

**Válasz**  
**Dr. Szökő Éva egyetemi tanár**  
**opponensi véleményére**

Köszönöm Szökő Éva professzornak értekezésem alapos áttanulmányozását és a hozzá fűzött megjegyzéseket és kérdéseket.

Először a bírálatban szereplő megjegyzésekre, azok sorrendjében válaszolok.

Az arzénvegyületek elválasztására bemutatott módszer 6 különböző arzén vegyület elválasztására alkalmas, akár nagy mátrixtartalmú mintákból is. A 200 nm-en történő UV detektálás alkalmazásakor 2-131 µM-os kimutatási határok voltak elérhetők, amely értékek messze elmaradnak például az ivóvizek arzén tartalmára az EU-ban 2003-ban felállított 10 µg/L-es (0,13 µM) határértéktől. A kidolgozott CE elválasztást érzékenyebb detektorral alkalmazva (pl. MS vagy ICP-MS) lehetne ivóvizek, vagy más valós minták vizsgálatára alkalmazni.

A nitrit, nitrát és tiocianát nyálmintákban történő meghatározásokat illető hiányosságok annak köszönhetőek, hogy az értekezésben ezt a témát csupán másfél oldalban mutattam be a rendelkezésre álló szűkös keretek miatt. A nitrit, nitrát és tiocianát validációs paramétereit az értekezésben nem, hanem csak a kapcsolódó közleményünkben adtam meg (A. Gáspár, P.Juhász, K. Bágyi, J. Chromatogr. A., 2005, 1065, 327):

Table 1  
Analytical parameters of nitrite and nitrate

	Migration time (min)	LOD* (µg/mL)	Peak area, RSD (%)**	Migration time, RSD (%)**
Nitrite	4.43	0.14	1.63	0.84
Nitrate	5.14	0.21	1.81	0.89

\* 3s ( $\lambda = 214$  nm).

\*\*  $c = 5$  µg/mL,  $n = 10$ .

Table 2  
Linearity regression data for nitrite and nitrate determined by CZE

	Regression equation	Correlation coefficient	Range (µg/mL)
Nitrite	$y = 0.5049x + 0.331$	0.9992	1–100
Nitrate	$y = 0.597x + 0.391$	0.999	1–100

A tiocianát kimutatási határa 0,35 µg/mL, a csúcsterületek, illetve a migrációs idők relatív szórása 1,75 és 0,85 RSD%; a lineáris kimutatási tartomány pedig 1-100 µg/mL volt.

A vizsgált nyálmintákban a nitrit és a nitrát mennyisége gyorsan csökken, mivel a szájüregben levő különböző baktériumok redukálják a nitrátot nitritté. 90 perccel a mintavételezést követően a teljes nitrit és nitrát eltűnt a nyálmintákból, míg a tiocianát koncentráció viszonylag állandó maradt. Mindezek alapján a tisztelt Bíráló jól gondolja, hogy ahhoz hogy a nyálminták mintavételezése pillanatában a

minták nitrit/nitrát tartalmát elemezhetjük, ezen ionok mennyiségének gyors csökkenését valamilyen mintakezeléssel kell kiküszöbölni. A mintákhoz annyi 1 M-os NaOH-ot adtunk, hogy azok pH-ja kb. 11-re nőjön, ahol a baktériumok működése megszűnik, majd 5 percnyi centrifugálás után hűtőben, 4°C-on tároltuk. A CE elemzések során többnyire molibdenát belső standardot használtunk. Az eljárást alkalmazva biztosítható volt, hogy a 3 vizsgált anion mennyisége a nyálmintákban állandó maradjon legalább 7 napig. (Ezek az eredmények is sajnos csak a kapcsolódó közleményünkben található meg, amiket lentebb mutatok be.)

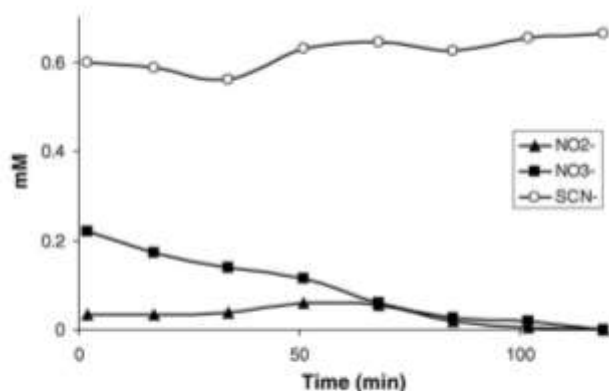


Fig. 3. The changes of the amount of the nitrite, nitrate and thiocyanate content of saliva stored at 25 °C.

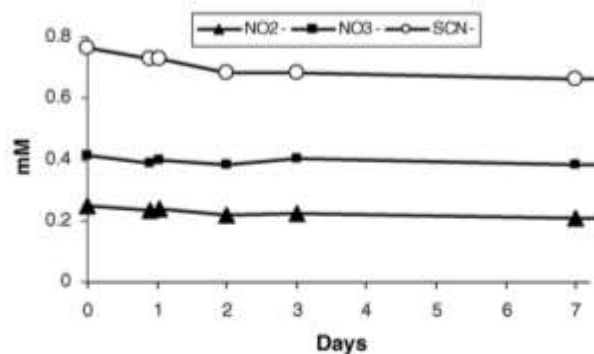
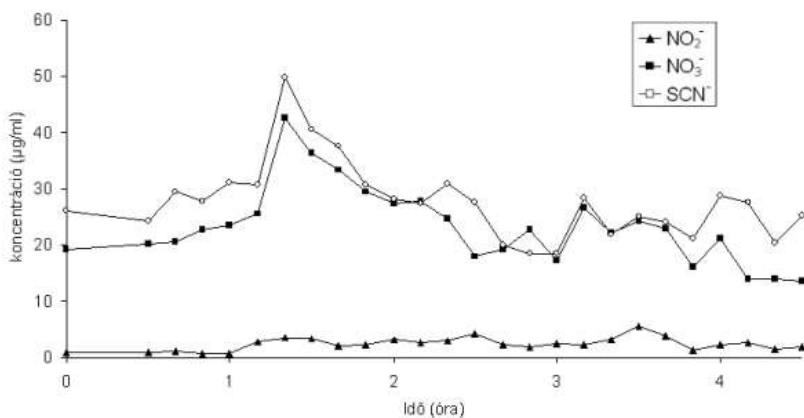


Fig. 4. Monitoring the changes of the amount of the nitrite, nitrate and thiocyanate content of saliva spiked with NaOH and stored at 4 °C up to 7 days. (Saliva sample was spiked with 10–10 µg/mL nitrite, nitrate and thiocyanate and 20 µg/mL molybdenate).

Forrás: A. Gáspár, P.Juhász, K. Bágyi, J. Chromatogr. A., 2005, 1065, 327

Ez a minimális mintakezelési eljárás alkalmas reális, biológiai minták vizsgálatára, a nyálminták hígítás nélküli (kvázi direkt injektálásos) CE elemzésére, amit az értekezés 17. ábráján bemutatott elektroferogramok is igazolnak. A 214 nm-en történő UV fotometriás detektálás lehetővé tette nagyszámú humán nyálminta elemzését, a nyálminták nitrit, nitrát és tiocianát tartalma hozzávetőlegesen 1,7 és 16 µg/ml körül alakult, de a bizonyos élelmiszerek fogyasztását követően ezek az értékek nagyobbak is lehetnek:



Nitrit, nitrát és tiocianát mennyiségének változása az időben, a két iont nagy mennyiségben tartalmazó étel fogyasztását követően. Forrás: P.Juhász, diplomamunka, DE, 2005.

