

**Válasz**  
**Dr. Kilár Ferenc egyetemi tanár**  
**opponensi véleményére**

Köszönöm Kilár Ferenc professzor úrnak értekezésem alapos áttanulmányozását és a hozzá fűzött megjegyzéseket és kérdéseket.

Először a bírálatban szereplő megjegyzésekre, azok sorrendjében válaszolok.

Sajnos valóban előfordulnak gépelési hibák a dolgozatban, így a tisztelt Bíráló által felsoroltak.

Néhány ábraalírás valóban nem tartalmaz minden egyes kísérleti paramétert, és emiatt az ábra esetleg nem volt részleteiben érthető. Úgy gondoltam, hogy szükség esetén – az ábraszövegben hivatkozott saját közleményekben – a részletek megtalálhatók, a nagyobb terjedelmű ábraszövegek viszont tovább fesztették volna az értekezés megírására rendelkezésre álló keretet.

Előfordulhatott, hogy az ábrákon található jelölések esetenként csak a hozzá tartozó közlemény alapján egyértelműsíthető, de a tisztelt Bíráló által hozott példánál, a 20. ábránál ezt a problémát nem látom.

A szakkifejezésekkel kapcsolatos megjegyzéseket a chip/csip írásmódja kivételével elfogadom. A szeparáció és a migráció szavak helyett magam is törekszem az elválasztás és a vándorlás szavakat használni, de valóban nem eléggé: így az értekezésben 201-szer használtam az "elválasztás" és 44-szer a "szeparáció" kifejezést. A szeparáció kifejezést szinte kizárólag a csatorna/kapilláris/távolság szavakkal együtt használtam, itt ugyanis még nem tudtam hozzászokni az "elválasztási csatorna/kapilláris/távolság" kifejezésekhez. Hasonlóképpen, bár a migráció helyett többször használtam a vándorlás szót, de itt sem tudtam még átállni a "vándorlási idő"-re a "migrációs idő" helyett. Megjegyzem hasonló nevezéktani probléma vethető fel a retenciós idő -visszatartási idő esetén a kromatográfiánál, ahol jelenleg a retenciós idő az általánosan használt.

A Bíráló javaslatát a "dugattyúszerű profillal" és a "mintadugóval" kapcsolatban köszönöm és elfogadom.

A chip-csip írásmóddal kapcsolatban valóban többször kaptam már bírálatot, de én csupán A magyar helyesírás szabályai (11. kiadás, Akadémiai Kiadó, 2009) legfrissebb kiadásában leírtakat követtem. "Ha egy latin betűs írású nyelvből átvett, általános fogalmat jelölő idegen szó közkeletűvé válik, eredeti írásmódját a magyar kiejtést tükröző formával váltjuk fel. Az idegen szavakat tehát aszerint írjuk már magyar vagy még idegen írásmód szerint, hogy mennyire haladtak előre a jövevénytárolás útján." Ennek megítélése nyilván szubjektív, de ugyanezen szabályzat szótár része a "chip" írásmód helyett a "csip"-et javasolja. A helyesiras.mta.hu helyesírási tanácsadó portál is elfogadja a mikrocsip írásmódot. Az 1994-ben kiadott Idegen szavak és kifejezések kézikönyvére (Bakos Ferenc, Akadémiai Kiadó), illetve az 1993-as kiadású Angol-magyar műszaki és tudományos szótár (Akadémiai Kiadó) is a chip helyett a csip írásmódot javasolja. (A helyesírási szabályzat 11. kiadása az eddigi legszélesebb körű demokratikus

közmegegyezésen nyugvó rendszerezés, az MTA a társadalom véleményét tekintetbe vevő állásfoglalása, melyet a MTA Helyesírási Bizottsága dolgozott ki.)

