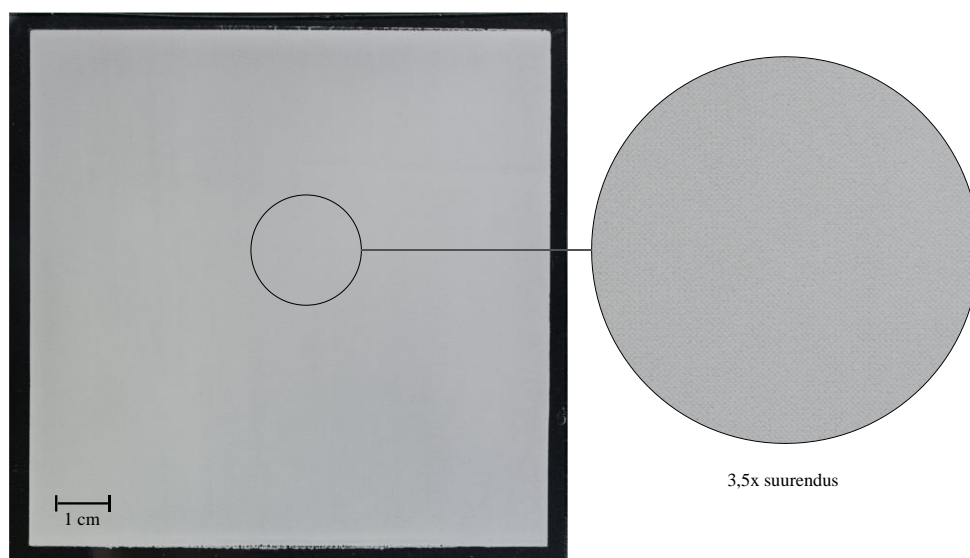
Katse käigus trükiti plaate vastavalt 2, 4, 6, 8, 10 ja 12-kihiliseks. Seejärel trükitud plaadid kuivatati ja mõõdeti kruvikuga nende paksus. Katsetulemused on toodud graafikul (Joonis 14). Kommertsiaalse tselluloosi plaadi puhul mõõdeti materjali paksuseks 0,105 mm.



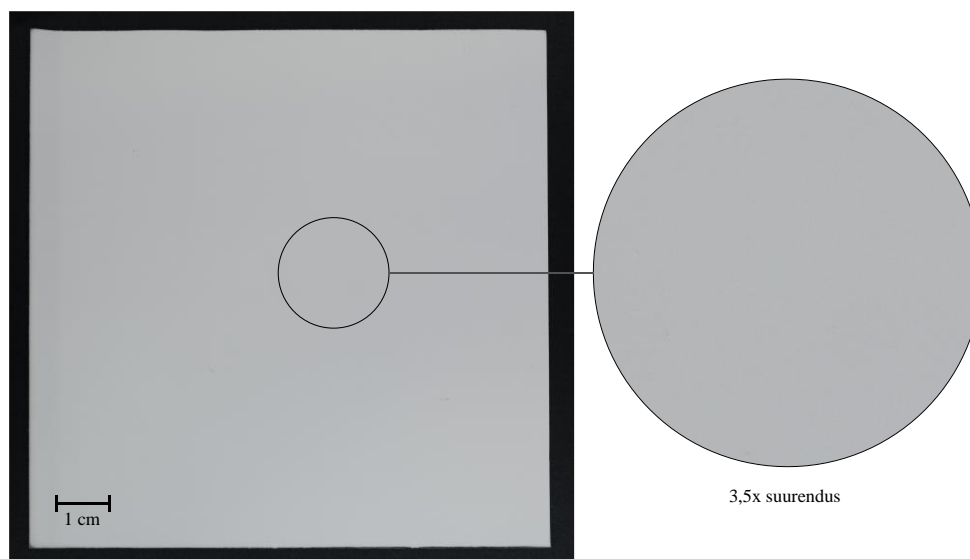
Joonis 14. Trükitud materjali paksuse sõltuvus kihtide arvust. 10-kihilise puhul tehti 4 korduskatset ning arvutati standardhälve

Tulemustest saab järeldada, et TLC plaatide trükkimine lubab kontrollida nende paksust, mis võib anda olulise eelise plaatide valmistamiseks rakenduste jaoks, kus oleks plaatide paksust vaja kontrollida.

Lisaks on tulemustest näha, et 10-kihiline trükitud TLC plaat on materjali paksuselt kõige sarnasem kommertsiaalse plaadi materjali paksusele. Trükitud 10-kihilise plaadi materjali keskmine paksus on 0,104 mm suhtelise standardhällbega 6,1% (n=4). Seega on kõigis järgnevat katsetes kasutatud 10-kihiliselt trükitud tselluloosi plaate.



Joonis 15. Siiditrükiga valmistatud 10-kihiline TLC plaat tselluloosi osakeste sisaldusega 290 mg ml^{-1}