Humán nyálminták CZE módszerrel meghatározott nitrit, nitrát és tiocianát tartalma

a,: egész napos mérés

b,: alacsony nitrát- és tiocianáttartalmú étel fogyasztását követő mérés

c,: magas nitrát- és tiocianáttartalmú étel fogyasztását követő mérés

d,: tizennégy egymást követő nap mérése nem stimulált nyál esetén

e,: tizennégy egymást követő nap mérése stimulált nyál esetén

	a,	b,	c,	d,	e,
N	41	25	25	14	14
<b>átlag koncentráció (µg/ml)</b>					
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1,03	1,69	2,50	1,02	1,1
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6,67	6,52	23,58	6,51	4,50
SCN <sup>-</sup>	14,95	25,10	27,96	16,99	14,56
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /SCN <sup>-</sup>	0,45	0,27	0,85	0,37	0,31
<b>RSD%</b>					
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	85,25	23,79	45,33	39,98	34,25
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	76,22	31,10	30,08	33,98	22,62
SCN <sup>-</sup>	57,78	22,27	25,58	28,39	20,41
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /SCN <sup>-</sup>	38,91	32,78	19,39	22,32	23,17

Forrás: P.Juhász, diplomamunka, DE, 2005.

Annak érdekében, hogy a mérés alatt hatékonyan kompenzáljuk az elemzés körülményeinek (pl. az eof mértékének) változásait, az alkalmazott belső standardnak a mintakomponenshez közel kell vándorolnia. Egyetlen belső standarddal végezve a migrációs idők korrekciót, az (1) összefüggést használhatjuk:

$$t_x^{i,corr} = t_x^i \cdot \frac{\frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^n t_{IS}^j}{t_{IS}^i} \quad (1)$$

ahol,

$t_x^{i,corr}$  : az X komponens korrigált vándorlási ideje a  $i$ -edik futtatás során (min)

$t_x^i$  : az X komponens vándorlási ideje az  $i$ -edik futtatás során (min)

$t_{IS}^i$  : a belső standard vándorlási ideje  $i$ -edik futtatás során (min)

n: az elektroforetikus futtatások száma

Az értekezésben bemutatam, hogy egyidejűleg 2 olyan belső standardot érdemes használni, mellyel lefedhetjük azt az időtartományt, amiben a komponensek vándorolnak. 2 belső standarddal történő

korrekcióhoz a  $t_{IS}^i$  paramétert a 2 belső standard vándorlási időinek mértani közepével kell helyettesítsük:

$$t_X^{i,corr} = t_X^i \cdot \frac{\frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^n \sqrt[m]{\prod_{k=1}^m t_{IS,k}^j}}{\sqrt[m]{\prod_{k=1}^m t_{IS,k}^i}} \quad (2)$$

ahol,

$t_{IS,k}^i$  : a  $k$ -dik belső standard vándorlási ideje az  $i$ -edik futtatás során (min)

$t_{IS,k}^j$  : a  $k$ -dik belső standard vándorlási ideje a  $j$ -dik futtatás során (min)

$n$ : az elektroforetikus futtatások száma

$m$ : az alkalmazott belső standardok száma

Mivel a belső standardok migrációs idejéhez közel álló komponensek esetében a legjobb a korrekció, a korrekcióhoz használt a képletnek tekintettel kell lennie arra, hogy a belső standard mennyire közel van az adott komponenshez. Ezért az (1) képlet  $t_{IS}^i$ -dik tagját kicserélhetjük a belső standardok vándorlási időinek súlyozott számtani közepével, ahol a súlyfaktor ( $w_k(X)$ ) az adott komponensnek a belső standardoktól való relatív távolságától függ:

$$w_k(X) = \min \left\{ \left( \frac{\frac{1}{n} \cdot \sum_{l=1}^n t_X^l}{\frac{1}{n} \cdot \sum_{l=1}^n t_{IS,k}^l} \right)^p, \left( \frac{\frac{1}{n} \cdot \sum_{l=1}^n t_{IS,k}^l}{\frac{1}{n} \cdot \sum_{l=1}^n t_X^l} \right)^p \right\} \equiv \exp \left( -p \cdot \left| \ln \sum_{l=1}^n t_X^l - \ln \sum_{l=1}^n t_{IS,k}^l \right| \right) \quad (3a)$$

ahol  $p \geq 0$ , és

$$t_{IS}^i(X) = \frac{\sum_{k=1}^m w_k(X) \cdot t_{IS,k}^i}{\sum_{k=1}^m w_k(X)} \quad (3b)$$

ahol

$w_k(X)$ : az  $X$  komponensre vonatkozó  $k$ -dik belső standard súlyfaktora

$t_{IS}^i(X)$  : a látszólagos belső standard különböző belső standardoknak az  $X$  komponenstől való távolságával súlyozott vándorlási ideje az  $i$ -edik futtatás során (min)

A fenti összefüggések összevonásával kapjuk azt a képletet, amit Matlab szoftverrel használtunk a korrigált vándorlási idők meghatározásához:

$$t_x^{i,corr} = t_x^i \cdot \frac{\frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^m \exp\left(-p \cdot \left| \ln \sum_{l=1}^n t_X^l - \ln \sum_{l=1}^n t_{IS,k}^l \right| \right) \cdot t_{IS,k}^j}{\sum_{k=1}^m \exp\left(-p \cdot \left| \ln \sum_{l=1}^n t_X^l - \ln \sum_{l=1}^n t_{IS,k}^l \right| \right) \cdot t_{IS,k}^i} \cdot \frac{\sum_{k=1}^m \exp\left(-p \cdot \left| \ln \sum_{l=1}^n t_X^l - \ln \sum_{l=1}^n t_{IS,k}^l \right| \right) \cdot t_{IS,k}^i}{\sum_{k=1}^m \exp\left(-p \cdot \left| \ln \sum_{l=1}^n t_X^l - \ln \sum_{l=1}^n t_{IS,k}^l \right| \right)} \quad (3c)$$

Eszerint a képlet szerint a meghatározandó komponenshez közelebb levő belső standard hozzájárulása nagyobb a korrekció esetén.

Az 5.1.2.4 fejezetben a két belső standard alkalmazásakor a számolás a (2) képlettel történt. Az értekezésben nem szereplő, közlésre nemrégiben elfogadott munkánkban (M. András, L. Zékány, A. Gáspár: Study on repeatability of the determination of temozolomide by micellar electrokinetic capillary chromatography using internal standards, J. Anal. Chem. 2015 közlésre elfogadva) írtuk le és tanulmányoztuk a (3c) összefüggés alkalmazhatóságát két vagy több belső standard egyidejű használatakor.

Az 5.1.3.3 fejezetben valóban nem adtam meg a kefalosporinok CZE elválasztására kidolgozott módszer esetében a mérés lineáris tartományát és a torzítatlanságot. Ezeket a paramétereket csak a kapcsolódó közleményeinkben találhatjuk meg. Ezek alapján ítélnéjük úgy, hogy a módszer alkalmas egyes klinikai mintákban kefalosporinok meghatározására.

Table 3  
Linearity regression data for cephalosporins

Cephalosporin	Regression equation	Correlation coefficient	Range (µg/ml)
CFD	$y = 0.054x - 0.011$	0.9989	2–150
CFL	$y = 0.041x - 0.061$	0.9955	5–200
CFC	$y = 0.072x - 0.0466$	0.9979	2–150
CFP	$y = 0.041x + 0.028$	0.9987	5–200
CTA	$y = 0.097x + 0.043$	0.9979	2–150
CCC	$y = 0.036x - 0.052$	0.9992	5–200
CFM	$y = 0.0514x - 0.0106$	0.9944	5–200
CZI	$y = 0.0647x - 0.022$	0.9974	2–150
CFR	$y = 0.347x - 0.115$	0.9989	1–100
CZO	$y = 0.170x - 0.143$	0.9986	2–150
COX	$y = 0.056x - 0.010$	0.9995	2–150
CTR	$y = 0.289x - 0.012$	0.9990	1–100
CIX	$y = 0.187x - 0.462$	0.9971	5–200
CFB	$y = 0.101x - 0.205$	0.9972	5–200

