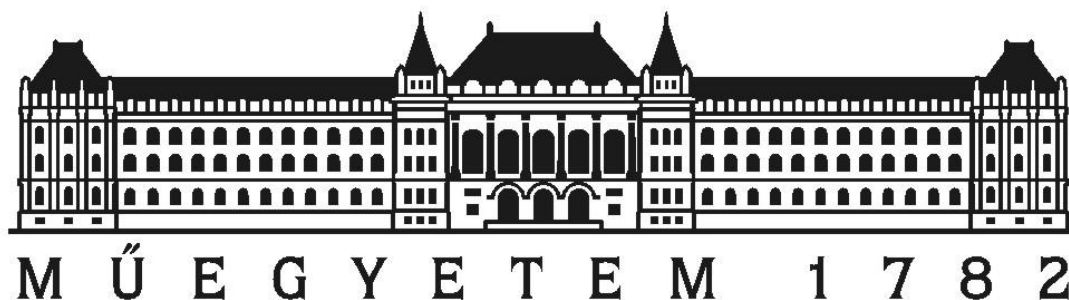




OTDK DOLGOZAT

NANOPIPETTA-ALAPÚ ÉRZÉKELŐK NANORÉSZECSEK SZÁMLÁLÁSÁRA

Készítette: Terejánszky István Péter, vegyészmérnöki MSc II. évf.

Témavezető: Dr. Gyurcsányi Ervin Róbert, egyetemi docens

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék
2012

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Témavezetőmnek az érdekes témaválasztást, a munka sikeréhez és a dolgozat megírásához hozzájáruló hasznos tanácsait és segítségét.

Köszönöm Jágerszki Gyulának a munka során felmerülő problémák megoldásához hozzájáruló ötleteit és önzetlen segítségét, valamint Makra Istvánnak a mérési eredményeim feldolgozását lehetővé tevő program elkészítését.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	2
Bevezetés.....	4
Irodalmi áttekintés.....	6
Részecske számlálás.....	6
A Coulter-számláló	6
Méretcsökkentés.....	7
A Coulter számlálás elméleti háttere.....	9
Részecske transzport kónuszos pórusokban.....	15
Nanopipetták egyenirányító hatása	19
Számlálás nanopipettával	22
Kísérleti munka	23
Alkalmazott műszerek.....	23
Nanopipetták készítése.....	23
Részecske számlálási kísérletek	23
Nanopipetták és nanorészecskék mikroszkópos vizsgálata	23
Nanorészecskék méretének és zétapotenciáljának mérése.....	23
Felhasznált anyagok	24
Alkalmazott módszerek.....	25
Nanopipetták készítése.....	25
Nanopipetták feltöltése.....	28
Nanopipetták karakterizálása	28
Részecske számlálási kísérletek	31
Részecskék SEM vizsgálata	34
Részecskék méretének és zéta-potenciáljának meghatározása	34
Eredmények és értékelésük	35
Részecske számlálás a Coulter elv alkalmazásával.....	35
Mikrorészecskék számlálása	35
750 nm átmérőjű latex részecskék számlálása	39
750 nm-es és 2 μ m-es részecske keverék.....	41
330 nm átmérőjű nanorészecskék számlálása	43
110 nm-es átmérőjű latex nanorészecskék számlálása.....	46
67 nm átmérőjű nanorészecskék vizsgálata	49
67 és 110 nm-es részecskék megkülönböztetése.....	51
67 és 110 nm-es részecskék megkülönböztetése egyéb módszerekkel.....	54
Összefoglalás.....	56
Irodalomjegyzék.....	57
Függelék	60

Bevezetés

A nanoszerkezeteken alapuló meghatározásokat a bioanalitika legérzékenyebb módszerei között tartják számon.[1] Sok esetben lehetővé teszik az érzékelési folyamat molekuláris szintű kontrollját, és akár egyetlen molekula detektálásához szükséges érzékenységet. Ilyen tulajdonságokkal bírnak a nanopórusos érzékelők is, amelyek kifejlesztését egyrészt a sejtmembránba ágyazott ioncsatornák működési mechanizmusának megismerése, másrészt a Coulter számlálási elven alapuló vérsejtszámlálók inspirálták.[2] A Coulter elven alapuló nanopórusos érzékelés lényege, hogy egy nanopórus által körbehatárolt rendkívül kis pórustérfogat összemérhető a vizsgálandó makromolekulák és nanorészecskék méretével. Így ezek bekerülése a pórusba jelentős mértékben meg tudja változtatni a pórusban levő oldat fizikai-kémiai tulajdonságait, pl. elektromos vezetését vagy törésmutatóját.[3-4] Az elektrokémiai kiolvasás esetében a póruson áthaladó komponensek a térfogatukkal megegyező, nagy vezetőségű elektrolitot kiszorítva a pórusból tranziens pórusellenállás növekedést, karakterisztikus áram pulzusokat eredményeznek. Ezeknek a pulzusoknak a frekvenciája a részecske koncentrációval, míg az amplitúdójuk a részecskék méretével arányos. Ennek az elvnek megfelelően a nanopórusok alkalmasak akár egyedi molekulák és nanorészecskék detektálására.

Jelenleg a nanopórusos érzékelés fejlesztésének fő hajtóerejét a DNS szálak ultragyors szekvenálásának lehetősége képezi. Ezt a fejlesztést Kasianowicz 1996-ban tett felfedezése indította el miszerint biológiai eredetű fehérje nanopórusok alkalmasak DNS szálak detektálására.[5] Munkája során egyszálú DNS láncok elektroforetikus átvitelét valósította meg a kb. 1.5 nm átmérőjű protein pórusokon keresztül, amely később lehetőséget adott egyedi DNS szálak hosszának és másodlagos szerkezetének vizsgálatára[6], illetve legújabban az alkotó bázisok azonosítására.[7] A biológiai nanopórusok instabilitása, az egy bázis felbontás biztosítása, illetve az egy molekula szintű méréseknél fellépő sztochasztikus fluktuációk rendkívüli nehézségeket jelentenek a DNS szekvenálás gyakorlati körülmények közötti megvalósítására.[6]

Ugyanakkor egy nagyságrenddel nagyobb átmérőjű pórusok már szintetikus úton, reprodukálhatóan előállíthatók és ezekkel elvileg lehetőség nyílik biológiai és szintetikus eredetű nanorészecskék meghatározására és karakterizálására, amely még gyerekcipőben járó rendkívül perspektivikus terület.

Ezen a kutatási területen Kutatócsoportunk fő célkitűzése vírusok szelektív meghatározása. A nanopórusos érzékelés által nyújtott inherens méretszelektivitás azonban nem elegendő komplex közegekben vírusok szelektív meghatározására és ez érvényes az oldatban szuszpendált nanorészecskék méretének meghatározására leggyakrabban alkalmazott dinamikus fényszórás elvén alapuló rendszerekre is. Ráadásul ezeknek a készülékeknek további hátránya, hogy költségesek, nehezen miniaturizálhatóak, csak viszonylag nagy koncentrációk mérésére alkalmasak és komplex mintákban nem használhatók. Ezek a hátrányok nem lépnek fel a nanopórusos érzékelők esetében, mert ezek egyedi részecskéket mérnek. A szelektív számlálás biztosításának érdekében Kutatócsoportunk egy új elvet vezetett be, amelynek lényege, hogy a „passzív” nanopórusokat, ún. „aktív” nanopórusokkal helyettesíti, azaz a vizsgált komponens és a pórus között szelektív kölcsönhatás jön létre. Ezeknek az aktív nanopórusos számlálóknak a kifejlesztése, amely a Bill&Melinda Gates alapítvány támogatását élvezi, képezi Kutatócsoportunk hosszú távú célját. Ennek a komplex projektnek az alapja a megfelelő szintetikus nanopórusok kifejlesztése, amelyek lehetőséget nyújtanak a 100 nm alatti részecskék számlálására és méreteloszlásuk meghatározására.

Kutatómunkám célja ezeknek a szintetikus nanopórusos számlálóknak a kifejlesztése és tesztelése volt modellként alkalmazott polimer nanorészecskék méretének és koncentrációjának meghatározására.

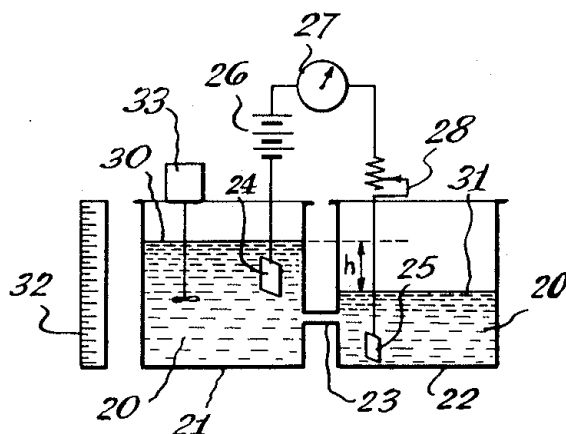
A szilárdtest nanopórusok előállítására alkalmas módszerek többsége rendkívül költséges és időigényes nanofabrikációs technológiákat alkalmaz.[8-9] Ennek megfelelően további feladatom volt a nanopórusok előállítására egy költséghatékony és gyors módszer kidolgozása, amely kompatibilis a későbbi alkalmazással. Így esett választásunk a kvarc nanopipettákra, amelyeket kvarc kapillárisok mikroprocesszor kontrollált lézeres húzásával állítottam elő. Bár ez a megközelítés kézenfekvőnek tűnik, nem volt szakirodalmi előzménye a nanorészecskék méreteloszlásának és koncentrációjának meghatározására kvarc nanopipettákkal. Munkámat a nagyobb részecskék számlálására alkalmas mikropipetták előállításával kezdtem, amely során lehetőség nyílt optikai mikroszkópiával vizualizálni a számlálás során a mért jelekhez tartozó jelenségeket a mikropipetta környezetében. Ezeket a tapasztalatokat terjesztettem ki a nanorészecskék jellemzésére alkalmas érzékelők kifejlesztésére.

Irodalmi áttekintés

Részecske számlálás

A Coulter-számláló

A hagyományos Coulter-számláló elektrolitban szuszpendált részecskék számlálását teszi lehetővé.[10] A Coulter számlálók esetében két elektrolittal feltöltött térfélt egy elektromosan szigetelő membránnal választanak szét, amelyben - a kereskedelmi készülékek esetében - tipikusan egy 20 mikrométer átmérőjű hengeres alakú pórus van kialakítva. A két oldattérbe helyezett elektród segítségével állandó ionáramot generálnak a póruson keresztül. Amennyiben az elektrolit oldatban a pórus átmérővel összehasonlítható, de annál kisebb méretű részecskék találhatók, akkor ezek is bekerülhetnek a pórusba és ezáltal az ionáram csökkenését okozzák. Ennek egyszerűsített magyarázata, hogy a szigetelő részecskék a térfogatukkal megegyező elektrolit mennyiséget szorítanak ki, ezáltal megnövelik a pórus ellenállását. A gyakorlatban a részecskéket nyomáskülönbség segítségével áramoltatják át a póruson keresztül a minta térfélből a referencia térbe. Az eredeti Coulter számláló berendezés sematikus rajzát az 1. ábra mutatja be. Jól látható, hogy a szuszpenziót hidrosztatikus nyomáskülönbség áramoltatja a póruson keresztül. Az első generációs készülékek az állandó ionáram fenntartásához szükséges feszültség impulzusokat detektálták az egyes részecskék áthaladásakor. Újabban azonban állandó feszültség alkalmazása mellett a részecskék áthaladása által okozott áramimpulzusokat detektálják.



1. ábra: Az eredeti Coulter-számláló sematikus ábrája, 23-assal jelölve az apertúrát, melyen a részecske szuszpenziót keresztüláramoltatják.[10]

Elvileg a különböző nyílások az átmérőikhez képest kb. 2-60%-os átmérőjű részecskék detektálására alkalmasak. A kereskedelmi forgalomban kapható számlálók legnagyobb alkalmazási területét a vér alakos elemeinek számlálása képezi, amely forradalmasította a korábban zömmel mikroszkópiás technikákat alkalmazó hematológiát és lehetővé tették a manuális, időigényes műveletek kiváltását viszonylag olcsó és automatizált rendszerekkel. Ezek a készülékek általában egy 20 mikrométer átmérőjű pórust/nyílást tartalmaznak, amely az elsődleges sejtszámlálási alkalmazások mérettartományára lett kifejlesztve. Így a kereskedelmi Coulter elven alapuló készülékek kimutatása határa kb. 0,4 μm és legfeljebb 1,6 μm átmérőjű részecskék számlását teszi lehetővé.[3] A Coulter számlálók nagy előnye, hogy a mért elektromos jel nem függ a részecske színétől (fényelnyelési tulajdonságaitól), törésmutatójától, alakjától és összetételétől.

Ugyanakkor a Coulter számlálókat alkalmazzák különböző egyéb pl. környezeti és élelmiszermintákban található sejtek, részecskék számlálására is. A széleskörű alkalmazás szemléltetésére egy pár példa: tengeri mikroorganizmusok analízise[11], ipari szűrések hatékonyságának vizsgálata, baktériumok méretének[12] és koncentrációjának (növekedésének), meghatározása, illetve porszenyyeződés, pollen, mikrobuborékok[13] és csiszoló anyagok jellemzésére.

Méretcsökkentés

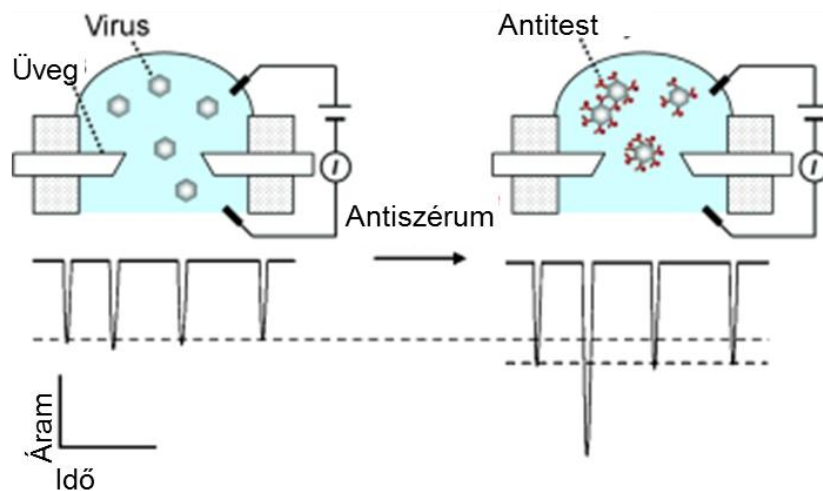
A kereskedelmi Coulter számlálók viszonylag nagy laboratóriumi készülékek annak ellenére, hogy tulajdonképpen az elektrokémiai és fluidikai rendszer miniatürizálásának nincs elvi akadálya. Ennek megfelelően jelentős erőfeszítések történtek miniatürizált, mikrofluidikai Coulter számlálók kifejlesztésére, amelynek a hajtóereje a minta térfogatának csökkentése, illetve a hordozható, olcsó készülékek széleskörű alkalmazhatósága.[14]

A nagy elvi áttörést azonban nem a fluidikai rendszer és/vagy az elektródok miniatürizálása jelenti különböző mikrofabricációs technológiák alkalmazásával, hanem a pórusok méretének csökkentése. Tekintettel, hogy a Coulter-számláló az alkalmazott pórus átmérőjének 2-60%-ának megfelelő átmérőjű részecskék analízisére alkalmas, a pórus méretének csökkentésével a detektálható részecskeméret-tartomány alsó határa akár molekuláris szintre is kiterjeszthető. Fontos kihangsúlyozni, hogy ez a kiterjesztés nem egy egyszerű méretcsökkenést jelent. A nanotartományban a számlált részecskék és a pórus felületének a hatása felértékelődik és olyan nanofluidikai jelenségekkel, illetve pórus-

részecske kölcsönhatásokkal kell számolni amelyek a mikrométeres tartományban nem fordulnak elő. [3]

A jelenleg használt legkisebb pórus az α -hemolizin fehérje, mely önrendeződéssel a lipid kettősrétegben egy 10 nm hosszú és legkeskenyebb keresztmetszetében 1,5 nm széles pórust képez. Ezt az egypórusú membránt helyezik két félcella közé és az adott feszültség hatására átfolyó áramot detektálják. [15] Ezen a póruson egy-szálú DNS és RNS molekulák elongált konformációban keresztül tudnak haladni,[5] ami alapot adott a DNS szekvenálásra alkalmas rendszerek fejlesztésére. A biológiai nanopórusos érzékelők alkalmazását azonban a lipid kettősréteg stabilitása korlátozza. Ennek áthidalására kerültek előtérbe a különböző szintetikus nanopórusok, melyek magukban hordozzák a gyakorlati alkalmazás lehetőségét. További előnyük, hogy sokkal nagyobb flexibilitást nyújtanak a pórus méretének és geometriájának beállítására. Figyelembe véve, hogy a jellemzően alkalmazott biológiai eredetű pórusok átmérője már annál is kisebb sem, hogy fehérjék áthaladását közvetlenül detektálni lehessen, tekintettel a dolgozat célkitűzésére a következőkben csak a szintetikus, szilárdtest nanopórusokkal végzett nanorészecske számlálási kísérleteket mutatom be.

Az első sikeres miniatürizálási kísérletet DeBlois és társai végezték, akik olyan szubmikronos, nyom-maratott, egyetlen 0,4 μm -es pórust tartalmazó membránokat készítettek, melyekkel különböző 100 nm körüli vírusok méretének jellemzését és koncentrációjának meghatározását tudták elvégezni. [16] A módszerrel a vírusokat, természetes állapotukban – fluidumban szuszpendálva – vizsgálhatták, ellentétben az elektronmikroszkópos módszerekkel. A DeBlois által javasolt Coulter-számláló a spektroszkópiai módszerekkel szemben akkor is használhatónak bizonyult vírusok vizsgálatánál, amikor a minta komponensek mérete kevéssé tért el, áthidalva a törmelékek és polidiszperzitás okozta problémákat. Érdekes módon DeBlois úttörő munkája után kevés erőfeszítés történt a szintetikus nanopórusok vírusok és egyéb nanorészecskék detektálására való alkalmazására. A következő számottevő kísérlet Uram és munkatársai nevéhez fűződik, akik egy 650 nanométer átmérőjű pórust alkalmaztak vírusszámlálásra.[17] Munkájuk jelentőségét az adja, hogy bebizonyították: ideális körülmények között a vírushoz antiszérumot adva, az antitest-vírus konjugátum jelentősen nagyobb árampulzus amplitúdót eredményezett az áthaladás során, mint amit a vírus számlálása során mértek (2. ábra). Ez tulajdonképpen lehetőséget ad vírusok szelektív meghatározására.



2. ábra: Szubmikronos nanopórusok alkalmazása vírusok szelektív számlálására. A vírusok burokfehérjéihez szelektíven kötődő antitestek jelentősen megnövelik az áthaladó vírus-antitest konjugátumok által okozott árampulzusok amplitúdóját.[17]

A Coulter számlálás elméleti háttere

A Coulter-számlálás elvi hátterét DeBlois kezdte kidolgozni, a Maxwell által szigetelő gömbök híg szuszpenziójára felírt úgynevezett effektív ellenállás (ρ_{eff}) segítségével. [18] Maxwell az effektív ellenállást a gömbök szuszpenzióbeli térfogathányadának sorfejtésével írta fel (1. egyenlet):

$$\rho_{\text{eff}} = \rho \left(1 + \frac{3f}{2} + \dots \right)$$

1. egyenlet: Maxwell sorfejtés a szuszpenzió effektív fajlagos ellenállásának definiálására.

L hosszúságú, D átmérőjű, ρ fajlagos ellenállású fluidummal töltött pórus ellenállása, ha $L \gg D$ (2. egyenlet):

$$R_1 = \frac{4\rho L}{\pi D^2}$$

2. egyenlet: A ρ fajlagos ellenállású fluidummal töltött pórus ellenállása.

Ha L és D összemérhető, akkor L -t $(L+0,8D)$ -vel kell helyettesíteni, hogy a belépési ellenállás miatt a pórus hosszát számolásnál korrigáljuk.

A pórusba bekerülő d átmérőjű gömb térfogathányada a pórushoz képest (3. egyenlet):

$$f = \frac{2d^3}{3D^2L}$$

3. egyenlet: a pórusban tartózkodó gömb és a pórus térfogatának hányadosa.

Az 1-3. egyenleteket felhasználva egy szigetelő gömböt tartalmazó pórus ellenállása:

$$R_2 = \frac{4\rho_{\text{eff}}L}{\pi D^2} = \left(\frac{4\rho L}{\pi D^2} \right) \left(1 + \frac{d^3}{D^2L} + \dots \right)$$

4. egyenlet: R_2 a pórus ellenállása a szigetelő gömb jelenlétében

Az 1-4. egyenletekkel a gömb által okozott ellenállás változás, ha a $d \ll D$ feltétel teljesül:

$$\Delta R = R_2 - R_1 = \frac{4\rho d^3}{\pi D^4}$$

5. egyenlet: A gömb által okozott ellenállás változás, d a gömb, D a pórus átmérője.

DeBlois ellenállás változást definiáló formuláját (5. egyenlet) Crooks és csoportja használta fel szén-nanocsöves Coulter-számlálójuk leírásához. [19] Amennyiben detektálható részecske nem tartózkodik a pórusban, ΔE_p feszültség alkalmazása esetén az áramerősség az alábbi képlettel fejezhető ki:

$$i_p = \frac{\kappa \pi d_p^2 \Delta E_p}{4(l_p + 0,8d_p)}$$

6. egyenlet: Alapvonalis áramerősség a pórusban. κ az elektrolit fajlagos vezetőképessége, d_p a pórus átmérője, l_p a pórus hossza, ΔE_p a membránpotenciál.

Figyelembe véve az ellenállás változást, a póruson áthaladó szférikus részecskék által okozott árampulzusokat az alábbi formula írja le:

$$\frac{\Delta i_p}{i_p} = S(d_p, d_s) \frac{d_s^3}{(1_p + 0,8d_p)d_p^2}$$

7. egyenlet: Részecske által okozott árampulzus. d_s a részecske átmérő, $S(d_p, d_s)$ korrekciós faktor (a pórus és a nanorészecske átmérőinek arányától függ) .

Az árampulzusok amplitúdóiból kiszámítható az áthaladó részecskék mérete. Látható, hogy a részecske átmérő kis változása is jelentős pulzus amplitúdó változást eredményez a köbös függés miatt.[20] Ez felhasználható polidiszperz részecske oldatokban az eltérő méretű komponensek megkülönböztetésére. [21]

A részecskék különböző anyagtranszport mechanizmussal haladhatnak át a póruson: hidrodinamikai, elektroforetikus, elektroosmotikus és diffúziós transzporttal. Ennek megfelelően a következő általános képlet írható fel az áthaladás sebességére figyelembe véve mind a négytípusú anyagtranszport hozzájárulását a részecske mozgására:

$$v_s = \frac{d_p^2}{32\eta l_p} \Delta P + \frac{\mu_s}{l_p} \Delta E_M - \frac{\varepsilon \zeta_p}{4\pi\eta l_p} \Delta E_M + \frac{D_s}{c_s l_p} \Delta c_s$$

8. egyenlet: részecske áthaladás sebessége: η és ε az elektrolit viszkozitása és dielektromos állandója, ζ_p a pórus falának zéta-potenciálja, μ_s és D_s a részecske elektroforetikus mobilitása és diffúzió állandója. A Δ -val jelölt tagok a részecske transzport hajtóerői, a nyomás-, a potenciál- és a koncentráció gradiensek.

A Coulter számlálók esetében a diffúziós tag elhanyagolható. A részecskék átlagos áthaladási sebességét meg lehet határozni az egyes pulzusok időtartamából (ennyi ideig tartózkodnak a pórusban), de meghatározható a részecske fluxus alapján is [19]:

$$v_s = \frac{4J_s}{\pi c_s d_p^2}$$

9. egyenlet: J_s a részecske fluxus, c_s a részecske koncentráció.