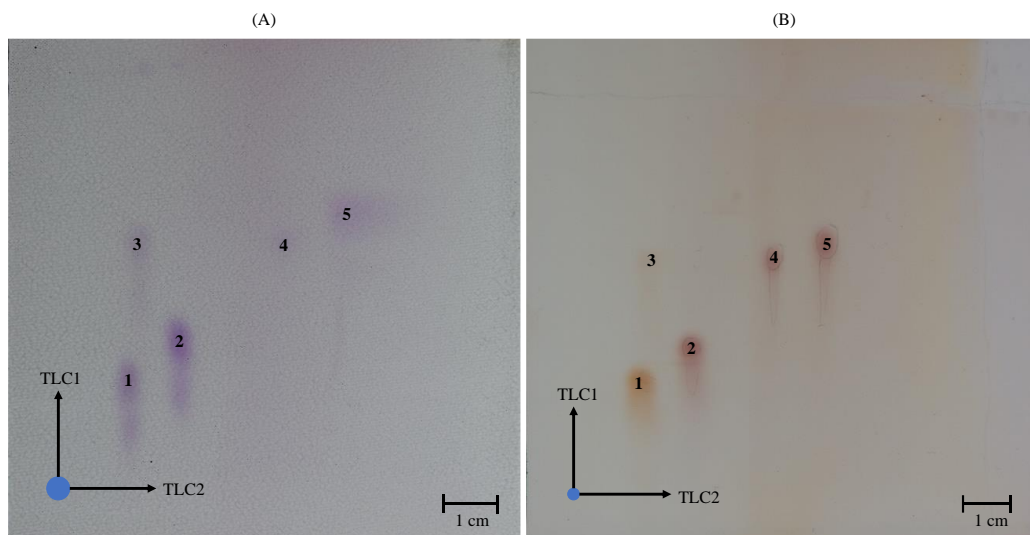


Joonis 16. Kommertsiaalne tselluloosi TLC plaat, milles on kasutatud samu osakesi, mis siiditrüki meetodil tehtud plaatide puhul

Siiditrüki meetodil trükitud 10-kihiline TLC plaat on ühtlane (Joonis 15), sarnaselt kommertsiaalsele TLC plaadile (Joonis 16), mis on tehtud samast materjalist. Siiditrükiga tehtud plaadi puhul on materjalil näha mustrit, mis on tingitud siiditrüki ekraanist endast. Kogu plaadi ulatuses on näha, et mõned kohad plaadist paistavad rohkem läbi kui teised, mis võib-olla põhjustatud trükkimise ajal ebaühtlasest trükipasta jaotusest ekraanil, kui on trükipastat läbi ekraani vajutatud.

3.1.3 TLC plaadi eraldusvõime hindamine

TLC eksperimendi läbi viimiseks kantakse 10-kihiliselt trükitud plaadile aminohapete segu (iga aminohappe kontsentratsioon on 0,02 M) ning teostatakse 2D TLC. Siiditrüki meetodil trükitud plaati võrreldi kommertsiaalse plaadiga (Joonis 17).



Joonis 17. Siiditrüki meetodil tehtud TLC plaat (A) ja kommertsiaalne TLC plaat (B). Sinise ringiga on tähistatud ligikaudne proovi lisamise punkt ning proovi laigu suurus pärast laiali valgumist. Nooltega on täistatud esimese elueerimise (TLC1) ja teise elueerimise (TLC2) suunad. Proovis olevad komponendid, mis ninhüdroiiniga reageerides nähtava värvuse annavad, on tähistatud numbritega 1-5 (sama tähistust on kasutatud ka edaspidi)

Katse tulemustest on näha, et eraldatakse viis komponenti, millest neli on aminohapped: Ser, Ala, Leu ja Met ning viies komponent on identifitseerimata. Tundmatu komponent tuleb eeldatavasti proovist, sest seda on näha nii kommertsiaalse kui ka prinditud plaadi puhul ning see ei sega trükitud TLC plaatide karakteriseerimist. Kuna töö eesmärk oli demonstreerida hetkel vaid tehnoloogia toimivust, siis ei teostatud aminohapete asukoha ega lisühendi identifitseerimist.

Tulemustest on näha, et aminohapped on üksteisest eraldatud nii trükitud plaadi kui ka kommertsiaalse plaadi puhul. Tulemuste võrdlemiseks mõõdeti suhtelised retentsiooni väärtused

esimese ja teise elueerimise suunas ning tekkinud aminohapete laikude kõrgused ja laiused. Tulemused on Tabelis 1 ja 2.

Tabel 1. Mõõdetud komponentide suhtelised retentsioonide väärtused

Komponent	Trükitud		Kommertsiaalne	
	TLC1	TLC2	TLC1	TLC2
1	0,25	0,18	0,32	0,19
2	0,33	0,29	0,40	0,30
3	0,55	0,20	0,61	0,21
4	0,55	0,50	0,61	0,50
5	0,62	0,63	0,65	0,62

Tulemustest on näha, et suhtelised retentsiooni väärtused on mõlema plaadi puhul üksteisele sarnased – maksimaalne erinevus R_f väärtustes on 0,06, mis on 10% vastavast R_f väärtusest. Sellest võib järeldada, et siiditrüki meetodil trükitud TLC plaadi R_f väärtused ei erine praktiliselt kommertsiaalsest plaadist, kui plaatide materjal on kasutatud samu tselluloosi osakesi.

Tabel 2. Mõõdetud komponentide laikude kõrgused ning laiused. Mõõtmistulemused on antud sentimeetrites

Komponent	Trükitud		Kommertsiaalne	
	Kõrgus	Laius	Kõrgus	Laius
1	1,71	0,40	0,73	0,46
2	1,64	0,41	1,12	0,46
3	2,03	0,34	1,77	0,37
4	0,41	0,41	1,58	0,37
5	0,66	0,98	1,91	0,37