Forrás: A.Gáspár, M.Andrási, Sz.Kardos, J. Chromatogr. B., 2002, 775, 239

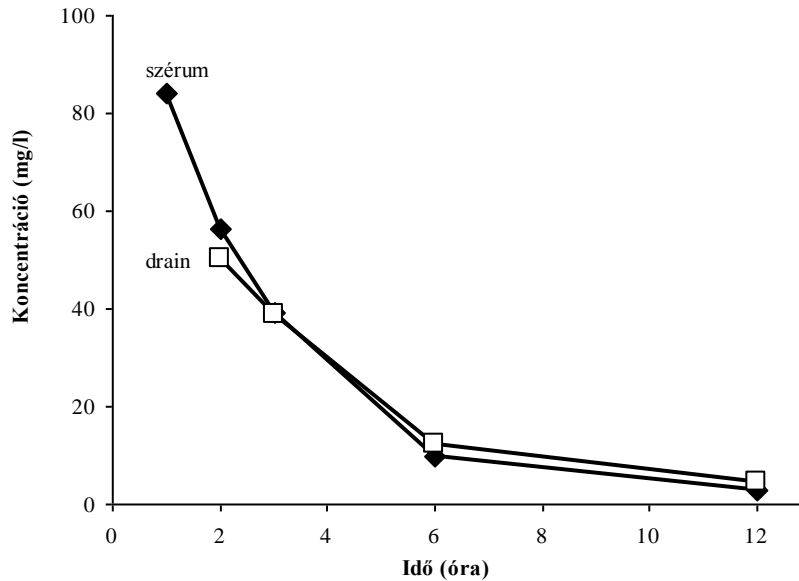
Table 1  
Intra-day reproducibility of ceftriaxon ( $N=10$ ,  $c=40$  µg/mL) in water, serum and sputum

	RSD (%)		Recovery (%)
	Migration time	Peak area	
Water	0.38	0.81	
Serum	0.77	1.41	103.1
Sputum	0.52	0.84	99.6
Sputum spiked <sup>a</sup>	0.76	1.78	97.8

<sup>a</sup> 2 g of sputum was spiked with 100 µL 1.2 mg/mL ceftriaxon. After homogenization the sample was divided into 10 parts and they were lyophilized. Each residue (9–10 mg) was dissolved in 300 µL methanol–water (1:1).

Forrás: M.Andrási, A.Gáspár, Á.Klekner, J. Chromatogr. B, 2007, 846, 355.

A cefazolinnal kezelt beteg szérumban a beadást megelőzően, és a beadást követő fél, egy, kettő, három, hat és tizenkét órával később elemeztük. Az értekezés 24. ábráján bemutatott elektroferogramok alapján a cefazolin koncentrációit a szérumban a gyógyszer beadását követő különböző időpontokban az alábbi diagram tartalmazza:



A cefazolin koncentrációjának változása a szérumban és a sebváladékban idegsebészeti műtét alatt, egyszeri 1 g cefazolin beadását követően

Az értekezésben szereplő 21. egyenlet indirekt UV detektálás és elektrokinetikus injektálás alkalmazásakor használható, amennyiben ismert a vizsgált és a standard ion töltésének hányadosa. További korlátozás, hogy a meghatározandó ion mozgékonyasága a kromofor háttérion (kromát), az ellenion (kálium-ion) és a belső univerzális standard (tioszulfát-ion) mozgékonyaságaitól legfeljebb 10%-ban térjen el. A vizsgált anionok (bromid, klorid, szulfát, nitrit, nitrát) esetében ezek a feltételek fennálltak, ezért kaphattuk azt a vizsgálataink során, hogy a javasolt kalibrációs eljárással legfeljebb 5%-os eltérés adódik az aktuális valós értékektől. A 2. táblázatban bemutatott valós és számított koncentrációértékek közötti eltérés egyedül a foszfát esetében nagyobb a szövegben deklarált legfeljebb 5%-nál. A foszfát ionnál mutatkozó nagyobb, 6%-os eltérés leginkább abból adódik, hogy annak mozgékonyasága lényegesen (több mint 30%-al) kisebb a tioszulfát mozgékonyaságánál. Az eltérés csökkentéséhez egy másik, a tioszulfáthoz hasonló mozgékonyaságú univerzális belső standardot kellene alkalmazni.

Valóban, a 4. táblázatban három kontrasztanyag esetében a reprodukálhatósági vizsgálatot nem 1 mM-os koncentrációban, hanem a megadott lineáris méréstartományba eső (például 0,1 mM) koncentrációban kellett volna elvégezni. Az a – táblázat adataiból is levonható – következtetés, hogy a belső standard csak akkor javítja a reprodukálhatóságot, ha kellően közel vándorol a mintakomponenshez az értekezés 47. oldala utolsó mondatában szerepel. Ehhez a bírálói megjegyzéshez kapcsolódik a belső standardok megfelelő alkalmazásával kapcsolatos fenti válaszom egy része is.

Az 5. táblázatban a betegektől vett szérumban és sputumban megadott kefalosporin-koncentrációk alapján több esetben valóban nem lehet pontos következtetést levonni az egyes kefalosporinok

sputumba való penetrációjára, mivel a mintavétel 6 órával a kezelést követően történt, az egyes kefalosporinok felezési ideje pedig eltérő. Mivel azonban a szérum és a sputum minták vétele ugyanakkor történt, a kezelésnél valamennyi beteg egyforma mennyiségben kapta a kefalosporint, és ha az adott kefalosporin felezési ideje hasonlóan tételezhető fel a szérumban és a sputumban, akkor az megállapítható, hogy a ceftriaxon penetrációja a sputumba nagyobb, mint például a cefazoliné. Érzékenyebb és pontosabb detektálás esetén – amennyiben a sputumbeli koncentrációk kimérhetőek lennének – a szérumban és sputumban kapott koncentrációk arányából a penetrációk mértéke összehasonlítható lenne.

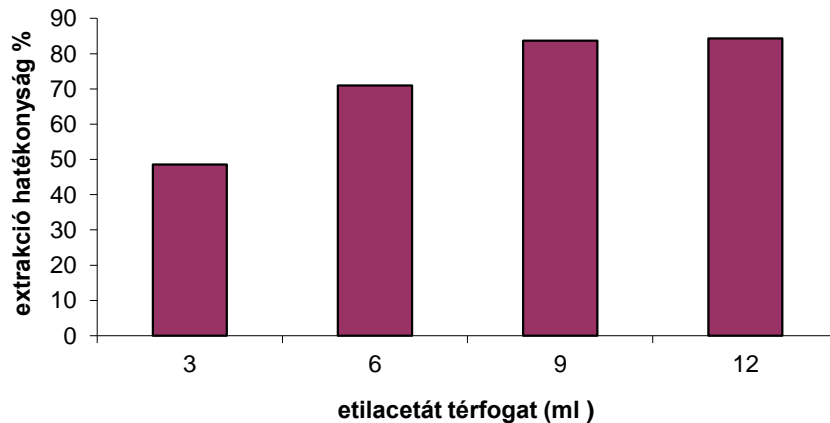
A táblázatba foglalt eredmények alapján leginkább az a következtetés vonható le, hogy a betegek bronchusváladékában valamennyi vizsgált kefalosporin szintje sajnos elmarad a baktériumok pusztulásához szükséges minimális gátló koncentrációtól (MIC), ami 2 µg/mL.

A 32. és 33. ábrák ábraalírásaiban valóban azonos kísérleti körülmények szerepelnek. Az egyetlen eltérés sajnos kimaradt, miszerint a 32. ábránál a detektorhoz közelebbi kapillárisvégnél injektáltunk (ún. "short-end injection"), míg a 33. ábránál a szokásos módon a detektortól messzebb levő kapillárisvégnél. Ez a magyarázat a közel tízszeres különbségre a migrációs időkben.

Az agytumor minták extrakcióját etil-acetáttal végeztük. A temozolomid agytumor mintákban történő mérése során visszanyerési vizsgálatot nem végeztünk, de az extrakció alatti veszteséget ellenőriztük. A 0,7-1 g tömegű mintákat liofilizálás és 50 µl 0.1 M HCl-be való visszaoldás után 3 x 300 µL etil-acetáttal extraháltuk, a harmadik extrakció után a vizes fázisban a temozolomid mennyiségét, jelenlétét kapilláris elektroforézissel ellenőriztük. Az etilacetátos extrakció hatásfokát 85%-nak határoztuk meg temozolomid standardoldatok felhasználásával. Az etil-acetátos fázisokat 1 ml-es edénykébe gyűjtöttük, majd a térfogat csökkenése után átmostuk a 100 µL-es CE edénykébe. A szárazra párolt temozolomid visszaoldódását 10 µl 0,1 M HCl oldatba a kis CE edénykében vortexszel és ultrahangos fürdővel is segítettük. Mivel az extrakció második fele, az utolsó szárazra párolások, a visszaoldás és az elemzés ugyanabból a kis CE edénykéből történt, ezért valószínűsíthető, hogy a veszteség nem jelentős.