A 9. egyenlet érvényességét és alkalmazhatóságát vizsgálta Crooks és társa szén nanocső alapú számlálójával. [19] Munkájukban a részecske transzport elektroforetikus és hidrodinamikai aspektusait vizsgálták. A mért részecske fluxus (9. egyenlet) alapján kiszámították v_s értékét. Állandó feszültség mellett nyomás-változtatással a hidrodinamikai (1. tag), illetve állandó nyomáskülönbség mellett feszültség változtatással az elektroforetikus (2. tag) transzport komponens koeficiensét határozták meg. Mivel a szén nanocső falának nincsen töltése, így az elektroosmotikus tag elhagyható.

Később Crooks és társai egy hasonló, de jobb jel/zaj viszonyú szén nanocsőes számlálóval [22] felületi töltés és részecskeméret egyidejű meghatározására alkalmas számlálót publikáltak. A méret meghatározása az árampulzusok amplitúdójának mérésével, a 7. egyenlet megoldásával történik. Az általuk meghatározott átmérők jó egyezést mutattak saját transzmissziós elektronmikroszkópos és fényszórás méréseik eredményeivel valamint a gyártó által megadott értékekkel. [23]

A felületi töltés a részecske átmérőjének meghatározásával és jó időfelbontással mért pulzus szélesség (áthaladási idő) alapján számolható ki. Ehhez fel kell használni az elektroforetikus mobilitás definícióját és kapcsolatát a felületi töltéssel:

$$\mu = \left(\frac{l_p + 0,8d_p}{\Delta t} \right) \left(\frac{E_M}{l_p + 0,8d_p} \right) = \frac{Q}{2\pi\eta d_s (1 + d_s / 2d_D)}$$

10. egyenlet: Δt a részecske által okozott pulzus szélessége, d_D a Debye-hossz az adott ionerősségen.
 Q a részecske felületi töltése.

$$Q = \frac{2\pi\eta(l_p + 0,8d_p)^2 d_s (1 + d_s / 2d_D)}{E_M \Delta t}$$

11. egyenlet: Az elektroforetikus mobilitás kifejezései Q -ra rendezve. $E_M \equiv \Delta E_M$ (8. egyenlet)

A kísérleteik során kis és nagy töltéssűrűségű latex-részecskéket is használtak. Mindkét részecske átmérője kb. 60 nm; az egyik 120, a másik 24220 felületi karboxil-csoportot tartalmaz. Kis töltéssűrűség esetén az elméleti adatokkal jó egyezést kaptak, míg nagyszámú karboxil-csoport esetén másfél nagyságrenddel kisebb eredményt számoltak a megadottnál. Szigorú értelemben ezzel a módszerrel elektrokinetikus töltés határozható meg, melynek értékét a hidrodinamikai térfogatban található egyéb ionok töltései is befolyásolják.

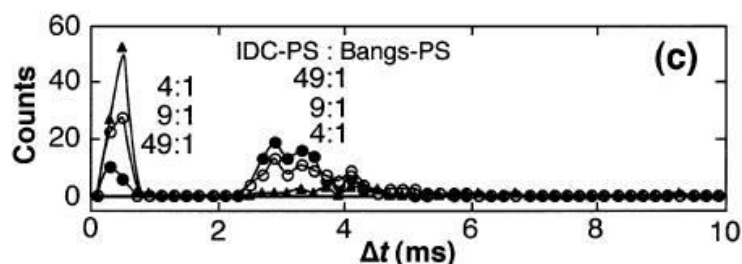
Ez és nagy töltéssűrűség esetén a Debye-Hückel közelítés érvénytelensége okozhatta az eltérést a 24220 karboxil-csoportot tartalmazó részecskék esetén.

A mért adatok nemcsak a részecske méretéről és felületi töltéséről hordoznak információt. Az úgy nevezett számlálási frekvenciából (a részecske fluxushoz köthető mennyiség) közvetlenül, kalibráció nélkül meghatározható a részecskék koncentrációja [22]. Amennyiben a domináns transzport mechanizmus elektroforetikus, akkor az alábbi egyenlet alapján történhet:

$$J_s = \frac{\pi d_p^2}{4} \frac{\mu E_M}{l_p + 0,8d_p} C_s$$

12. egyenlet: J_s a számlálási frekvencia, E_M a potenciálkülönbség a pórus két oldalán, μ az elektroforetikus mobilitás, C_s a részecske koncentráció.

Egymás mellett számlálva a kis és nagy töltéssűrűségű részecskéket, a módszer alkalmasnak bizonyult a részecskék megkülönböztetésére a pulzus szélességek alapján.



3. ábra: Különböző töltésű részecskék áthaladási idejeinek eloszlása. [22]

Mivel a transzportfolyamat elektroforetikus komponense domináns, a nagyobb elektrokinetikus töltésű részecskék haladnak át gyorsabban. A részecske koncentráció arányokat úgy állították be, hogy az összkoncentráció megegyezzen az egyrészecskés számlálásoknál beállítottnál (5×10^{11} db/mL). A 3. ábrán IDC-PS-sel jelölték a kis töltéssűrűségű részecskét, a koncentráció arányok eszerint értelmezendők.

Amennyiben a részecskék között nincs kölcsönhatás az alábbi egyenlettel adható meg a teljes számlálási frekvenciára: ($J_{s,\text{total}}$)

$$J_{s,\text{total}} = \frac{C_{s,1}}{C_{s,0}} J_{s,1} + \frac{C_{s,2}}{C_{s,0}} J_{s,2}$$

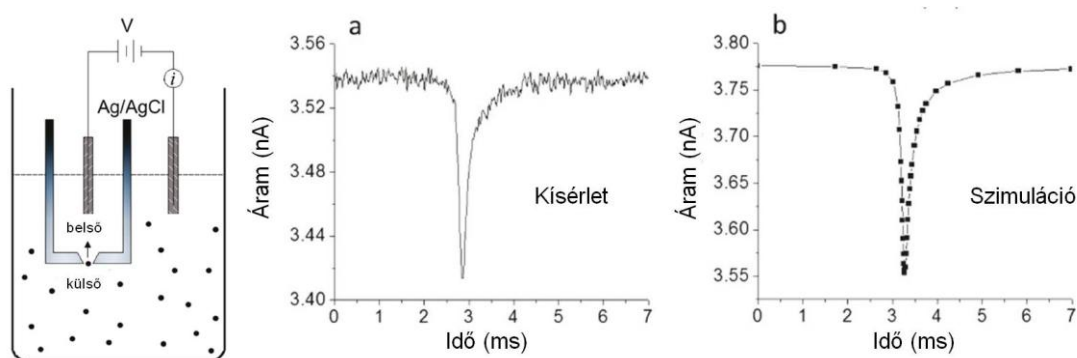
13. egyenlet: $C_{s,1}$ $C_{s,2}$ a részecskék koncentrációi, $J_{s,1}$ $J_{s,2}$ a számlálási frekvenciáik 5×10^{11} db/mL-es oldatukban.
 $C_{s,0}$ az összkoncentráció a keverékben. ($C_{s,1} + C_{s,2}$)

Eszerint a számlálási frekvencia lineárisan függ az egyes komponensek móltörtjeitől. Ezt az összefüggést kísérleteikkel igazolták az összeállított részecske keverékekre.

DNS-molekulák elemzésekor a számlálási frekvencia növekedését eredményezte a póruson keresztül sógrádiens létrehozása. A transzportot elősegítette, amikor a molekulák a kisebb ionkoncentráció felől a nagyobb felé haladtak át a póruson, fordított esetben gátolta. Ezzel az úgynevezett elektrosztatikus fókuszálással növelhető a számlálási frekvencia.[24]

Részecske transzport kónuszos pórusokban

Az irodalomban nagyon kevés a fellelhető cikk ilyen aszimmetrikus geometriájú pórusokkal kialakított Coulter-elvű számlálókról. White és társai nem rég közzétették kísérleteiket [25], amelynek során kónuszos pórusokkal számláltak nanorészecskéket. Az alkalmazott üvegporusok előállításának alapját egy előzőleg elektrolitikusan kihegyezett fém-szál üveg kapillárisba való olvasztása képezte hasonlóan a voltametriás mikroelektrodok készítése eljárásához. Ezt követően, az üvegfelesleget csiszolással eltávolították felszabadítva a fémhegy korong alakú keresztmetszetét, majd feloldották a fémhegyet a pórus kialakításához. A pórus átmérőt jelentősen befolyásolta az üvegfelesleg eltávolítása után az üvegcsiszolás leállításának ideje, mert minél tovább tartott a csiszolás annál nagyobb volt a fémhegy korong alakú keresztmetszetének átmérője, azaz a pórus átmérője. Kísérleteik során kb. 240 nm sugarú, azaz 480 nm átmérőjű pórusral vizsgálták a 160 és 320 nm átmérőjű polisztirol részecskéket. A méréseik során a részecskéket elektroforetikus mozgatták keresztül a póruson. 0,01 M-os KCl elektrolitot alkalmaztak, mert nagyobb ionerősségnél túlzottan lecsökkent a részecskék ζ -potenciálja. COMSOL programban véges-elem szimulációval tengely szimmetriát feltételezve kiszámolták a kónusz alakú pórusban detektálható aszimmetrikus jelek alakját:



4. ábra: A mérési elrendezés, a kónuszos pórusban detektált és szimulációval számolt jelalak összevetése. [25]

Látható, hogy a pulzusalak (4. ábra) logikailag megfelel a kísérleti elrendezésnek, azaz a részecskék a kónusz keskenyebb végébe lépnek be, és az érzékelő zónát a szélesedő vége felé haladva hagyják el, vagyis a külső oldatból haladnak a belső oldat és a munka elektród felé. A szilanizáló szerekkel módosított üvegmembrán nanopórusának falát semleges töltésűnek tekintették. Kiszámították az ion fluxust és az elektromos mezőt a pórus nyílásában „részecskementes” állapotban. Ezután a részecskét Δz lépésként átvitték a póruson, minden

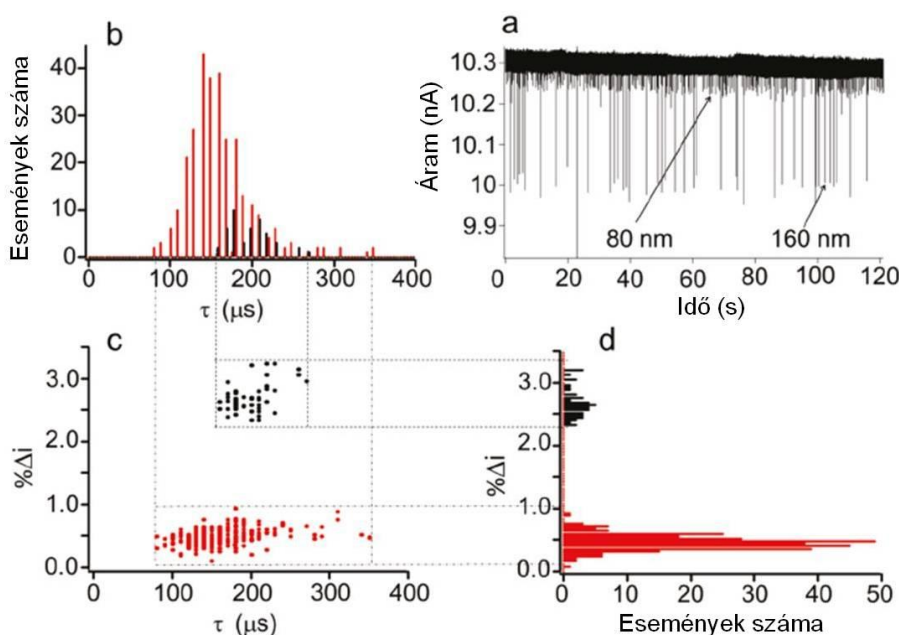
pontban kiszámítva a megfelelő ionfluxust. Így egy részecske helyétől függő árampulzust kaptak.

$$\mu = \frac{v}{E}$$

14. egyenlet: Töltött részecske migrációja elektromos térben. v és E a helyfüggő részecske sebesség és elektromos térerő, μ a részecske elektroforetikus mobilitása.

A részecske elektroforetikus mobilitását ζ -potenciál mérések eredményeiből számolták, az elektromos térerőt a szimulációk alapján határozták meg. Így megkapták a részecske sebességét, mint helyfüggvényt, ezzel pedig meghatározták az időfüggő áramjelet (4. ábra). A kísérleti és szimulált jelek amplitúdóinak eltérését a szimuláció során alkalmazott egyszerűsítő feltételeknek tulajdonították. A pórus falát semleges töltésűnek tekintették, és feltételezték, hogy a részecske felületi töltése nem befolyásolja a pórus vezetését.

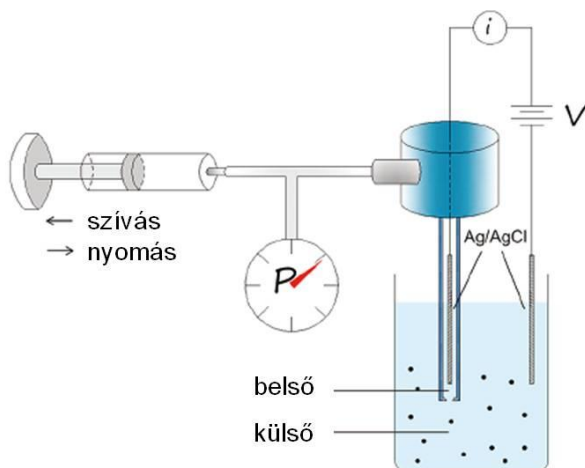
Végeztek kísérleteket 230 nm sugarú üveg nanopórus membránnal 80 és 160 nm rádiuszú, azaz 160 és 320 nm átmérőjű részecske keverékek számlálására. A keverékben a kisebb részecske koncentrációja 1×10^9 db/mL, a nagyobbé 1×10^8 db/mL:



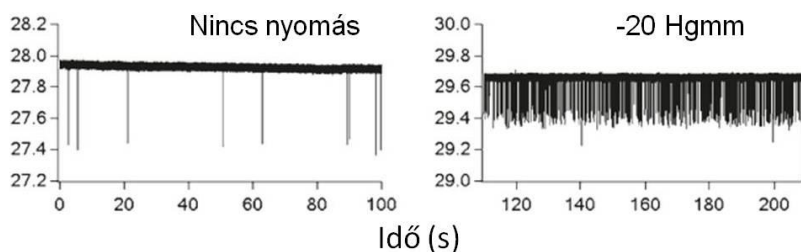
5. ábra: (a) Áram-idő görbe a keverék mérésekor 600 mV feszültségen. (b) Az áthaladási idők hisztogramja. (c) 2D hisztogram a százalékos áramcsökkenés és áthaladási idő ábrázolásával. (d) Pulzus-amplitúdó hisztogram.[25]

Az 5. ábrán pirossal jelölték a 160 és feketével a 320 nm átmérőjű részecskék jeleit. A kisebb részecskék gyorsabban haladnak és kisebb pulzust okoznak. Látható, hogy a különböző méretű részecskék okozta jelek jól elkülönülő csoportokban jelennek meg a hisztogramon, így a részecskék méretének és koncentrációjának meghatározását is lehetővé teszi a kónuszos alakú Coulter-számláló.

White és társai alig egy éve publikáltak egy másik tanulmányt [26], amelyben a nyomás vezérelt részecske transzport-jelenséget tanulmányozták. 210 nm sugarú (420 nm átmérőjű) pórusban tanulmányozták 120 nm sugarú részecskék ($\varnothing = 240$ nm) konvektív transzportját. A mérések során 0,1 M-os KCl-ban dolgoztak az elektroforetikus transzport minimalizálása érdekében (részecskék ζ -potenciálja csökken):



6. ábra: Mérési elrendezés a nyomás szabályzására alkalmas kísérlet esetén.[26]

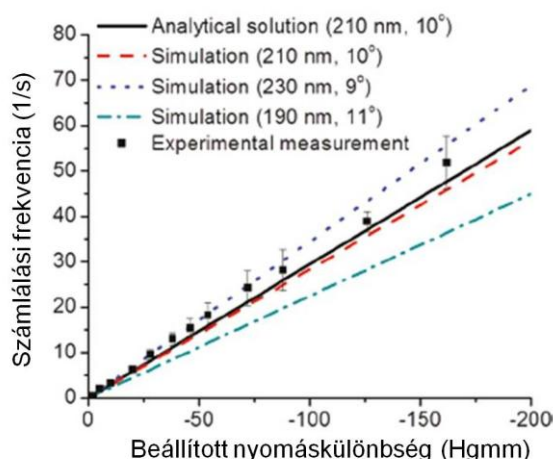


7. ábra: Nyomás alkalmazásának hatása a részecske transzportra. A - irány az oldat belső térbe áramlását eredményező nyomáscsökkenést jelent. A membránpotenciál 200 mV, munkaelektrod a belső oldatban.[26]

Nyomásmentes állapotban a részecskék transzportja elektroforetikus és diffúziós mechanizmusból eredhet (7. ábra). A szívás (6. ábra) növelése, az átáramló oldat (ezáltal részecskék) mennyiségét befolyásolja. Ez a mért alapvonal áramerősséget is megnöveli, mert az ionok gyorsabban áramlanak keresztül az érzékelő zónán. A jobb oldali görbén a jelek amplitúdói a műszer alul-áteresztő szűrője miatt csökkentek le.

Ebben a publikációban szintén véges-elemes módszerrel szimulálták a részecske transzportot a póruson keresztül (COMSOL). A szimulációs modellezésen kívül analitikusan is megoldották a problémát, a Hagen-Poiseulle egyenlet kónuszos pórusra megoldásával.

A szimuláció és az analitikus megoldás részletes ismertetésétől ehelyütt eltekintve az alábbi eredményt kapták:

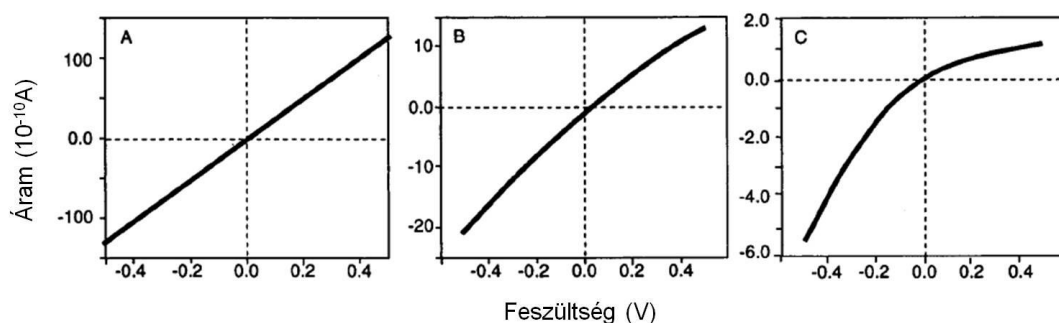


8. ábra: Az analitikus megoldás, a szimulációk és a kísérleti eredmények összehasonlítása.[26]

A 3 féle szimuláció (8. ábra) elvégzésének oka, hogy kónuszos pórus esetén a térfogatáram nyomásfüggésének meghatározásánál számít a kúp félszöge, ezt változtatták az egyes számításoknál. A lineáris számlálási frekvencia – nyomáskülönbség összefüggés oka, hogy a részecske transzportot főleg az elektrolit konvektív áramlása befolyásolja. Az oldat átlagos sebessége egyenesen arányos a beállított nyomáskülönbséggel. A számlálási frekvenciát a térfogatáram és a részecske koncentráció szorzataként kapták meg az analitikai megoldás és a szimulációk során.

Nanopipetták egyenirányító hatása

Korábban felmerült, hogy kis átmérőjű nanopórusok használatakor különleges nanofluidikai jelenségekkel kell számolni. Erre példa az 1997-ben Bard és társai által a nanopipetták esetében tapasztalt rektifikálási (egyenirányítású) effektus. [27] Nanopipetta elektródokkal végzett méréseik során nem lineáris áram-feszültség összefüggést tapasztaltak kisebb ionerősségek esetén. (9. ábra) Mivel az áramot a pórus ellenállása határozza meg, ezért a makroszkópikus rendszerek analógiájára ohmikus viselkedést vártak, ugyanis ez a jelenség nem tapasztalható mikropipetták esetén, ahol lineáris I-E karakterisztikát tapasztaltak.

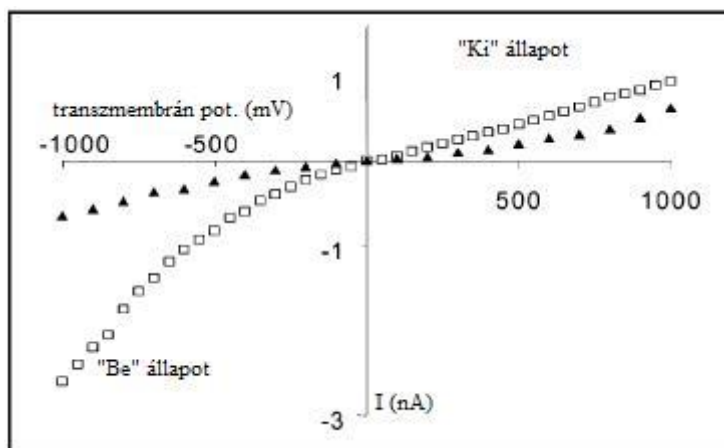


9. ábra: Ciklikus voltametriás görbék: 1; 0,1 és 0,01 M KCl elektrolitban. A feszültség tengelyt a belső Ag/AgCl szálon mérhető potenciálnak kell tekinteni a külső, ugyanolyan koncentrációjú KCl oldatba merülő Ag/AgCl referencia-elektrodhoz képest.[27]

A 9. ábrán látható, hogy töményebb, 1M-os KCl oldatot használva az egyenirányító hatás nem jelentkezik, ugyanakkor tized mólos oldat esetén már jellegzetes a hatás, ami század mólos elektrolit esetében tovább erősödik. A jelenség hátterében az áll, hogy a kvarc nanopipetta belső fala negatív töltésű (a kvarc nanopipetták fala semlegeshez közeli pH-n negatív töltésű, a felületi szilanol-csoportok deprotonálódása miatt) és ennek megfelelően egy elektromos kettős réteg alakul ki a pórus belsejében. A rektifikáló hatás akkor alakul ki a kónikus alakú nanopipetta pórusok esetében, amikor a pipetta átmérője és az elektromos kettősréteg vastagsága (Debye-hossz) hasonló mérettartományba esik. Ebben az esetben a nanopórus kation permszelektivitással rendelkezik, azaz a nanopóruson keresztüli iontranszportot döntően kationok biztosítják. A permszelektivitás még nem eredményez önmagában nem-lineáris karakterisztikát. Ugyanakkor a nanopipetták aszimmetrikus kónikus geometriája eltérő kation transzportot biztosít az elektród polaritás függvényében. A jelenség intuitív magyarázata, hogy pozitívan polarizált nanopipetta elektród esetében a kálium kiáramlás egy

folyamatosan szűkülő térből történik a külső oldatba, míg negatív polarizáció esetén a káliumionok hemiszférikus diffúzióval jutnak be egy táguló keresztmetszetű térbe. Az utóbbi sokkal hatékonyabb transzportot, ezáltal nagyobb áramszintet biztosít, mint az ellentétes polarizáció esetében.