Tulemustest on näha, et enamasti tekib piikide asümmeetria. Piikide asümmeetriat pole näha vaid komponendil 4 trükitud plaadil. See komponent võib-olla plaadil asümmeetrilise kujuga, kuid nõrga värvi intensiivsuse tõttu ei ole võimalik asümmeetriat tuvastada. Tabelist 2 on näha, et trükitud plaadi puhul on piikide asümmeetria suurem, kui kommertsiaalse plaadi puhul. Vastavalt kromatograafia teooriale [39] võib see antud olukorras olla põhjustatud erinevatest asjaoludest: (1) ksantaankummi kasutamine trükitud plaadi materjal on põhjustab sekundaarseid interaktsioone analüüdiga, mida kommertsiaalse plaadi puhul ei ole, (2) siiditrüki meetodil valmistatud plaatide puhul võivad olla osakeste vahel suuremad tühimikud, (3) pärast proovi lisamist plaadile valgub see trükitud plaadi puhul rohkem laiali (4-5 mm) võrreldes kommertsiaalse plaadiga (2,5 mm), (4) trükitud plaadi mahtuvus on väiksem kui kommertsiaalse plaadi mahtuvus ning katsed on tehtud plaatide mahtuvuse lähedal ja (5) trükitud plaadi kiirem elueerumine (arutatud allpool) võib viia

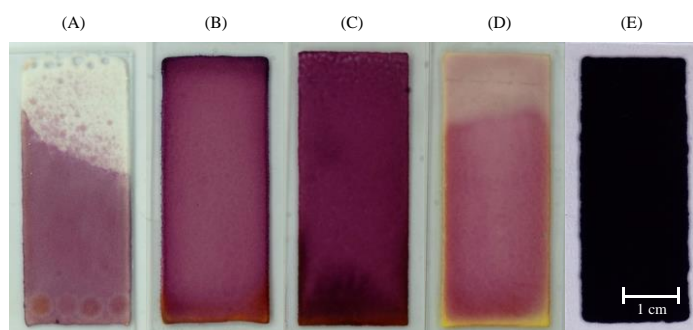
tugevama asümmeetriani, kuna statsionaarse faasiga tugevamini interakteeruvad molekulid või poorides olevad molekulid jäävad analüüdi põhiosast rohkem maha.

Oluline erinevus trükitud ning kommertsiaalse plaadi vahel oli ka eluentide liikumise kiirused. Trükitud plaadi puhul olid elueerimiste ajad keskmiselt 39 (TLC1) ja 23 minutit (TLC2). Kommertsiaalse plaadi puhul olid elueerimiste ajad keskmiselt 97 (TLC1) ja 64 minutit (TLC2). Selle ning proovi suurem laiali valgumine trükitud plaadil viitab, et trükitud materjal märgub paremini kui kommertsiaalne plaat. Seda võib põhjustada ksantaankummi juuresolek, mis suurendab statsionaarse faasi polaarsust. Kiirem analüüsi tulemuste saavutamine on oluline eelis trükitud plaatide puhul, kuid see võib olla põhjustanud ka tugevama piikide asümmeetria ja seega kehvema eralduse.

3.2 SAX ja silikageeli osakeste kombineerimine

Mikrofluidika uurimisgrupis on eelnevates töodes SAX ja silikageeli osakeste trükkimispasta komponentide kontsentratsioonid optimeeritud, kuid ei ole katsetatud nende kasutamist aminohapete kontsentreerimiseks ja puhastamiseks ning spetsiifilist disaini nende kahe materjali ühendamiseks.

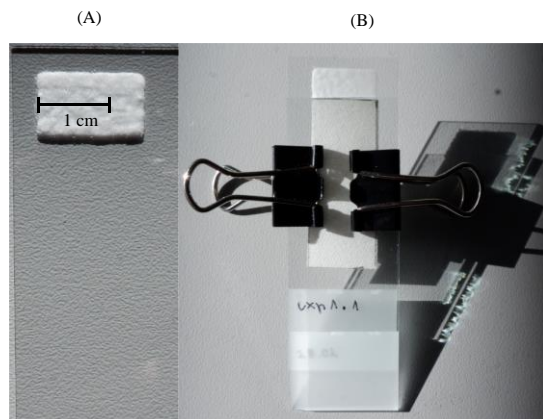
Puhast SAX materjali kasutades sooviti uurida, kas aminohapped elueeruvad materjalil või mitte. Saadud tulemuse põhjal polnud võimalik järeldusi teha, kuna ninhüdrini abil pole materjali peal võimalik aminohapete asukohta nähtavalt tuvastada (Joonis 18). Selle probleemi võimalik seletus on, et SAX pinna peal on ka primaarsed amiinid, mitte ainult tertsiaalsed nagu tootjapoolne kirjeldus lubab (vastavat hüpoteesi kinnitas ka tootja kirjavahetuse teel).



Joonis 18. Trükitud SAX plaadid, (A) plaadile on lisatud aminohapped, kuivamise järgselt ninhüdriniga pihustatud. (B) plaadile on lisatud aminohapped, elueeritud äädikhappe lahusega ning pihustatud ninhüdriniga. (C) plaadile on lisatud aminohapped, elueeritud DI veega ning pihustatud ninhüdriniga. (D) plaadile on lisatud aminohapped ja elueeritud Tris-puhvriga, pihustatud ninhüdriniga. (E) plaadil on puhas SAX materjal, millele pole midagi lisatud, pihustatud ninhüdriniga

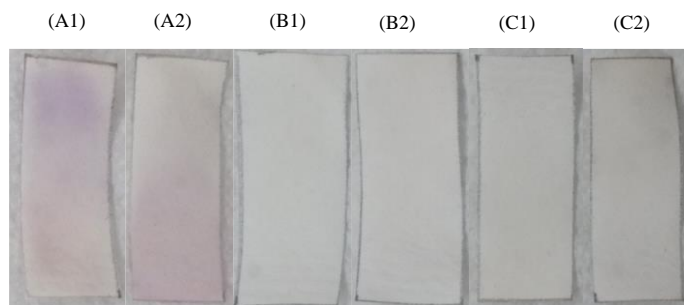
3.2.1 Aminohapete elueerimine SAX-ilt

Kuna varasemates katsetes ei olnud SAX materjalilt võimalik aminohappeid silmaga nähtavalt tuvastada, kasutati SAX materjali SPE-na ning elueeriti aminohapped filterpaberile (390, Filtrak). Selle jaoks trükiti $1,5 \times 1$ cm SAX materjali riba, mille kohale asetati filterpaber mõõtmetega $1,5 \times 4$ cm selliselt, et filterpaberi ja SAX materjali kattuvus oleks 1 mm. Filterpaber pressiti kahe klaasslaidi vahele kinni ja kinnitati paberiklambritega (Joonis 19).