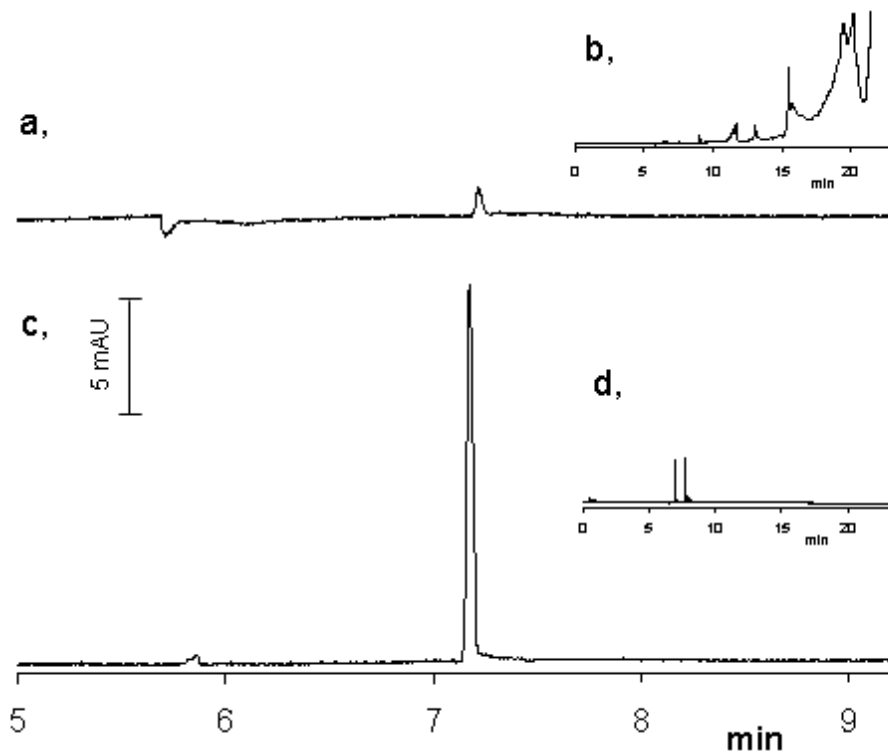
Optimálás során végeztünk egy kísérletet arra vonatkozóan milyen etilacetát térfogat szükséges a megfelelő extrakciós hatékonyság eléréséhez. Az alábbi ábra bizonyítja, hogy elegendő a 3 x 300 µl etilacetáttal való extrakció, mert a harmadik adag hozzáadása után már nem nő számottevően az extrakciós hatékonyság.





Etilacetát térfogatának hatása az extrakció hatékonyságára (0,5 mL TMZ oldatból)  
 Forrás: M.Andrási, B.Törzsök, Á.Klekner, A.Gáspár, J.Chromatogr.B, 2011, 879, 2229.

Temodalt szedő agydaganatos beteg vérmintáját mintaelőkészítés nélkül, majd etilacetátos extrakció után detektáltuk. Az alábbi ábra jól mutatja, hogy nagymértékű dúsulás érhető el extrakcióval, tizenháromszor nagyobb jelet kaptunk az elektroferogramon.



Temodalt szedő beteg vérmintája mintaelőkészítés nélkül 325 nm-en (a) és 200 nm-en (b), majd extrakció után 325 nm-en (c) és 200 nm-en (d) (Kísérleti körülmények: 7100 CE készülék, puffer: 25 mM foszfát + 45 mM SDS, pH= 6,8; hőmérséklet: 25°C, feszültség: +25 kV, injektálás: 50 mbar·4 sec). Forrás: M.Andrási, B.Törzsök, Á.Klekner, A.Gáspár, J.Chromatogr.B, 2011, 879, 2229.

A tumorminták esetén viszanyerési vizsgálat végzése azért nehézkes, mert nincs olyan tumorminta amelynek a temozolomid tartalma ismert (bizonylatolt) lenne. A tumormintákhoz történő ismert mennyiségű temozolomid hozzáadásakor csak a tumorszövetek felületére kerül a temozolomid és nem pedig a szövetek, sejtek belsejébe. Így a standard hozzáadással ("spike"-olással) végzett visszanyerési kísérletek nem teljesen korrektek, megbízhatók.

A 127. oldalon, az Összefoglalásban valóban félreértelmezhető volt két állítás az agytumor minták elemzése kapcsán. Az a megállapításunk igaz, hogy a szilárd halmazállapotú tumorminták egy viszonylag egyszerű mintakezelés – a liofilizált minta sósavoldatba való visszaoldása – után nagy sűrűségű, de homogén oldatként közvetlenül injektálhatók voltak a CE kapillárisba, ahol sok komponens egymástól elválasztható volt. UV fotometriás detektorunkkal azonban nem tudtuk a temozolomidot detektálni ezekben a mintákban. Az agytumor mintákban a temozolomidot csak akkor lehet meghatározni a rendelkezésünkre álló CE készülékkel, ha a tumor minták temozolomid tartalmát extrakcióval dúsítjuk (a 70. oldalon leírtak szerint). Ilyen módon tudtuk meghatározni az Összefoglalás részben megadott temozolomid tartalmakat.

Mivel a vizeletürítések alkalmával kapott vizelet minták komponenseinek koncentrációja különböző, a meghatározandó kontrasztanyag csúcsát a vizelet valamely egyéb ("természetes") összetevőjének csúcsához viszonyítva vizsgáltuk. E viszonyítási komponensnek a vizsgálandó és kontroll vizeletmintákra kapott elektroferogramokon nagy intenzitású, jellemző UV-spektrumot adó, 14,132 perc vándorlási idejű csúcsot választottuk. Mivel a CE készülékünkhöz nincs tömegspektrometriás detektor, ezért e komponens nem tudtuk azonosítani.

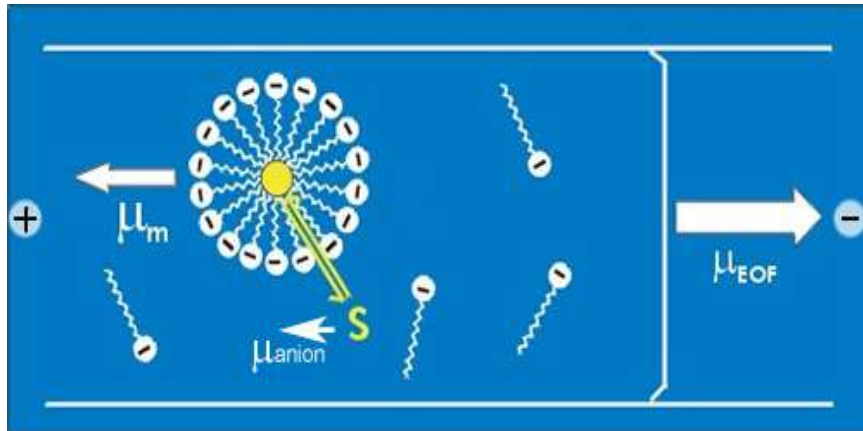
A tisztelt Bíráló felvetett kérdéseire azok sorrendjében a következőket válaszolom:

1,

CZE módszernél a két semleges Gd-tartalmú kontrasztanyag (a Gd(DTPA-BMA) és a Gd(HPDO3A)) az EOF-el együtt vándorolnak, és egyszerre – a legkisebb felbontódás nélkül – érik el a detektort. A  $[Gd(DOTA)]^-$ ,  $[Gd(AAZTA)]^-$ ,  $[Gd(BOPTA)]^{2-}$  és  $[Gd(DTPA)]^{2-}$  nettó töltése negatív, de a kísérleti körülmények közt a vándorlási sebességük kisebb az EOF-énél, így a katód felé vándorolnak. A négy anionos  $Gd^{3+}$ -tartalmú kontrasztanyag esetében a vándorlási idők a vegyületek tömeg/töltés arányának megfelelően alakulnak. Az egyszeresen negatív töltésű komplexek ( $[Gd(DOTA)]^-$ ,  $[Gd(AAZTA)]^-$ ) ugyan egyértelműen elválasztódnak a neutrális komplexektől és a kétszeres töltésű komplexektől, csúcsaik azonban egymással átfedődnek. Ennek oka egyrészt, hogy a két komplex tömeg/töltés aránya nagyon hasonló: nettó töltésük azonos, molekulatömegükben csak 15%-os az eltérés. Másrészt a csúcsok viszonylag erősen torzultak. (Bár a háromszög alakú csúcsok utalhatnak az elektrodiszperzió jelenségére, ez azonban csak a kifejezetten nagy elektroforetikus mozgékonyaságú anionok esetében lenne várható, amikor nagyon nagy a pufferion és az adott komponens elektroforetikus mozgékonyaságai közötti különbség.)