Az elektrokinetikus injektálással kapcsolatos kutatásainkat valóban nem végeztük fedett kapillárisban, vagy gélben, ahol nincs, vagy minimális az elektrooszmózis. Ugyanakkor, mivel az elektrokinetikus injektálásra kidolgozott (18) és (21) összefüggéseink a (13-16) egyenleteken alapulnak, melyek magába foglalják az elektrooszmotikus mozgékonytságot is (ez akár zéró is lehet), valószínűleg ezekben a rendszerekben is használható a belső univerzális kalibrálás vagy a (21) egyenlet. A mintaoldat vagy a háttérektrólit pH-ja természetesen jelentős hatással van a komponensek töltésére, így a mozgékonytságaikra, de ez hatással van a (21) egyenlet  $n_{x,iUS}$  paraméterére vagy a (18) egyenlet  $I_{S2}/I_{S1}$  paraméterére, ezért feltételezem, hogy a javasolt összefüggések különböző pH-jú minták esetén is jól használhatók.

A 10. ábrán a metil-Hg, etil-Hg és fenil-Hg vegyületek vándorlási ideje (mozgékonytsága) nagyon hasonló, de hogy a ciszteinnel képzett komplexek miatt jelentkeztek kissé más mozgékonytsággal mint a többi komplexek esetében, nem tudok logikus magyarázatot adni, én sem vártam változást a migrációs sorrendben.

A 14. ábrán bemutatott micelláris elektrokinetikus módszerrel elemzett Gd-komplexek esetén a  $[Gd(BOPTA)]^{2-}$  és a  $[Gd(DTPA)]^{2-}$  komplexek kétszeresen negatív töltésűek, így az anionos micellákkal nem lépnek kölcsönhatásba, ezért ezeknek a komplexeknek a mozgékonytsága hasonló CZE és MEKC esetén, hiszen a puffer mindkét esetben 25 mM foszfát (pH=9,1) volt, a MEKC esetén az SDS tartalom inkább csak a nagyobb ionerősséget okozó hatás miatt csökkenti kissé a komplexek látszólagos mozgékonytságát.

Egyetértek a bírálóval, hogy többször nem fogalmaztam pontosan, amikor a klinikai minták elemzése során mintaelőkészítés nélküli mintabevitelről (direkt mintabevitelről) beszéltem. Valójában a nagy só- és/vagy fehérjetartalmú klinikai mintáknál (vizelet, szérum, különböző váladékok) igaz minimális mintaelőkészítést (kvázi "direkt injektálást") alkalmaztunk, olyanokat amelyek valamilyen egyszerű fizikai műveletnek tekinthetők, vagy például egy komponenst/adalékot kis térfogatban adtunk a mintához, de végül is ez is mintaelőkészítést jelent. Helyesebb lett volna, ha a "minimális mintaelőkészítés" kifejezést használtam volna az értekezésben. A tisztelt Bíráló helyesen jegyzi meg, hogy "például hasznos lett volna az emberi testfolyadékokban történő nitrát meghatározás esetén valamilyen baktérium-működést gátló (a nitrát redukciót megakadályozó) körülmény biztosítása, ezzel elősegítve a mennyiségi meghatározás pontosságát és a vizsgálat tényleges végrehajtásának idejétől való függetlenségét". Az értekezésben (ahol csak egyetlen oldalon tárgyaltam a nyál minták nitrit/nitrát/tiocianát tartalmának vizsgálatát) sajnos nem adtam meg azt, amit a munkánkat részletesebben tárgyaló közlemény (A.Gáspár, P.Juhász, K.Bágyi, J.Chromatogr.A., 2005, 1065, 327) tartalmaz: a nyál minták vételekor kevés tömény NaOH-val az oldat pH-ját 11 fölé vittük a nitrit/nitrát tartalom meghatározásakor, hogy a nyálban levő baktériumok ne változtassák meg a nitrit/nitrát mennyiségét. Ezt a bírálói megjegyzést az 5. bírálói kérdés kapcsán részletesebben is tárgyalom.

Valóban, bár kefalosporinok abszorpciós együtthatója kifejezetten nagy 270 nm-en, a fehérjéknek is van elnyelési maximuma 280 nm-en az aminosavak aromás csoportjai miatt, még ha jóval gyengébb is, mint 200 nm-nél. Ugyanakkor, mivel az SDS-tartalmú pufferek alkalmazásakor a kapott elektroferogramokon a kefalosporinok csak csekély mértékben fedődnek át a fehérjék széles sávjaival, ezért a 270 nm-es detektálási hullámhossz alkalmazása a klinikai minták kefalosporin tartalmának meghatározásakor nem volt különösebben zavaró, amit standard addíciós vizsgálatok is igazoltak.