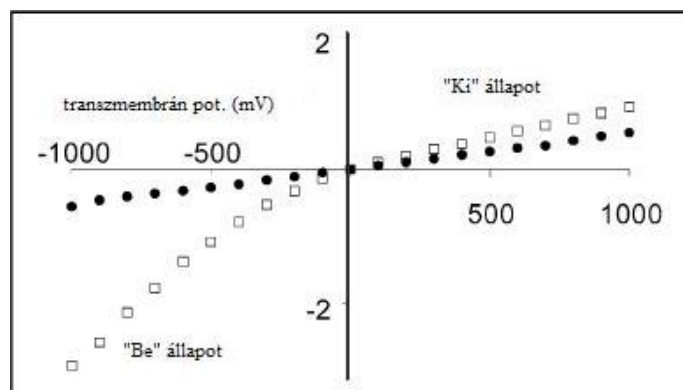
Martin és társai publikáltak egy tanulmányt, [28] melyben a felületi töltés jelentőségét az egyenirányító hatásra egyértelműen bizonyították. A méréshez kónuszos Au-nanocsövet használtak. A pórus kisebbik átmérője 10 nm, így alkalmas esetben rektifikáló hatás tapasztalható. Az Au-nanocsövet két, ugyanolyan oldatrészletbe merülő Ag/AgCl elektród közé helyezték. A ráadott feszültséget, a nanopipettás kísérlethez hasonlóan, a pórus kisebb átmérőjű oldalán lévő referencia elektróddal szemben a másik oldalon található elektród-potenciáljaként kell értelmezni. A méréseket 0,1 M KCl és 0,1 M KF elektrolitban végezték el.(10. ábra)



10. ábra: I-V görbék 0,1 M KCl-ban ($\square$) és 0,1 M KF-ban ($\blacktriangle$).[28]

KCl-ban a nanopórus ionrektifikáló tulajdonsággal rendelkezik, de KF-ban nem. A fluoridionok nem adszorbeálódnak az arany felületen, de a Cl^- ionok igen, adszorbeált állapotban is egyszeres negatív töltéssel. Ez arra utal, hogy a negatív töltésű felületnek szerepe van az aszimmetrikus áram-feszültség karakterisztika kialakulásában.

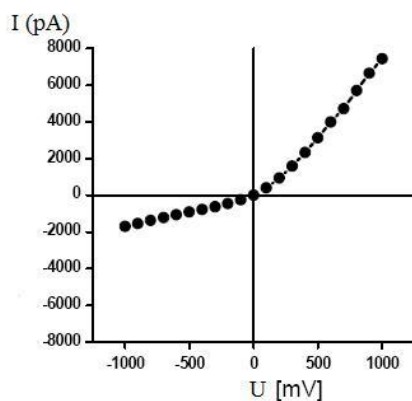
Hogy igazolják a felületi töltés szerepét hasonló kísérletet végeztek olyan arany nanocsővel, melynek felületén tiolos merkaptopropion-savat kemisorbeáltak. Itt 0,1 M KF-ban, két beállított pH értéken, protonált és deprotonált COOH-csoportok jelenlétében nézték meg az ionrektifikáló hatást. (11. ábra)



11. ábra: I-V görbék 0,1 M KF-dal töltött, 2-merkaptopropionsavval módosított arany pórusokban.
A jelölések: □ pH = 6,6 és ● pH = 3,5.[28]

Látható, hogy a savcsoport deprotonálódása következtében a pórus fala negatív töltésű lesz és ionrektifikáló hatás tapasztalható. Alacsonyabb pH-n a disszociáció visszaszorul és nem lesz felületi töltés.

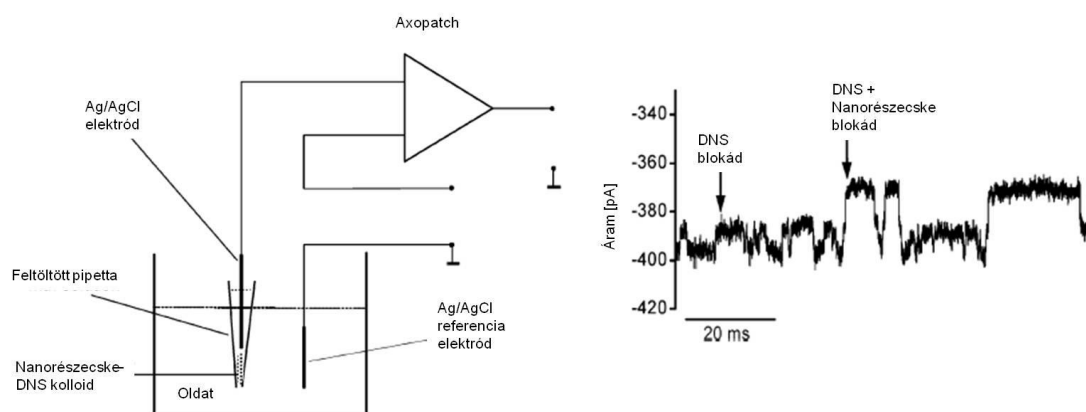
A nanopipetták és más kónikus pórusok egyenirányító jelenségét illetve a rektifikálás mértékét befolyásoló tényezőket az utóbbi időben igen sokat vizsgálták. [29-31] A pipetta falának módosításával Umehara és társai fordított irányban rektifikált áramot mértek.(12. ábra) [32]



12. ábra: Poli-L-lizinnel módosított pipetta, a protonált amin-csoportok megfordítják az egyenirányítást.

Számlálás nanopipettával

Karhanek és társai publikálták az egyetlen fellelhető tanulmányt, [33] melyben nanopipettát részecske számlálásra használnak. 24 bázisból álló, tiol-módosított DNS láncukat 10 nm-es arany nanorészecske felületéhez rögzítették. 10-100 mM KCl oldatot töltöttek a pipetta belsejébe és ebbe a belső oldatba helyezték a nanorészecskéket is. A pipetta egy kis térfogatú cellába merült, melyet a pipettába töltött oldattal megegyező koncentrációjú KCl elektrolittal töltöttek fel:



13. ábra: A mérési elrendezés, illetve néhány pipetta blokkolási esemény alakja az áram-idő görbén.

Érdekes, hogy White-ék mérésével [25,26] ellentétben nem háromszög alakú, hanem négyszög pulzusokat tapasztaltak kónuszos pórus esetén. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy a mérések erősen kvalitatív jellegűek és nem történt kísérlet koncentrációfüggő számlálások kivitelezésére.

A nanopipetták használata előnyösebb más planáris membránokban előállított nanopórusoknál[33] abban a tekintetben, hogy:

- a pipetta csúcs feltöltéséhez szükséges hosszirányú nyomással szemben rendkívül ellenálló,
- az előállításukhoz egy viszonylag olcsó lézeres húzó kell és a nanopipetta gyorsan, egy lépésben elkészíthető,
- az apertúra mérete tetszőlegesen változtatható a húzáskor alkalmazott paraméterek beállításával.

Kísérleti munka

Alkalmazott műszerek

Nanopipetták készítése

A nanopipettákat, amelyeket a kísérletekben használtam P-2000 Micropipette Puller-rel (Sutter Ins. Co.) készítettem. A P-2000 CO₂-lézerrel felszerelt, mikroprocesszor vezérelt készülék, amely különböző átmérőjű pipetták húzására alkalmas.

A kísérletekhez felhasznált nanopipettákat Q(F)100-70-7,5 jelölésű kvarc kapillárisokból (Sutter Ins. Co.) készítettem.

Részecske számlálási kísérletek

A részecskék számlálásához és a nanopipetták karakterizálásához Gamry Reference 600 potenciosztót használtam. A kísérleteket az elektronikus zaj csökkentésének érdekében Faraday-kalitkában végeztem.

A kísérletek során alkalmazott nyomáskülönbségeket vízzel töltött U-csöves manométerrel mértem és fecskendő dugattyúval szabályoztam. A folyadék kis mennyiségű festékanyagot tartalmazott a könnyebb láthatóság és egyszerűbb leolvashatóság érdekében. A kísérletek egy részénél higannyal töltött manométert használtam.

Nanopipetták és nanorészecskék mikroszkópos vizsgálata

A képalkotó vizsgálatokat a Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetben pásztázó elektronmikroszkóp felhasználásával végeztem. A téremissziós elektronmikroszkóp típusa: **Zeiss-SMT LEO 1540 XB SEM**

Nanorészecskék méretének és zétapotenciáljának mérése

A részecskék hidrodinamikai méretét és zétapotenciálját a Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetben, Zetasizer Nano (Malvern Ins. Ltd.) készülékkel határoztam meg.

Felhasznált anyagok

KCl (analitikai tisztaságú, Riedel de Hën)

KOH (Siegfried AG)

Triton X-100 (Merck)

Polybead Carboxylate 2 μm (meghatározott méret: 2,14 μm Polysciences Inc.)

Polybead Carboxylate 0,75 μm (meghatározott méret: 0,75 μm Polysciences Inc.)

CML latex 0,3 μm (meghatározott méret: 0,33 μm Invitrogen)

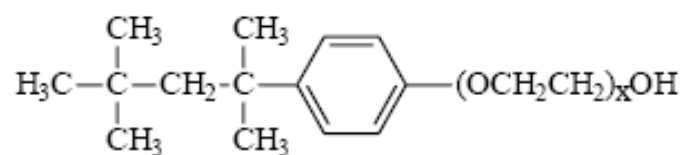
CML latex 0,1 μm (meghatározott méret: 0,11 μm Invitrogen)

Aldehyde/Sulfate latex 0,1 μm (meghatározott méret: 0,12 μm Invitrogen)

CML latex 0,06 μm (meghatározott méret: 0,067 μm Invitrogen)

A felhasznált oldatok készítéséhez Millipore (18,2 M Ω) tisztaságú vizet használtam.

Triton X-100 szerkezeti képlet:



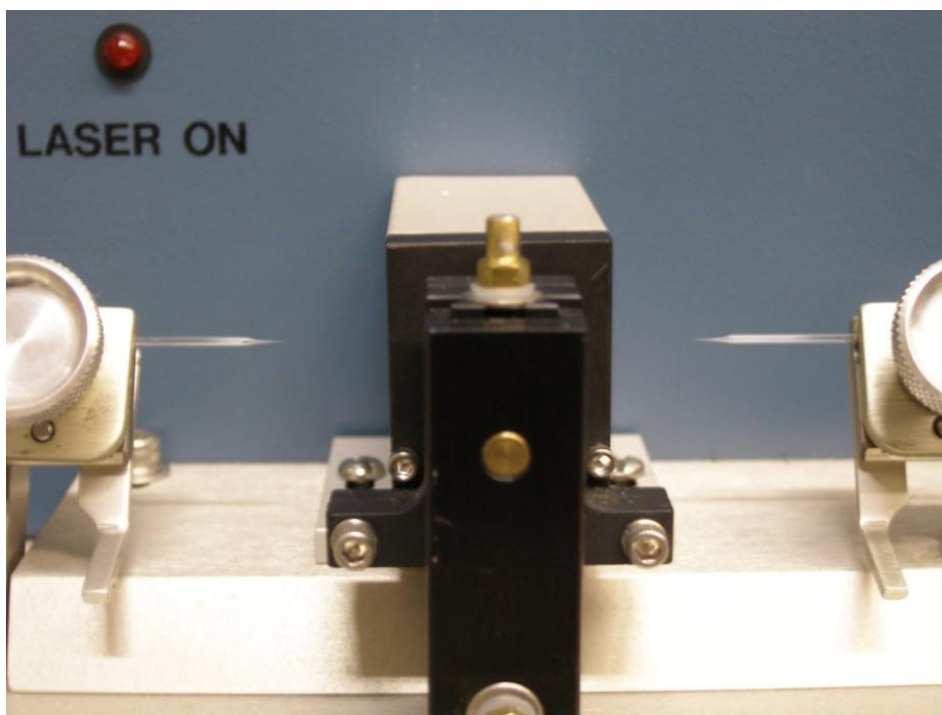
Alkalmazott módszerek

Nanopipetták készítése

A munkám során felhasznált nanopipettákat a már korábban említett Sutter P-2000 pipettahúzó berendezéssel készítettem. A mikroprocesszor vezérelt készülék CO₂-lézerének nagy előnye, hogy energia kibocsátása miatt kvarc kapillárisok használatára – meghúzására is alkalmas.[34]

A kísérletek során felhasznált mikropipettákat Q100-70-7,5 kvarc kapillárisból, a nanopipettákat QF100-70-7,5 jelölésű kvarc kapillárisokból állítottam elő. A QF kapilláris tartalmaz egy, a hossza mentén végighúzódnó, a majdani pipetta feltöltését megkönnyítő nedvesítő szálát. A kapillárisok 1 mm külső, 0,7 mm belső átmérőjűek, hosszuk 7,5 cm. A felhasználni kívánt kapillárisok külső falát a húzás előtt, etanollal átítatott, szálmentes papírral áttöröltem, hogy az esetleges szennyeződésekeltávolítsam.

A készüléket használat előtt 15 perccel be kell kapcsolni a lézer felmelegedése és minél kisebb szórású energiaközlése érdekében. A kapillárisokat a készülék befogóival kell rögzíteni, majd a biztonsági fedél lecsukása után a megfelelő húzóprogramot végre lehet hajtani.



14. ábra: A pipetta húzó készülék és két elkészített nanopipetta [35]

A húzásokat 5 különböző paraméter alapján hajtja végre a készülék. A beállítások változtatásával különböző átmérőjű és geometriájú pipettákat készíthetünk. A kapillárisokat a készülék lézerrel megvilágítja-olvasztja, majd adott időpillanatban a befogók segítségével szétrántja, az anyag elszakad és kialakul a pipetta geometriája.

A húzás 5 paramétere: [34]

- *Heat*: (0-999) Ez a paraméter a lézerfény intenzitását, az átadott energia mennyiségét szabályozza.
- *Filament*: (0-15) A lézer által a kapilláris hossza mentén pásztázott tartomány méretét állítja be.
- *Velocity*: (0-255) A kapilláris kezdetben hosszirányú terhelésnek van kitéve, amely a hőmérsékletének emelkedésével, a kvarc meglágyulása következtében, annak megnyúlását (*initial pull*) eredményezi. A viszkozitás csökkenésével a nyúlás sebessége növekszik, bizonyos értéket (*Velocity*) elérve a fűtés kikapcsol.
- *Delay*: (0-255) Ez a paraméter a fűtés kikapcsolása és a szétrántás közti időt szabályozza. Ha *Delay* > 128 akkor a rántás a lézer deaktiválása után következik be, ha nem akkor a lézer kikapcsolása előtt.
- *Pull*: (0-255) A rántás (*hard pull*) erősségét szabályozza. Minél nagyobb a beállított érték a rántás annál erősebb lesz, a húzott pipetta csúcs átmérője pedig kisebb. Legalább 10 egységnyi változtatás eredményez szignifikáns hatást az átmérő méretében.

A P-2000 memóriájában a gyártó által készített pipettahúzó programok vannak a felhasználás megkönnyítésére. A készülék egy- és két- (vagy akár több) soros programok végrehajtására képes. Egysoros programok esetén a készülék adott beállításokkal végrehajtja a húzást, azaz egy felfűtéssel és rántással kialakul a pipetta végleges geometriája. Kétsoros műveletnél, az első lépésben a kapilláris elvékonyodik-nyúlik, majd a második lépésben szakad el és készül el a pipetta, ilyenkor két felfűtés és rántás történik, csak az első rántás nem eredményezi a kapilláris két részre szakadását. Szakdolgozatommal ellentétben ehhez a munkához két soros húzásokat alkalmaztam. [35]

A gyártó által javasolt, mikropipetta készítésére alkalmas alapprogramok:

prog	Heat	Filament	Velocity	Delay	Pull
52	700	4	55	132	55
~ 5-7 μm	800	4	30	129	40
prog	Heat	Filament	Velocity	Delay	Pull
53	700	4	55	132	55
~ 1-2 μm	800	4	25	129	10
prog	Heat	Filament	Velocity	Delay	Pull
54	750	4	55	132	55
< 1 μm	800	3	30	129	70

1. táblázat: A gyártó által beállított alpprogramok paraméterei különböző pipetták készítésére.

A fenti táblázatból látható, hogy melyik program milyen átmérőjű pipetták készítésére alkalmas. A munkám során ezeket az alpprogramokat használtam fel, a különböző részecskék számlálására alkalmas pipetták húzásához. Nanorészecskék számlálására alkalmas pipettákat az 54-es programmal illetve módosított paraméterű 54-es programokkal készítettem. A gyártó tájékoztatása szerint a *Pull*, tehát a rántás erősségét megszabó paraméter növelésével, amennyiben a többi értéket változatlanul tartjuk, egyre kisebb átmérőjű pipettacsúcsokat kapunk. Mivel ez a módosítás, akkor fejt ki hatását, amikor a kapilláris el is szakad, így a második sor *Pull* értékének változtatásával kaptam egyre kisebb pipettákat.

prog	Heat	Filament	Velocity	Delay	Pull
54	750	4	55	132	55
< 1 μm	800	3	30	129	70
prog	Heat	Filament	Velocity	Delay	Pull
P120	750	4	55	132	55
<< 1 μm	800	3	30	129	120
prog	Heat	Filament	Velocity	Delay	Pull
P150	750	4	55	132	55
<<< 1 μm	800	3	30	129	150

2. táblázat: A gyártó 54-es programja és a saját, módosított 54-es programjaim.

A sajátprogramokat P betűvel és az adott *Pull* számértékkel jelölöm a továbbiakban.

Nanopipetták feltöltése

A nanopipetták feltöltését alapvetően a szakdolgozatomban [35] már ismertetett módon, a 0,7 mm átmérőjű kapilláris rész felől, a mellékelt képen látható eszközökkel hajtottam végre:



15. ábra: A mikro és nanopipetták feltöltésére szolgáló eszközök.[35]

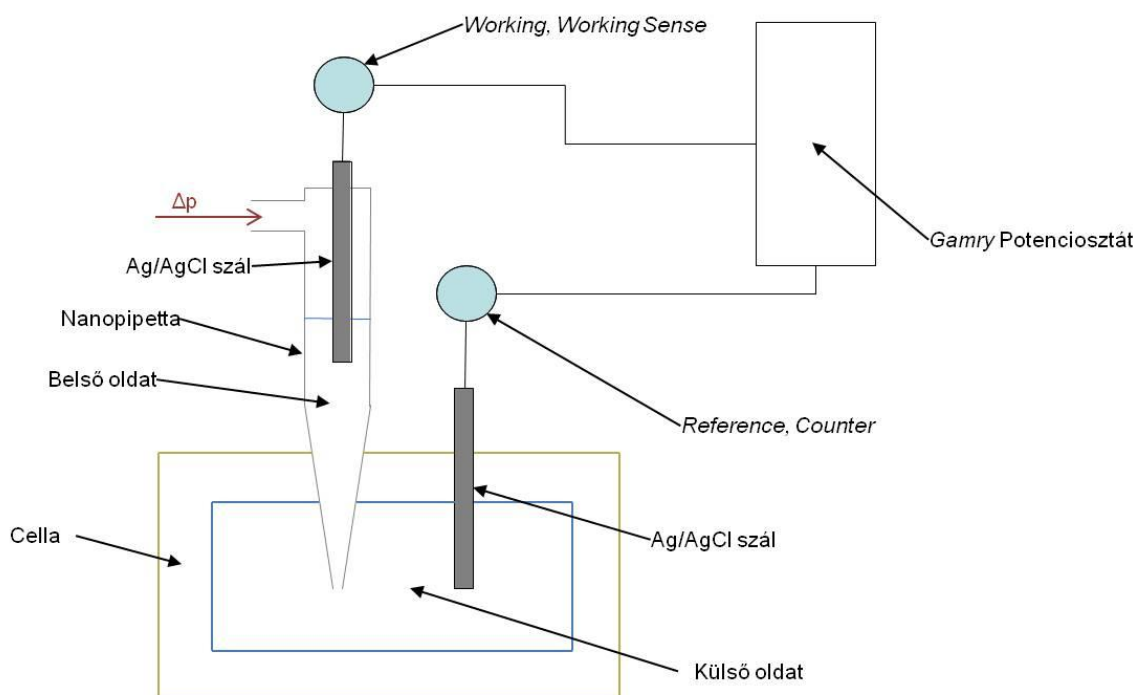
A dolgozatban bemutatott kísérletekben szereplő pipetták feltöltéséhez az alsó, szűrőfeltétet és GC-kapillárist integráló fecskendőt használtam. A szűrőfeltét 100 nm-es pórusokat tartalmazó membránlapot tartalmaz.

A mikropipetták Q jelű kapillárisból készültek, ezek bár nedvesítő szálát nem tartalmaznak, feltöltésük méretükből kifolyólag nem jelentett gondot, mert a kapilláris rész felől a folyadék kiszorította a csúcson keresztül az összeszűkülő hegyből a levegőt. Probléma merült fel azonban a nanopipetták esetén, ezért ezeket QF (filamentumos) kapillárisból készítettem. A folyadék a nedvesítő szál mentén eljut a pipetta hegyéig, majd idővel a csúcsba szorult levegő buborék formájában a kapilláris rész felől eltávolítható. Az elektrolithoz adott felületaktív anyag (Triton X-100) szintén segíti a mikro és nanopipetták feltöltését.

Nanopipetták karakterizálása

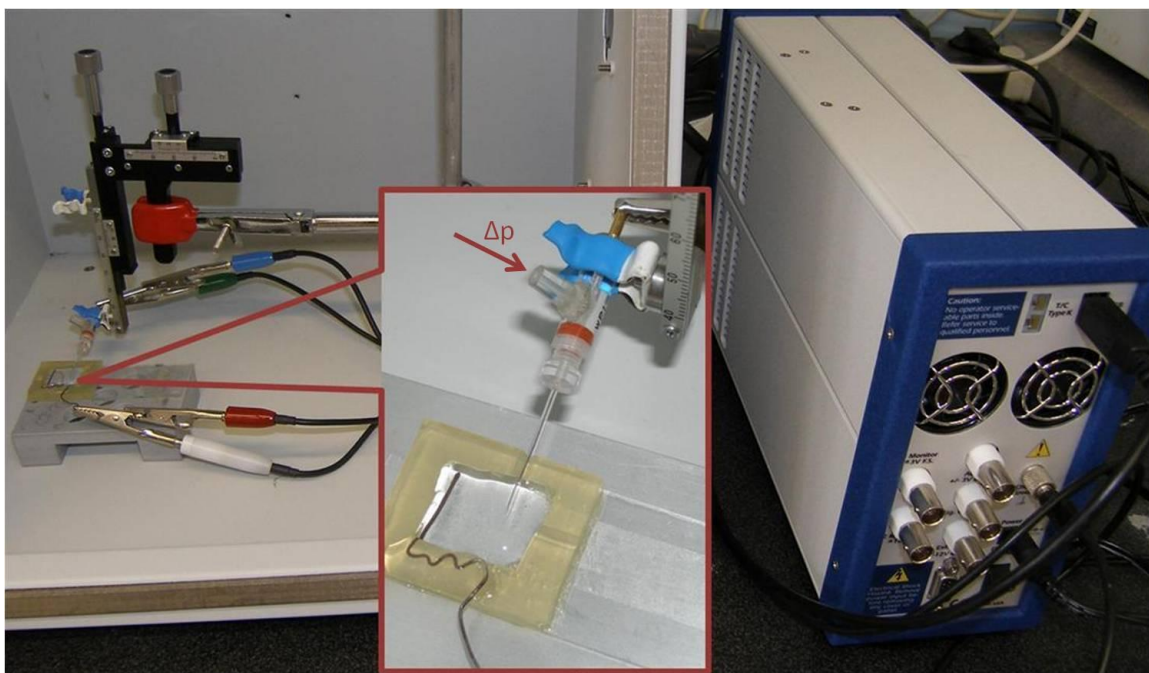
Az elkészített nanopipettákat karakterizálni kell, azaz meg kell állapítani, hogy a felhasználási célnak megfelelő méretű-e a pipetta csúcsának átmérője. Ez egy olyan elektrokémiai cella összeállításával valósítható meg, amelynek áramköre a pipetta csúcsán keresztül záródik. A nanopipetta érzékelő zónája méretéből kifolyólag egyértelműen definiálja, az Ag/AgCl referencia-elektrodok között mérhető ellenállást. Még a nagyobb részecskék meghatározására alkalmas 6 μm -es pipetták átmérője is 2 nagyságrenddel kisebb a kapilláris rész belső átmérőjénél (700 μm), ezért a pipetta csúcsában fog esni az ellenállás gyakorlatilag teljes, mérhető hányada.