Mint ismeretes a MEKC módszerrel a töltés nélküli komponensek is elválaszthatók. A Gd(HPDO3A) vándorlási ideje azért lesz nagyobb, mint a szintén töltés nélküli Gd(DTPA-BMA)-é, mert kissé hidrofób a hidroxipropil csoport jelenléte miatt és így több időt tartózkodik a micellában, mint a pufferelektrolitban

a másik neutrális komplexhez képest. A micellákban a neutrális komponensek lassabban vándorolnak a katód felé, mint a micellákon kívül, az elektrolitban. A kétszeresen negatív töltésű komplexek ( $[\text{Gd}(\text{BOPTA})]^{2-}$ ,  $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ ) kölcsönhatása a negatív töltésű micellák belső terével elhanyagolható, így vándorlásukat gyakorlatilag nem befolyásolják a micellák, ezek a komponensek kizárólag méret/töltés arányuk szerint vándorolnak, a felbontás mértéke szinte teljesen megegyezik a CZE-nél tapasztalttal.



Az, hogy az egyszeres töltésű Gd-komplexek elválasztása is javul a MEKC módszer esetén, nem teljesen világos. Mivel a micellák ( $\mu_m$ ) és az eof ( $\mu_{\text{EOF}}$ ) mozgékonyaságai állandók, a két komplex elektroforetikus mozgékonyaságai ( $\mu_{\text{anion}}$ ) pedig nagyon hasonlóak a CZE eredmények alapján, a megoszlásuknak kell különbözniük a micellák és az elektrolit között. Az egyszeres töltésű Gd-komplexek elválasztását így az segítheti, hogy a két komplex kis mértékben kölcsönhatásba lép a micellák belső hidrofób terével, és e kölcsönhatások erőssége kis mértékben eltér egymástól; a  $[\text{Gd}(\text{AAZTA})]$  komplexnél erősebb lehet a kölcsönhatás az exociklusos metilcsoportja miatt.

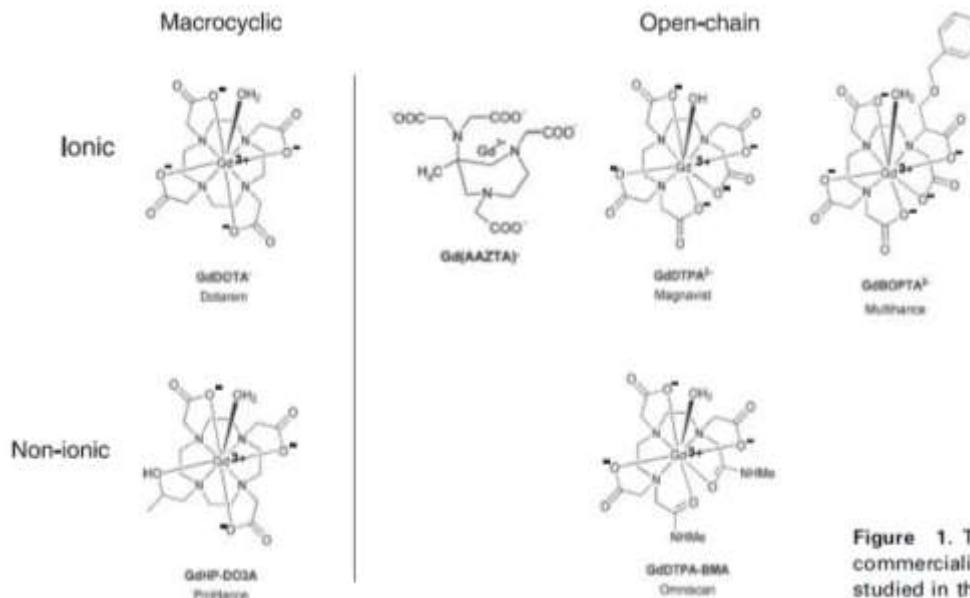
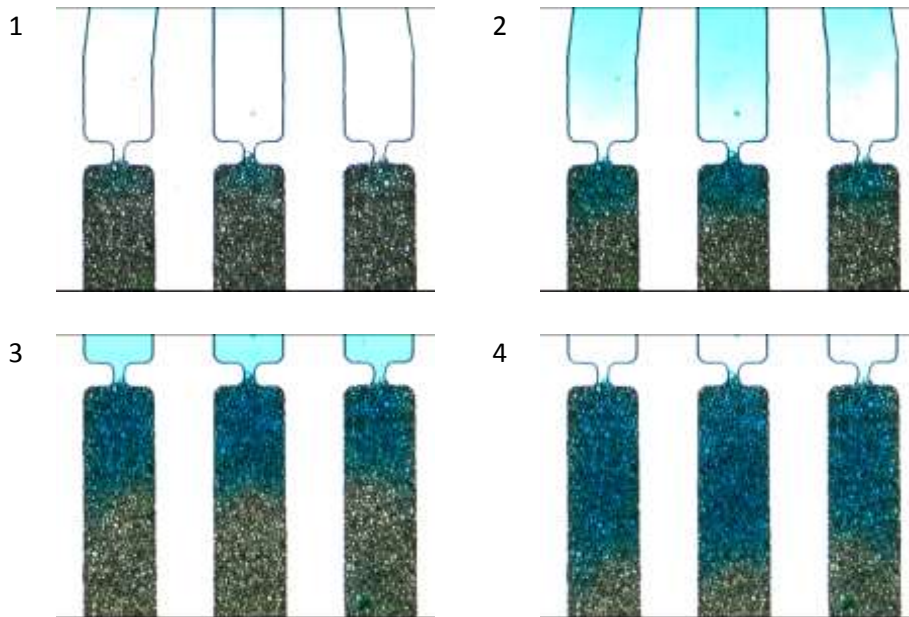


Figure 1. The structure of the currently commercialized Gd-chelates used for MRI studied in this work.

forrás: M.Andrási, A.Gáspár, O.Kovács, Zs.Baranyai, Á.Klekner, E.Brücher, Electrophoresis, 2011, 32, 2223

2,

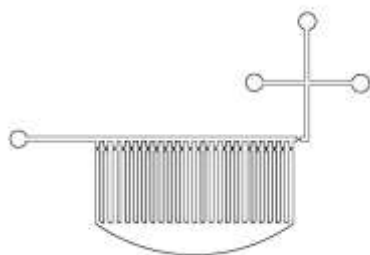
Az értekezésemben bemutattam, hogy a mikrofluidika által nyújtott előnyök egyik legfontosabbika, hogy sok analitikai rendszer – például kromatográfias töltet – helyezhető el egyetlen mikrocsipben, így egyidejűleg több kromatográfias elválasztás is végrehajtható. A 63. ábrán a párhuzamos kromatográfias töltetek kialakítására alkalmas többcsatornás mikrocsipek készítésére használható litográfias maszkmintázatok főbb típusai láthatók. A tisztelt Bíráló által említett 63.c ábrán olyan 3 párhuzamos csatornát tartalmazó mikrocsip látható, ahol az egyetlen mintát egy kereszteződésbe áramoltatjuk, és ahol a bejuttatott minta egyenletesen oszlik el a párhuzamos csatornák között. Ezt kísérletesen is igazoltuk a 63.c ábrán bemutatott csatornamintázatú mikrocsipben kialakított 3 töltetre rávitt festékminta injektálásakor. Két mikrofluidikai rendszerben összesen 6 egyforma kromatográfias tölteten végzett egyidejű elválasztás alapján a kék festékkomponens elúciós idejének relatív standard deviációja 3,6%-nak adódott.



