

dc_923_14

Elektroforetikus elválasztások kapillárisban és mikrocsipben

MTA doktori értekezés tézisei

Gáspár Attila

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Technológiai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Debrecen, 2014

1. Bevezetés és célkitűzések

Az analitikai eljárások célja, hogy egy anyagi rendszer összetevőiről információt nyerjünk. Az analitika fejlődésével egyre komplexebb igények jelennek meg, általában a minta nem csak egyetlen, hanem több komponensét, sokszor teljes összetételét kell meghatározni a legkülönbözőbb mintákból. Emiatt a modern analitikai elválasztási módszerek egyre fontosabb szerephez jutnak a tudományos kutatásban és a legkülönbözőbb ipari alkalmazási területeken.

A kapilláris elektroforézis (CE) egy olyan nagy teljesítőképességű elválasztástechnikai módszer, mely jól egyesíti a nagy elválasztási hatékonyság, a gyors elemzés, kis mennyiségű minta- és vegyszerfelhasználás, illetve poláros és nem-poláros anyagok elemzésének lehetőségét. A módszer egyik legnagyobb előnye a lehetséges alkalmazások rendkívül széles köre, hiszen alkalmazható fémionok, szerves anionok, királis vegyületek, peptidek és fehérjék, szénhidrátok, DNS fragmentumok, de akár egész sejtek és vírusok elválasztásához és meghatározásához is. A kapilláris elektroforézis sokoldalúsága miatt alkalmas az egyes gyógyszervegyületek legkülönbözőbb farmakokinetikai, fizikai-kémiai jellemzőinek meghatározására, gyógyászati hatékonyságának vizsgálatára. A 3 évtizede bevezetett kapilláris elektroforézis, melynek alap kutatása még jelenleg is folyik jelenleg a nagyhatékonyságú kromatográfiai módszerek legfontosabb alternatívája. Napjainkban a CE jelentőségét mutatja a fehérjealapú gyógyszerek analitikájában vagy a proteomikai vizsgálatokban betöltött fontos szerepe, illetve, hogy a mikrofluidikai csipekben a legegyszerűbben, leghatékonyabban alkalmazható elválasztási módszer.

Az utóbbi években a „lab-on-a-chip” technológia átalakítani látszik a laboratóriumi kísérleteket és analitikai vizsgálatokat. Az analitikai mérőrendszerek miniatürizálása nem csupán a jelenlegi technológia méretének csökkentését jelenti, de egyúttal egészen újfajta analitikai rendszerek megszületését is lehetővé teszi. A mikrocsipekben végzett vizsgálatok sokkal gyorsabbak, pikoliternyi mintaoldatot, illetve mikroliternyi reagens oldatot igényelnek. Ezek a kutatások - elsősorban biotechnológiai, klinikai és analitikai kémiai területeken - intenzíven folynak a fejlett országok egyetemeken és a különböző fejlesztő cégekben.

Tanszékünkön egyetemi hallgatóként, doktori ösztöndíjasként és kezdő kutatóként az atomspektrometria mintabeviteli problémáival és egyes elem-specieszek meghatározásával foglalkoztam. 2000-től egy számomra teljesen új területen, a kapilláris elektroforézis módszerrel kezdtem előbb elem-specieszeket, majd más vegyületeket elválasztani és az ennél az analitikai módszernél is kritikusnak számító mintainjektálási problémákat tanulmányoztam. 2007-ben USA-beli tanulmányutam során a mikrofluidika alapjait sajátíthattam el, és hazatérve kezdtem el kialakítani mikrofluidikai analitikai laboratóriumunkat. Jelenleg a tanszékünkön folyó mikrofluidikai analitikai kutatásaink hosszútávú célja, hogy mikrofabricációs eljárások

segítségével egyfajta integrált laboratóriumokat (lab-on-a-chip, micro total analysis system (μ TAS)) tervezzünk és készítsünk el.

Az értekezésemben az elmúlt 14 év során kapillárisban és mikrofluidikai csipben végzett elektroforetikus kutatásaink eredményeit foglaltam össze. Mind a két módszernél alapvető és jelenleg is a kutatások egyik legfontosabb tárgya a nanoliter vagy annál is kisebb térfogatú *minták reprodukálható, injektálási hibáktól mentes bejuttatása a szeparációs kapillárisba vagy mikrocsatornába*. A mikrofluidikai csipeknél különösen fontos lenne a nanoliternél is kisebb térfogatú minták bejuttatására egyszerű *hidrodinamikus injektálási* eljárás. Ezek a mintainjektálási kutatások adják az elektroforetikus elválasztások, meghatározások elméletét érintő vizsgálatainkat.

Mivel az analitikusok munkájának, kutatásainak irányát sokszor befolyásolják a változatos tudományterületekről érkező analitikai feladatok, magam is sokféle vegyülettípus (pl. szervetlen ionok, elemspecieszek, toxinok, gyógyszervegyületek) meghatározására fejlesztettem ki analitikai módszereket a legkülönbözőbb mintatípusokból (pl. szérum, vizelet, tumor, nyál, felszíni víz) kapilláris elektroforézis segítségével. Olyan *kapilláris elektroforetikus módszerek* kidolgozására törekedtünk, melyek eddig nem vizsgált komponensek elválasztására vagy speciális mintatípusokból történő *közvetlen, mintaelőkészítés nélküli elemzések*re irányultak.

Az alig húsz éve megszületett analitikai mikrofluidika területén még számos alapvető probléma (pl. érzékeny és univerzális detektálás hiánya, a komplett mérőrendszer miniatürizálása, injektálási nehézségek, a megfelelő elemzési reprodukálhatóság biztosítása) gátolja a mikrocsipek széleskörű, rutinszerű analitikai használatát. Mikrofluidikai kutatásainkban elsősorban *új detektálási lehetőségek* alkalmazhatóságának tanulmányozására, *különböző csatornarendszerek tervezésére*, az *(elektro)kromatográfiás töltetek kialakításának* újfajta módszerének kidolgozására, illetve *párhuzamosan végezhető analitikai elválasztások* kifejlesztésére törekedtünk.