Az elektrolittal feltöltött pipettát a pipetta-befogó (Pipette Holder, WPI, Inc.) Ag/AgCl-szálára húzom rá, így kapom meg a pipetta-elektródot. A pipetta-tartón van egy harmadik kivezetés, ezen keresztül lehet szabályozni a nyomást a pipetában lévő elektrolit felett. Az így elkészült pipetta-elektrodot közel vízszintes helyzetben merítettem egy, a kapillárisban lévő elektrolittal megegyező minőségű és ionerősségű külső oldatba, melybe egy másik Ag/AgCl-szál merül.



16. ábra: A nanopipetták karakterizálására használt kísérleti elrendezés blokkvázlata.
A cella felülnézetből van ábrázolva, a pipetta kb. -5° -kal hajlik el a vízszintes síktól.

A cella falán egy V keresztmetszetű bemetszésbe lehet beleengedni a pipetta kapilláris részét. A Gamry potenciosztát (16. ábra) kivezetéseit úgy csatlakoztattam az Ag-szálakhoz, hogy a pipetta-elektrod legyen munkaelektrodként, a külső oldatbeli pedig referenciaelektrodként kapcsolva. A cellába töltött 1 ml elektrolit ellepi a pipetta kapilláris részét is, az enyhe döntés és a pipetta hegyének szűkülése miatt természetesen a csúcsnyílást is. Így alakítható ki olyan elektrokémiai cella, melynek ellenállását a pipetta átmérője szabja meg. A pipetta vízszintes helyzetére a részecske számlálási kísérleteknél térek ki.



17. ábra: A számlálási kísérletek és a karakterizálás során alkalmazott kísérleti elrendezés fényképe. A nyíllal jelölt csatlakozóra lehet a nyomákszabályozó rendszert applikálni.

A pipetta ellenállásának és karakterisztikájának meghatározására munkám során impedancia-spektroszkópiát és ciklikus voltametriás méréstechnikát alkalmaztam. A CV mérés során áram-feszültség függvényt veszünk fel, a feszültség folyamatos változtatása mellett. Ez a lépés az irodalmi áttekintésben ismertett rektifikáló hatás szempontjából fontos. Amennyiben rektifikáló hatás nincs a pipetta ohmikus viselkedésű és ellenállása megegyezik az impedancia-spektroszkópiás mérés eredményével. A mért ellenállás alapján a pipetta átmérőjét becsülhetjük meg (15. egyenlet):

$$d_{\text{tip}} = \frac{4\rho l_{\text{tip}}}{\pi d_{\text{base}} R}$$

15. egyenlet: d_{tip} a csúcs átmérője, l_{tip} az érzékelő zóna hossza, d_{base} a kónikus alakú érzékelő zóna másik végének átmérője, ρ az elektrolit fajlagos ellenállása, R a mért ellenállás. [35]

Kihasználva a 15. egyenletben, hogy d_{tip} és R fordítottan arányos, a pipetta átmérő egy ismert ellenállású és méretű pipetta alapján becsülhető. (F1)

Az ellenállás mérés alapján tehát megállapítható, hogy az elkészült nanopipetta megfelel-e a részecske számlálási kísérlet méretfeltételének (kb. kétszer akkora, mint a számlálni kívánt részecske).

Részecske számlálási kísérletek

A tapasztalataim szerint számlálási kísérleteket lineáris áram-feszültség karakterisztikájú, ohmikus viselkedésű nanopipettákkal lehetett elvégezni. Amennyiben a pipetta karakterisztikája rektifikáló hatást mutatott, megpróbáltam az oldat ionerősségét, vagyis a KCl koncentrációt növelni. Ezzel a módszerrel a rektifikáló hatás megszüntethető, mivel a kettős réteg a pipetta negatívan töltött fala mentén elvékonyodik. Ez a módszer azonban véges alkalmazhatóságú a számlálandó nanorészecskék stabilitása miatt, ami az ionerősség növelésével jelentősen csökken.

A számlálási kísérletek során főleg karboxil-csoportokkal funkcionizált latex nano- (és mikro) részecskéket számláltam. Az optikai mikroszkóp alatt végzett 0,75 és 2 μm -es számlálások tapasztalatai alapján, a pipetta csúcsban kialakuló és eltömődést okozó aggregátumok keletkezését a pH lúgos tartományba állításával igen hatékonyan el lehet kerülni. 9-10-es pH érték mellett a részecskék felületi karboxil-csoportjai várhatóan teljes mértékben disszociált állapotban vannak. Hasonlóképpen a kvarc felületén található szilanol-csoportok deprotonálódása következtében a pipetta fala is negatív töltésű. Az így létrejövő erős elektrosztatikus taszító hatás miatt a részecskék adszorbeálódása a csúcs közelében meglehetősen kis valószínűséggel következik be. Amennyiben ennek ellenére is bekövetkezik a pipetta eltömődése, akkor a pipetta feletti nyomás növelésével, ami a dugattyú méretétől akár a külső nyomás kétszerese is lehet, az aggregátum az elektrolit áramoltatásával eltávolítható a pipetta csúcsából. A nagy számban disszociált karboxil-csoportok miatt a részecskék egymást is taszítják a létrejött negatív felületi töltés következtében. A kapillárisok feltöltésénél már említésre került Triton X-100 felületaktív anyag szintén a részecskék stabilitását növeli az elektrolit oldatban.

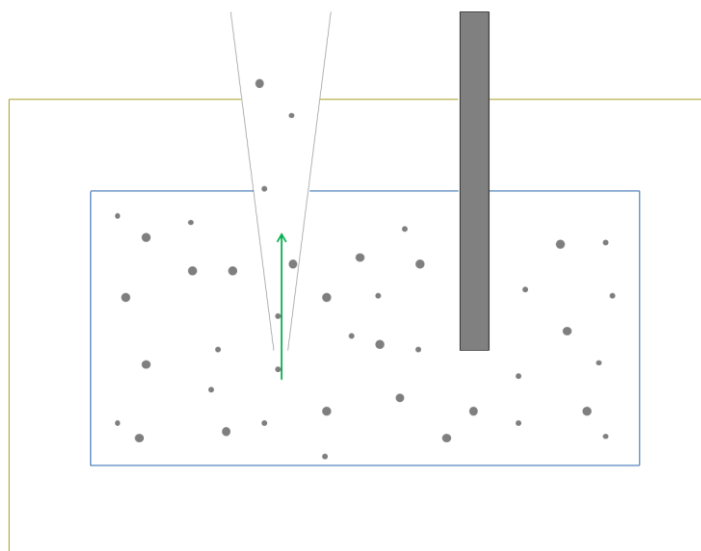
Ezen tapasztalatok alapján a pipetta feltöltése előtt az oldatok pH-ját 10-re állítottam. A felületaktív anyag 0,05 térfogatszázalékban volt jelen. Így a pipetta fecskendő feltöltése során elkerülhető az erős habzás, de a kapilláris falát jól nedvesíti az elektrolit-oldat.

Az alábbiakban összefoglalom a mérések során alkalmazott oldatösszetételt táblázatosan:

Oldat jellemző paraméter	Ionerősség, KCl koncentráció	Felületaktív anyagtartalom	pH	Részecske koncentráció
Mennyiség, vagy koncentráció	Jellemzően 0,01; 0,1 vagy 1 M	0,05 v/v %	10, értékre állítva a mérés előtt	db/mL egységben megadva

3. táblázat: Oldatösszetétel a kísérletekben.

A részecske számlálási kísérletek során a karakterizáláskor már bemutatott kísérleti elrendezést használtam:

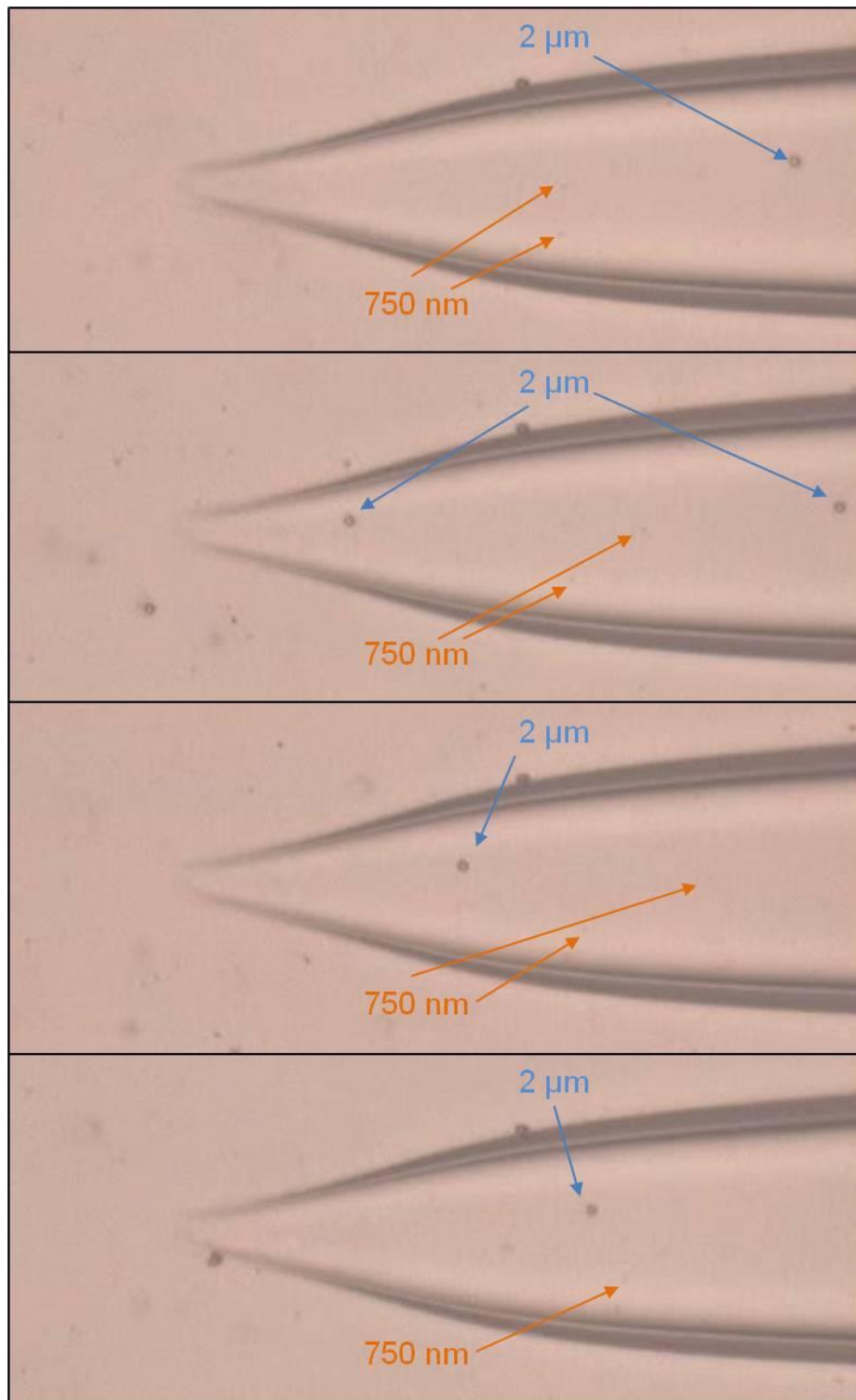


18. ábra: A részecske számlálási kísérletek során a részecskék a külső oldatból lépnek be a pipettába.

A részecskéket mindig a külső oldathoz adtam hozzá, majd elkevertem, hogy a részecske eloszlás minél homogénebb legyen. A kísérletek során úgy tapasztaltam, hogy a számlálások enyhe hidrosztatikai nyomáskülönbség biztosításával valósíthatók meg. A belső oldat felett csökkentettem a nyomást kb. 50-60 Pa egységgel a légköri nyomáshoz képest. ($\Delta p = -50$ Pa)

Mivel a részecskék negatív töltésűek, ezért a pipetta-elektrodra pozitív polaritású feszültséget kapcsoltam a külső oldatbeli referencia elektródhoz képest. A továbbiakban a cellafeszültségeket eszerint értelmezem. A mérések során konstans potenciál-különbséget alkalmaztam és kronoamperometriás technikával áram-idő görbéket vettem fel.

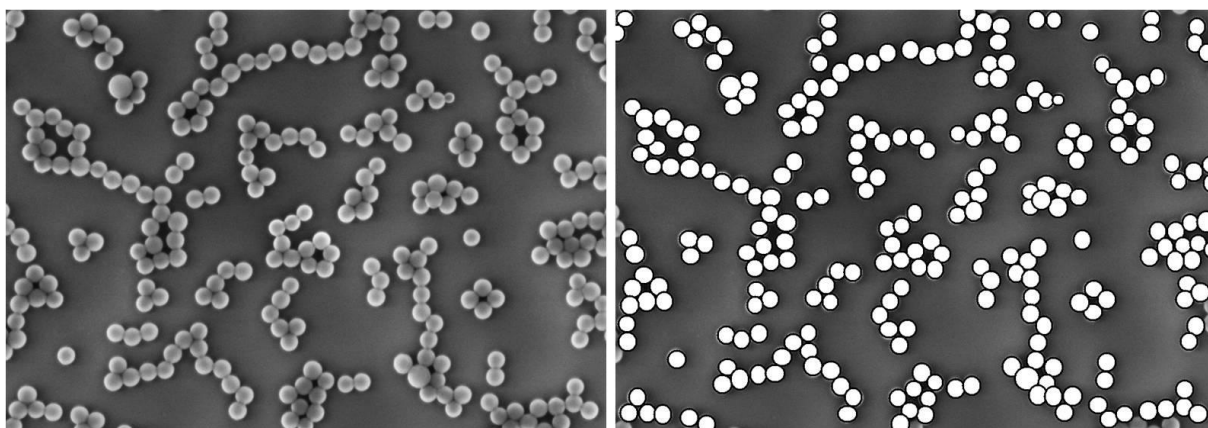
A munka kezdetén a 0,75 és 2 μm -es részecskék pipettán való áthaladását vizsgáltam optikai mikroszkóppal. A mikroszkóphoz csatlakoztatott kamerával készítettem felvételt a részecske keverék számlálásáról is (19. ábra):



19. ábra: 0,75 és 2 μm átmérőjű részecske áthaladása kb. 3,5 mikronos pipettán.

Részecskék SEM vizsgálata

A Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetben a számlálásra használt nanorészecskékről pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket is készítettem. A részecskék 3 μl térfogatú oldatát kb. 5x5 mm-es szilícium lapkákra szárítottam rá. A részecske koncentrációt úgy állítottam be, hogy a részecskék ne alkossanak összefüggő réteget a felületen a víz elpárolgása után. A részecskékről készült felvételeket *Mac Biophotonics ImageJ* programmal értékeltem ki. A programmal lehetőség van a részecskék méret szerinti eloszlásának ábrázolására is. A felvételek manipulációjára volt szükség, mert az összetapadt részecskék képét a program egyetlen, összefüggő alakzatként értékeli ki.



20. ábra: 110 nm-es részecskék SEM felvétele a kiértékeléshez szükséges manipuláció előtt és után.

Részecskék méretének és zéta-potenciáljának meghatározása

A részecskék elektrolit-oldatbeli tulajdonságainak megmérésére szintén az MFA-ban volt lehetőség. A készülékkel *Dinamic Light Scattering* (DLS) technikával lehet meghatározni a részecskék hidrodinamikai méretét. Összehasonlítandó a DLS és a Coulter-számláló teljesítőképességét, egymáshoz viszonylag közeli részecske-keverék mérését is elvégeztem ezzel a készülékkel.

A nanorészecske zéta-potenciálja fontos oldatbeli tulajdonság, mind stabilitás mind elektroforetikus mobilitás tekintetében. Minél nagyobb a részecske zéta-potenciálja, annál stabilabb az oldat és annál nagyobb az elektroforetikus mobilitás, ami a számlálhatóságnak kedvez.

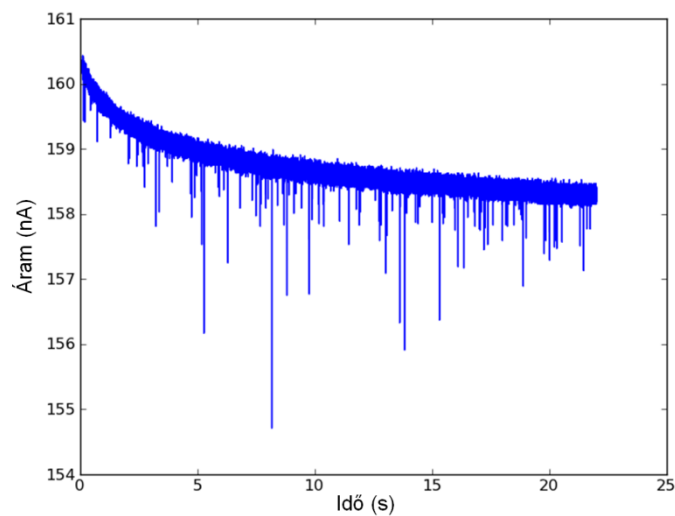
Eredmények és értékelésük

TDK-munkám során a kísérleteimet úgy terveztem, hogy kezdetben nagyobb optikai mikroszkóppal nyomon követhető 2 μm -es latex részecskékkel végzett kísérleteken keresztül megállapítsam az optimális kísérleti körülményeket, amelyeket később nanorészecske számlálások során alkalmazhatok. A továbbiakban fokozatosan csökkentettem a nanopipetta átmérőjét, hogy detektálhassam az egyre kisebb (750, 330, 110, 67 nm) átmérőjű karboxilezett latex nanogömböket. A mérési eredmények ismertetésénél az oldatparaméterek közül csak az elektrolit és a részecskék koncentrációját adom meg, a többi körülmény a 3. táblázatban részletezetteknek felel meg.

Részecske számlálás a Coulter elv alkalmazásával

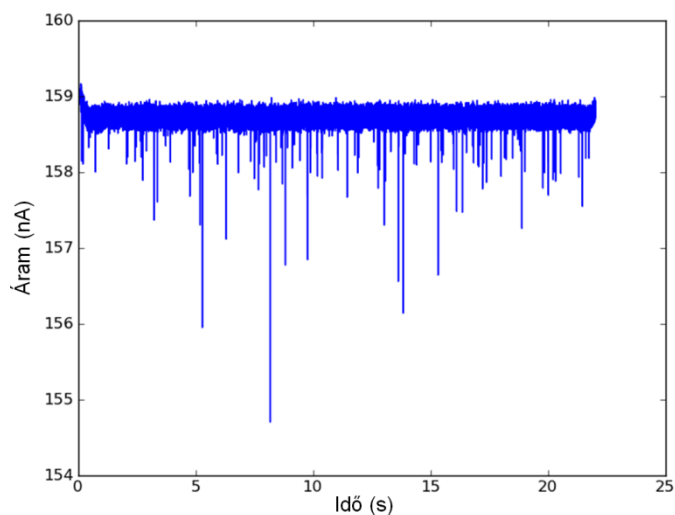
Mikrorészecskék számlálása

Munkám során a 2 μm átmérőjű részecskék számlálásához a kapilláris húzó készülék memóriájából az 52-es programot használtam, amelynek részleteit az 1. táblázatban ismertettem. Tapasztalataink alapján a programmal körülbelül 6 mikron átmérőjű mikropipettákat lehet készíteni. A készített pipetták és az alkalmazott mikrorészecskék méretét optikai mikroszkóppal határoztam meg a számlálási kísérlet előtt. Az optikai mikroszkópiás vizsgálat után a mikropipettákat kronoamperometriás üzemmódban 6×10^6 db/mL koncentrációjú részecskék számlálására alkalmaztam. A következő mérési sorban szemléltetni kívánom a számlálás során mért tipikus áramtranzienseket és ezek feldolgozási módját. Egy tipikus számlálási jelet mutat be a 21. ábra, amelyen jól látszanak a részecskék áthaladása által okozott árapulzusok. Az alkalmazott -600 Pa nyomáskülönbség arra utal, hogy a kísérlet során a külső mintaoldatot a póruson keresztül a pipetta belsejébe szívjuk.



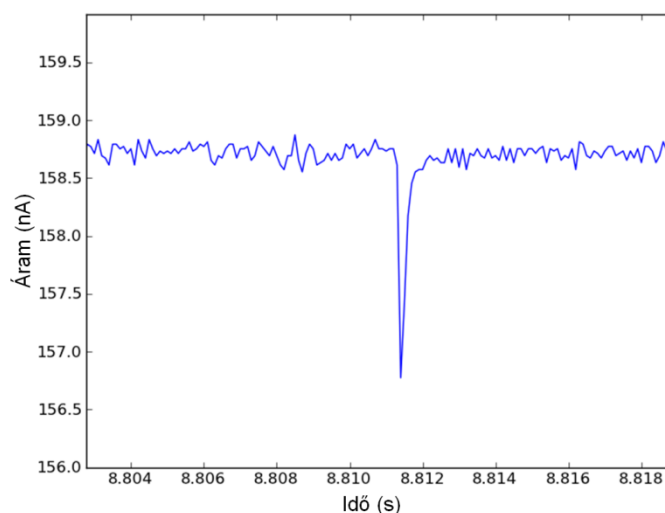
**21. ábra: A mérés során detektált áram-idő görbe. Minden csúcs egy mikrorészecske áthaladását jelenti.
A részecske koncentráció 6×10^6 db/mL 0,01 M KCl elektrolitban. Nyomáskülönbség – 600 Pa.
A cellafeszültség 400 mV, a mintavételi frekvencia 10 kHz (0,1 ms)**

Ugyanakkor jól látható az ebben a mérettartományban jelentkező kismértékű (kb. 100 pA/s) alapáram drift. A csúcsfelismerés elősegítésére az alapáram driftjét 2 Hz-es felül áteresztő szűrővel távolítottuk el a 22. ábrán bemutatott eredménnyel.



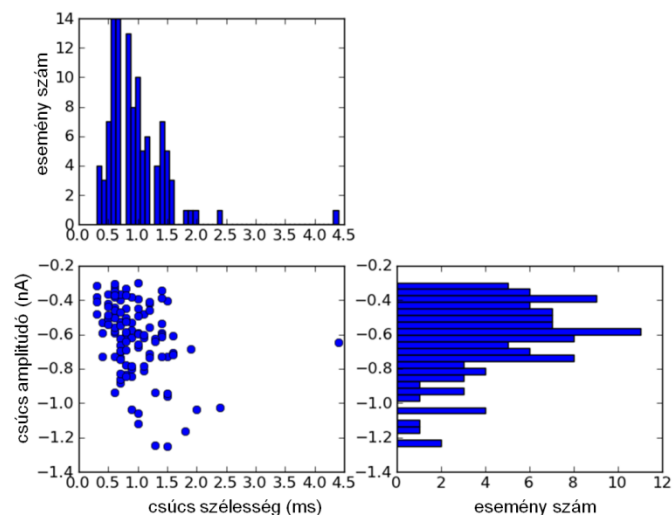
22. ábra: A számlálási áramjel alakja a 2 Hz-es felül áteresztő szűrő alkalmazása után.

Az optikai mikroszkópos felvételek azt mutatták, hogy az átlagos jel nagyságtól eltérő árampulzusok általában részecske aggregátumoktól vagy az oldatban jelenlevő egyéb „törmelékektől” származnak. Szintén okozhat eltérést, hogy ha részecskék túl gyorsan haladnak át az érzékelő zónán az alkalmazott mintavételi frekvenciához képest, így a mérés időbeni felbontása nem elég a csúcs amplitúdó pontos meghatározásához. A 21. ábrán látszik, hogy az árampulzus időtartama kevesebb, mint egy milliszekundum a kísérletben alkalmazott beállítások mellett. Ennek megfelelően 100 μ s adatvételi időt alkalmaztam a kísérletek során. Az áramimpulzusok megfeleltek a kónikus nanopórusoknál vártaknak a részecske haladás irányában. A nanopipetta belsejébe kerülő részecskék először a pórus legkisebb keresztmetszetén mennek át és itt okozzák a legnagyobb áramcsökkenést, majd a folyamatosan táguló keresztmetszetű pórusban haladva fokozatosan áll vissza az áramérték az alapszintre. Ez a trend megfordul amennyiben a nanopipetta belső oldalába helyezzük a nanorészecskéket és a póruson áthaladva a külső oldattérbe kerülnek.