Egyetértek a bírálóval, hogy több ábraszöveg esetén a körülmények pontosítására lett volna szükség. A 23. ábránál az adott komponensek vándorlási idői azért kisebbek, mert rövidebb, 48,5 cm kapillárist és így (ugyanazon +25 kV alkalmazása miatt) nagyobb térerősséget használtunk. Ez sajnos az értekezésben nem került feltüntetésre. A 33. ábrán pedig a kísérleti körülmények csak annak kivételével egyeztek meg a 32. ábrán megadottakkal, hogy a 33. ábrán 64 cm-es effektív kapilláris hosszt alkalmaztunk a 32. ábrához használt 8 cm helyett.

A 27. ábránál, amikor a puffer pH-jának hatását mutattuk be a cefalexin vándorlási idejére. A pK meghatározáshoz elengedhetetlen, hogy az elektroforetikus elválasztáshoz használt különböző, pontos pH-jú pufferek ionerősségei megegyezzenek, ezért a 2,0-9,7 pH-tartományú puffereket Poole és mtsai. (S.K.Poole, S.Patel, K.Dehring, H.Workman, C.F.Poole, J.Chromatogr. A., 2004, 1037, 445.) receptjei alapján készítettük NaOH, NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, CH<sub>3</sub>COONa, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> és HCl vegyszerekből. Ez szerepel a munkával kapcsolatos közleményünkben, de valóban kimaradt az értekezésből.

A 48. ábra a, és b, elektroferogramjaiból nem lehet azt a következtetést levonni, hogy az elválasztott komponensek csúcshélessége kisebb a nagyobb elválasztási hosszúság esetén. Az ábrából az tűnik ki (az a, és b, elektroferogramokon eltérő az időskála), hogy az első komponens csúcshélessége (a jel magasságának felénél) 1 s és 2,5 s a 10 mm, illetve a 45 mm elválasztási hosszak esetén.

Egyetértek a Bírálóval, hogy a miniatürizált kapilláris elektroforézis rendszerben a kísérletek továbbfejlesztése szükséges úgy a detektálás, mint az elektrooszmózt befolyásoló felületkezelés esetén.

A kromatográfiás, illetve elektrochromatográfiás töltetek rugalmas anyagú mikrocipben való kialakításakor félreérthetően fogalmaztam a kemény falú kapillárisokban megfigyelhető ún. "üres térrel" kapcsolatban. Valójában úgy értettem, hogy a kemény falú kapillárisokban a merev fal közvetlen közelében az állófázis részecskéi közötti "üres" terek (amelyek csak a mobilfázist vagy pufferelektrolitot tartalmaznak), könnyen átjárhatók folyadékok által, könnyebben, mint a töltetek közepén vagy a rugalmas falú csatornák fala mentén. Emiatt áramolhat a folyadék gyorsabban a kemény, merev falú kapillárisokban, mint a töltet belsejében. Munkánkban azt találtuk, hogy e jelenség (fal-hatás) következtében a tölteten elválasztott komponensek sávjai kiszélesednek, de a rugalmas falú csatornáknál, ahol a csatorna fala mentén és a töltet középső részében hasonló a hidrodinamikai ellenállás, a sávok kiszélesedése kisebb mértékű.

A kromatográfiás tölteteket tartalmazó mikrocsipekben a zónák vándorlása során tapasztalható diszperziós hatásoknak többféle forrása van.

Az egyik az Eddy diffúziós tag, mely a töltet részecskéi közti áramlási egyenetlenségekből adódó csúcshéyesedést fejezi ki ( $A = 2 \cdot \lambda \cdot d_p$ , ahol  $\lambda$  : a töltet minőségét jellemző tényező,  $d_p$  : a töltet átlagos szemcsemérete.), mely független a lineáris áramlási sebességtől. A kísérleteinkben alkalmazott töltetek egyrészt 5-10  $\mu\text{m}$  méretű gömb alakú, kereskedelmi forgalomban levő részecskéket tartalmaztak, melyek mérete kissé nagyobb, mint a mai modern töltetek részecskéi. Másrészt az elporított és szuszpendált aerogél részecskék jó része ugyan 1  $\mu\text{m}$ -nél is kisebbek, de az alakjuk nagyban eltérhet. Természetesen az is kétséges, hogy a laboratóriumunkban elkészített, rugalmas falú mikrocsipben a töltetek kis nyomással történő kialakítása olyan homogén, tökéletesen illeszkedő töltetet eredményezett-e, mint a mai korszerű kolonnákban.