Az értekezésben bemutatott kapilláris elektroforetikus kutatásokat kizárólag, a mikrofluidikai vizsgálatainknak pedig a túlnyomó részét a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén végeztük. Az elmúlt másfél évtizedben végzett kapilláris elektroforetikus kutatásainknak nem voltak előzményei egyetemünkön, mikrofluidikai analitikai területen pedig a legaktívabb kutatócsoport vagyunk hazánkban.

2. Alkalmazott készülékek és módszerek

Vizsgálatainkhoz HP ^{3D}CE és 7100 CE (Agilent) kapilláris elektroforézis készülékeket használtunk. A detektálás spektrofotometriásan történt, az elektroferogramokat a gyártó szoftverével értékeltük ki. Az elektroforetikus elválasztásokhoz 50 µm belső átmérőjű kvarckapillárisokat használtunk. A klinikai minták elemzése során a készülék mintatartóját +15°C-on termosztáltuk, egyes klinikai mintákat (sputum, tumor) liofilizáltunk. A CZE-vel meghatározott pK értékeket pH-potenciometriás (Radiometer pHM 93) titrálásokkal is ellenőriztük.

A mikrofluidikai kutatásainkhoz szükséges infrastruktúrát tanszékünkön néhány éve alakítottuk ki. A vizsgálatainkhoz használt saját tervezésű mikrocipeket magunk készítettük polidimetilsziloxán (PDMS) műanyagból egy ún. lágy litográfias eljárás segítségével. A csatornamintázatot nagyfelbontással átlátszó fóliára (fotográfias maszk) nyomtattuk, majd egy szilíciumlapkára vékony fényérzékeny réteget felvive a mintázatot fotolitográfias technikával alakítottuk ki rajta. Az így elkészült öntőformára PDMS oligomert és a térhálósító adalékot (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, USA) öntöttünk. Az öntőformáról leválasztott, a mintázatot tartalmazó PDMS lapkát levegőplazmás (PDC-32G, Harrick) kezelést követően rögzítettük egy üveglaphoz.

A mikrocip csatornáiban a folyadékokat perisztaltikus vagy fecskendőpumpa segítségével áramoltattuk, a bennük végbemenő folyamatokat pedig inverz mikroszkóppal (Axio Observer A1, Zeiss) figyeltük meg. A videók és képek készítéséhez nagyfelbontású digitális kamerát (AxioCam ICC3, Zeiss) és a gyártó kép/video rögzítő és feldolgozó szoftverét alkalmaztuk. A mikrocipen való elektroforézishez nagyfeszültségű tápegységet (0,5-2,5 kV: Microply, Cetox Kft., illetve 10-30 kV: Spellman, Ithaca, NY, USA) használtunk. A mikrocipen, illetve a kvarckapillárison a detektálást száloptikás UV spektrofotométerrel (Avaspec-2048-2, Avantes) közvetlenül a csatorna/kapilláris falán keresztül végeztük. A felületi plazmon rezonanciás mérések F. Gomez laboratóriumában (CSU Los Angeles) 2-csatornás érzékelővel ellátott SPR készülékkel (BI-3000, Biosensing Instrument Inc., Tempe, USA) történtek.

3. Új tudományos eredmények

1.

Az indirekt UV spektrometriás detektálással kapott jelek nagysága és az elektrokinetikus injektált különböző vezetőképességű minták koncentrációja közötti kapcsolatot tanulmányozva azt találtuk, hogy a mérendő mintával megtöltött CE kvarckapillárisban mért áramerősség értékek megfelelő korrekciós tényezőket szolgáltatnak a *külső kalibrációs* eljáráshoz:

$$\frac{n_{a,S1}}{n_{a,S2}} = \frac{I_{S2}}{I_{S1}} \frac{c_{a,S1}}{c_{a,S2}}$$

ahol $n_{a,S1}$ és $n_{a,S2}$ az a komponensre nézve $c_{a,S1}$ és $c_{a,S2}$ koncentrációjú mintaoldatokból a kapillárisba beinjektált a komponens anyagmennyiségei, az I_{S1} és I_{S2} pedig a mintákkal töltött kvarckapillárisban mért áramerősségek nagysága.

Igazoltuk, hogy amennyiben a mintaoldat összes-ion koncentrációja nem haladja meg a 150 μM -t, a kiszámolt $n_{a,S1}/n_{a,S2}$ értékek eltérése az elektroferogramokból adódó $A_{a,S1}/A_{a,S2}$ csúcsterületek arányától nem haladja meg a 4%-ot. A javasolt eljárás jelentősége abban van, hogy a híg (kis vezetőképességű) oldatok kapilláris elektroforézisénel az elemzés nagy érzékenységét biztosító elektrokinetikus injektálás alkalmazásakor is használható az egyszerű *külső kalibrációs* mennyiségi meghatározási módszer. [1]

2.

Elektrokinetikus injektálást és indirekt UV detektálást alkalmazó mennyiségi meghatározásokhoz egy *belső univerzális kalibrációs* eljárást dolgoztunk ki:

$$c_x = c_{IUS} \frac{A_x}{A_{IUS}} \cdot z_{X,IUS}$$

ahol c_x és c_{IUS} , illetve A_x és A_{IUS} a vizsgálandó X komponens és a *belső univerzális standard* (IUS) koncentrációi, illetve jelterületei, $z_{X,IUS}$ pedig a vizsgált ion és a IUS töltéseinek hányadosa.