23. ábra: A részecske áthaladása által okozott árampulzus alakja megfelel a kónusz alakú pórusban vártaknak és az áthaladási iránynak.

A kísérleti részben leírt csúcsfelismerő rutin meghatározza az áramimpulzusok jellemző paramétereit, így a pulzus amplitúdóját és időtartamát és ábrázolja ezek eloszlási hisztogramját. A két paraméter együttes kétdimenziós ábrázolása további lehetőséget ad a részecskék méretszerinti megkülönböztetésére.



24. ábra: a bemutatott mérési görbén látható csúcsok kiértékelése. A csúcs szélességek és csúcs amplitúdók hisztogramján kívül a program 2D hisztogramot is készít a csúcsok adataiból.

A kiértékelő program a csúcsok statisztikáját nemcsak grafikusán ábrázolja, hanem számszerűen is meghatározza a sokaság jellemzőit is, mely a bemutatott mérés során az alábbiak szerint alakul:

Csúcsok száma	Csúcs szélesség (ms)	szórás	Csúcs amplitúdó (pA)	szórás
108	0,96	$\pm 0,52$	-622	± 213

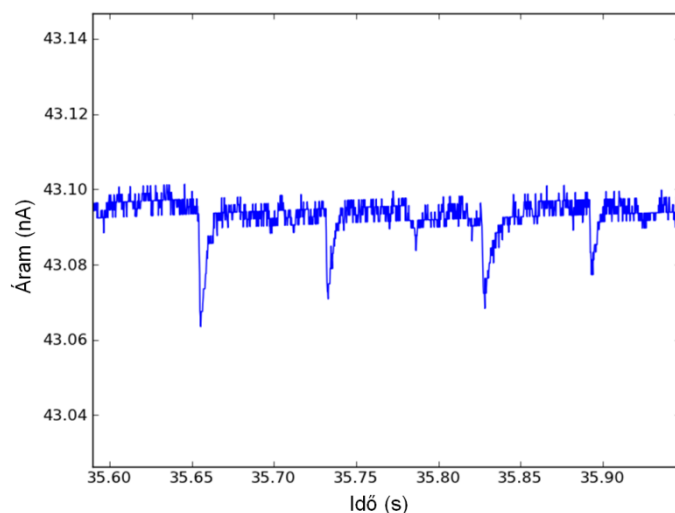
4. táblázat: A kiértékelő program által a méréshez (21. ábra) készített statisztikai adatok.

A részecske számláláshoz szükséges számlálási frekvencia a csúcsok számának és a mérési vagy adatgyűjtési idő hányadosaként adódik. A mérések során változtattam a cellafeszültséget, de úgy találtam, hogy ez a számlálási frekvenciát nem befolyásolja. A részecskék áthaladását döntő mértékben a hidrosztatikai nyomáskülönbség és ennek hatására fellépő oldatáramlás okozza.

A 2 μm -os részecskék méretükből kifolyólag ülepednek, így idővel koncentrációjuk a külső oldattérben változik. A szedimentáció miatt ezekkel a részecskékkel nem folytattam egyéb méréseket, csak a megfelelő kísérleti körülmények megtalálása volt a célom. Mivel leginkább a pipetta eltömődése jelent gondot, ezért ezeket a részecskéket elsősorban mikroszkópos megfigyelések céljából számláltam.

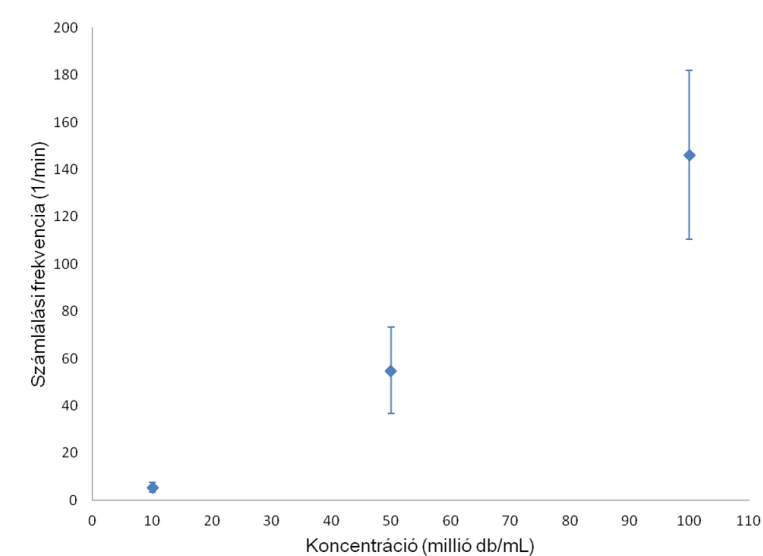
750 nm átmérőjű latex részecskék számlálása

A 750 nm-es részecskék számlálásához az 53-as gyári beállított programmal (1. táblázat) húzott mikropipettákat használtam. Ezzel a programmal 1-2 μm -es pipetták készíthetők.

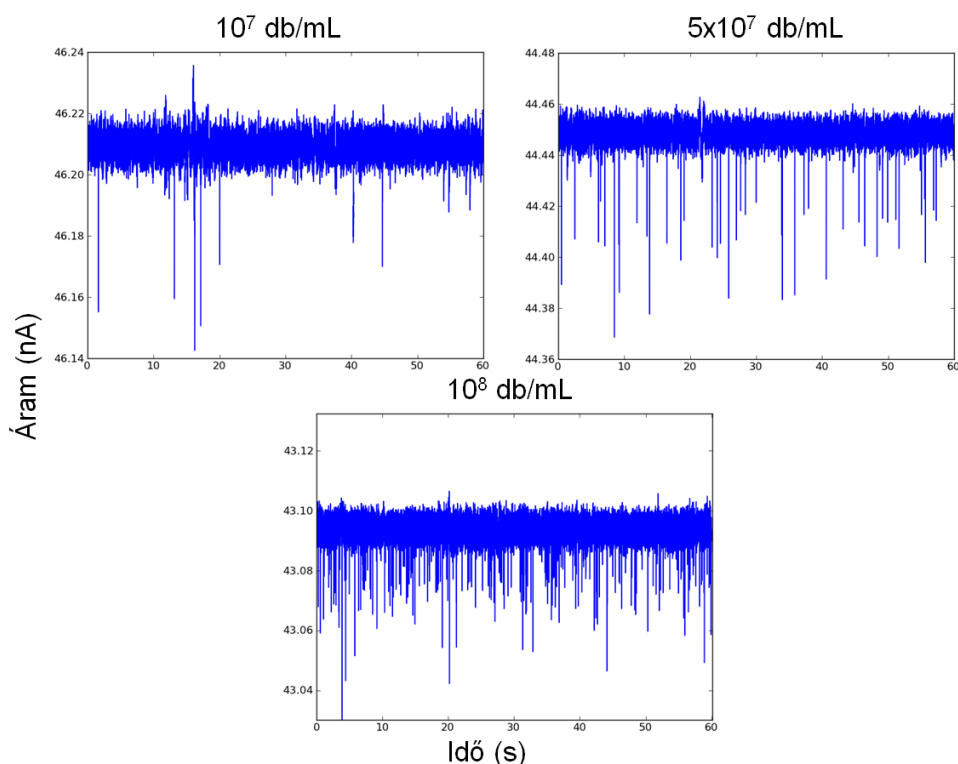


25. ábra: 750 nm átmérőjű részecskék jelei 0,01 M KCl-ban. Alkalmazott feszültség 600 mV, 4 kHz-es mintavételi frekvencia (0,25 ms). Alkalmazott nyomáskülönbség: -30 Pa.

A részecske áthaladás megfelelő sebességét optikai mikroszkóp alatt állítottam be a nyomás szabályozásával. Az 25. ábrán látható részecskék kisebb sebességgel haladnak át az érzékelő zónán, mint a 21. ábrán a mikrorészecske. (egy csúcs pulzus több pontból áll, adatvételi idő 250 μs , jobb felbontással mérhető a jelalak.)



26. ábra: A részecske koncentráció hatása a számlálási események előfordulási frekvenciára.



27. ábra: Különböző részecske koncentrációk esetében regisztrált áram-idő görbék.

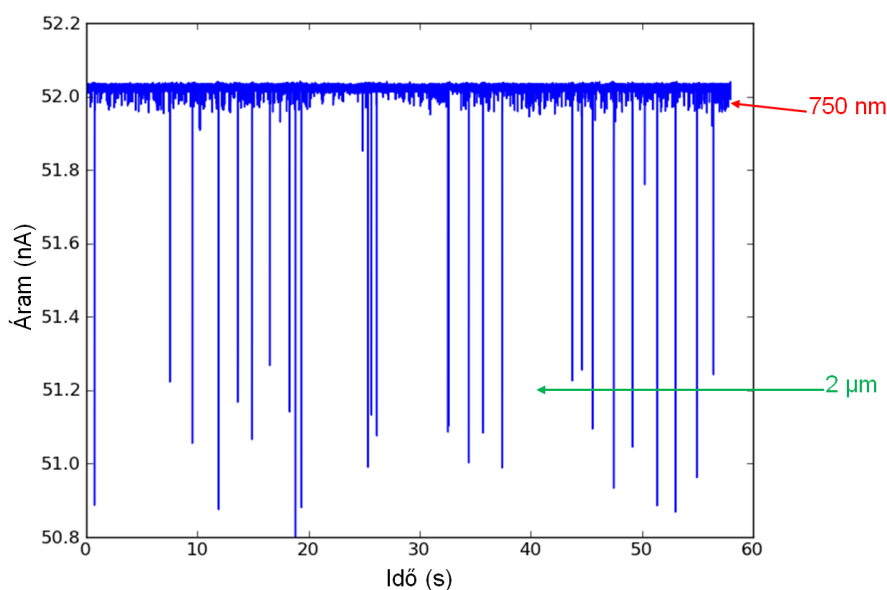
A mért áramtranzienseken látszik, hogy nagyobb részecske koncentrációk esetén az áthaladási események gyakorisága (frekvenciája) megnő. A számlálási frekvencia közel lineárisan függ a részecske koncentrációtól, ami megfelel más pórusokkal mért irodalmi adatoknak. A részecskék szedimentációja nem okoz olyan jelentős gondot.

A 750 nm-es részecskék esetén is vizsgáltam a cellafeszültség hatását a részecskék transzportjára, de úgy találtam, hogy itt is elsődlegesen a hidrosztatikus nyomáskülönbség okozza a póruson való áthaladást. A különböző feszültségeken felvett tranziensek esetében nem volt különbség a számlálási frekvenciában.

Továbbiakban megpróbáltam célzott pipetta méretcsökkentéssel, az ideális pipettaméret/részecskeméret arány ($\sim 2,5 - 3$) ismeretében, nanorészecske oldatok esetén tanulmányozni a transzportjelenségeket és a koncentráció – számlálási frekvencia összefüggést.

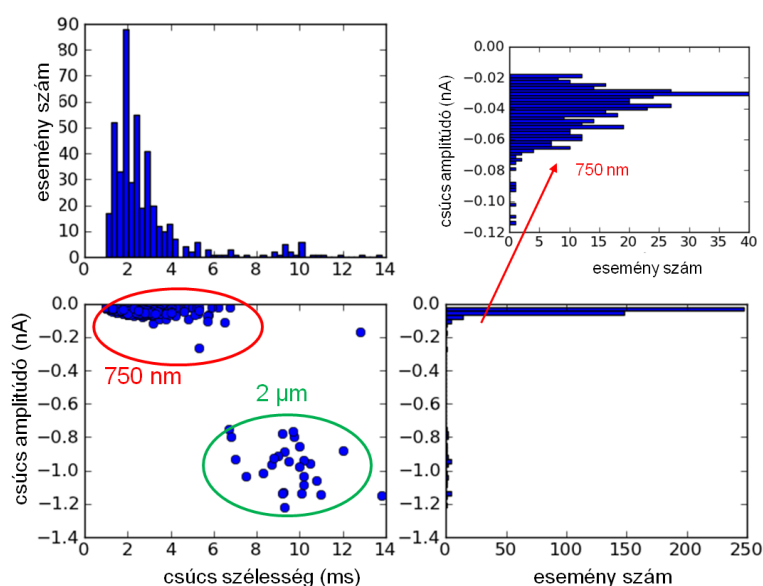
750 nm-es és 2 µm-es részecske keverék

A 750 nm és 2 µm átmérőjű latex részecskék keverékének detektálására 3 – 3,5 µm átmérőjű pipettákat alkalmaztam. A mikroszkópos megfigyelések alapján, a 2 µm-es részecske is akadálytalanul halad át kisebb nyomáskülönbség hatására a póruson. Erről készült a videófelvétel, melyből a részecske keverék számlálását demonstráló kimerevített képeket bemutattam korábban. A továbbiakban már csak az volt kérdéses, hogy a 750 nm-es részecske okoz-e elegendő ellenállás változást, miközben keresztülmegy a pórus érzékelő zónáján.



28. ábra: 750 és 2000 nm-es részecskék számlálásakor detektált kronoamperometriás görbe. A részecskék 0,01 M KCl-ban vannak szuszpendálva. $C_{750} = 10^8$ db/ml, $C_{2000} = 6 \times 10^6$ db/mL. A piros nyíl a 750 nm-es részecskék áthaladásának megfelelő kisebb amplitúdójú csúcsokat, a zöld nyíl pedig 2 µm átmérőjű részecskék által okozott árampulzusok átlagos szintjét jelöli. A mérés során 600 mV feszültséget, -30 Pa nyomáskülönbséget állítottam be. Mintavételi frekvencia: 4kHz.

A részecskék a korábban már bemutatott háromszög alakú, de eltérő amplitúdójú pulzusokat okoznak (23. ábra, 25. ábra). A mért áramtranzienseken is látható, hogy az eltérő átmérőjű részecskék eltérő amplitúdójú jeleket okoznak, mert más térfogatú elektrolit oldatot zárnak ki a pórusból (28. ábra). A 2D ábrázolás ebben az esetben egyértelműen lehetőséget ad a 750nm és 2 µm átmérőjű részecskék által okozott árampulzusok megkülönböztetésére, ugyanis a nagyobb átmérőjű részecskék nemcsak nagyobb amplitúdójú árampulzusokat eredményeznek, hanem a pulzusok időtartama is nagyobb. (29. ábra)



29. ábra: Az előző mérési görbe kiértékelése: a keverék 2D-s hisztogramján jól elkülöníthetők a különböző részecskéktől származó jelek. A grafikus statisztikából látható a koncentrációk közti nagyságrendbeli különbség. A 750 nm-es részecskék nagy száma miatt jól látható a jelamplitúdók Gauss-eloszlása.

A fenti grafikus megjelenítés után a keverék statisztikai jellemzői táblázatosan:

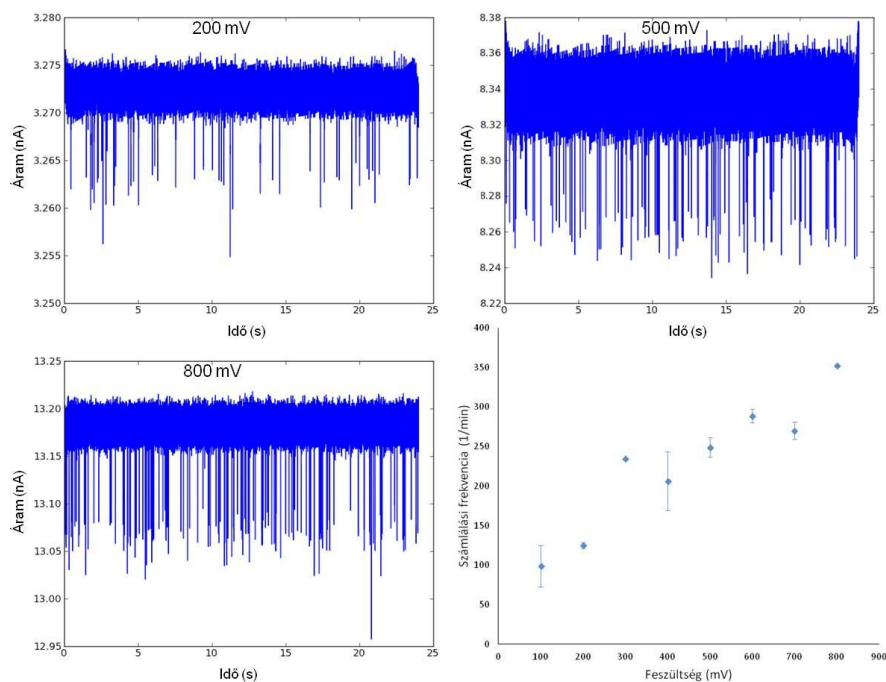
Részecske (nm)	Koncentráció (db/mL)	Számlálási frekvencia (1/min)	Csúcs- szélesség (ms)	szórás	Csúcs- amplitúdó (pA)	szórás
750	10^8	428	2,44	$\pm 0,98$	- 41,1	$\pm 14,8$
2000	6×10^6	30	9,48	$\pm 1,75$	-919	± 229

5. táblázat: A keverék egyes komponenseinek statisztikai jellemzése.

A grafikus statisztikai ábrázolásból, illetve a csúcsok statisztikai kiértékeléséből is látható, hogy a Coulter-elven meg lehet különböztetni egymástól a különböző részecskéket akár mikropipettával is. A mért számlálási frekvenciák és a beállított koncentrációk aránya igen jól egyezik (14,3 és 16,7). Eszerint a módszer nem csak a részecskék méret szerinti megkülönböztetésére, de koncentrációarányuk megállapítására is alkalmas lehet.

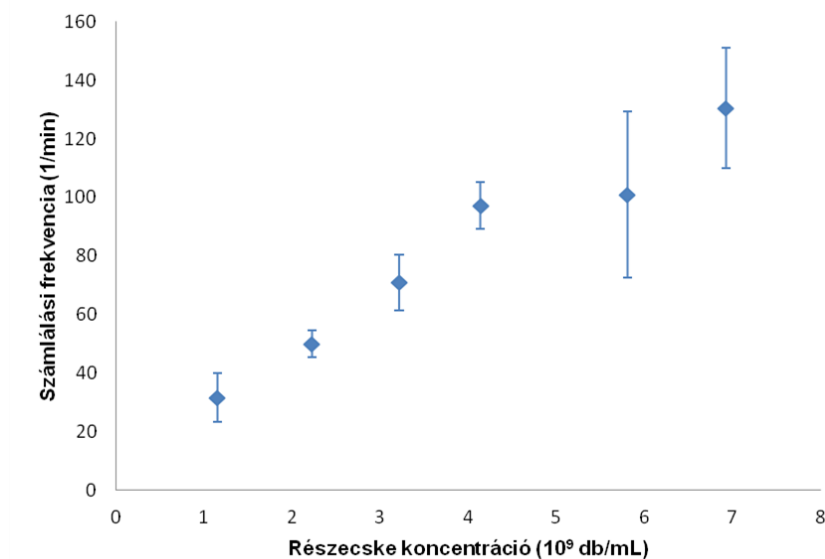
330 nm átmérőjű nanorészecskék számlálása

A 330 nm átmérőjű részecskék már kolloid oldatot alkotnak. Megfelelő oldatösszetétel esetén nincs jelen szedimentációs folyamat. Az esetleges részecske aggregáció, például túl nagy ionerősség hatására, észrevehető kiülepedést okoz. Ezekkel a részecskékkel különböző kísérleteket tudtam elvégezni, melyekkel vizsgálni tudtam bizonyos transzport jelenségeket. Erre alkalmas pipettákat az 54-es programmal (1. táblázat) készítettem. Ezek mérete szubmikronos ezért optikai mikroszkóppal nem állapítható meg, ugyanakkor elektrokémiai úton a pórus ellenállását meghatározva és a pórus alakjának ismeretében megbecsülhető. A számlálási kísérletek során mért áramtranzienseket a 30. ábra mutatja be. Kiemelendő, hogy ebben a mérettartományban már jelentős hatása volt az alkalmazott feszültségnek az áthaladási gyakoriságra. Ez azt jelenti, hogy a 330 nm-es részecskék transzportjában már szignifikáns szerepet kap az elektroforetikus anyagtranszport. A részecskék ζ -potenciálját dinamikus fényszórás mérésén alapuló eljárással határoztam meg a számlálási kísérletekben alkalmazott körülmények mellett: 10-es pH-ra beállított, felületaktív anyagot tartalmazó 0,01 M koncentrációjú KCl oldat. A részecske zéta-potenciálja -36,5 mV, ami indokolja az elektroforetikus transzportot. A mérés eredménylapja a mellékletben látható. (F2)



30. ábra: 330 nm-es részecskék számlálásakor felvett áram-idő görbék és a részecske fluxus feszültség függése.
A kísérletek során 0,01 M KCl-ban, -50 Pa nyomáskülönbség mellett, 4 kHz-es mintavételi frekvenciával mértem.
A részecskék koncentrációja az oldatban 3×10^{10} db/mL, ζ -potenciálja: -36,5 mV.

A lineáris összefüggés a számlálási frekvencia és a feszültségkülönbség között megfelel az elméletileg vártaknak (12. egyenlet), azaz J_s lineárisan változik a potenciálkülönbség (E_M) függvényében. Hasonló lineáris trendet tapasztaltunk a részecske koncentráció és az áthaladási események gyakorisága között.



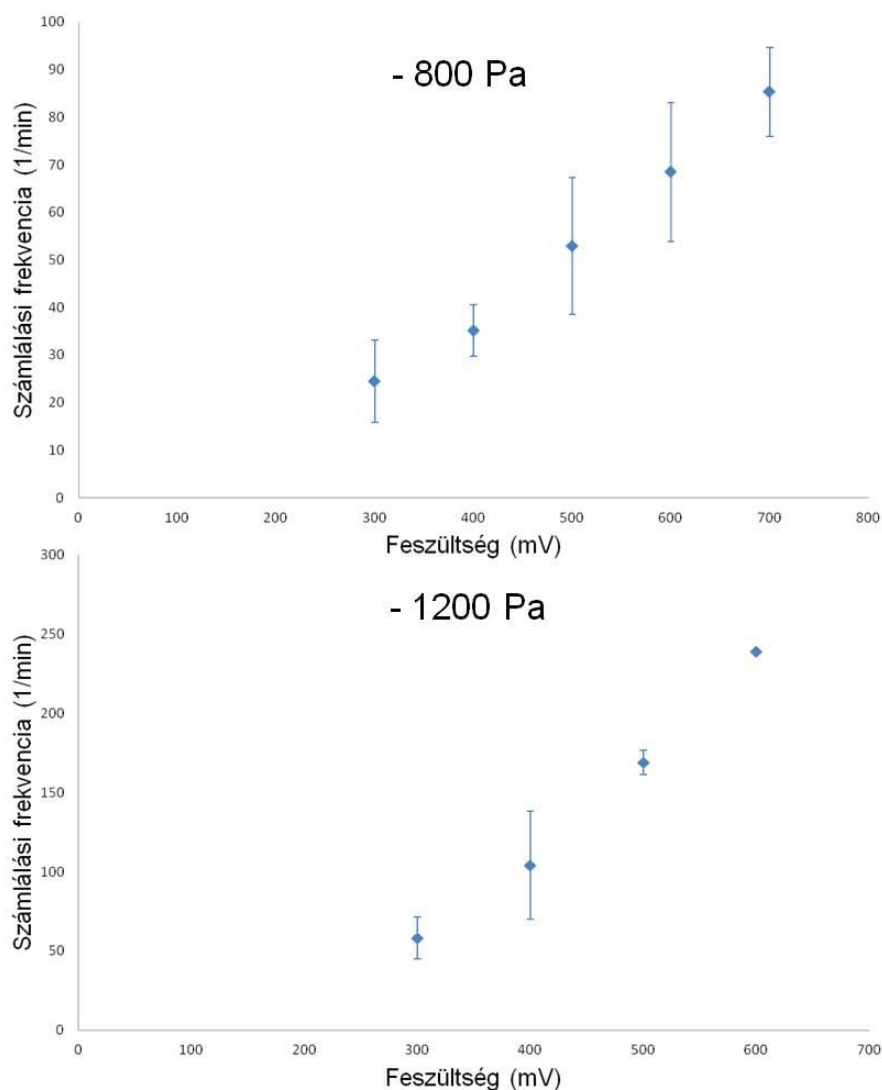
31. ábra: A számlálási frekvencia függése a részecske koncentrációtól A mérések során -50 Pa nyomáskülönbséget, 200 mV feszültséget és 4 kHz-es mintavételi frekvenciát alkalmaztam.