Közismert, hogy a zóna hosszirányban az idő előrehaladtával diffúziós úton is szélesedik. A rugalmas falú mikrocsipekben a folyadékokat, így a mintazónákat is, (ultra)kis sebességű perisztaltikus vagy fecskendő pumpával áramoltattuk, a folyadékok pulzáló áramoltatása időnként jól látható volt a mikroszkópos megfigyelés során, ami jelentős diszperziót okozhatott.

A (spit) mintainjektálási lépés, a megfelelően kicsiny dugattyúszerű mintazóna kialakítása is kulcskérdés. Az általunk bemutatott és alkalmazott injektálási módszer még csak kevéssé tanulmányozott, itt további vizsgálatok szükségesek.

Mindezekon kívül a zónák diszperzióját növelik a hagyományos kromatográfiás módszereknél jelentkező, részletesen leírt egyéb effektusok is.

Egyetértek a tisztelt Bírálóval, hogy a "kromatográfiás kölcsönhatás" mint fogalom – bár előfordul a hazai és nemzetközi szakirodalomban – nem megfelelően definiált, használatát kerülni kell. Amikor az értekezésben ezt a fogalmat használtam, akkor azon olyan kémiai, fizikai kölcsönhatások/hatások összességét értettem, amelyek szerepe a kromatográfiás elválasztás során alapvető fontosságú. Itt minden olyan kölcsönhatásról szó lehet, amelyek erősebbek az elválasztandó molekulák és az állófázis között, mint a molekulák és a mobilfázis molekulái között (dipól-dipól kölcsönhatás, indukciós effektus, diszperziós hatás, H-kötés, stb.).

Valóban jó néhány szakkönyvre és összefoglaló közleményre hivatkoztam, amik közül több esetén használhattam volna szakcikkre való hivatkozást. Az értekezésben használt 216 hivatkozásból 5 volt internetes honlap. 2 internetes honlapot [34, 187] azért adtam meg, mert a használt, ingyenesen letölthető szoftverek (Peak Master, EpaNet) különböző verziói innen érhetők el, innen nyerhetők róluk információ. 3 internetes honlap [192-194] pedig azért került be a hivatkozások listájára, mert három készülékgyártó felületi plazmon spektrométer detektor cellájának paramétereiről ezeken a honlapokon nyertem információt.

A monolitok leírásánál az elsőként leírt elválasztórendszert ugyan valóban nem hivatkoztam (S.Hjertén, J.L.Liao, R.Zhang, J.Chromatogr., 1989, 473, 273) de ugyanazon szerzőtől (S.Hjertén) származó mikrocsipben történő monolit kialakítási eredményeket tartalmazó első közlést [113] már igen.

A tisztelt Bíráló felvetett kérdéseire azok sorrendjében a következőket válaszolom:

1,

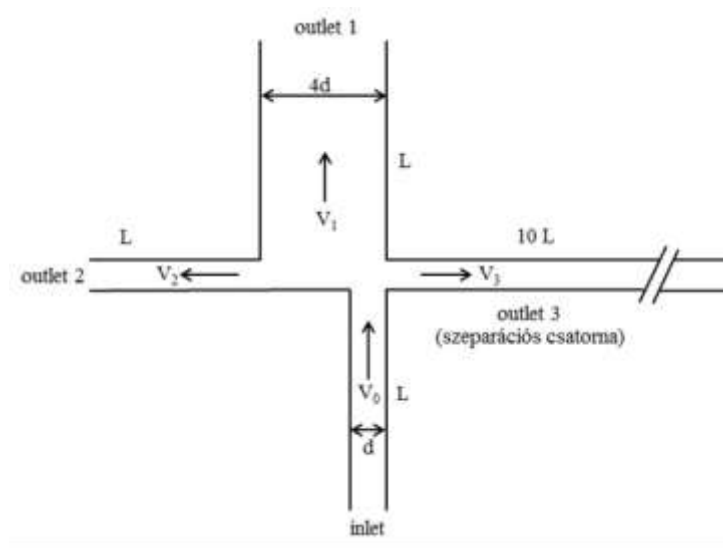
Az értekezésben szereplő 21. egyenlet indirekt UV detektálás és elektrokinetikus injektálás alkalmazásakor használható, amennyiben ismert a vizsgált és a standard ion töltésének hányadosa. További korlátozás, hogy a meghatározandó ion mozgékonyasága a kromofor háttérion (kromát), az ellenion (kálium-ion) 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 (2. táblázat). Ezzel a háttérelektrolit rendszerrel valószínűleg még számos komponens esetén is jó eredményeket kaphattunk volna, hiszen pl. a klorát, a cianid, az oxalát vagy perklorát mozgékonyaságai is az optimális tartományban vannak.

A kérdésben felvetett amfoter vegyületek esetén is elvileg alkalmazható a 21. egyenlet, és az alkalmazhatóság nem függ az amfoter komponensek esetleg lényegesen eltérő méretétől. Amennyiben a vizsgált amfoter vegyület kielégíti a fent leírt körülményeket, azaz a ha a mozgékonyasága  $-69$  és  $-76$   $\text{mm}^2/\text{kV}\cdot\text{s}$  között van, akkor a kromátos háttérelektrolit és a tioszulfát belső univerzális standard használatával elvégezhető a mennyiségi meghatározás. Természetesen ebben az esetben tekintettel kell lenni arra, hogy az adott háttérelektrolit rendszerben, a 10-es pH-jú oldatban ismerni kell az amfoter komponens töltését, hogy képezhessük a 21. egyenletben szereplő  $n_{x,\text{IUS}}$  parametert. Az is szükséges, hogy az amfoter vegyület esetén alkalmazhassuk az indirekt UV detektálást, azaz 275 nm-en, a detektálás hullámhosszán (a kromát maximális elnyelési tartományában) az amfoter komponensnek elhanyagolható legyen az elnyelése.

Amennyiben ezek a feltételek nem állnak fenn, akkor olyan háttérelektrolit rendszert és univerzális belső standardot kell találni, mely megfelel az adott mérendő komponensnek, legyen az egy amfoter vegyület.

2,

A mikrofluidikai rendszereinkben alkalmazott split (folyadékmegosztásos) mintabevitelt lehet kombinálni elektrokinetikus injektálással, de valószínűleg nem érdemes. A folyadékmegosztásos injektálást éppen azért dolgoztuk ki, mert a hagyományos elektrokinetikus injektálás hibával terhelt (az eltérő mozgékonyaságú komponensekből különböző mennyiségek jutnak be az elválasztási kapillárisba), ez pedig a mennyiségi meghatározás pontosságát csökkenti. Ráadásul az injektálás időtartama alatt az elektródon történő elektrokémiai folyamatok változást okoznak a mintaösszetételben, illetve az elektrolízis miatt az oldat pH-jában is. Mindezek miatt a hagyományos kapilláris elektroforézisnél is csak ritkán használjuk az elektrokinetikus injektálást (például akkor, ha a mintánk vagy a kapillárist kitöltő futtató elektrolit viszkózus (kapilláris gélelektroforézis), vagy ha elektrodúsítást akarunk elérni, de ezt a módszert használták korábban a házilagos készítésű (lab-made) rendszerekhez is az injektálási eljárás egyszerűsége miatt). Ugyanakkor a mikrofluidikai rendszerekben a nyomással történő injektálás (a nanoliternél is kisebb mintatérfogatok kialakítása) nehézkes, jelenleg nincs általánosan használt ilyen módszer. Az általunk bemutatott, egyszerű elvű split injektálás elméletileg is, és a tapasztalataink alapján is kiküszöböli az elektrokinetikus injektálás alkalmazásának előbb tárgyalt problémáit.