Elektrokinetikus injektálást alkalmazva a hagyományos mennyiségi meghatározási módszerek hibával terheltek, de indirekt UV detektáláskor egy ún. *belső univerzális kalibrációs standardot* alkalmazva az általunk javasolt egyszerű számítással helyes kvantitatív eredményekhez juthatunk. Ez a kalibrációs eljárás *belső* abban az értelemben, hogy a referencia komponens közvetlenül a mérendő mintához adjuk, és egyúttal *univerzális* is, hiszen a mintában jelenlevő több komponens mennyisége is meghatározható az egyetlen referencia komponens válaszjele alapján. Igazoltuk, hogy a tioszulfát, mint *belső univerzális standard* jól alkalmazható az olyan teljesen

disszociáló komponensek mennyiségi meghatározására, amelyek elektroforetikus mozgékonyasága legfeljebb 10%-ban különbözik a kromofor háttérion (pl. kromátion), az ellenion (pl. káliumion) és a belső univerzális standard (pl. tioszulfátion) mozgékonyaságától. Bizonyítottuk, hogy a javasolt kalibrációs eljárással meghatározott koncentráció értékek kevesebb, mint 5%-al térnek el a valódi koncentráció értékektől még akkor is, ha mintaoldatok jelentős mátrixanyagot tartalmaztak. Ellentétben a hagyományos belső standardos mennyiségi meghatározásokkal, a kidolgozott módszer esetében nincs szükség a mintakomponenseknek a belső standardra vonatkozó relatív érzékenységeinek meghatározására, hiszen az indirekt detektálás miatt a meghatározandó komponensek koncentrációjával arányos válaszjelet a háttéreltrolit kromofor ionja szolgáltatja. [2]

3.

Fémek különböző specieszeinek meghatározására kapilláris zónaelektroforetikus (CZE) és micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfiás (MEKC) módszereket fejlesztettünk ki.

Hat szervetlen és szerves arzénvegyület elválasztásával demonstráltuk, hogy az elemek különböző ionos (szervetlen és szerves) vegyületeinek meghatározására a CZE egy egyszerű és gyors (akár 2 percen belüli) lehetőséget nyújt. [3]

Bár egy fémion különböző, egymással gyors dinamikus egyensúlyban levő komplexei elválasztástechnikai módszerekkel nem határozhatók meg, bemutattuk, hogy a CZE az inert Cr(III) komplexeinek, így a CrCl_3 vízben való oldásakor kapott 3 akvakomplex ($[\text{CrCl}_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$, $[\text{CrCl}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ és $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$) elválasztására már alkalmazható. Bár csak a két klorokomplex detektálható UV spektrofotometriásan a foszfátpufferben, igazoltuk, hogy az indirekt UV detektálás alkalmazásával mindhárom komponens elemezhető, az átalakulások sebessége meghatározható. [4]

Abban az esetben, ha a szervetlen vegyületek csak kevésbé ionosak és/vagy kevésbé nyelnek el fényt, a vegyületek származékképzése vagy a MEKC módszer alkalmazása lehet célravezető. Négy higanyvegyületnek (Hg^{2+} , metil-Hg, etil-Hg, fenil-Hg) négy különböző tiolvegyülettel (cisztein, glutation, 2-merkaptó-nikotinsav, merkaptó-ecetsav) történő származékképzését követően mindegyik esetben sikeresen demonstráltuk, hogy a komponensek elválaszthatók és UV spektrometriásan detektálhatók. Igazoltuk, hogy a vizsgált származékképzők mindegyike megfelelő a higanyvegyületek CZE elválasztásához, és csak kis mértékű eltérések mutatkoztak az egyes komponensek kimutatási határaiban, a meghatározás időtartamában, illetve az elválasztás hatékonyságában. [5, 6] Hat ionos, illetve töltés nélküli Gd tartalmú kontrasztanyag elválasztására elsőként dolgoztunk ki MEKC módszert, és megmutattuk, hogy megfelelően kiválasztott két belső standard (dimetil-szulfoxid, fahéjsav) egyidejű alkalmazásával a komponensek migrációs időinek kis relatív szórása (0,027-0,34 RSD% ($c = 1 \text{ mM}$, $N = 10$)) érhető el. [7]

4.

Különböző klinikai minták elemzéseikhez CE módszereket fejlesztettünk ki és igazoltuk, hogy komplex, jelentős mátrixanyagot tartalmazó minták is közvetlenül vagy csak minimális mintaelőkészítést követően beinjektálhatók a szeparációs kapillárisba. [8-10]

4.1. 14 kefalosporin antibiotikum elválasztására CZE módszert fejlesztettünk, mellyel a migrációs idők 1,3 RSD%-nál kisebb relatív szórása és 0,42-1,62 µg/mL kimutatási határok voltak elérhetőek. A kefalosporinok koncentrációjának időbeni alakulását CZE módszerrel meghatározva a betegektől származó *szérumban*, kivezetett *sebváladékban* (drain), *agyvízben* (liquor), *vizeletben* és *bronchiális váladékban* (sputum) megmutattuk, hogy mely esetekben marad el az egyes kefalosporinok koncentrációsintje a baktériumok pusztulásához szükséges (MIC) értékek mögött. A kapillaris zónaelektroforézist először mi alkalmaztuk viszkozus, nagy sűrűségű bronchiális váladék minták elemzésére. Bár a liofilizálásos/visszaoldásos mintakezelés nem eredményezett lényeges eltérést az elektroferogramok csúcsmintázatában a közvetlen mintainjektálással történő elemzésekhez képest, a reprodukálhatóbb elemzésekhez (0,52 RSD% és 0,84 RSD% a migrációs idők, illetve a jelterületek esetén (N= 10, c= 40 µg/mL) szükség van erre az egyszerű mintaelőkészítési eljárásra. Tanulmányozva a kefalosporin antibiotikumok időbeni stabilitását vizes oldatokban, és különböző mátrixokban, megállapítottuk, hogy a vizsgált 14 kefalosporint vízben oldva 4 óra alatt a hatóanyagok 10-20%-a bomlott el. [11-14]