A 6×10^9 db/mL-es ponthoz tartozó nagyobb szórás ellenére a módszerrel viszonylag nagy pontossággal lehet megállapítani a részecske koncentrációt. A nanopórusos Coulter-számláló pontossága kb. 20-30% az irodalomban fellelhető adat szerint [22]. Ennek megfelel az általam alkalmazott módszer is.

A részecske transzport konvektív komponensének változását csak igen kis nyomáskülönbségek esetén vizsgálhattam, mert a Gamry potenciosztáthoz tartozó mérőprogram adattárolási kapacitása véges, így az egyes mérések során a mintavételi frekvencia és a mérési idő egymás rovására változtatható. Ez egyben limitálta a detektálás alsó határát is, mivel 20-30 1/min-es számlálási frekvencia értékek alá nem érdemes menni, mert nem lehet elég reprezentatív statisztikákat készíteni a detektált jelekről. A mérési idő növelése pedig a mintavételi frekvencia csökkentését, ezáltal jeltorzulást okozna.

110 nm-es átmérőjű latex nanorészecskék számlálása

A 330 nm-es részecskékénél kisebb részecskék számlálásához szükséges pipettákat a gyártó által beállított 54-es program módosításával készítettem. A P120-as programokkal (2. táblázat) olyan pipettákat kaptam, melyek alkalmasak voltak a 110 nm-es részecskék számlálására. Ezeknél a pipettáknál már problémát okozott a rektifikáló hatás, ezért ennek kiküszöbölésére megnöveltem az oldatok KCl koncentrációját 0,1 M-ra.



32. ábra: 110 nm-es részecskék transzportjelenségeinek vizsgálata különböző nyomásokon. A részecskék 2×10^{10} db/mL-es koncentrációban vannak 0,1 M KCl-ban. Mintavételi frekvencia: 5 kHz.

A 32. ábrán látható, hogy a 110 nm-es részecskék transzportját a hidrosztatikai nyomáskülönbség és a feszültség változása is befolyásolja. A részecske ζ -potenciál értéke 0,01 M KCl-ban -34,7 mV. Az ionerősség növelésével ez biztosan csökkent, de kvantitatív információ nincs ennek mértékéről. (A készülék 0,01 M-os vagy hígabb elektrolitban képes meghatározni a ζ -potenciált.) Azonban a részecske elektrokinetikus töltése biztosan negatív, mert az elektroforetikus transzport komponens szerepe nő a feszültség növelésével.

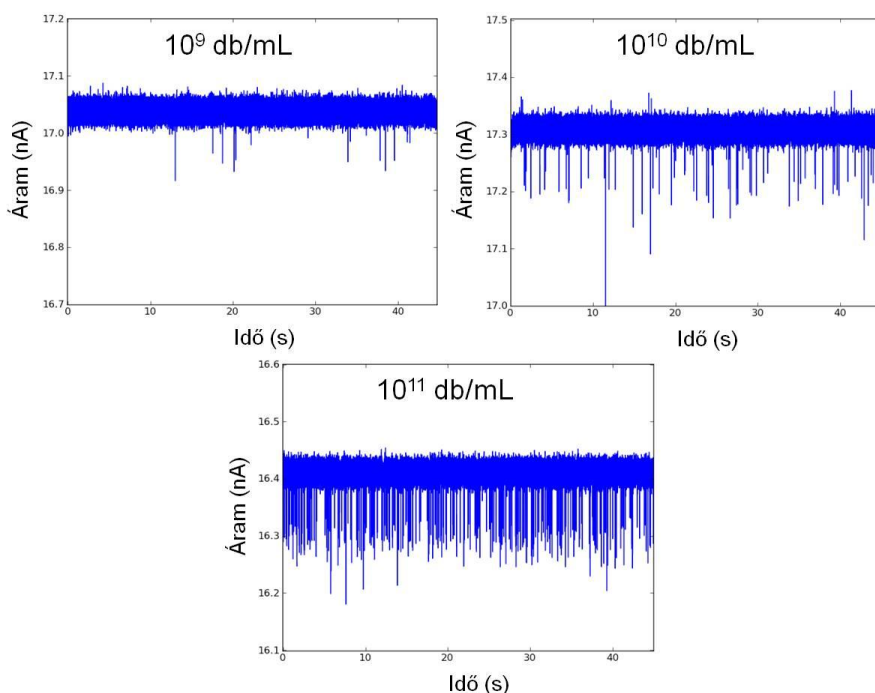
Érdekes jelenség, hogy a görbe nem 0 vagy pozitív értéknél metszi az y-tengelyt (számlálási frekvencia). Ez utalhat mérési hibára, mert az elektroosmotikus tag szerepével sem magyarázható. Az elektroosmózis esetünkben a pipetta negatív töltésű fala miatt az oldat pipettából való kiáramlását okozza, azonban szerepe a potenciál-különbségtől függ, így 0 mV közelében kizárt, hogy jelentős oldatkiáramlást okozzon a -800 és -1200 Pa szívónyomás ellenében.

A 110 nm-es karboxilezett részecskén kívül rendelkezésemre állt 120 nm-es, felületén aldehid és szulfát-csoportokat tartalmazó nanorészecske is. A részecskék mérete alapján ez a keverék aligha különböztethető meg, viszont eltérő elektrokinetikus töltés esetén elképzelhető, hogy az áthaladási időkben szignifikáns különbséget tapasztalunk. Ezért azt a kísérleti tervet állítottam össze, hogy 110 nm-es részecske koncentrációját lépésekben növelem adott értékig, majd hozzáadom a 120 nm-es eltérő anyagi minőségű részecskét ugyanilyen lépésekben. Ezután a kiértékeléskor figyelem az egyes lépcsőkhöz tartozó csúcshélesség hisztogramokon látható változást. Ha a 110 nm-es részecskék jeleitől eltérő helyen jelennek meg a 120 nm-es részecskék, akkor a két részecske elektrokinetikus töltése eltér és megkülönböztethetők egymástól a különböző típusú részecskék.

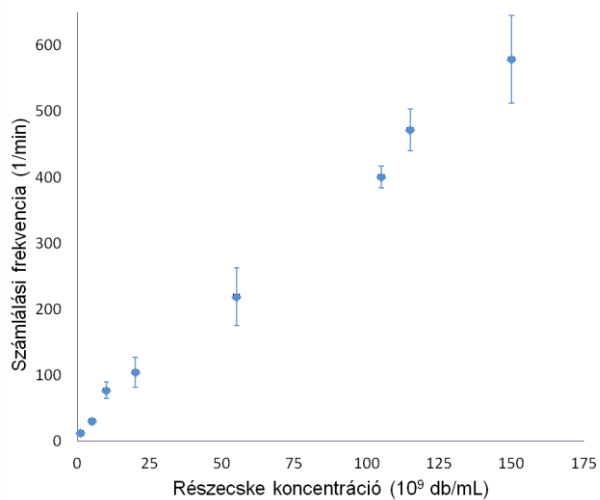
A kísérlet során azonban nem tudtam megkülönböztetni egymástól áthaladási idők alapján a részecskéket. Az egyes lépcsők mérési görbéiből azonban kiderült, hogy a 120 nm-es részecskék eloszlása kevésbé homogén, mint a 110 nm-eseké. A 120 nm-es részecskék hozzáadásakor az addig detektált csúcsoknál nagyobb amplitúdójú jeleket is detektáltam. A számlálási módszer kimutatta a nagyobb méretű részecskék szennyezését a 120 nm-es részecskék között.

Ezek a szennyezések látszanak a 120 nm-es részecske SEM felvételein is. (F8)

Annak ellenére, hogy a részecskék nem különböztethetőek meg, a kísérlet alkalmas volt számlálási frekvencia – koncentráció összefüggés vizsgálatára:



33. ábra: 110 és 120 nm-es részecskék kronoamperometriás görbéi eltérő koncentrációkon.

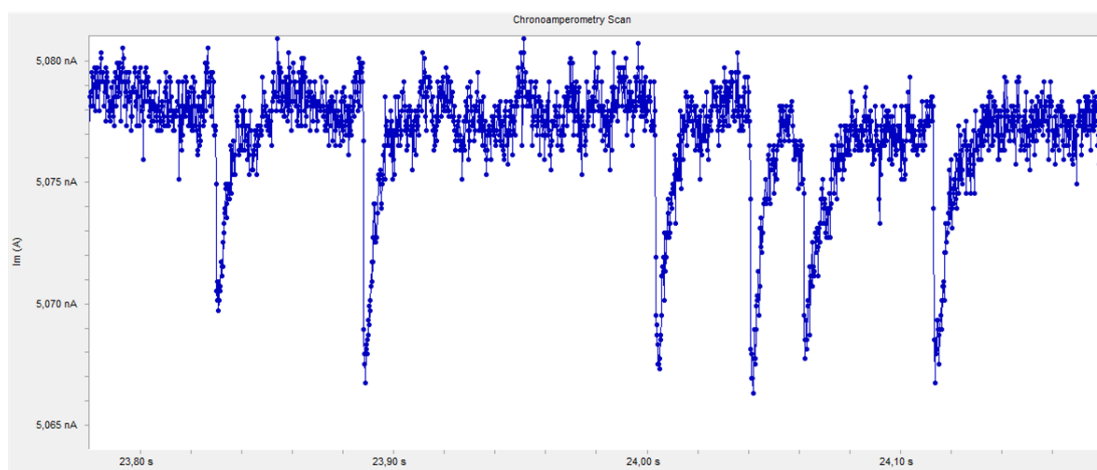


34. ábra: Részecske koncentráció és számlálási frekvencia összefüggése 10^9 és 10^{11} db/mL koncentráció tartományban. 0,1 M KCl-ban, -60 Pa nyomáskülönbség és 400 mV feszültség hatására haladnak át a részecskék. A mintavételi frekvencia: 5 kHz (0,2 ms)

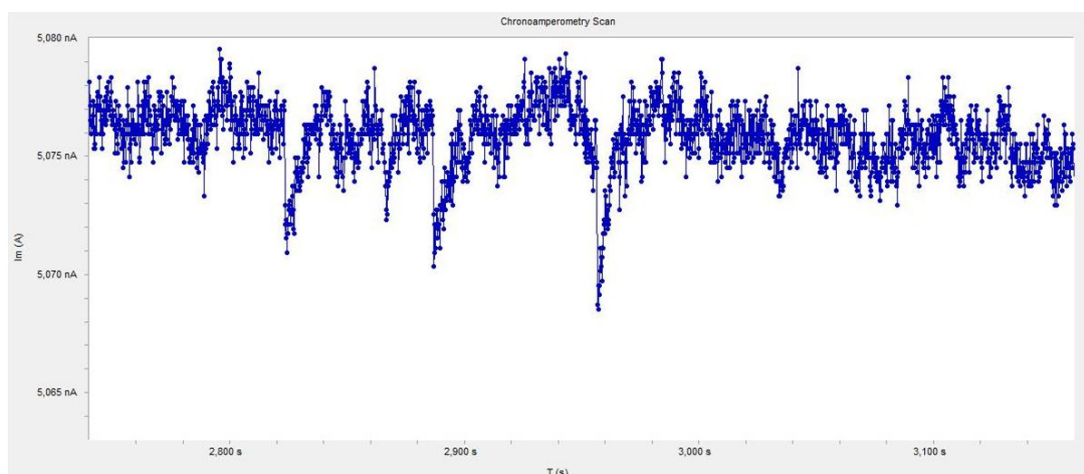
A kapott összefüggés megfelel az irodalomban található, miszerint a számlálási frekvencia egyenesen arányos a részecske koncentrációval (12. egyenlet). Ezek alapján megállapítható, hogy a módszer alkalmas 100 nm körüli részecskék számlálására.

67 nm átmérőjű nanorészecskék vizsgálata

A 110 nm-es részecskék számlálása után a következő rendelkezésre álló részecskeméret a 67 nm-es. Ezek elemzéséhez még kisebb átmérőjű pipettára volt szükség, ezért a pipetta-húzó 54-es programjában a második sor Pull értékét 120-ról 150-re növelve kisebb átmérőjű pipettákat készítettem. Ez a P150-es programmal (2. táblázat) készített pipetta alkalmasnak bizonyult 67 nm-es részecskék detektálására. Ilyen kis méretű részecskék esetében a póruson való áthaladás sebessége nagy. Ezért annak érdekében, hogy az egyedi áthaladási eseményeket detektálni tudjam fontos volt a póruson eső nyomáskülönbség beállítása. A 35. és 36. ábrán két különböző nyomás mellett regisztrált árampulzusok láthatók 67 nm-es részecskék számlálásakor.



35. ábra: 67 nm-es részecskék detektálása 5×10^9 db/mL koncentrációjú oldatból. 0,1 M KCl koncentráció, +50 Pa nyomás, 300 mV feszültség. Mintavételi frekvencia 5 kHz (0,2 ms).



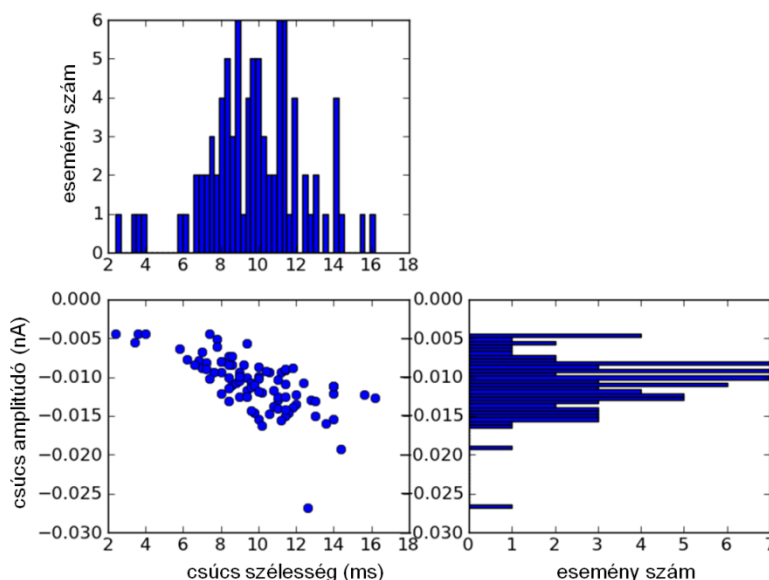
36. ábra: 67 nm-es részecskék detektálása 5×10^9 db/mL koncentrációjú oldatból. 0,1 M KCl koncentráció, -500 Pa nyomás, 300 mV feszültség. Mintavételi frekvencia 5 kHz (0,2 ms).

Az áram-idő görbék alapján is megállapítható, hogy a részecskék gyorsabban haladnak keresztül a póruson -500 Pa nyomáskülönbség hatására, mint +50 Pa nyomás esetén. Ugyanolyan mintavételi frekvencia mellett pontosabban ki lehet mérni a részecskéket, ha lassabban haladnak. A két mérési görbe összefoglaló statisztikáit a 6. táblázat tartalmazza.

Nyomás	Mérési idő (s)	Jelek száma	Csúcs-szélesség (ms)	szórás	Jel-amplitúdó (pA)	szórás	Számlálási frekvencia (1/min)
-500 Pa	10	57	7,91	$\pm 2,47$	-6,08	$\pm 1,97$	342
+50 Pa	45	88	9,78	$\pm 2,58$	-10,87	$\pm 3,51$	117

6. táblázat: Különböző nyomásokon detektált 67 nm-es részecskék statisztikái.

A statisztika alapján látható, hogy nem csak eltérő sebességgel haladnak át a póruson a nanorészecskék, hanem eltérő mennyiségben is. A számlálási frekvencia különbségét az okozza, hogy pozitív nyomáson az oldat kifelé áramlik a pipetta nyílásán, míg negatív nyomáson (szívás) a pipettába áramlik. Ez a tendencia, a jelalakok és a részecske átlagos sebességének növekedésétől bekövetkező jeltorzulás bizonyítja, hogy ténylegesen a hozzáadott 67 nm-es részecskéket detektáltam.

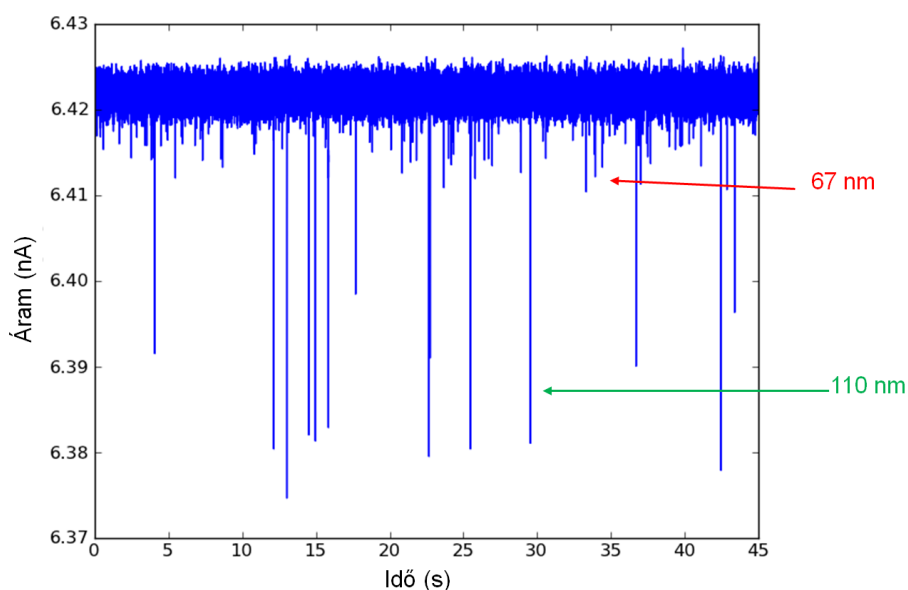


37. ábra: 67 nm-es részecskék hisztogramja hasonló eloszlást mutat a korábban vizsgált nagyobb részecskékhöz.

67 és 110 nm-es részecskék megkülönböztetése

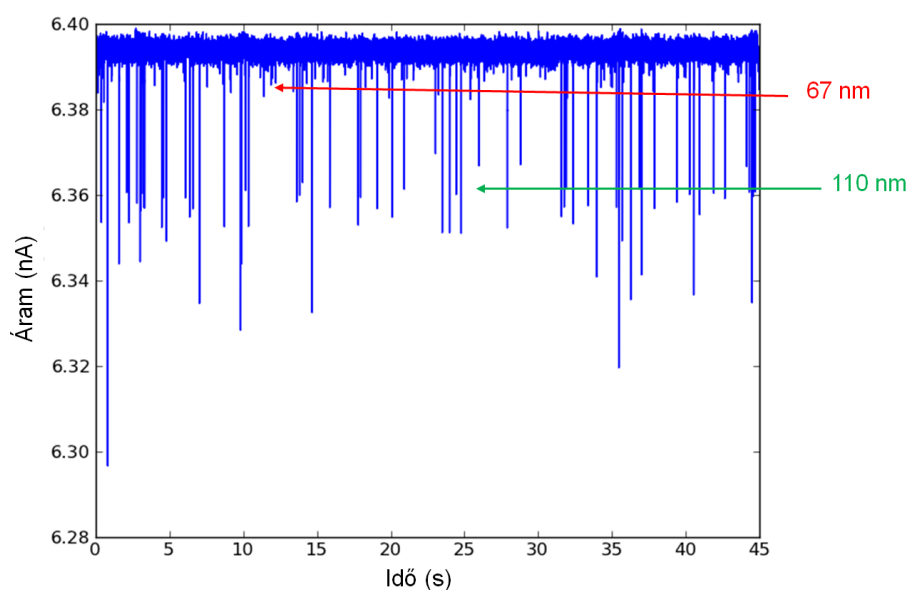
A további kísérleteim célja az volt, hogy sikerüljön egymás mellett detektálni és egymástól egyértelműen megkülönböztetni a 100 nm körüli és annál kisebb nanorészecskéket, ahogy az korábban 2 és 0,75 μm átmérőjű részecskékkel sikerült. Ehhez P135-ös programmal húztam pipettákat. Az így készült nanopipetták a 110 nm-es részecskénél használt pipettáknál kisebbek, de a 67 nm-eseknél használtaknál nagyobbak.

A kísérlet során különböző koncentrációban adtam hozzá a részecskéket a külső oldathoz:



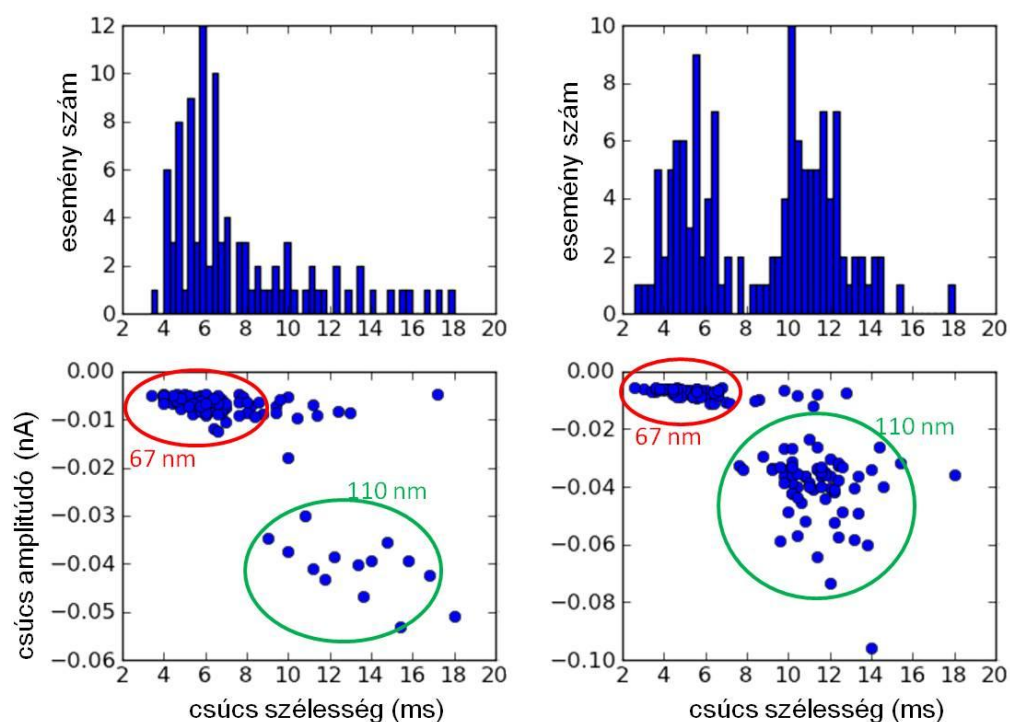
38. ábra. 67 és 110 nm-es keverék kronoamperometriás görbéje, a különböző részecskék által okozott jelekkel. A mérés 0,1 M KCl oldatban, -60 Pa nyomáskülönbséggel, 200 mV feszültségen történik. Mintavétel: 5 kHz. A piros nyíl a 67 nm, a zöld nyíl a 110 nm átmérőjű részecskékhez tartozó árapulzusokat jelöli. $C_{67} = 5 \times 10^{10}$, $C_{110} = 10^{10}$ db/mL.