A folyadékmegosztásos injektálás kombinálása az elektrokinetikus hatásokkal úgy lenne kialakítható, ha a nyomással történő injektálás alatt (miközben a mintaoldat áramlik az inlet port felől a 3 másik port felé) feszültséget alkalmazunk az *outlet 2* port és a szeparációs csatorna vége között. Az *outlet 1* portra nem érdemes feszültséget, hiszen a mintaoldat túlnyomórésze ide áramlik, de ha az elektromos térerő révén innen is a szeparációs csatornába kényszerítjük a minta komponenseket, akkor túl nagy mennyiségű (a hatékony elektroforetikus elválasztást lehetetlenné tevő) mintazóna alakulna ki. Abban az esetben is túlzottan nagy mintazóna alakul ki, ha az *inlet* portra (ahonnan a minta oldat áramlik a mikrocsipbe) kapcsolunk feszültséget, hiszen az eredeti mintaoldat komponensei közvetlenül vándorolnak a szeparációs csatornába.

Ha az *outlet 2* portra helyezük az egyik elektródot, akkor a mintakomponensek a nyomás és az elektromos térerő hatására jutnak be a szeparációs csatornába. Minél nagyobb a feszültség és minél kisebb az alkalmazott nyomás annál inkább elektrokinetikus jellegű az injektálás. (Hasonló jellegű injektálás végezhető a kapilláris elektroforetikus készülékekkel, ha úgy alkalmazunk elektrokinetikus injektálást, hogy a kapilláris végei között magasságkülönbséget létesítünk, hogy hidrosztatikai nyomás alakuljon ki, amely a mintaoldatot beviszi a kapillárisba.)

Míg az azonos csatornaméret arányok és azonos mintatérfogat mellett azonos méretű mintazónát lehet bejuttatni az elválasztó csatornába (és erre még az alkalmazott nyomás sincs hatással), a tisztelt Bírálónak igaza van abban, hogy különböző méretű mintazónákat lehet kialakítani, ha feszültséget is alkalmazunk a folyadékmegosztásos injektálással párhuzamosan.

Az elektrokinetikus injektálás, vagy a Bíráló által felvetett, split-injektálással kombinált injektálás esetén az elektroosztatikus áramlás hatását az injektálandó komponensek ismerete alapján lehet megítélni. Megítélésem szerint, minél nagyobb az elektroosztatikus mozgékonyosság a komponensek effektív elektroforetikus mozgékonyosságához képest, annál nagyobb a valószínűsége annak, hogy az eredeti minta összetételéhez hasonló összetételű mintazóna alakul ki az elválasztótérben. Ha kicsi az elektroosztatikus áramlás, akkor az azzal ellentétes előjelű mozgékonyssággal bíró komponensek esetleg egyáltalán nem is jutnak be az elválasztótérbe (feltételezve, hogy az elektroosztatikus az elválasztási csatorna irányába történik).

3,

A hatékony kromatográfias elválasztáshoz az szükséges, hogy a mobilfázis nagy felületen érintkezzen az állófázissal, ugyanakkor az állófázis könnyen átjárható is legyen a folyadék által. Bár az állófázisok ma leggyakrabban kis méretű kromatográfias részecskékből (gyöngyökből) kialakított töltetek, a monolit oszlopok alkalmazásának előnyei nyilvánvalóak, a monolitok porozitása általában úgy haladja meg a hagyományos töltetek porozitását, hogy emellett az anyag hidraulikus ellenállása csekély. Az alkalmazható monomerek változatossága miatt hidrofil vagy hidrofób polimerek egyaránt készíthetők, melyek gyakran átlátszóak. A monolitok hátrányaként a lehetséges fal-hatást és az oszlopok előállításának, illetve jellemzőinek nem túl jó reprodukálhatóságát hozzák fel.