4.2. A gyorsan bomló temozolomid rákellenes szer vizsgálatára olyan MEKC módszert dolgoztunk ki, mellyel a hatóanyag és két bomlásterméke akár 1,2 percen belül is elválasztható. Demonstráltuk, hogy közvetlen mintainjektálással a temozolomid terápiás koncentrációi, valamint a csúcskoncentráció (8,2–10,1 µg/mL) és T_{max} (44–65 min) érték a *szérumban* UV detektálással meghatározhatók. A szilárd halmazállapotú tumorminták egyszerű mintakezelés (~1 g minta liofilizálást követő 500 µL sósav oldatba történő visszaoldása) után kapott nagy sűrűségű, de homogén oldatként közvetlenül injektálhatók voltak a CE kapillárisba. Etilacetátos extrakciós eljárást dolgoztunk ki, mellyel 10 µL térfogatba dúsítottuk ~1 g tumor minta temozolomid tartalmát. A temozolomidot daganatos betegektől származó *agyttumor* mintákban is meghatároztuk (0,061 - 0,117 µg/g), igazolva, hogy a temozolomid átjut a tumorba. [15-16]

5.

Hat kefalosporin antibiotikum CZE módszerrel történő savi disszociációs állandóinak (pK_s) meghatározásán keresztül bemutattuk, hogy egyetlen mintából, egyidejűleg több, akár bomlékony komponens pK_s értéke is meghatározható. Igazoltuk, hogy a jelentős mátrixanyagot tartalmazó minták (pl. sóoldatok, fermentlevek, szérum) komponensei bár a kefalosporinok csúcsainak torzulásához vezetnek, csak csekély mértékben módosítják azok migrációs időit, így az ilyen mintákból és a tiszta vizes oldatokból meghatározott pK_s értékek megegyeznek. A CZE további előnye a potenciometriás pK meghatározásokhoz képest, hogy akkor is alkalmazható, ha csak kevés ($<30 \mu\text{L}$) mintamennyiség áll rendelkezésre, vagy ha a komponenssel együtt más anyagok is jelen vannak. Igazoltuk, hogy a CZE-vel meghatározott pK_s értékek jól egyeznek a potenciometriás módszerrel kapott értékekkel, de azt is kimutattuk, hogy az egymáshoz közeli pK_s értékek potenciometriásan nagyobb pontossággal határozhatók meg. [14]

6.

Mikrocsipekben történő elektroforézishez egy új, *folyadékmegosztás elvén alapuló, nyomással történő injektálási módszert dolgoztunk ki a csatornák olyan mintázatú keresztveződését kialakítva, ahol az egyik csatorna szélessége négyszer nagyobb, mint a szeparációs csatorna szélessége.* Ellentétben az irodalomban található túlnyomórészt elektrokinetikus elven történő mikrocsip-injektálási módszerekkel, a kidolgozott, nyomással történő injektálási eljárásnál nem jelentkeznek az elektrokinetikus injektálásokra jellemző, a mennyiségi meghatározások pontosságát csökkentő hibák. Igazoltuk, hogy ez az injektálási módszer lehetővé teszi $100\text{-}300 \mu\text{m}$ hosszúságú mintadugók ($\sim 200 \text{ pL}$) kialakítását, de a csatornák szélességének és hosszainak változtatásával kisebb vagy nagyobb mintadugók is létrehozhatók.

Megállapítottuk, hogy az injektált mintadugó térfogata a pumpálási sebességtől nem, csak a csatornák átmérőinek arányától és hosszától, illetve az eredeti minta térfogatától függ. A csatornák keresztveződésében kialakított és a szeparációs csatornába juttatott $\sim 0,5 \text{ nL}$ térfogatú minta többszöri injektálásakor a csúcsmagasságok és csúcsterületek esetén $4,8$, illetve $3,7 \text{ RSD\%}$ ($N=6$) relatív szórás volt elérhető. [17]

7.

Igazoltuk, hogy a folyadékmegosztás elvén alapuló, nyomással történő injektálás alkalmazható zónaelektroforetikus elválasztások végrehajtására a polidimetilsziloxánból készült mikrocsipekben. Az ilyen módon végzett elválasztások során (bár az irodalomban ellentmondásos közlések találhatók a kezeletlen PDMS felületi töltését illetően) megállapítottuk, hogy a hidrofób PDMS-ből készült mikrocsipekben katód irányú elektroosmotikus áramlás lép fel. A csatorna egységes, állandó töltésű és minőségű felületét különböző detergenssek fali

adszorpciójával alakítottuk ki. A detergensekkel csak a mintainjektálást megelőzően öblítettük át a csatornarendszert, a pufferelektrolit nem tartalmazta a detergenset. A legjobb zónaelektroforetikus elválasztást akkor kaptuk, amikor az elektroozmotikus áramlást csökkentve a PDMS mikrocship csatornái falát metilcellulózzal kezeltük, ekkor a két vizsgált anionos vegyület 15 s-on belül elválasztható volt 1 cm-nyi szeparációs távolságon. [17, 18]

8.