Az áram-idő görbén láthatóak a nanorészecskék áthaladására utaló eltérő amplitúdójú pulzusok. Ezek után, hogy igazoljam a nagyobb pulzusok eredetét, a 110 nm-es részecskék koncentrációját is 5×10^{10} db/mL-re állítottam be. A számlálási jel változását a 39-es ábra mutatja be. Egyértelműen látható, hogy ez a nagyobb amplitúdójú áramtranziensek gyakoriságának növelését okozta.

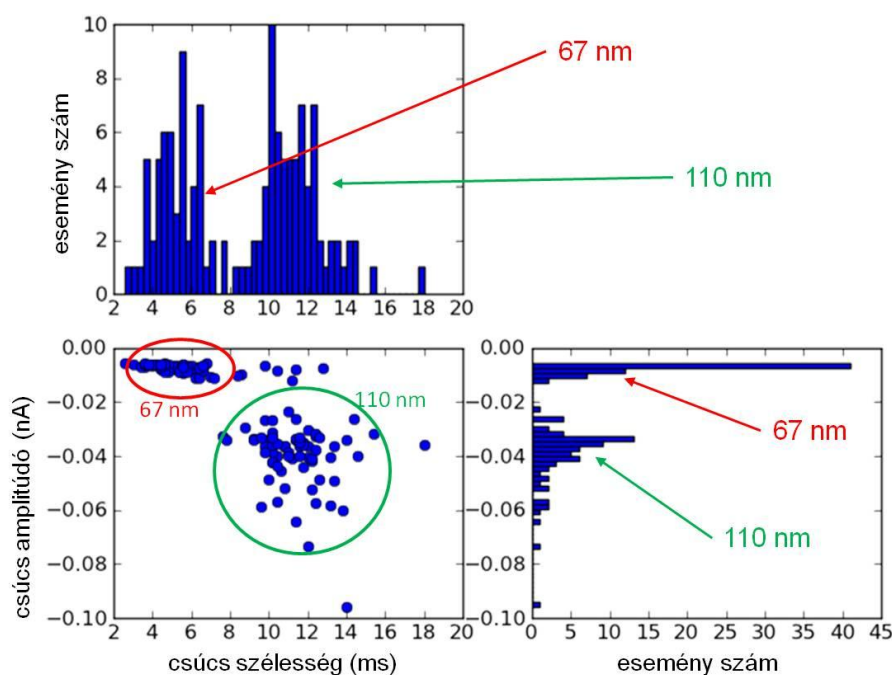


39. ábra: A 67 és 110 nm-es keverék áram-idő görbéje, a korábbi beállításokkal, egyenlő részecske koncentrációnál.

A méretszerinti megkülönböztetés és a részecske koncentráció hatása egyértelműen nyomon követhető a 2D pulzus amplitúdó-pulzus időtartam hisztogramokon.



40. ábra: A baloldali hisztogramok olyan részecske keverékről készültek, melyben ötször nagyobb koncentrációban van jelen a 67 nm-es részecske. A jobboldali hisztogramokon a két részecske koncentrációja megegyezik 5×10^{10} db/mL.



41. ábra: 67 és 110 nm-es részecske keverék statisztikai grafikus ábrázolásban. A részecskék az áthaladás ideje és az okozott áramcsökkenés mértéke alapján is megkülönböztethetők egymástól. $C_{67} = C_{110} = 5 \times 10^{10}$ db/mL.

A grafikai ábrázolás alapján látható, hogy a részecskék egymástól jól elkülönülő jelcsoportokat okoznak. Az egyenlő koncentrációnak megfelelően a jelek mennyisége nagyjából azonos. Mivel a részecskék mozgása sztochasztikus esemény, így elképzelhető, hogy a póruson az átlagosnál gyorsabban vagy lassabban haladnak át. A 2D-hisztogramon erre példa néhány 67 nm-es részecske áthaladási ideje.

Részecske	Koncentráció (db/mL)	Számlálási frekvencia (1/min)	Csúcs-szélesség (ms)	szórás	Jel-amplitúdó (pA)	szórás
67	5×10^{10}	83	5,72	$\pm 2,00$	-7,38	$\pm 1,58$
110	5×10^{10}	92	11,41	$\pm 1,72$	-40,10	$\pm 11,66$

7. táblázat: 67 és 110 nm átmérőjű részecskék számlálása során meghatározott jellemző paraméterek összefoglaló statisztikája

A 7. táblázat alapján is látható, hogy a különböző részecskék jelei, vagyis a részecskék jól megkülönböztethetők.

67 és 110 nm-es részecskék megkülönböztetése egyéb módszerekkel

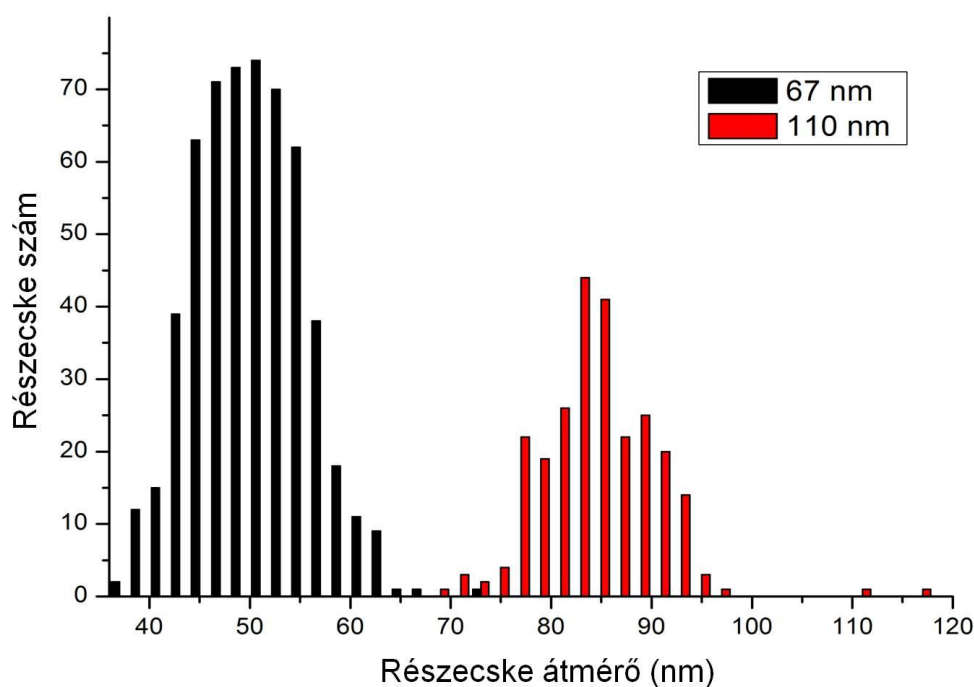
A munkám során további két, részecskék méretének meghatározására alkalmas módszer teljesítőképességével vettem össze az általam kidolgozott eljárást.

DLS technikával vizsgáltam a 67 és 110 nm-es részecske keveréket. Ezzel a módszerrel nem sikerült elkülönült jelet kapni a két különböző méretű részecskére, hanem egy az átlagos részecske-átmérőhöz közeli értéket. (F4-5-6) Ennek megfelelően az átlagérték a két részecske DLS-sel meghatározott mérete között helyezkedik el. (Hasonló részecske koncentrációk esetén a nagyobb részecskék fényszórása dominál, ezért a 110 nm-es közeli érték.)

67 nm-es részecske	110 nm-es részecske	67 és 110 nm-es keverék
72,7 nm	122,5 nm	112,6 nm

8. táblázat: A DLS mérések eredményei.

A részecskék méretének meghatározását elvégeztem pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján is. A részecskék a SEM-felvételek alapján megkülönböztethetők (42. ábra). A felvételek szilícium lapkára cseppentett és beszárított részecskeoldatokról és nem a részecske keverékről készültek.



42. ábra: A részecskék méreteloszlása a SEM-felvételek alapján. A részecskék jól elkülöníthető sokaságokat alkotnak.

A függelékben mellékelt képek alapján látható, hogy a használt kiértékelő programmal alighanem keverékből is megkülönböztethetők lennének a nanorészecskék. (F7)

Mindezek alapján megállapítható, hogy a Coulter-elven működő nanopipetta-alapú érzékelővel olyan részecske keverékek is elemezhetők, amelyek más módszerrel nem vagy csak nagyon körülményesen. Az általam kidolgozott eljárás a DLS technika méret szerinti felbontóképességét felülmúlja, ráadásul többlet információval is szolgál, hiszen a részecskék mennyiségi meghatározására is alkalmassá tehető. Ezt a funkciót a DLS nem tudja ellátni.

A kidolgozott érzékelő méret szerinti felbontóképessége nagyjából hasonló a pásztázó elektronmikroszkópos képalkotásénak. (39. és 40. ábra) Azonban meg kell említeni, hogy amíg a Coulter-elven oldatból történik a részecske meghatározás, addig a SEM a mintaoldat beszárítása után képes a minta elemzésére. Ezek alapján nagyobb hatékonysággal működhet a nanopipetta-alapú érzékelő, ráadásul a módszerrel a részecskék mennyiségi meghatározása is gyorsan kivitelezhető. Elviekben a részecske koncentráció meghatározható lenne SEM-felvételek alapján is, de ehhez adott nagyságú térfogatrészlet felszárítása után a felületen maradt összes részecskét meg kellene számolni. Ez a gyakorlatban igencsak nehézkesen valósítható meg.

A mennyiségi meghatározás az általam bemutatott eljárással történhet kalibrációval, kihasználva a számlálási frekvencia és részecske koncentráció közti lineáris összefüggést. A direkt mennyiségi meghatározás a számlálási frekvencia alapján csak akkor lehetséges, ha nagyon pontos információkkal rendelkezünk a részecske elektroforetikus mobilitásáról és a pipetta geometriájáról. A pórus érzékelő zónájának pontos geometriáját egyelőre nem ismerjük, ezért a kalibrációs módszer tűnik járható útnak részecskék kvantitatív meghatározására.

Összefoglalás

TDK-munkám célja különböző méretű nanorészecskék oldatainak elemzése volt. Erre a célra olyan szintetikus nanopórusokat állítottam elő, amelyek alkalmasak nanorészecskék méretének és koncentrációjának meghatározására. Ennek érdekében kvarc kapillárisokból mikro- és nanopipettákat állítottam elő, amelyek egyetlen, kónusz-alakú pórust tartalmaznak. A javasolt eljárással igény szerinti méretben, páratlan egyszerűséggel és költséghatékonysággal állíthatók elő nanopórus érzékelők. A munkám során 200 nm és 6 μm közötti átmérőjű kvarcpipettákat készítettem, amelyeket elektrolittal töltöttem fel és egy Ag/AgCl referencia elektródot tartalmazó pipetta befogóba illesztettem. A számlálási kísérleteknél a pipettákat a mintaoldatba merítettem, majd a minta- és belső oldatba merülő referencia elektródok között, konstans feszültség mellett, a póruson átfolyó áramot mértem. A póruson áthaladó nanorészecskék a térfogatukkal megegyező, nagy vezetőségű elektrolitot kiszorítva a pórusból tranziens pórusellenállás növekedést, karakterisztikus áram pulzusokat eredményeznek. Ezeknek a pulzusoknak a frekvenciája a részecske koncentrációval, míg az amplitúdójuk a részecskék méretével arányos. Kísérleteimben úgy találtam, hogy a részecskeszámlálás leghatékonyabb módja, hogy hidrosztatikai nyomáskülönbség alkalmazásával áramoltassam a nanorészecskéket tartalmazó oldatot a póruson keresztül. Amennyiben a nanorészecskék felületi töltéssel rendelkeznek, a számlálási frekvenciát nagyban befolyásolja az alkalmazott feszültség polaritása és nagysága is. Ezeket a tendenciákat vizsgáltam különböző méretű gömb alakú nanorészecskékkel megfelelő méretű pórusokat alkalmazva.

Összefoglalásként, kidolgoztam az első nanopipetta-alapú számlálókat és eljárásokat, amelyek lehetőséget adtak gömb alakú polimer részecskék mennyiségi meghatározására 60 nm és 2 μm -es átmérő között, továbbá akár egymástól kevésbé eltérő méretű nanorészecskék megkülönböztetésére az áram pulzusok amplitúdói és időtartamai alapján.

Irodalomjegyzék

1. Rosi NL, Mirkin CA. Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews*. 2005;105:1547-1562
2. Bayley H, Martin CR. Resistive-pulse sensing - From microbes to molecules. *Chemical Reviews*. 2000;100:2575-2594.
3. Gyurcsányi ER. Chemically-modified nanopores for sensing. *Trends in Analytical Chemistry*. 2008;27:627-639.
4. Griffiths J. The realm of the nanopore. *Analytical Chemistry*. 2008;80:23-27.
5. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Biophysics*. 1996;93:13770-13773.
6. Vercoutere W, Winters-Hilt S, Olsen H, Deamer D, Haussler D, Akeson M. Rapid discrimination among individual DNA hairpin molecules at single-nucleotide resolution using an ion channel. *Nat Biotech*. 2001;19:248-252.
7. Astier Y, Braha O, Bayley H. Toward Single Molecule DNA Sequencing: Direct Identification of Ribonucleoside and Deoxyribonucleoside 5'-Monophosphates by Using an Engineered Protein Nanopore Equipped with a Molecular Adapter. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128:1705-1710.
8. Li J, Gershow M, Stein D, Brandin E, Golovchenko JA. DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope. *Nat Mater*. 2003;2:611-615.
9. Storm AJ, Chen JH, Ling XS, Zandbergen HW, Dekker C. Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision. *Nat Mater*. 2003;2:537-540.
10. WH. Coulter. Means for counting particles suspended in a fluid. US Patent 2,656,508, 1953.
11. Hastings JW, Sweeney BM, Mullin MM. COUNTING AND SIZING OF UNICELLULAR MARINE ORGANISMS. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1962;99:280-289.
12. Kubitschek HE. Electronic Counting and Sizing of Bacteria. *Nature*. 1958;182:234-235.
13. Grulke DC, Marsh NA, Hills BA. Experimental air embolism: measurement of microbubbles using the Coulter counter. *British journal of experimental pathology*. 1973;54:884-891.
14. Zhang H, Chon C, Pan X, Li D. Methods for counting particles in microfluidic applications. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2009;7:739-749.

15. Gyurcsányi ER. Új irányok a biomolekuláris felismerés detektálásában. *Magyar Kémiai Folyóirat*. 2005;111:133-142.
16. Deblois RW, Wesley RKA. Sizes and Concentrations of Several Type C Oncornaviruses and Bacteriophage T2 by the Resistive-Pulse Technique. *Journal of Virology*. 1977;23:227-233.
17. Uram JD, Ke K, Hunt AJ, Mayer M. Submicrometer Pore-Based Characterization and Quantification of Antibody-Virus Interactions. *small*. 2006;2:967-972.
18. DEBLOIS RW, BEAN CP. Counting and Sizing of Submicron Particles by the Resistive Pulse Technique. *THE REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*. 1970;41:909-916.
19. Sun L, Crooks RM. Single Carbon Nanotube Membranes: A Well-Defined Model for Studying Mass Transport through Nanoporous Materials. *J. Am. Chem. Soc.* 2000;122:12340-12345.
20. Ito T, Sun LI, Crooks RM. A Carbon Nanotube-Based Coulter Nanoparticle Counter. *Accounts of Chemical Research*. 2004;37:937-945.
21. Fraikin J-luc, Teesalu T, Mckenney CM, Ruoslahti E, Cleland AN. A high-throughput label-free nanoparticle analyser. *Nature Nanotechnology*. 2011;6:308-313.
22. Ito T, Sun L, Crooks RM. Simultaneous Determination of the Size and Surface Charge of Individual Nanoparticles Using a Carbon Nanotube-Based Coulter Counter. *Anal Chem*. 2003;75:2399-2406.
23. Ito T, Sun L, Bevan MA, Crooks RM. Comparison of Nanoparticle Size and Electrophoretic Mobility Measurements Using a Carbon-Nanotube-Based Coulter Counter, Dynamic Light Scattering, Transmission Electron Microscopy, and Phase Analysis Light Scattering. *Langmuir*. 2004;20:6940-6945.
24. Wanunu M, Morrison W, Rabin Y, Grosberg AY, Meller A. Electrostatic focusing of unlabelled DNA into nanoscale pores using a salt gradient. *Nature Nanotechnology*. 2009;5:160-165.
25. Lan W-J, Holden DA, Zhang B, White HS. Nanoparticle Transport in Conical-Shaped Nanopores. *Anal Chem*. 2011;83:3840-3847.
26. Lan W-J, Holden DA, Liu J, White HS. Pressure-Driven Nanoparticle Transport across Glass Membranes Containing a Conical-Shaped Nanopore. *The Journal of Physical Chemistry*. 2011;115:18445-18452.
27. Wei C, Bard AJ, Feldberg SW. Current Rectification at Quartz Nanopipet Electrodes. *Anal. Chem*. 1997;69:4627-4633.

28. Siwy Z, Heins E, Harrell CC, Kohli P, Martin CR. Conical-Nanotube Ion-Current Rectifiers: The Role of Surface Charge. *J. Am. Chem. Soc.* 2004;126:10850-10851.
29. Guerrette JP, Zhang B. Scan-Rate-Dependent Current Rectification of Cone-Shaped Silica Nanopores in Quartz Nanopipettes. *J. Am. Chem. Soc.* 2010;132:17088-17091.
30. Lan W-J, Holden DA, White HS. Pressure-Dependent Ion Current Rectification in Conical-Shaped Glass Nanopores. *J. Am. Chem. Soc.* 2011;133:13300-13303.
31. White HS, Bund A. Ion Current Rectification at Nanopores in Glass Membranes. *Langmuir*. 2008;24:2212-2218.
32. Umehara S, Pourmand N, Webb CD, Davis RW, Yasuda K, Karhanek M. Current Rectification with Poly-L-Lysine-Coated Quartz Nanopipettes. *Nano Letters*. 2006;6:2486-2492.
33. Karhanek M, Kemp JT, Pourmand N, Davis RW, Webb CD. Single DNA Molecule Detection Using Nanopipettes and Nanoparticles. *Nano Letters*. 2005;5:403-407.
34. P-2000 Micropipette Puller Operation Manual – Rev.2.0b (20070307)
35. Terejánszky István Péter. Nanopórusos számlálók fejlesztése. Szakdolgozat. *BME Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék 2010*.

Függelék

1. Számláláshoz használt pipetták ellenállásai, becsült átmérőí.
2. 330 nm-es részecske zéta-potenciál mérésének eredménye.
3. 110 nm-es részecske zéta-potenciál mérésének eredménye.
4. 67 és 110 nm-es részecske-keverék DLS méret meghatározása.
5. 110 nm-es részecske DLS méret meghatározása.
6. 67 nm-es részecske DLS méret meghatározása.
7. 67 és 110 nm-es részecskék SEM felvételei
8. 110 és 120 nm-es részecskék SEM felvételei
9. SEM-felvételek nanopipettáról I.
10. SEM-felvételek nanopipettáról II.

F1: Számláláshoz használt pipetták ellenállása, becsült átmérője

A pipetták átmérője a 15. egyenlet alapján az alábbi módon becsülhető:

Program (Pull értéke)	R (MΩ)	ρ (Ωcm)	R/ ρ hányados (viszonyszám)	R _{norm} (0,1 M)
40	11,4	707,7	0,016	1,3
70	52,6	707,7	0,074	5,8
70	41,5	707,7	0,059	4,6
70	11,1	149,9	0,074	5,8
120	66,8	149,9	0,446	34,6
120	34,9	77,6	0,450	34,9
120	22,9	77,6	0,295	22,9
135	33,3	77,6	0,429	33,3
150	60,4	77,6	0,778	60,4

Program (Pull értéke)	R _{norm} (0,1 M)	arányszám	becsült d _{tip} (nm)	számlált részecske (nm)
40	1,3	1,0	6000	2000
70	5,8	4,6	1300	330
70	4,6	3,6	1600	330
70	5,8	4,6	1300	330
120	34,6	27,7	220	110
120	34,9	27,9	220	110
120	22,9	18,3	330	110 és 120
135	60,4	48,3	230	67 és 110
150	33,3	26,6	120	67

A megmért ellenállást elosztjuk az elektrolit fajlagos ellenállásával. A kapott hosszúság dimenziójú mennyiség csak a pipetta geometriától függ. Átszámoljuk 0,1 M KCl-ban mérhető ellenállásra. A mikropipetta 'normált' ellenállásához viszonyítjuk a többi pipetta R_{norm} értékét. Felhasználva d_{tip} és R fordított arányosságát, valamint a mikropipetta vizuálisan meghatározott átmérőjét, becsüljük a pipetta átmérőket. Viszonyításképp a nanopipettával számlált részecskék átmérői a becsült értékek mellett fel vannak sorolva.

F2: 330 nm-es részecske zéta-potenciál mérésének eredménye.