Joonis 19. Siiditrükiga trükitud SAX materjal (A). Kokkupandud katseseade, kus on filterpaber surutud kahe klaasslaidi vahele selliselt, et SAX materjal ja filterpaber kattuksid (B). Klaasslaidide kinnitamiseks on kasutatud paberiklambreid

SAX materjalile pipeteeriti 2 μ l igat aminohapet eraldi, lasti õhu käes kuivada. Katseseade asetati eluneti ning elueeriti kuni paberi täies ulatuses märgumiseni. Katseseade ühendati lahti ning filterpaber kuivatati õhu käes. Filterpaberile pihustati ninhüdroksiini aminohapete nähtavale toomiseks.

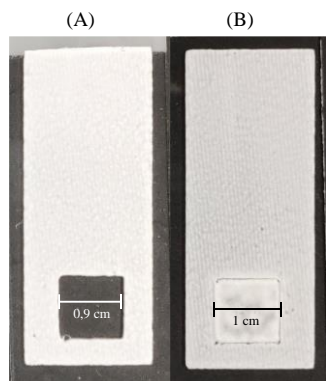


Joonis 20. Filterpaberid, millele on elueeritud SPE materjalilt aminohapped. (A1) filterpaberile on elueeritud Ser ja Ala äädikhappe vesilahuses. (A2) filterpaberile on elueeritud Met ja Leu äädikhappe vesilahuses. (B1) filterpaberile on elueeritud Ser ja Ala DI veega. (B2) filterpaberile on elueeritud Met ja Leu DI veega. (C1) filterpaberile on elueeritud Ser ja Ala Tris-puhvriga. (C2) filterpaberile on elueeritud Met ja Leu Tris-puhvriga

Tulemusest (Joonis 20) on näha, et aminohapped elueeruvad SAX materjalilt filterpaberile vaid happelist eluenti kasutades.

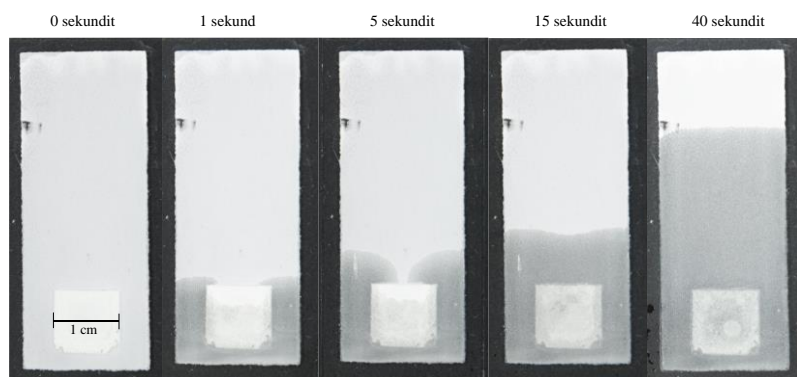
3.2.2 SAX ja silikageeli materjali kokku trükkimine

Siiditrüki abil valmistati kiip, kus elueerimisala on silikageelist ning SPE ala on SAX materjalist. Esialgu trükiti silikageeli materjal, jättes kiibi sisse $0,9 \times 0,9$ cm ava (Joonis 21, pilt A) ja hiljem trükiti avale 1×1 cm SAX materjali kiht (Joonis 21, pilt B). Katse tulemustest on näha, et materjalide kokku trükkimisel ei esinenud probleeme – trükitud materjalid on säilitanud oma disainitud kuju.



Joonis 21. Esmalt trükiti silikageeli materjal (A). Materjal kuivatati ning seejärel trükiti SAX materjal (B)

Lisaks katsetati, kas kiibi materjalid on omavahel kontaktis ning märguvad DI veega. Tulemustest on näha, et DI vesi märgab mõlemat materjali ning liigub ühtlaselt ühelt materjalilt teisele (Joonis 22). SAX materjali mõnevõrra aeglasem märgumine võib olla põhjustatud sellest, et see on oluliselt paksem ja seega mahutab oluliselt rohkem vedelikku kui silikageel. Erinev materjalide paksus on tingitud erineva koetihedusega võrgu kasutamisest materjalide trükkimisel.

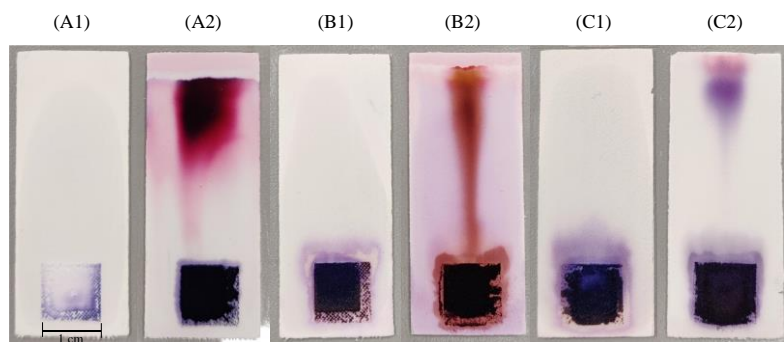


Joonis 22. Silikageelist ja SAX materjalist kombineeritud kiibi märgumine DI veega.