A felületi plazmon rezonancia (SPR) spektroszkópiát az irodalomban elsőként használtuk arra, hogy az SPR szenzor lapkát egy 100 nm-nél vékonyabb PDMS filmmel bevonva különböző komponensek (kis méretű ionok, semleges komponensek, gyógyszermolekulák, fehérjék, detergens) PDMS felületre történő erősebb vagy gyengébb adszorpciós folyamatait valós időben, jelölésmentesen vizsgáljuk. Ezekkel a vizsgálatokkal igazoltuk, hogy például a PDMS felületére adszorbeálódó SDS több percig jelen van a PDMS felületen akkor is, ha SDS-t nem tartalmazó oldatot áramoltatunk a felület fölött, és ezzel a szemipermanens réteggel jelentősen növelhető az elektroozmotikus áramlás sebessége. A neutrális detergens hidroxipropilmetil-cellulóz (HPMC) nagyon erősen adszorbeálódik a PDMS felületére. A kvázi irreverzibilis réteget folyamatos, 2 órás vízzel vagy pufferrel történő mosással sem tudtuk eltávolítani, így a HPMC-vel statikus bevonatok kialakítására nyílik lehetőség. Bemutattuk, hogy ezek a vizsgálatok jól hasznosíthatók a PDMS mikrocshipben jelentkező elektroozmotikus áramlás változásainak, illetve egyes komponensek adszorpciós jelenségeinek (elnyúló csúcsalakok) megértéséhez. [19, 20]

9.

Mikrocship alapú miniatürizált kapilláris elektroforézis rendszert fejlesztettünk ki, melyben a mintainjektálás egy PDMS mikrocshipben, az elektroforetikus elválasztás pedig egy rövid, 15 cm hosszú kvarckapillárisban történik, melynek végei a mikrocshiphez csatlakoztak. A néhány nL-nyi mintadugó kialakításához a 6. tézispontban ismertetett, kis nyomással történő, folyadékmegosztás elvén alapuló mintabevitelt alkalmaztuk, míg az UV fotometriás detektálás - hasonlóan a hagyományos CE készülékeknél ismert konstrukcióhoz - közvetlenül a kvarckapillárison történt. Demonstráltuk, hogy ebben a miniatürizált rendszerben hat kefalosporin antibiotikum hasonló elválasztási hatékonyság ($N = 5\,000 - 15\,000$) mellett választható el, mint a hagyományos CE készülékekben ($L_{\text{eff}} = 15\text{ cm}$). A kifejlesztett rendszert miniatürizált, saját fejlesztésű, akkumulátorról működtethető nagyfeszültségű tápegységgel és kis méretű száloptikás spektrométerrel használtuk, így nemcsak az elektroforetikus elválasztást miniatürizáltuk, de a komplett rendszer is kis méretűvé, hordozhatóvá vált. [18]

10.

Megoldottuk a kapilláris elektroforézis kapcsolását *felületi plazmon rezonancia spektroszkópiához két PDMS-ből készült mikrofluidikai platform segítségével.* Az egyik mikrocsipben néhány nanoliternyi mintadugót alakítottunk ki és továbbítottunk a szeparációs kvarckapillárisba a 6. tézispontban ismertetett, kis nyomással történő, folyadékmegosztás elvén alapuló mintabevitelt alkalmazva, a másik kapillárisvéghez csatlakoztatott mikrocsip az 1 nanoliternél kisebb térfogatú átfolyócella szerepét töltötte be. Azt találtuk, hogy ha a szeparációs kapilláris végét az SPR szenzorra helyezett PDMS platform nyílásába töltük egészen a szenzorlapkáig, akkor a kapillárisban áramló folyadék elérve a kapilláris végét onnan lassan, egyenletesen szivárgott a kapilláris körül fölfelé, a kisebb hidrodinamikai ellenállás felé. Az így kialakított átfolyócellában a detektálási térfogat lényegében a PDMS lap nyílásában a kapillárisvég alatti vékony szivárgó folyadékfilm. Demonstráltuk az SPR detektálás univerzális jellegét zónaelektroforetikus elválasztásnál és rámutattunk a módszerrel történő detektálás előnyeire és korlátaira. [21]

11.

Kifejlesztettünk egy mikrofluidikai csipekben alkalmazható mágneses szelepet, mely azon az elven működik, hogy a folyadékcsatorna vékony, rugalmas PDMS fala összenyomható egy mágnes és egy fémtest segítségével, így egy csatornában a folyadék áramlása reverzibilisen elzárható vagy indítható. Igazoltuk, hogy a rugalmas PDMS membrán esetén elérhető deformáció nagyban növekszik, amennyiben a membrán vastagsága 100 μm alá csökken. A szelep működtetése során egy 25 μm vastagságú, a mikrofluidikai csatornarendszer fölött található, rugalmas PDMS réteg deformálása történik egy kis méretű állandó mágnes felé mozuló parányi fémtest által. A szelepek megfelelő nyitásával/zárásával nanoliter nagyságrendű mintadugók alakíthatók ki a mikrocsipben. Igazoltuk, hogy a mikrofluidikai rendszerekben tipikus 0,01-1 $\mu\text{L}/\text{min}$ áramlási sebességek alkalmazásakor a mágneses szeleppel teljes (szivárgásmentes) zárás biztosítható. Demonstráltuk, hogy a mágneses szeleppel részleges zárás is elérhető, és ilyenkor kromatográfiás részecskék visszatartására, így mikrokromatográfiás töltetek kialakítására van lehetőség. [22, 23]

12.

Több módszert fejlesztettünk ki a kromatográfiás tölteteknek hagyományos fritek nélküli kialakítására mikrocsipekben.