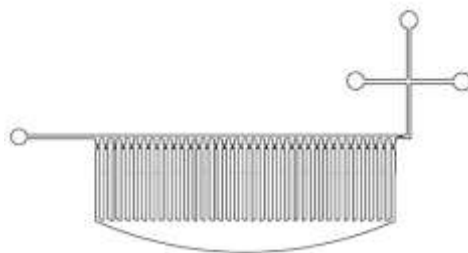
Kétkomponensű ételfesték keverék egyidejű elválasztása három egyforma kromatográfias (10  $\mu\text{m}$ , C18) tölteten.

A mikrocsipen a párhuzamos csatornák száma mindaddig növelhető, míg az elektródok vagy pumpacsövek csatlakozásához használt portok megfelelő (legalább 3-4 mm) távolságban vannak egymástól. Terveztünk 12, 24, 36 illetve 60 párhuzamos csatornát tartalmazó rendszereket is, amelyek közös kivezető porttal rendelkeznek, azonos kromatográfias töltetek kialakítására alkalmasak. Ezeknél a mikrocsipeknél – legegyszerűbb esetként – az egyforma töltetekre egyetlen minta beinjektálását végezhetjük.

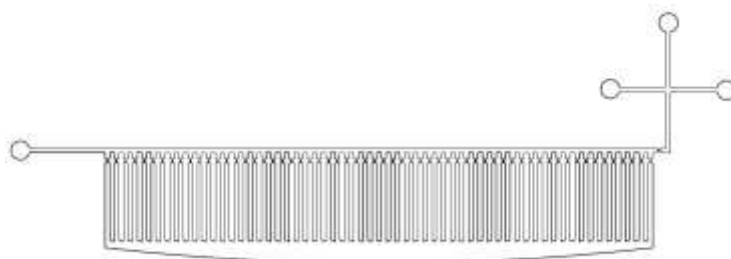
a,



b,



c,

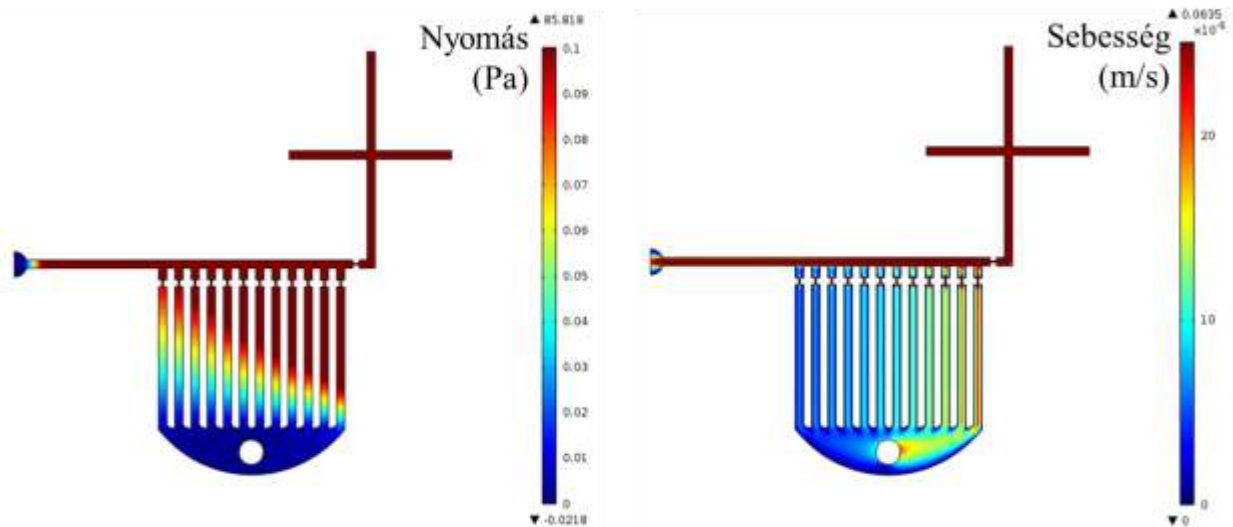


Sokcsatornás mikrofluidikai rendszerek AutoCAD rajzai.

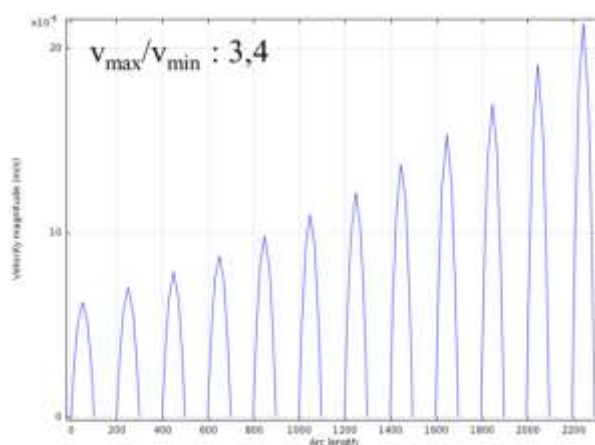
(24 párhuzamos csatornát (a,), 36 párhuzamos csatornát (b,) és 60 párhuzamos csatornát (c,) tartalmazó rendszerek.)

Az értekezésben beszámoltam arról, hogy az ilyen soktöltetes mikrocsipek párhuzamos csatornáiban az áramlási sebességek kismértékben eltérnek, ami lehetőséget adhat a van Deemter diagram egyszerű, gyors felvételéhez, de nyilvánvalóan problémát jelent a párhuzamos kromatográfias elválasztások alkalmazhatósága és összehasonlíthatósága miatt. A tisztelt Bíráló is feltehetőleg ezért kérdezi, hogyan lehet nagyszámú csatornában azonos sebességet elérni. Ezzel a problémával az értekezésem megírása óta foglalkoztam részletesebben. Ebben a munkában a mikrocsipek csatornáiban fellépő áramlási viszonyok szimulálására Dr. Iván Kristóffal (PPKE, Információs Technológiai és Bionikai Kar) való együttműködésben a COMSOL Multiphysics szoftvert alkalmaztuk.

A tizenkét párhuzamos csatornát tartalmazó rendszert modellezve a nyomás- és sebességeloszlás görbéken éppen akkora különbségek voltak megfigyelhetőek a párhuzamos csatornában (a csatornában számított legnagyobb és legkisebb áramlási sebességek aránya valamivel több mint kettő), mint amit a 72. ábránál leírt kísérlet során is tapasztaltunk. Ez a különbség még inkább látható volt a "kontúrvonalas" sebességeloszlás diagramon (a párhuzamos csatornákat azokra merőlegesen egy vízszintes vonallal elmetstettük és e vonal mentén mértük az áramlási sebességeket a csatornában).



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

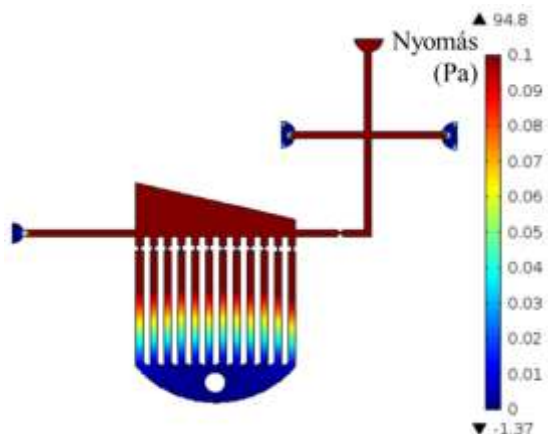


A tizenkét párhuzamos csatornában számított áramlási sebességek.