A monolitoknak a fentebb említett előnyös tulajdonságuk alapján valóban érdemesnek tűnik mikrocsipekben alkalmazni őket. Egy belga kutatócsoporttal, akik a metakrilát alapú monolitokat használtak elektrokromatográfias elválasztásokhoz a hagyományos kvarckapillárisos CE készülékekben, még 2009-ben folytattunk kooperációt. Van der Heyden professzor PhD hallgatójával és posztdoktorával az általuk otthon rutinszerűen előállított metakrilát alapú monolitot próbáltuk kialakítani a PDMS mikrocsipben a laboratóriumunkban. Sajnos, meglepetésünkre a monolitok nem alakultak ki, sőt a lezárt csatornából néhány óra alatt a folyadék (monomert tartalmazó szerves oldószer) is teljesen eltűnt. A paraméterek változtatásával, a PDMS felületi kezelésével sem jutottunk megfelelő monolithoz (a témáról egy konferencián számoltunk be (I. Tanret, D. Mangelings, A. Gaspar, Y. van der Heyden: Combining methacrylate based monolithic separation potential with microfluidic lab-on-a-chip technology: a novel approach. 5th Symposium on Separation and Related Techniques by Nordic Society of Separation Science; 26-29 August 2009, Tallinn, Estonia). Évekkel később egy kolozsvári kutatócsoporttal újra próbálkoztunk ilyen monolitok kialakítására, de mikrocsipjeinkben továbbra sem sikerült. A probléma az lehet, hogy a szilárd PDMS elasztomer egy nagyon permeábilis anyag, amelyben a különböző anyagok, szerves oldószerek, de akár a víz is lassan elnyelődik. Másrészt a PDMS térhálósítását követően mindig marad az elasztomerben a monomer és a Pt-alapú katalizátort és más komponenseket tartalmazó térhálósító adalék feleslege, melyek kidiffundálnak a csatorna felületére, és gátolhatják a monolitok polimerizációját. Ez lehet az oka annak is, hogy az irodalomban csak nagyon kevés olyan munkát találunk amelyben monolitot integráltak mikrocsipbe. Hjertén professzornak az értekezésben is hivatkozott munkája (C. Ericson, J. Holm, T. Ericson, S. Hjertén, Anal. Chem. 2000, 72, 81-87) azért lehetett sikeres, mert ő a poliakrilamid alapú monolitot kvarccsipben alakította ki, a kvarc pedig nem porózus, a csatornák éppen olyan zártak, mint a CE kapillárisok. Egy másik munkában (M.F. Bedair, R. D. Oleschuk, Anal. Chem. 2006, 78, 1130-1138) különböző anyagú (PDMS, poli(metil-metakrilát) és ciklikus olefin kopolimer) mikrocsipekben hasonlították össze a létrehozott metakrilát alapú (laurilakrilát-etilén dimetakrilát) monolitokat. A szerzők a PDMS mikrocsipben nem kaptak megfelelő monolitot, ezt azzal magyarázták, hogy a monomer és a porogén oldószer adszorbeálódik a PDMS-re, és a PDMS áteresztí az oxigént. Az oldószer "elvesztése" valószínűleg úgy kerülhető el, ha a csip csatornáját hígabb monomerral kezeljük és polimerizációs reakciót indítanak be, hogy a csatorna belső falát egy vékony, folyadékokat át nem eresztő polimer réteggel szigeteljük.

A monolitikus szilika aerogélek lényegesen különböznek a hagyományos szilikagélektől mind szerkezetükben, mind porozitásukban, előállításukhoz pedig speciális szuperkritikus körülmények között végzett szárítás szükséges. Az extrém nagy belső porozitásuk ellenére (az anyag 90-95% levegő) ezeket az anyagokat korábban nem használták kromatográfias állófázisként. Ennek egyik oka az lehet, hogy az

aerogél makroszkópikus szilárd váza összeomlik, amikor vízzel érintkezik. Ugyanakkor azt találtuk, hogy az aerogél porítása és vízben való szuszpendálása után a részecskék mérete 0.2-1  $\mu\text{m}$  tartományban állandósul. Értekezésemben a Dr. Lázár István kutatócsoportja által előállított C16 - módosított szilika aerogélt az irodalomban először használtuk kromatográfiai elválasztási célra mikrocsipekben. Az aerogél porítása és szuszpendálása után az általunk bemutatott, szűkület segítségével történő töltet kialakításának előnye az, hogy a mikrocsip csatornahálózatában tetszőleges szakaszokon állíthatunk elő töltetet, míg a monolitok *in situ* polimerizációja során többnyire a teljes csatornahálózatban történik a monolit képzése. További előnye az általunk javasolt eljárásnak, hogy sokkal kevésbé léphet fel a falhatás mint az *in situ* képzett monolitok esetén, melyeknél a csatorna fal és a monolit szélének illeszkedése sokszor nem szivárgásmentes.