3.2.3 SAX ja silikageeli materjali toimimine aminohapete eelkontsentreerimiseks ja puhastamiseks

Järgnevalt kontrolliti, kas SAX ja silikageeli kombineeritud kiibi osa töötab aminohapete eelkontsentreerimiseks ja puhastamiseks. Lisaks uuriti, kas saadakse sarnased tulemused, mis filterpaberiga tehtud katses, kus aminohapped elueerusid SAX materjali pealt maha vaid happelises keskkonnas. Selle jaoks kasutati peatükis 3.2.2 trükitud kiipe.

Aminohapete segu lahust, kus iga aminohappe kontsentratsioon on 0,2 M, pipeteeritakse 2 µl SAX materjalile ning lastakse õhu käes kuivada. Võrdluskatse jaoks kasutatakse sama protseduuri, kuid aminohapete asemel pipeteeriti MilliQ vett. Kiip asetatakse nõusse nii, et kiibi alumine serv ulatub eluendi nivooeni. Kiip eemaldatakse eluendist, kui eluendi front kiibil oli kiibi ülemisest servast ligikaudu 0,5 cm kaugusel. Kiibil lasti kuivada tõmbekapi all, kuni eluendi aurustumiseni. Kiibile pihustati nihütriini lahust ja lasti tõmbekapi all kuivada.



Joonis 23. Aminohapete elueerimine SAX materjalilt silikageelile. Tehti ka võrdluskatse, kus aminohapete segu asemel lisati SAX materjalile DI vett. Erinevad katsed: (A1) võrdluskatse äädikhappe lahusega, (A2) aminohapped ja äädikhappe lahus, (B1) võrdluskatse PBS-puhvriga, (B2) aminohapped ja PBS-puhver, (C1) võrdluskatse Tris-puhvriga, (C2) aminohapped ja Tris-puhver

Tulemustest (Joonis 23) on näha, et aminohapped elueeruvad SAX materjalilt silikageelile sõltumata eluendi pH-st. Samade tulemusteni jõuti ka teostatud korduskatsetes. Nende tulemuste selgitamiseks kontrolliti üle aminohapete pK_a väärtused, mis on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Aminohapete pK_a väärtused [40]

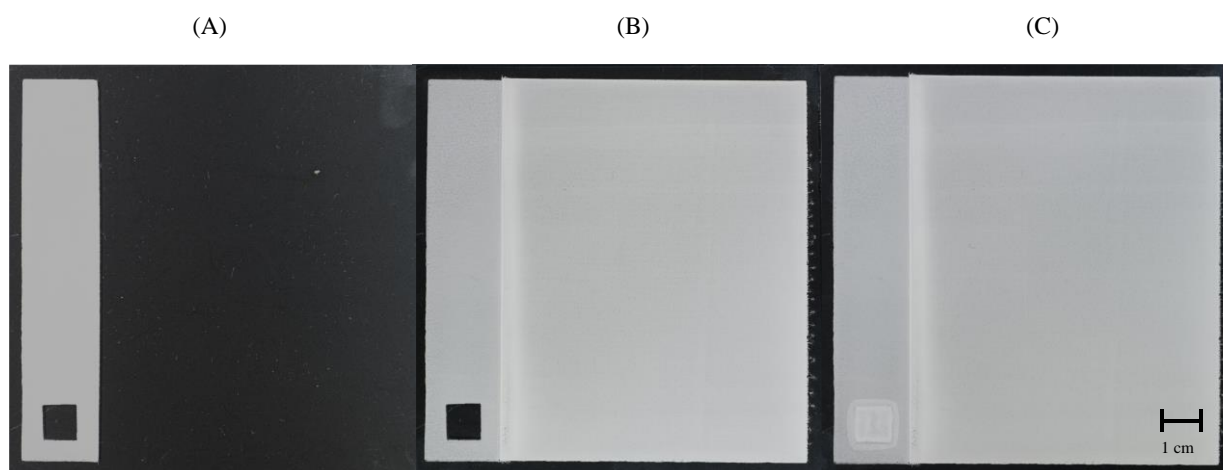
Aminohape	pK_{a1}	pK_{a2}
Seriin	2,21	9,15
Alaniin	2,34	9,69
Leutsiin	2,36	9,60
Metioniin	2,28	9,21

Nendest andmetest saab järeldada, et kasutatud aminohapped on antud eluentide puhul, kas positiivselt laetud või tsvitterioonina (üldlaeng on 0). Seetõttu elueeruvad aminohapped SAX materjalilt maha, kuna SAX materjali pind on positiivse laenguga.

Sellele probleemile on lahenduseks, kas (1) veelgi aluselisema puhvi kasutamine või (2) SCX materjali kasutamine SAX asemel. Kuna silikageel ei ole enamasti aluselises keskkonnas stabiilne, siis eeldatavalt on parem lahendus SAX-i väljavahetamine SCX materjaliga.