Zeta Potential Report

v2.2



Sample Details

Sample Name: 330 nm 10 mM KCl 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes: merooldat

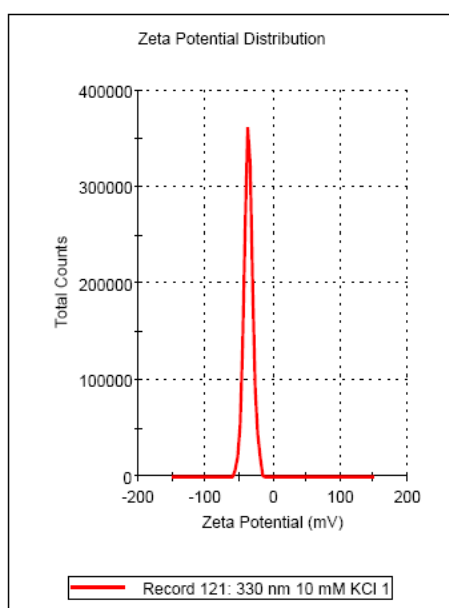
File Name: gergoo.dts Dispersant Name: Water
Record Number: 121 Dispersant RI: 1,330
Date and Time: 2012. szeptember 25. 10:08:03 Viscosity (cP): 0,8883
Dispersant Dielectric Constant: 78.5

System

Temperature (°C): 25,0 Zeta Runs: 12
Count Rate (kcps): 262,3 Measurement Position (mm): 2,00
Cell Description: Clear disposable zeta cell Attenuator: 6

Results

Mean (mV) Area (%) Width (mV)
Zeta Potential (mV): -36,5 Peak 1: -36,5 100,0 6,65
Zeta Deviation (mV): 6,65 Peak 2: 0,00 0,0 0,00
Conductivity (mS/cm): 1,54 Peak 3: 0,00 0,0 0,00



Zeta Potential mV	Total Counts	Zeta Potential mV	Total Counts	Zeta Potential mV	Total Counts
-150	0.000	-48.8	53137.877	52.1	0.000
-146	0.000	-45.1	133981.018	25.8	0.000
-142	0.000	-41.3	281320.822	58.6	0.000
-138	0.000	-37.6	361142.688	63.3	0.000
-135	0.000	-33.8	326023.868	87.1	0.000
-131	0.000	-30.1	189964.672	70.8	0.000
-127	0.000	-26.4	86670.716	74.5	0.000
-124	0.000	-22.6	44626.895	73.3	0.000
-120	0.000	-18.9	19206.152	82.0	0.000
-116	0.000	-15.2	1187.670	85.7	0.000
-112	0.000	-11.4	0.000	89.5	0.000
-108	0.000	-7.69	0.000	93.2	0.000
-105	0.000	-3.85	0.000	96.9	0.000
-101	0.000	-0.214	0.000	101	0.000
-97.4	0.000	3.62	0.000	104	0.000
-93.6	0.000	7.26	0.000	108	0.000
-89.9	0.000	11.0	0.000	112	0.000
-86.2	0.000	14.7	0.000	116	0.000
-82.4	0.000	18.5	0.000	119	0.000
-78.7	0.000	22.2	0.000	123	0.000
-75.0	0.000	26.0	0.000	127	0.000
-71.2	0.000	29.7	0.000	131	0.000
-67.5	0.000	33.4	0.000	134	0.000
-63.7	0.000	37.2	0.000	138	0.000
-60.0	0.000	40.9	0.000	142	0.000
-56.3	0.000	44.6	0.000	146	0.000
-52.5	20729.400	48.4	0.000	149	0.000

F3: 110 nm-es részecske zéta-potenciál mérésének eredménye

Zeta Potential Report

v2.2



Sample Details

Sample Name: 110 nm 10 mM KCl 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes: merooldat

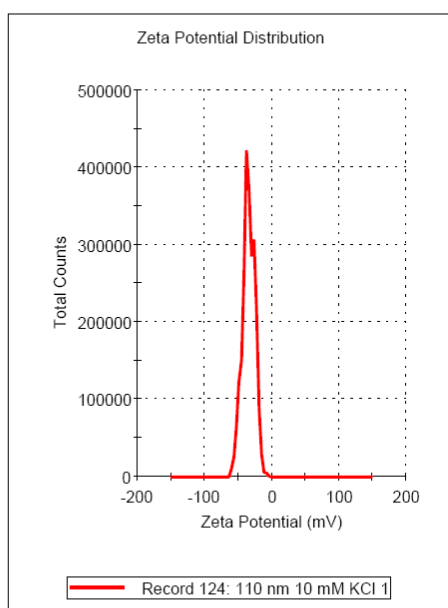
File Name: gergoo.dts Dispersant Name: Water
Record Number: 124 Dispersant RI: 1,330
Date and Time: 2012. szeptember 25. 10:32:36 Viscosity (cP): 0,8866
Dispersant Dielectric Constant: 78.6

System

Temperature (°C): 25,0 Zeta Runs: 12
Count Rate (kcps): 228,6 Measurement Position (mm): 2,00
Cell Description: Clear disposable zeta cell Attenuator: 8

Results

Mean (mV) Area (%) Width (mV)
Zeta Potential (mV): -34,7 Peak 1: -38,9 64,6 6,63
Zeta Deviation (mV): 9,06 Peak 2: -25,7 35,4 4,42
Conductivity (mS/cm): 1,55 Peak 3: 0,00 0,0 0,00



Zeta Potential mV	Total Counts	Zeta Potential mV	Total Counts	Zeta Potential mV	Total Counts
-150	0,000	-49,1	122537,664	51,6	0,000
-148	0,000	-45,4	150674,644	55,3	0,000
-142	0,000	-41,6	262009,063	59,0	0,000
-139	0,000	-37,9	421729,406	62,8	0,000
-135	0,000	-34,2	368715,344	66,5	0,000
-131	0,000	-30,4	284610,031	70,2	0,000
-127	0,000	-26,7	305777,219	74,0	0,000
-124	0,000	-23,0	218469,141	77,7	0,000
-120	0,000	-19,3	87904,508	81,4	0,000
-116	0,000	-15,5	29765,934	85,1	0,000
-112	0,000	-11,8	6241,378	88,9	0,000
-109	0,000	-8,07	5186,888	92,6	0,000
-105	0,000	-4,35	1122,789	96,3	0,000
-101	0,000	-0,618	0,000	100	0,000
-97,8	0,000	3,11	0,000	104	0,000
-95,8	0,000	6,84	0,000	108	0,000
-90,1	0,000	10,6	0,000	111	0,000
-86,4	0,000	14,3	0,000	115	0,000
-82,6	0,000	18,0	0,000	119	0,000
-78,9	0,000	21,8	0,000	122	0,000
-75,2	0,000	25,5	0,000	126	0,000
-71,5	0,000	29,2	0,000	130	0,000
-67,7	0,000	32,9	0,000	134	0,000
-64,0	0,000	36,7	0,000	137	0,000
-60,3	9900,144	40,4	0,000	141	0,000
-56,5	26208,766	44,1	0,000	145	0,000
-52,8	65213,746	47,9	0,000	149	0,000

F4: 67 és 110 nm-es részecske-keverék DLS méret meghatározása.

Size Distribution Report by Intensity

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Sample Name: 67 es 110 nm 100 mM KCl hr 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes: merooldat

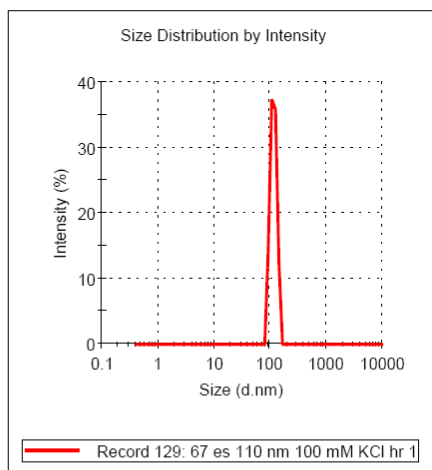
File Name: gergoo.dts Dispersant Name: Water
Record Number: 129 Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,59 Viscosity (cP): 0,8883
Material Absorbtion: 0,01 Measurement Date and Time: 2012. szeptember 25. 11:...

System

Temperature (°C): 25,0 Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 457,0 Measurement Position (mm): 5,50
Cell Description: Clear disposable zeta cell Attenuator: 4

Results

Z-Average (d.nm): 112,6 **Peak 1:** 114,2 % Intensity 100,0 Width (nm) 14,87
Pdl: 0,002 **Peak 2:** 0,000 0,0 0,000
Intercept: 0,932 **Peak 3:** 0,000 0,0 0,000



Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %
0,4000	0,0	13,54	0,0	458,7	0,0
0,4632	0,0	15,69	0,0	531,2	0,0
0,5365	0,0	18,17	0,0	615,1	0,0
0,6213	0,0	21,04	0,0	712,4	0,0
0,7195	0,0	24,36	0,0	825,0	0,0
0,8332	0,0	28,21	0,0	955,4	0,0
0,9649	0,0	32,67	0,0	1106	0,0
1,117	0,0	37,84	0,0	1281	0,0
1,294	0,0	43,82	0,0	1484	0,0
1,499	0,0	50,75	0,0	1718	0,0
1,736	0,0	58,77	0,0	1990	0,0
2,010	0,0	68,06	0,0	2305	0,0
2,328	0,0	78,82	0,0	2669	0,0
2,696	0,0	91,28	14,3	3091	0,0
3,122	0,0	105,7	37,4	3580	0,0
3,615	0,0	122,4	35,8	4145	0,0
4,187	0,0	141,8	12,5	4801	0,0
4,849	0,0	164,2	0,0	5560	0,0
5,615	0,0	190,1	0,0	6439	0,0
6,503	0,0	220,2	0,0	7456	0,0
7,531	0,0	255,0	0,0	8635	0,0
8,721	0,0	295,3	0,0	1,000e4	0,0
10,10	0,0	342,0	0,0		
11,70	0,0	396,1	0,0		

F5: 110 nm-es részecske DLS méret meghatározása.

Size Distribution Report by Intensity

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Sample Name: 110 nm 10 mM KCl 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes: merooldat

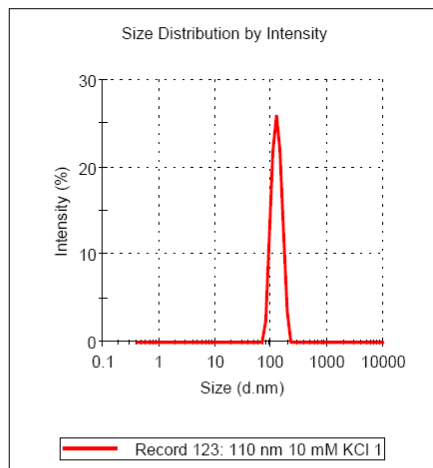
File Name: gergoo.dts Dispersant Name: Water
Record Number: 123 Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,59 Viscosity (cP): 0,8863
Material Absorbtion: 0,01 Measurement Date and Time: 2012. szeptember 25. 10:...

System

Temperature (°C): 24,9 Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 408,6 Measurement Position (mm): 5,50
Cell Description: Clear disposable zeta cell Attenuator: 4

Results

Z-Average (d.nm): 122,5 **Peak 1:** 125,9 **% Intensity** 100,0 **Width (nm)** 25,92
Pdl: 0,029 **Peak 2:** 0,000 0,0 0,000
Intercept: 0,939 **Peak 3:** 0,000 0,0 0,000



Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %
0,4000	0,0	13,54	0,0	458,7	0,0
0,4632	0,0	15,69	0,0	531,2	0,0
0,5365	0,0	18,17	0,0	615,1	0,0
0,6213	0,0	21,04	0,0	712,4	0,0
0,7195	0,0	24,36	0,0	825,0	0,0
0,8332	0,0	28,21	0,0	955,4	0,0
0,9649	0,0	32,67	0,0	1106	0,0
1,117	0,0	37,84	0,0	1281	0,0
1,294	0,0	43,82	0,0	1484	0,0
1,499	0,0	50,75	0,0	1718	0,0
1,736	0,0	58,77	0,0	1990	0,0
2,010	0,0	68,06	0,0	2305	0,0
2,328	0,0	78,82	2,5	2669	0,0
2,696	0,0	91,28	11,7	3091	0,0
3,122	0,0	105,7	21,8	3580	0,0
3,615	0,0	122,4	26,0	4145	0,0
4,187	0,0	141,8	22,0	4801	0,0
4,849	0,0	164,2	12,5	5560	0,0
5,615	0,0	190,1	3,5	6439	0,0
6,503	0,0	220,2	0,0	7456	0,0
7,531	0,0	255,0	0,0	8635	0,0
8,721	0,0	295,3	0,0	1,000e4	0,0
10,10	0,0	342,0	0,0		
11,70	0,0	396,1	0,0		

F6: 67 nm-es részecske DLS méret meghatározása.

Size Distribution Report by Intensity

v2.0



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Sample Name: 67 nm 100 mM KCl 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes: csak elektrolit

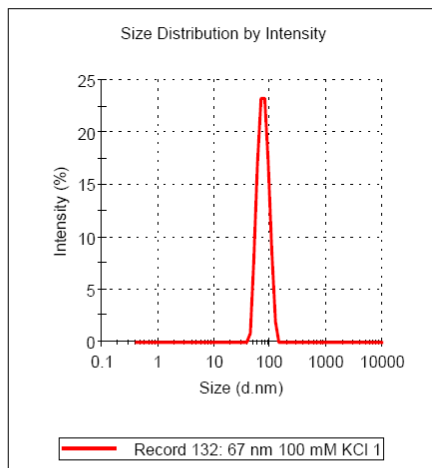
File Name: gergoo.dts Dispersant Name: Water
Record Number: 132 Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,59 Viscosity (cP): 0,8884
Material Absorbtion: 0,01 Measurement Date and Time: 2012. szeptember 25. 11:...

System

Temperature (°C): 25,1 Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 460,9 Measurement Position (mm): 5,50
Cell Description: Clear disposable zeta cell Attenuator: 4

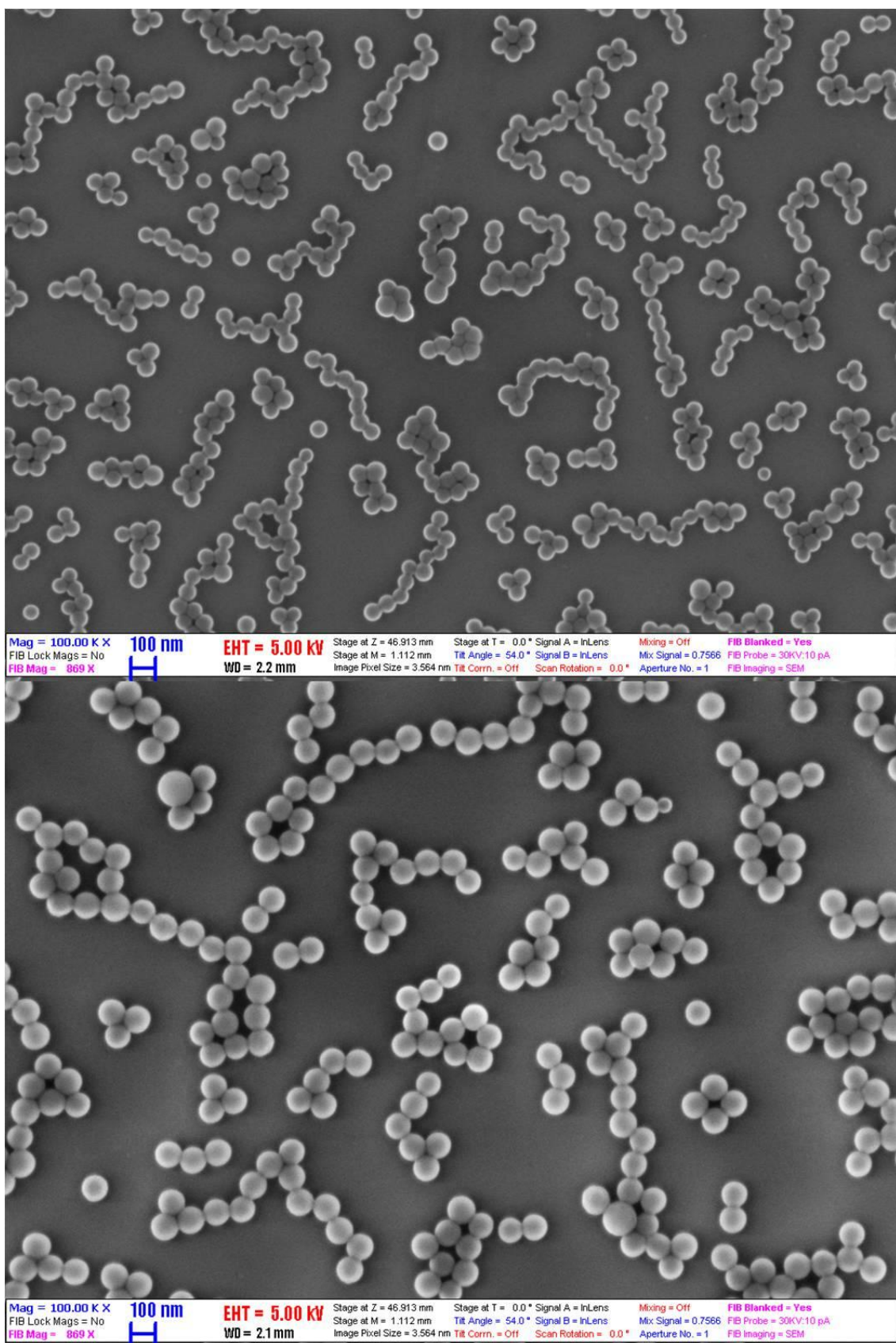
Results

Z-Average (d.nm): 72,66 **Peak 1:** 75,78 **% Intensity** 100,0 **Width (nm)** 16,87
Pdl: 0,015 **Peak 2:** 0,000 0,0 0,000
Intercept: 0,933 **Peak 3:** 0,000 0,0 0,000

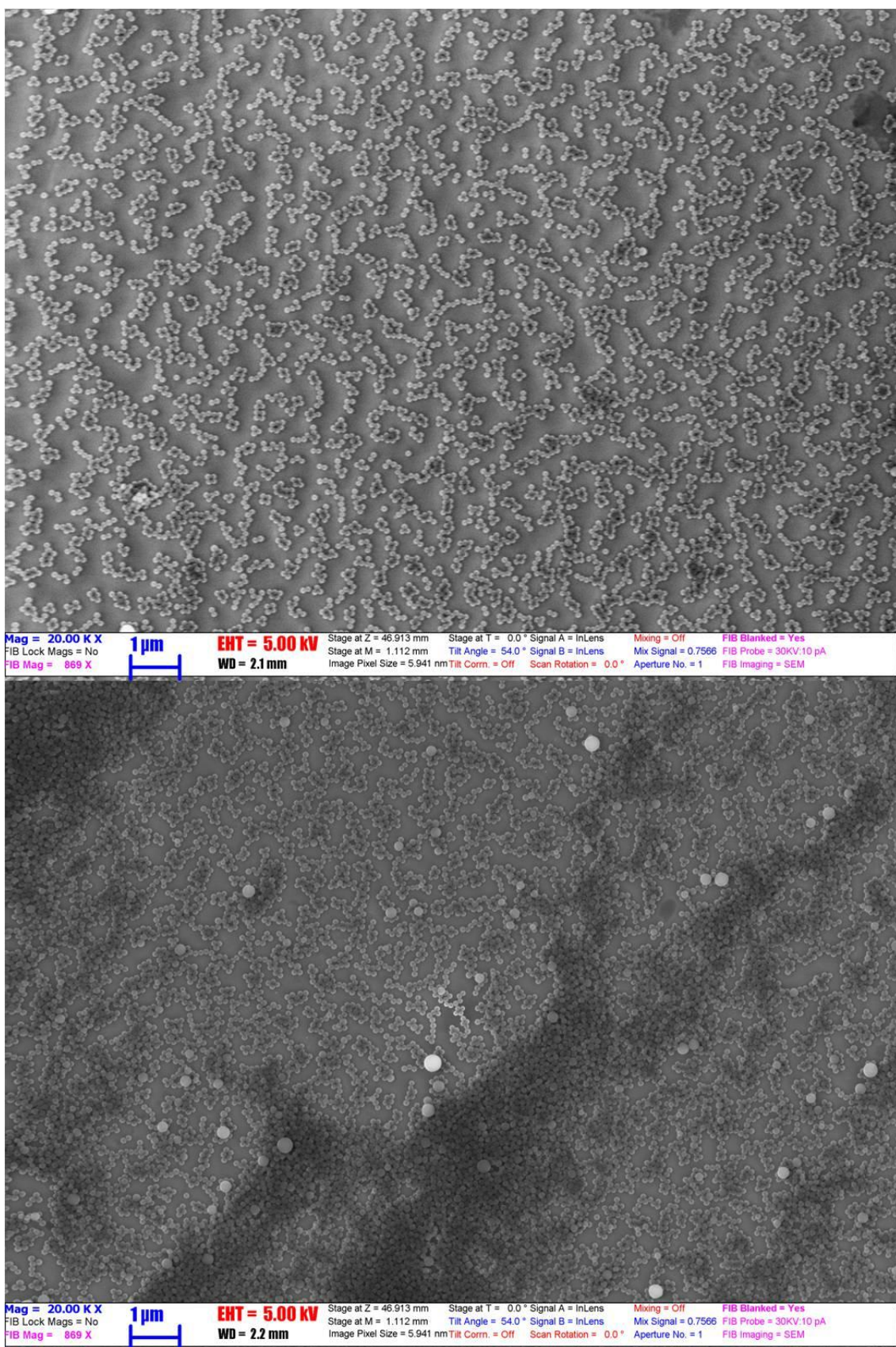


Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %	Size d.nm	Intensity %
0,4000	0,0	13,54	0,0	458,7	0,0
0,4632	0,0	15,69	0,0	531,2	0,0
0,5365	0,0	18,17	0,0	615,1	0,0
0,6213	0,0	21,04	0,0	712,4	0,0
0,7195	0,0	24,36	0,0	825,0	0,0
0,8332	0,0	28,21	0,0	955,4	0,0
0,9649	0,0	32,67	0,0	1106	0,0
1,117	0,0	37,84	0,0	1281	0,0
1,294	0,0	43,82	0,9	1484	0,0
1,499	0,0	50,75	7,7	1718	0,0
1,736	0,0	58,77	17,0	1990	0,0
2,010	0,0	68,06	23,3	2305	0,0
2,328	0,0	78,82	23,3	2669	0,0
2,696	0,0	91,28	17,3	3091	0,0
3,122	0,0	105,7	8,7	3580	0,0
3,615	0,0	122,4	2,0	4145	0,0
4,187	0,0	141,8	0,0	4801	0,0
4,849	0,0	164,2	0,0	5560	0,0
5,615	0,0	190,1	0,0	6439	0,0
6,503	0,0	220,2	0,0	7456	0,0
7,531	0,0	255,0	0,0	8635	0,0
8,721	0,0	295,3	0,0	1,000e4	0,0
10,10	0,0	342,0	0,0		
11,70	0,0	396,1	0,0		

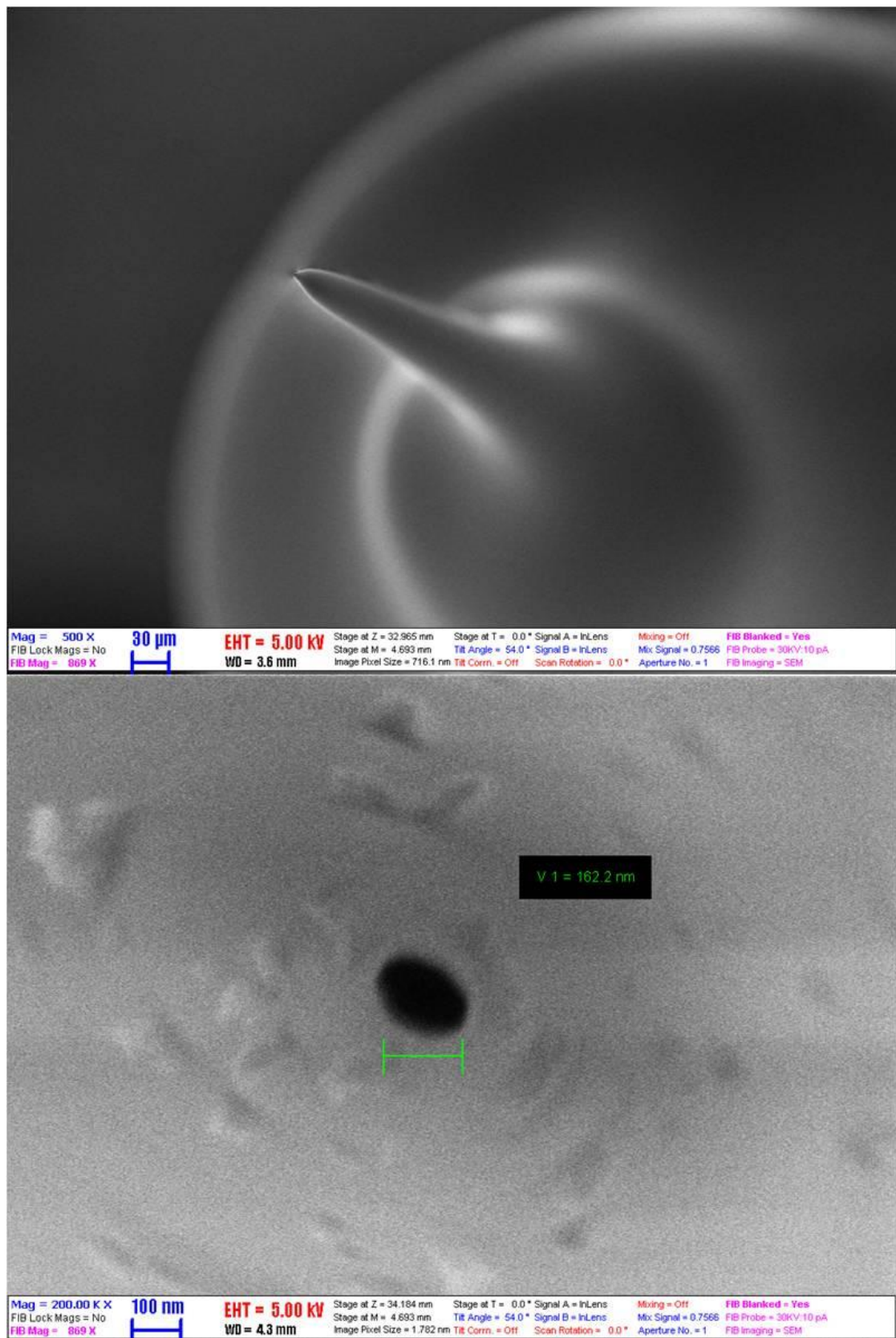
F7: 67 és 110 nm-es részecskék SEM felvételei



F8: 110 és 120 nm-es részecske SEM felvételei



F9: SEM-felvételek nanopipettáról I.



F10: SEM-felvételek nanopipettáról II.