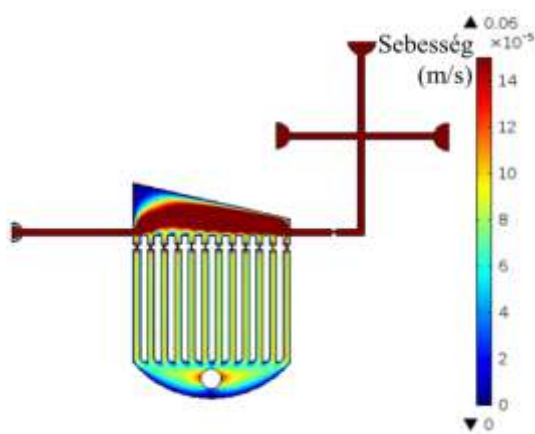
A párhuzamos csatornák áramlási sebességeinek kiegyenlítésére több módszert is kipróbáltunk. Elzártuk, illetve kinyitottuk a csatornarendszer egyes portjait, illetve nyomást vagy vákuumot alkalmaztunk a csatornarendszer egyes pontjainál. Ezekkel az elvi (szimulációs) módszerekkel ugyan képesek voltunk kiegyenlíteni a csatornabeli sebességeket, de ezek a módosítások kísérletesen nehezen megvalósíthatóak, reprodukálhatóak.

Egy másik lehetőség a csatornamintázat geometriájának módosítása lehet. Így a párhuzamos csatornák előtti csatornaszakasz alakját trapéz-szerűvé módosítottuk. A szimulációs vizsgálatok alapján az áramlási sebességek 1%-nál kisebb eltérését akkor kaptuk, amikor a trapéz párhuzamos oldalainak aránya 8:1 volt. Ugyancsak a szimulációk világítottak rá arra, hogy a trapézalakú csatornarész csúcsában a folyadék áramlási sebessége szinte nulla, így ez a rész a rendszer holtterefogatának számít. A holtterefogat csökkentésének érdekében ezt a csatornarészt lekerekítettük és szimulációkkal igazoltuk a módosítás eredményességét.

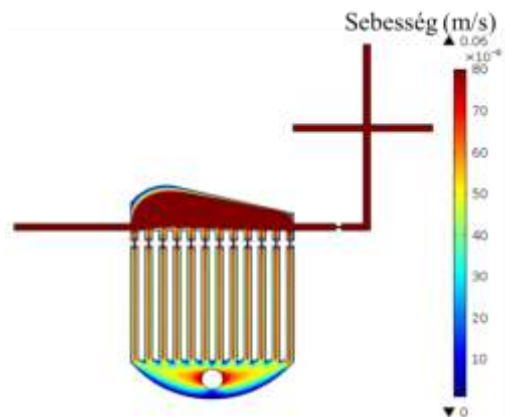
a,



b,

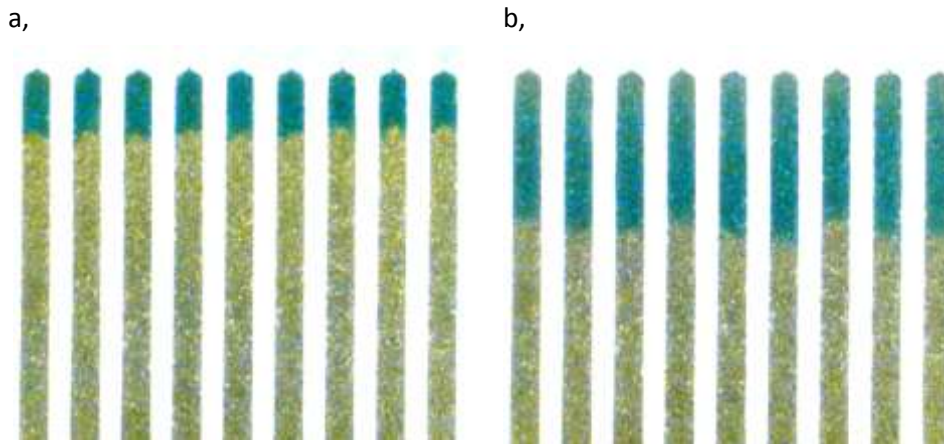


c,



A 64.a ábrán bemutatott csatornamintázat trapéz-alakú módosítását követő COMSOL szimulációk eredményei: nyomáeloszlás (a,) és sebességeloszlás (b,) diagramok, valamint a lekerekített trapéz-alakú módosítást tartalmazó csatornarendszerben a sebességeloszlás diagram (c,).

Elkészítettük e szimulációs kísérletek által javasolt csatornamintázatú mikrocipeket, majd a párhuzamos csatornában tölteteket hoztunk létre 10  $\mu\text{m}$ -es C18-as kromatográfiás részecskékből. A tölteteken festékkeveréket választottunk el. Az áramlási sebességek nagyon hasonlóak voltak a párhuzamos csatornában, a csatornában mért legnagyobb és legkisebb áramlási sebesség aránya 1,05 volt. Ezen elválasztás kivitelezésével bizonyítottuk, hogy a COMSOL szimulációs szoftverek segítségével a mikrocipek tervezése nagymértékben egyszerűsíthető, gyorsítható.



Ételfestékek elválasztása a módosított, szimulációs kísérletek által javasolt csatornamintázatú mikroszipben készített kromatográfias tölteteken (10  $\mu\text{m}$ , C18-as részecskék, zöld ételfesték keverék, oldószerváltás: vízről metanol)

Ezek a vizsgálataink az értekezés megírását követően születtek és nemrégiben publikáltuk (A. Nagy, E.L. Tóth, K. Iván, A. Gáspár: Design and modeling of microfluidic systems for multiple chromatographic separations, *Microchem.J.*, 2015, 123, 125-130.). Tudomásunk szerint jelenleg nincs más irodalmi adat nagyszámú párhuzamos csatornájú mikroszipen olyan kialakításáról, melyben a csatornában az áramlási sebesség azonos és minden csatornát egyidejűleg ér el a bejuttatott folyadék.

3,

A kapillárison és mikroszipen végzett elválasztások során a detektálás érzékenysége elvileg nagyon hasonló kellene legyen, amennyiben ugyanazt a detektáló rendszert használjuk. Hiszen a leggyakrabban alkalmazott spektrofotometriás detektálásnál az érzékenységet alapvetően meghatározó tényező az optikai fényút hossza a mintában. Ez a kapillárisokban és a mikroszipen csatornáiban egyaránt 50  $\mu\text{m}$  körül van. Az általunk készített mikroszipen ráadásul az üvegnél is nagyobb fényáteresztéssel jellemezhető PDMS-ből készülnek, és mind a két rendszerben a detektálás lehetséges közvetlenül a kapillárison, illetve a mikroszipen. Mindezek ellenére az általunk konstruált miniatürizált rendszerekben és mikroszipekben jóval rosszabb kimutatási határokat kaptunk, mintha a gyártók készülékeivel végeztük volna a meghatározásokat. Az értekezés 5.2.2 fejezetében bemutatott miniatürizált kapilláris elektroforézisnél ( $\mu\text{CE}$ ) az elérhető kimutatási határok 110-276 mg/L között alakultak, amelyek kb. két nagyságrenddel maradnak el az Agilent CE készülékekkel elérhető LOD értékekhez képest. Az összeállított  $\mu\text{CE}$  rendszerben tapasztalt gyenge detektálási erő oka, hogy a fényforrás felől érkező fény széttart a szál-optikából kilépve, így a fény egy része nem jut a kapillárisbeli folyadékra, illetve szóródik a kapilláris falán, jelentős háttérzajt okoz a detektálás során. (A modern CE készülékekben a fénysugarat pontosan a kapilláris belsejébe fókuszálják.) Kísérleteink során legalább 2 nagyságrenddel rosszabb kimutatási határokat kaptunk mikroszipen, mint a CE készülékekkel. A megoldás természetesen az lehet, ha – és a jövőben mi is ezt tervezzük – a fényt megfelelően fókuszáljuk és a csatorna közvetlen közelében rést alkalmazunk. Az értekezésben UV fotometriás detektálást a mikroszipen való



detektáláshoz nem alkalmaztam, hanem egyszerűen a mikroszkóppal követtem a színes festékek elválasztásait.