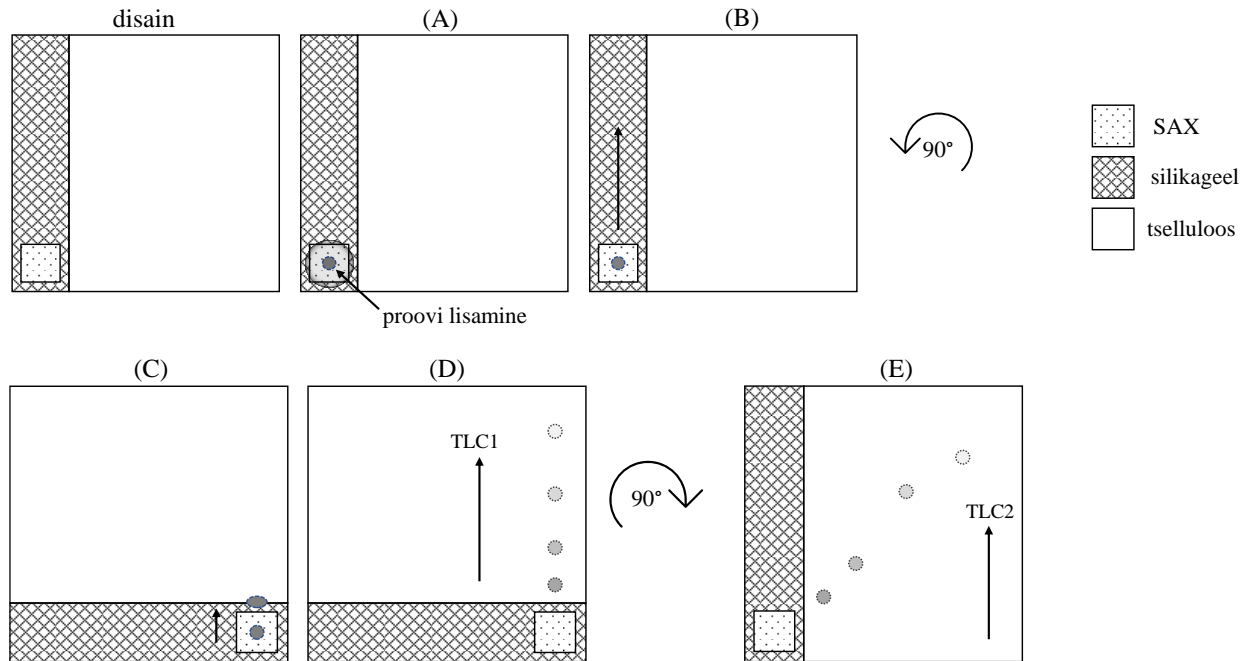
3.3 Kolme erineva materjali kokku trükkimine ühtseks kiibiks

Järgmise katsena demonstreeriti kogu kiibi kokku trükkimist, kus kombineeritakse kolm materjali: silikageel, SAX ja tselluloos (Joonis 24).



Joonis 24. Siiditrüki meetodil kiibi kokku trükkimise etapid. (A) silikageelist trükitud osa, (B) tselluloosist juurde trükitud osa silikageelile, (C) SAX materjali juurde trükitud osa silikageelile ja tselluloosile.

Joonisel 25 on välja toodud kiibi disain ning toimimise põhimõte.



Joonis 25. Kiibi disain ja toimimise põhimõte. (A) proovi eelkontsentreerimine, (B) analüütide eraldamine proovimaatriksist, (C) analüütide elueerimine TLC osa algusesse, (D) 1D TLC esimese eluendiga, (E) 2D TLC teise eluendiga

Tulemustest on näha, et kiibi trükkimine õnnestus. Kuna eelnevas katses demonstreeriti, et SAX materjal ei tööta aminohapete jaoks SPE materjalina (peatükk 3.2.3), siis seetõttu kogu kiibi toimimist ei olnud hetkel võimalik katsetada.

Kokkuvõte

Selle töö eesmärk oli tõestada, et siiditrüki meetodil on võimalik valmistada kiipe, mis koosnevad erinevat tüüpi osakestest. Töö käigus uuriti täpsemalt: (1) tselluloosi osakeste trükkimist ja saadud plaadi kasutamist 2D TLC analüüsiks aminohapete eraldamisel, (2) SAX-i ja silikageeli kombineerimist kiibiks, et eelkontsentreerida aminohappeid ja neid segavatest ühenditest puhastada, ning (3) eelnevates etappides arendatud osade kombineerimist üheks kiibiks.

Töö käigus demonstreeriti, et siiditrüki meetodit kasutades on võimalik trükkida tselluloosi osakesi ning et trükitud materjalist on võimalik valmistada poorsete omadustega materjali mikrofluidika seadmete jaoks või TLC plaatide valmistamiseks. Leiti, et sobivaimad trükkimispasta parameetrid on 290 mg ml^{-1} tselluloosi osakesi ja 8 mg ml^{-1} ksantaankummi. Lisaks täheldati, et TLC plaati 10 korda trükkides saavutatakse plaadi paksus, mis on lähedane kommertsiaalse plaadi paksusele.

Siiditrüki meetodil trükitud TLC plaadi suhtelised retentsioonifaktorid on sarnased kommertsiaalsele plaadile, kuigi eraldus on mõnevõrra halvem piikide suurema asümmeeria tõttu. Siiski sobivad trükitud plaadid 2D TLC jaoks.

Silikageeli ja SAX osakeste kiibi trükkimine õnnestus. Ilmnesid probleemid aminohapete eelkontsentreerimisel SAX materjaliga, kuid selle lahendamiseks saab SAX osakesed asendada sarnase suurusega silikageeli baasil olevate SCX osakestega.

Lisaks demonstreeriti, et siiditrüki abil on võimalik valmistada ühtne kiip, mis koosneb erinevat tüüpi osakestest (silikageel, SAX ja tselluloos).

Seega võib kokkuvõtvalt öelda, et töö eesmärgid on saavutatud ning edaspidi saab töö käigus leitud puudused parandada ja kogu kiibi toimivust tõestada.

Summary

The objective of this study was to demonstrate the feasibility of fabricating a chip composed of several distinct particle types using screen printing. This study specifically investigated the following: (1) printing cellulose particles and utilizing the resulting plate for two dimensional thin-layer chromatography to separate amino acids, (2) merging strong anion exchange and silica gel into a chip that could pre-concentrate amino acids and cleanse them of interfering compounds, (3) integrating the components developed in the earlier steps into a single unified chip.