12.1. Demonstráltuk, hogy a kromatográfiás tölteteket létrehozó részecskéket a csatorna bármely szakaszán visszatartjuk a rugalmas PDMS mikrocship csatornája részleges összenyomásával létrehozott ideiglenes szűkület segítségével. Megmutattuk, hogy a kialakított kromatográfiás töltetek stabilitását a mikrocsipekben általunk először megfigyelt zárókő- és bilincshatás eredményezi. A mikrocsatornában kialakított szűkület felé áramoltatott részecskék közül az elülső részecskék megszorulnak a szűkület elején és ezek tartják vissza a mögöttük jövő részecskéket, egyfajta "zárókő" szerepét betöltve. Megfigyeltük, hogy a kromatográfiás részecskék szuszpenziójának és a folyadékoknak a szűkület felé történő pumpálásakor (kb. 2-3 bar nyomás hatására) a csatorna fala kiszélesedik, és ezt a megnövelt térfogatot a részecskék teljes mértékben kitöltik, majd amikor a folyadék pumpálását leállítjuk (vagy sebességét jelentősen csökkentjük), a rugalmas falú csatorna újra összehúzódik, a töltet körül egy folyamatos összeszorító erő alakul ki (bilincs-hatás). A töltet stabilitásához az apoláris töltetrészecskék és a hidrofób tulajdonságú fal között jelentkező erős kölcsönhatások is hozzájárulnak. A PDMS fal közvetlen közelében lévő kemény szilika kromatográfiás részecskék deformálják a rugalmas fal alakját, részlegesen behatolnak a falba és ezek, mint valamiféle horgonyok rögzítik a töltetet a csatornában (horgony-hatás). **Szilikaerogél részecskékből először mi alakítottunk ki kromatográfiás töltetet mikrocshipben.** [24, 25]

12.2. Bizonyítottuk, hogy az 5-10 μm méretű kromatográfiás részecskékből oly módon is kialakítható töltet a mikrocshipben, ha a csatornamintázat tervezése során (litográfiás maszk rajzolatán, majd az öntőformán) alakítjuk ki a megfelelő szűkületet a csatorna kiválasztott helyén. Megállapítottuk, hogy a részecskék stabil visszatartásához az szükséges, hogy a szűkület optimális szélessége, magassága ne legyen nagyobb, mint a visszatartandó részecske méretének háromszorosa, illetve, hogy a szűkület hosszának (amennyiben legalább kétszerese a részecske méretének) nincs hatása a töltetek kialakítására. Ahhoz, hogy 10-20 μm szélességű csatornaszűkületeket alakíthassunk ki a mikrocshipben, kellően nagy felbontás elérésére érdekében a mikrofabrikálási eljárást részletesen optimaltunk. A különböző magasságú csatornák olyan öntőformák segítségével alakíthatók ki, melyek készítése során különböző vastagságú fotoreziszt réteget viszünk fel a Si hordozóra. A különböző vastagságú fotoreziszt azonos időtartamú besugárzásával különböző szélességű szűkület nyerhető, a vékonyabb fotoreziszten szélesebb lesz a szűkület. [26]

13.

Olyan 3, 10 vagy 12 kromatográfiás töltetet tartalmazó mikrocsipeket fejlesztettünk ki, melyeknél a mikrocsipbe injektált egyetlen minta oszlott szét több (azonos, vagy különböző) töltet felé, de demonstráltuk, hogy lehetőség van egyidejűleg injektált több különböző minta párhuzamos elemzésére is. A 12.2 tézispontban bemutatott módszert alkalmazva nagyszámú mikrotöltet alakítható ki egyidejűleg, ha a csatornáknak egyetlen közös portja felől áramoltatjuk a kromatográfiás részecskék szuszpenzióját a csatornák szűkületei felé. Megmutattuk, hogy egyetlen mikrocsipen elhelyezhető elektroforetikus elválasztási csatornák/kromatográfiás töltetek számát nem maguk az elválasztóegységek száma korlátozza, hanem az elektródok és pumpacsövek csatlakozó portjainak száma.

Az egyetlen minta beinjektálására alkalmas, közös kimeneti portú sokcsatornás rendszerek párhuzamos csatornáiban a folyadék áramlási sebessége fokozatosan csökken csatornáról csatornára, a 12 csatornás rendszerben a két szélső csatornában az áramlási sebességek aránya 2,2. Igazoltuk, hogy EPANET szoftverrel szimulálható az áramlási sebességek alakulása a komplex mikrofluidikai rendszerekben és a szoftver segítségével olyan csatornamintázatokot terveztünk, amelyekben megvalósítható, hogy az áramlási sebességek azonosak legyenek a párhuzamos csatornában. [27, 28]

14.

Igazoltuk, hogy a mikrocsipben általunk kialakított kromatográfiás töltetek alkalmasak komponensek (festékek, kefalosporinok) gyors és hatékony elválasztására, dúsítására, mátrixkomponensek eltávolítására. Bemutattuk, hogy egy mikrocsipben csupán 200 μm hosszú töltetre 0,2 nL mintát injektálva akár 7 s-nál rövidebb idejű teljes elválasztás is elérhető. A kialakított tölteten (5 μm , C18) egy festékkomponensre (Brillantkék FCF) vonatkozó visszatartási kapacitás $7,5 \cdot 10^{-12}$ mol/mm-nek adódott, és kevesebb, mint 1 μL mintaoldat felhasználásával ötvenszeres dúsítás érhető el. Kefalosporin antibiotikumok elválasztásán keresztül demonstráltuk, hogy ugyanazon a mikrotölteten hatékonyabb elválasztás érhető el, ha feszültséggel (CEC) és nem nyomással (LC) áramoltatjuk a folyadékot.

Először mutattuk be annak lehetőségét, hogy egyetlen mintaoldatot egy mikrocsipbe injektálva a minta egyforma részletei három különböző töltetre vihetők és választhatók el egyidejűleg, így az adott analitikai feladathoz gyorsan kiválasztható az optimális állófázis.