Hasonlóképpen, a laborunkban általunk tervezett és egyszerű technológiával elkészített mikrocsipen az elérhető pontosság is elmarad a legjobb műszergyártók által kifejlesztett és sokszor csúcstechnikával legyártott mikrocsipekkel elérhető értékektől (pl. az Agilent kemény poliiimid műanyagban lézerablációs technikával készíti el a csatornamintázatot és az egyes rétegeket speciális technikával illeszti össze). Mind a kapillárisban, mind a mikrocsipben a pontosság, az elemzések ismételtetősége elsősorban attól függ, hogy mennyire azonos az elválasztóegységbe bejuttatott mintazónák nagysága és alakja. Mivel a kapilláris elektroforetikus rendszerekben a mintabevitel automatikusan történik, a mikrocsipekben mi pedig ezt manuálisan végeztük, utóbbi esetén nyilvánvalóan lényegesen rosszabb RSD%-ok érhetők el mind a csúcsterületekben, mind vándorlási vagy retenciós időkből. Míg ezek az értékek CE készülékekben legfeljebb 1-2 RSD%-ot tesznek ki, a mikrocsip rendszereknél 5-20 RSD%-ot értünk el, ami tipikusnak számít az irodalomban talált hasonlóképpen házilagosan készített mikrocsipekkel végzett kutatásokban.

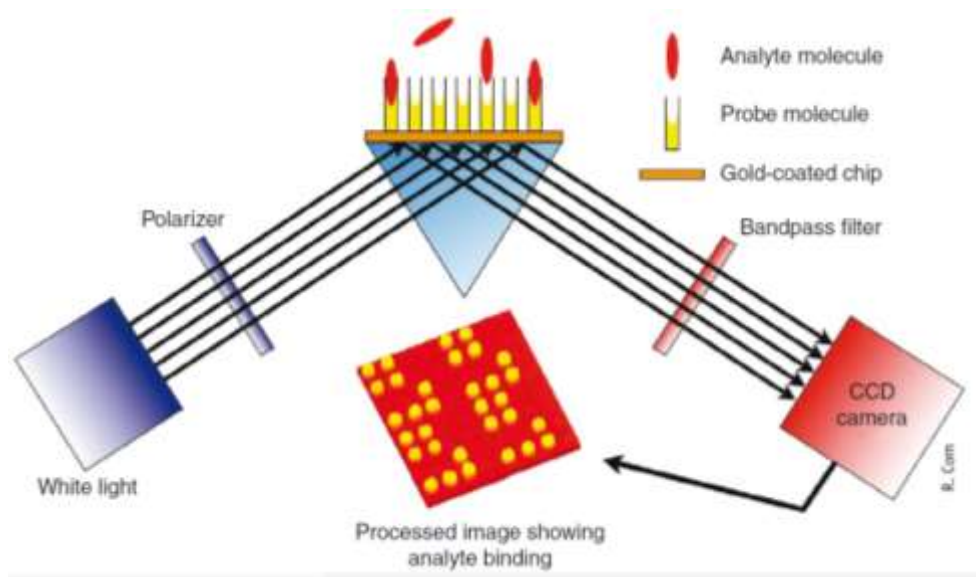
Meg kell még jegyeznem, hogy értekezésem mikrofluidikai részében az elválasztórendszerek fejlesztésére és új mintabeviteli módszerek kidolgozására fókuszáltam, a detektálási érzékenység és a meghatározások pontosságának szükségszerű jelentős javítása még sok kutatást igényel a mi részünkről is, de a területen dolgozó tudományos kutatóktól és készülégyártóktól is. E tekintetben új technológiai felfedezések különösen fontosak lesznek.

Mikrocsipekben a kvantitatív meghatározás érzékenysége on-line dúsító eljárás vagy érzékeny detektálás alkalmazásával javítható. Akár többszázszoros dúsítást érhetünk el izotachoforézissel vagy izoelektromos fókuszálással úgy, hogy az elválasztó csatorna felének mintával való feltöltéséhez kevesebb, mint 1  $\mu$ l szükséges. Izotachoforézissel dúsítottunk már PDMS mikrocsipben szerves anionokat, festékeket, de még baktériumokat is.

Mikrocsipekhez sokféle detektálási módszert kipróbáltak már ezidáig, mi az értekezésben felületi plazmon rezonancia spektroszkópia és mikro-spektrofotométer alkalmazhatóságát vizsgáltuk. Jelenleg különböző atomspektrométereket, mint érzékeny elemspektív detektorokat igyekszünk kapcsolni a mikrocsipekhez. Kísérleteket végeztünk lángatomabszorpciós (FAAS), lézer indukált plazma spektrometriás (LIBS), grafitkemencés atomabszorpciós spektrometriás (GFAAS) módszerekkel. Jelenleg előkísérleteket végzünk a rendkívül érzékeny ICP-MS-el való kapcsolással is, azt kihasználva, hogy a mikrocsip csatornájához kapcsolódó fémkapillárisra 10 kV feszültséget kapcsolva finom aeroszol (elektrospray) képezhető, ami optimális lehet ICP/AES vagy ICP-MS rendszerekhez.

A legtöbb hagyományosan használt érzékeny detektor azért nem alkalmazható könnyen a mikrofluidikai rendszerekkel, mert azok 1  $\mu$ l-nél is lényegesen kisebb térfogatú mintaoldatokat szolgáltatnak a detektor számára, ami a legtöbb esetben nem elegendő. Ráadásul a mikrocsipekhez miniatürizálható, sőt, optimális esetben közvetlenül a mikrocsipre integrálható detektor lenne előnyös. Mindezek alapján jelenleg a mikrocsipekhez használható legérzékenyebb detektálás lézerindukált fluoreszcencia (LIF) elvén alapul. Nem véletlen, hogy a kereskedelmi forgalomban levő mikrofluidikai rendszereknél is ezt használják (pl. Bioanalyzer, Agilent; Labchip, Perkin Elmer). LIF detektálással az irodalmi adatok alapján akár 50 ng/mL RNS vagy DNS is meghatározható 1  $\mu$ l mintaoldatból. (Ez nagyjából 3 nagyságrenddel jobb kimutatási határ, mint ami UV fotometriás vagy vezetőképességmérési detektálással elérhető.) A másik

alternatíva a nagy érzékenység eléréséhez a tömegspektrometria lehet, és itt is van már kereskedelmi forgalomban levő rendszer integrált elődúsító oszloppal (HPLC-chip/MS, Agilent), amelyre a gyártó különböző peptidekre 30 attomól kimutatási határt ad meg 1  $\mu$ l mintaoldat felhasználásával. A chip-MS rendszerénél azonban sajnos elveszik a hordozhatóság, olcsóság és a párhuzamos elemzések lehetősége. Az is fontos igény lenne ugyanis, hogy a mikrocsip több (akár több száz) különböző pontján lehessen egymástól független detektálásokat végezni, hiszen egyetlen mikrocsipen – mint azt az értekezésben a soktöltetes rendszereknél bemutattam – sok párhuzamos analízáló rendszer is elhelyezhető. Ebből a szempontból ígéretes detektorként tűnt fel néhány éve a felületi plazmon rezonanciás képalkotás (SPR imaging), aminek nagy előnye a mérések párhuzamosításának lehetősége (egy vékony aranyrétegre mikrofluidikai chip közvetlenül illeszthető):



Forrás: N.Blow, Nature Methods, 2009, 6, 389.

Egy ilyen rendszerben akár 100, egyenként 100  $\mu$ m átmérőjű területen nM-os kimutatási határok érhetők el fehérjék, antitestek esetén [R.B.M.Schasfoort, A.J.Tudos, Handbook of Surface Plasmon Resonance, RSC Publishing, 2008].

A kvantitatív meghatározások érzékenysége tehát jelentősen javítható, és mivel a mikrofluidikai rendszerekhez alkalmazható érzékeny, univerzális, a mikrocsipekhez integrálható és párhuzamosítható detektorok kifejlesztésére nagy szükség van, az ez irányú kutatások jelenleg is intenzívek kutatóintézetekben és készülégyártó cégeknél.

Végezetül még egyszer köszönöm a dolgozatomban bírálatának elkészítését és azt, hogy az értekezés nyilvános vitára való bocsátását javasolja.

Debrecen, 2015. szeptember 23.

Dr. Gáspár Attila