This research illustrated the viability of printing cellulose particles using screen printing, which then could be transformed into porous materials suitable for microfluidic devices or the creation of thin-layer chromatography plates. Optimal parameters for the printing paste were established at 290 mg ml⁻¹ for cellulose particles and 8 mg ml⁻¹ for xanthan gum. Additionally, it was found that printing the thin-layer chromatography plate ten times yielded a thickness approximating that of a commercial plate.

The thin-layer chromatography plate, manufactured using the screen-printing method, demonstrated relative retention factors akin to commercial plates. However, due to increased asymmetry, the separation was slightly less effective. Despite this, they proved suitable for two-dimensional thin-layer chromatography printing.

The printing of a chip integrating silica gel and strong anion exchange particles was successful. Some issues arose concerning the pre-concentration of amino acids with strong anion exchange material, but these can be remedied by substituting the strong anion exchange particles with strong cation exchange particles, which are of a similar size and silica gel based.

Moreover, it was shown that a cohesive chip comprising all three types of particles - silica gel, strong anion exchange, and cellulose - could be fabricated using screen printing.

In conclusion, the goals of this study were successfully met. Future work will focus on addressing the identified shortcomings and confirming the entire chip's functionality.

Kasutatud kirjandus

1. G.M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature*. 442 (2006) 368–373.
2. Meander & Continuous-Flow PCR Chips - Fluidic 47, Microfluidic ChipShop.
3. P. Chaikhan, Y. Udnan, R. Sananmuang, R.J. Ampiah-Bonney, W. Chuachud Chaiyasith, A low-cost microfluidic paper-based analytical device (μ PAD) with column chromatography preconcentration for the determination of paraquat in vegetable samples, *Microchemical Journal*. 159 (2020) 105355.
4. C.D. Chin, V. Linder, S.K. Sia, Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices, *Lab Chip*. 12 (2012) 2118.
5. E.K. Sackmann, A.L. Fulton, D.J. Beebe, The present and future role of microfluidics in biomedical research, *Nature*. 507 (2014) 181–189.
6. A.W. Martinez, S.T. Phillips, M.J. Butte, G.M. Whitesides, Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 1318–1320.
7. M. Santhiago, E.W. Nery, G.P. Santos, L.T. Kubota, Microfluidic paper-based devices for bioanalytical applications, *Bioanalysis*. 6 (2014) 89–106.
8. D.M. Cate, J.A. Adkins, J. Mettakoonpitak, C.S. Henry, Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices, *Anal. Chem.* 87 (2015) 19–41.
9. X. Li, D.R. Ballerini, W. Shen, A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends, *Biomicrofluidics*. 6 (2012) 011301.
10. M. Younas, A. Maryam, M. Khan, A.A. Nawaz, S.H.I. Jaffery, M.N. Anwar, L. Ali, Parametric analysis of wax printing technique for fabricating microfluidic paper-based analytical devices (μ PAD) for milk adulteration analysis, *Microfluid Nanofluid.* 23 (2019) 38.
11. P. Lisowski, P.K. Zarzycki, Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PADs) and Micro Total Analysis Systems (μ TAS): Development, Applications and Future Trends, *Chromatographia*. 76 (2013) 1201–1214.
12. H. Fu, P. Song, Q. Wu, C. Zhao, P. Pan, X. Li, N.Y.K. Li-Jessen, X. Liu, A paper-based microfluidic platform with shape-memory-polymer-actuated fluid valves for automated multi-step immunoassays, *Microsyst Nanoeng.* 5 (2019) 50.
13. T. Songjaroen, W. Dungchai, O. Chailapakul, C.S. Henry, W. Laiwattanapaisal, Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices, *Lab Chip*. 12 (2012) 3392.
14. Lim, Jafry, Lee, Fabrication, Flow Control, and Applications of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices, *Molecules*. 24 (2019) 2869.
15. R. Jayaprakasam, R. Sivakumar, Thin-layer chromatography on cellulose, *Current Science*. 58 (1989) 980–982.
16. E. Stahl, M.R.F. Ashworth, eds., *Thin-layer chromatography: a laboratory handbook*, 2. ed., fully revised and expanded, Springer, Berlin, 1969.

17. X. Kong, X. Chong, K. Squire, A.X. Wang, Microfluidic diatomite analytical devices for illicit drug sensing with ppb-Level sensitivity, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 259 (2018) 587–595.
18. B. Gao, H. Liu, Z. Gu, Patterned Photonic Nitrocellulose for Pseudo-Paper Microfluidics, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5424–5429.
19. L. Serex, A. Bertsch, P. Renaud, Microfluidics: A New Layer of Control for Extrusion-Based 3D Printing, *Micromachines*. 9 (2018) 86.
20. D. Fichou, G.E. Morlock, Open-Source-Based 3D Printing of Thin Silica Gel Layers in Planar Chromatography, *Anal. Chem.* 89 (2017) 2116–2122.
21. H. Evard, H. Priks, I. Saar, H. Aavola, T. Tamm, I. Leito, A New Direction in Microfluidics: Printed Porous Materials, *Micromachines*. 12 (2021) 671.
22. J. Pan, G.L. Tonkay, A. Quintero, Screen printing process design of experiments for fine line printing of thick film ceramic substrates, *Journal of Electronics Manufacturing*. 09 (1999) 203–213.
23. R.J. Horwood, Towards a better understanding of screen print thickness control, (n.d.) 9.
24. Z. Zhang, J. Sun, B. Lu, Y. Duan, Turning mechanism and optimisation design of automatic screen printing machine, *IJWMC*. 15 (2018) 151.
25. J. Arends, *Silk Screen Printing, Design*. 41 (1940) 12–13.
26. M. Santiago, S. Strobel, *Thin Layer Chromatography*, in: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 2013: pp. 303–324.
27. L. Cai, *Thin Layer Chromatography, CP Essential Lab Tech*. 8 (2014).
28. J.C. Touchstone, Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 671 (1995) 169–195.
29. H.K. Mangold, Thin-layer chromatography of lipids, *J Am Oil Chem Soc*. 38 (1961) 708–727.
30. S. Gocan, Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 27 (2004) 1105–1113.
31. C.F. Poole, New trends in solid-phase extraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 22 (2003) 362–373.
32. C.L. Arthur, Janusz. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
33. M.E.I. Badawy, M.A.M. El-Nouby, P.K. Kimani, L.W. Lim, E.I. Rabea, A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis, *ANAL. SCI.* 38 (2022) 1457–1487.
34. E. Barbaro, A. Spolaor, O. Karroca, K.-T. Park, T. Martma, E. Isaksson, J. Kohler, J.C. Gallet, M.P. Bjorkman, D. Cappelletti, G. Spreen, R. Zangrando, C. Barbante, A. Gambaro, Free amino acids in the Arctic snow and ice core samples: Potential markers for paleoclimatic studies, *Science of The Total Environment*. 607–608 (2017) 454–462.