Egy 12 mikrotöltetet (C18, 5 μm) tartalmazó mikrocsippel elsőként demonstráltuk a mikrocsip alapú kromatográfia lángatomabszorpciós spektrometriával (FAAS) való kapcsolásának lehetőségét elemspecieszek gyors elválasztására/dúsítására és meghatározására. 80 μL térfogatú mintaoldatnak a mikrocsip töltetén való átáramoltatásakor megkötött Cr(VI)-ot 30 μL -nyi metanollal eluálva és a

lángatomabszorpciós spektrométerbe porlasztva a Cr(VI) kimutatási határa 0,0031 µg/mL-nek adódott. [24-28]

4. Az eredmények hasznosításának lehetőségei

Értekezésemben olyan hatékony kapilláris elektroforetikus elválasztásokat mutattam be, melyek természetszerűleg önmagukban hordozzák az alkalmazási lehetőségeket. Így a kidolgozott CZE, MEKC módszerek alkalmazásával különböző jellegű, elsősorban klinikai mintákban határoztunk meg gyógyszervegyületeket (kefalosporin antibiotikumok, temozolomid, MRI kontrasztanyagok), illetve tanulmányoztuk az egyes hatóanyagok bomlását. E gyógyszeranalitikai vizsgálatok hasznosíthatók lehetnek a legkülönbözőbb gyógyszeripari, orvosdiagnosztikai laboratóriumi területeken akár önmagukban, akár más (pl. kromatográfiás) analitikai módszerrel együtt használva. Amint az az értekezésben is megjelenik, a kapilláris elektroforetikus módszerek igen jól alkalmazhatók az egyes gyógyszervegyületek fizikai-kémiai paramétereinek meghatározására is.

Bár mikrofluidikai (lab-on-chip) analitikai kutatásaink leginkább alap kutatás jellegűek, ezeket a munkáinkat hosszabb távon kifejezetten alkalmazás-orientáltnak gondoljuk, hiszen távlati célunk az, hogy az analitikai meghatározásokat sokkal olcsóbban, gyorsabban, kevesebb minta/reagens felhasználásával és mégis kellően hatékonyan lehessen végrehajtani. Teljesen újszerűnek számít az a törekvésünk, hogy párhuzamos csatornában egyetlen mikrocshipen nagyszámú kromatográfiás töltetet alakítsunk ki, ily módon gyors és kifejezetten nagy elemzési sebességű eszközhöz juthassunk. A kromatográfiás részecskékkel töltött PDMS mikrocshippek elkészítésének egyszerűsége és csekély költsége gyakorlatilag a mikrocship egyszer használatos jellegét is lehetővé teszi.

Mivel az analitikai vizsgálatok a világon mindenütt jelentős összegeket emésztenek fel, a jövőben az analitikai célú mikrofluidikai csipek széleskörű elterjedése várható. A kidolgozott módszerek hasznosíthatósága jól illusztrálható azzal, hogy a mikrocshippekben alkalmazható mágneses szelepet nemrégiben az USA-ban szabadalmaztattuk.

5. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények*

- [1] A. Gáspár, L. Gábor
Quantitative determination of traces using capillary electrophoresis with electrokinetic injection and indirect UV detection,
J.Chromatography A, **2005**, 1091, 163-168. (IF: 3,096)
- [2] A. Gáspár, E. Dudás
Internal universal calibration for determination of inorganic anions in capillary electrophoresis using UV detection,
J.Chromatography A, **2006**, 1110, 254-260. (IF: 3,554)
- [3] A. Gáspár, C. Sógor, J. Posta
Separation of organic and inorganic arsenic species by capillary zone electrophoresis,
Chromatographia, **2000**, 51, 135-138. (IF: 1,619)
- [4] A. Gáspár, P. Buglyó
Separation and kinetic study of chromium(III) chlorocomplexes by capillary electrophoresis,
Chromatographia, **2000**, 51, 143-147. (IF: 1,619)
- [5] A. Gáspár, C. Páger
Determination of mercury compounds by capillary electrophoresis,
Chromatographia, **2002**, 54, 115-120. (IF: 1,230)
- [6] A. Gáspár, C. Páger
Possibilities of determination of mercury compounds using capillary zone electrophoresis,
Microchem.J., **2002**, 73, 53-58. (IF: 1,325)
- [7] M. András, A. Gáspár, O. Kovács, Z. Baranyai, E. Brücher
Determination of magnetic resonance imaging contrast agents by micellar electrokinetic capillary chromatography,
Electrophoresis, **2011**, 32, 2223-2228. (IF: 3,303)
- [8] Gáspár A
A kapilláris elektroforézis alkalmazása szerves vegyületek meghatározására,
Anyagvizsgálók lapja, **2003**, 391-94.
- [9] Gáspár A., András M.
Elektroforetikus elválasztások kapillárisban és mikrocsipben,
Magy.Kém.Foly., **2011**, 117, 47-50.

* Gáspár A. a közlemények mindegyikének első vagy levelező szerzője.

- [10] A. Gáspár, P. Juhász, K. Bágyi
Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of nitrite and nitrate in saliva,
J.Chromatography A., **2005**, 1065, 327-331. (IF: 3,096)
- [11] A. Gáspár, M. Andrási, S. Kardos
Application of capillary zone electrophoresis in analysis and stability study of cephalosporins,
J.Chromatogr.B., **2002**, 775, 239-246. (IF: 1,913)
- [12] A. Gáspár, S. Kardos, M. Andrási, Á. Klekner
Direct determination of cephalosporins in clinical samples using capillary electrophoresis,
Chromatographia, **2002**, 54, 109-115. (IF: 1,230)
- [13] M. Andrási, A. Gáspár, Á. Klekner
Determination of cephalosporins in sputum samples using capillary electrophoresis,
J.Chromatography B., **2007**, 846 355-358 (IF: 2,935)
- [14] M. Andrási, P. Buglyó, L. Zékány, A. Gáspár
Comparative study of determination of dissociation constants of cephalosporins using capillary electrophoresis and potentiometry,
J.Pharmac.Biomed.Anal., **2007**, 44, 1040-1047 (IF: 2,761)
- [15] M. Andrási, B. Törzsök, Á. Klekner, A. Gáspár
Determination of temozolomide in serum and brain tumor with micellar electrokinetic capillary chromatography,
J.Chromatogr.B, **2011**, 879, 2229-2233. (IF: 2,888)
- [16] M. Andrási, R. Bustos, A. Gáspár, F.A. Gomez, Á. Klekner
Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis,
J.Chromatogr. B., **2010**, 878, 1801-1808. (IF: 2,971)
- [17] A. Gáspár, P. Koczka, H. Carmona, F.A. Gomez
Hydrodynamic split-injection for microchip electrophoresis,
Microchem.J., **2011**, 99, 180-185. (IF: 3,048)
- [18] P.I. Koczka, A. Gáspár
Application of a capillary-assembled microfluidic system for separation of cephalosporins,
Electrophoresis, **2014**, 35, 2534-2537. (IF: 3,161)
- [19] A. Gáspár, F.A. Gomez
Application of surface plasmon resonance spectroscopy for adsorption studies of different types of components on poly(dimethylsiloxane),
Anal.Chim.Acta, **2013**, 777, 72-77. (IF: 4,517)