35. X. Hu, F. Guo, Amino Acid Sensing in Metabolic Homeostasis and Health, *Endocrine Reviews*. 42 (2021) 56–76.
36. I. Spanik, G. Horvathova, A. Janacova, J. Krupcik, On the use of solid phase ion exchangers for isolation of amino acids from liquid samples and their enantioselective gas chromatographic analysis, *Journal of Chromatography A*. 1150 (2007) 145–154.
37. F.K. H. Lang, Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography on Two-Layer Plates of Amino Acid, *Clinical Chemistry*. 16 (1970).
38. M. Friedman, L. David Williams, Stoichiometry of formation of Ruhemann's purple in the ninhydrin reaction, *Bioorganic Chemistry*. 3 (1974) 267–280.
39. V. Meyers, *Practical high-performance liquid chromatography*, 5th ed, Wiley, Chichester, U.K, 2010.
40. F.A. Carey, R.M. Giuliano, *Organic chemistry*, 8th ed, McGraw-Hill, New York, 2011.

Tänuavaldused

Suur tänu kuulub selle töö juhendajale, Hanno Evardile, kes pühendas selle töö valmimisse märkimisväärselt aega ning oli abiks nii katsete teostamisel kui ka töö kirjutamise protsessis.

Soovin väljendada oma tänulikkust ka Indrek Saarele, kelle asjatundlikud soovitusel siiditrüki teemal olid hindamatu väärtusega. Samuti tänan Airiin Laanevälja, kes pakkus kasulikke nõuandeid bakalaureusetöö teksti koostamisel.

Lisaks ei saa mainimata jätta Naila Nasirovat, kes jagas lahkesti töös kasutatud Tris-puhvrit.

Lõpetuseks tahan tänada Darja Lavõginat, Jaak Nerutit ja Andra Rummi, kelle väärtuslik tagasiside õppeainete Loodusteadusliku meetodi seminar ja Lõputöö seminar raames aitas kaasa selle töö edukale valmimisele.

Infoleht

Lühikokkuvõte: Käesolevas töös demonstreeriti, et uudne osakestepõhine mikrofluidika võimaldab ühele kiibile kombineerida erinevaid materjale. See võimekus lubab ühel kiibil teostada mitu erinevat analüüsi sammu: analüütide eelkontsentreerimine, puhastamine ja kromatograafiline eraldus. Kiibi valmistamiseks kasutati siiditrükki. Täpsemalt demonstreeriti, et siiditrüki abil (1) on võimalik valmistada tselluloosiosakestest koosnev õhukese kihi kromatograafia plaat, mille toimimine tõestati aminohapete eraldamise abil, (2) saab trükkida silikageelist ja tugeva anioonvaheti osakestest koosneva kiibi aminohapete eelkontsentreerimiseks ja puhastamiseks, (3) on võimalik kaks eelnevat etappi ühendada, et valmistada kolmest eri materjalist koosnev kiip.

Märksõnad:

Osakestepõhine mikrofluidika, siiditrükk, kahemõõtmeline õhukese kihi kromatograafia, tahkefaasi ekstraktsioon, aminohapete analüüs, analüütiline keemia

CERCS kood: P300 Analüütiline keemia

Short summary: In this work, it was demonstrated that novel particle-based microfluidics enables the combination of different materials onto a single chip. This capability allows multiple analysis steps to be performed on one chip: pre-concentration, purification, and chromatographic separation of analytes. Silk screen printing was used for chip fabrication. More specifically, it was demonstrated that with silk screen printing: (1) it is possible to fabricate a thin-layer chromatography plates composed of cellulose particles, which was proven to function through the separation of amino acids, (2) it is possible to print a chip consisting of silica gel and strong anion exchange particles for pre-concentration and purification of amino acids, (3) it is possible to combine the two previous stages to fabricate a chip composed of three different materials.

Keywords: Particle-based microfluidics, Silk screen printing, Two-dimensional thin-layer chromatography, Solid-phase extraction, Amino acid analysis, Analytical chemistry

CERCS code: P300 Analytical chemistry

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Heili Aavola,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose Tahke faasi ja kromatograafilise eralduse kombineerimine osakestepõhisele mikrofluidika kiibile aminohapete määramiseks, mille juhendaja on Hanno Evard, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **24.05.2023** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Heili Aavola
24.05.2023