- [20] A. Gáspár, A. Kecskeméti, F.A. Gomez
The use of surface plasmon resonance to study adsorption of different types of components on poly(dimethylsiloxane),
Electrophoresis, **2013**, 34, 1249-1252. (IF: 3,161)
- [21] A. Gáspár, F.A. Gomez
Development of an ultra-low volume flow cell for surface plasmon resonance detection in a miniaturized capillary electrophoresis system,
Electrophoresis, **2012**, 33, 1723-1728. (IF: 3,261)
- [22] Gáspár, M.E. Piyasena, L. Daróczy, F.A. Gomez
Magnetically Controlled Valve for Flow Manipulation in Polymer Microfluidic Devices,
Microfluid.Nanofluid., **2008**, 6, 523-531. (IF: 3,314)
- [23] F.A. Gomez, A. Gáspár, M.E. Piyasena
Magnetically controlled valve for flow manipulation in polymer microfluidic devices,
USA szabadalom, Lajstromszám: US20120118410, Benyújtás éve: 2011. Közzététel éve: 2012
- [24] A. Gáspár, M.E. Piyasena, F.A. Gomez
Simple fabrication of fritless chromatographic microchips packed with conventional reversed-phase silica particles,
Anal.Chem., **2007**, 79, 7906-7909. (IF: 5,287)
- [25] A. Gáspár, L. Hernandez, S. Stevens, F.A. Gomez
Electrochromatography in Fritless Chromatographic Microchips Packed with Conventional Reversed-Phase Silica Particles
Electrophoresis, **2008**, 29, 1638-1642. (IF: 3,509)
- [26] A. Gáspár, A. Nagy, I. Lázár
Integration of ground aerogel particles as chromatographic stationary phase into microchip,
J.Chromatogr. A., **2011**, 1218, 1011-1015 (IF: 4,531)
- [27] A. Nagy, A. Gáspár
Packed multi-channels for parallel chromatographic separations in microchips,
J.Chromatogr. A., **2013**, 1304, 251-256 (IF: 4,258)
- [28] A. Nagy, E. Baranyai, A. Gáspár
Interfacing microfluidic chip based chromatography with flame atomic spectrometry for determination of chromium (VI),
Microchem.J., **2014**, 114, 216-222 (IF: 3,583)

6. Tudománymetriai adatok

Gáspár Attila tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása az MTA VII. Kémiai Tudományok Osztálya szabályai szerint (2014.10.17)

| Tudományos közlemények | A PhD fokozat megszerzése óta (1997-) | Összesen |
|--|---------------------------------------|-----------|
| Összes közleményeinek száma¹ (1.1-1.7 sorok összege) | 62 | 70 |
| 1.1 Közlemények SCI referált folyóiratokban | 52 | 60 |
| 1.2 Közlemények magyar nyelvű folyóiratokban | 2 | 2 |
| 1.3 Megadott alapszabadalmak száma | 2 | 2 |
| 1.4 Közlemény egyéb nemzetközi folyóiratokban | 0 | 0 |
| 1.5 Közlemény egyéb magyar nyelvű folyóiratokban | 0 | 0 |
| 1.6 Kongresszusi kiadványban (teljes munka, nem rövid kivonat) | 4 | 4 |
| 1.7 Összefoglaló művek | 2 | 2 |
| Összefoglaló cikk idegen nyelvű | 0 | 0 |
| Összefoglaló cikk magyar nyelvű | 1 | 1 |
| Felsőoktatási tankönyv | 1 | 1 |

| Tudománymetriai adatok | i, H |
|--|-------|
| Összes dolgozatának idézettsége ² , önhivatkozás nélkül (i) | 823 |
| Szabadalmainak idézettsége ² , önhivatkozás nélkül (i) | 0 |
| Könyvfejezeteinek idézettsége ² , önhivatkozás nélkül (i) | 0 |
| Közleményeinek összesített hatása (H) | 122,9 |

| Speciális adatok | Adat | Az összes %-ában |
|--|---------------|------------------|
| Az utolsó tudományos fokozat (PhD) utáni (1997-) közlemények száma, (összesített impakt faktora) és ez utóbbi részaránya a teljes impaktfaktorösszeg százalékában | 62 (116,3) | 94,61 % |
| Magyar nyelven megjelent közlemények száma és részaránya az összes közlemény százalékában | 12 | 17,14 % |
| A legmagasabb impaktfaktoral rendelkező 5 közleményének IF-a | 23,2 | --- |
| Az öt legmagasabb független idézettségű közlemény idézettségi számai ² | 231 | --- |
| Hirsch index az összidézettségre számolva ³ | 19 | --- |

¹ Teljes tudományos közlemény az MTA doktori eljárásban

² Hivatkozások (idézések) a disszertáció és egyéb típusúak nélkül

³ A disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül számolva