A mikrocsipekbe integrált monolitokkal kapcsolatban szükséges még megjegyezni azt az érdekes alkalmazási lehetőséget is, hogy velük nagynyomású, mozgó alkatrészek nélküli, elektroosztatikus mikropumpák hozhatók létre, pl. egy 100  $\mu\text{m}$  átmérőjű kapillárisban 2.9  $\mu\text{L}/\text{min}$  sebességgel és 3 atm nyomással áramoltatható a folyadék 6 kV feszültség alkalmazása mellett (P. Wang, Z. Chen, H. Chang, Sens. Actuat. B 113 (2006) 500–509). Ez a folyadék áramoltatási módszer pedig alkalmas lehet miniatürizált HPLC vagy lab-on-a-chip-ekhez.

Mindezek alapján úgy gondolom, hogy a monolitok mikrocsipben való alkalmazása ígéretes, de további kutatások szükségesek a témában.

4,

Valóban, a 3D-nyomtatás napjainkban olyan gyorsan fejlődő gyártási eljárás, amellyel vékony rétegek lerakásával készíthetők tárgyak szemben a hagyományos megmunkálással, ahol egy nagyobb nyersanyagból távolítják el a felesleges anyagot és a megmaradó rész lesz a kész termék. A 3D-nyomtatásokhoz ugyanolyan vagy hasonló számítógépes tervező programot (AutoCAD-ot) használnak, amely a mikrofluidikai csipek tervezésénél általánosan használatos.

A 3D-s nyomtatókkal kapcsolatban valóban nagy a várakozás a mikrofluidikai kutatások területén, hogy a jelenlegi mikrocsip előállítási eljárások még gyorsabbak és olcsóbbak legyenek. Ezt a várakozást mutatja az is, hogy a Lab on a Chip folyóirat 2012-ben címlapján adott hírt az egyik első 3D-nyomtatással készített mikrocsipről.

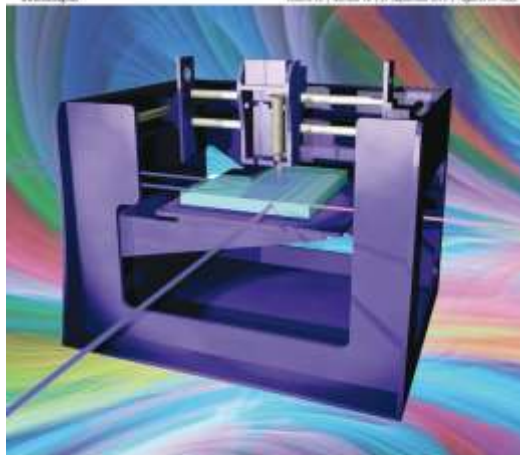


# Lab on a Chip

Microfluidics for chemistry, physics, biology, materials science and bioengineering

www.rsc.org/loc

Volume 13 | Number 18 | 21 September 2013 | Pages 1746-1811

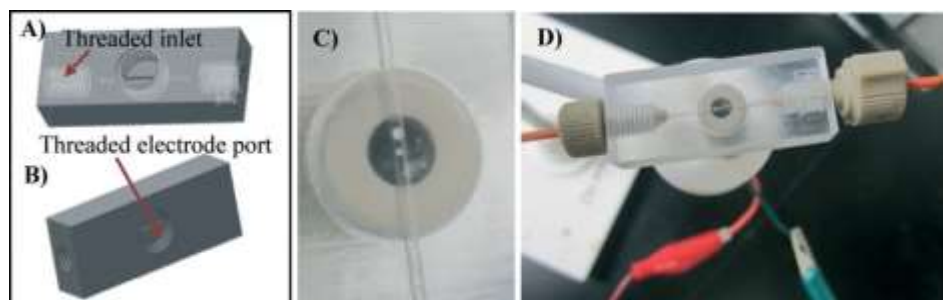


RSC Publishing

COMMUNICATION  
Paper  
View Article Online  
DOI: 10.1039/C3LC50081G

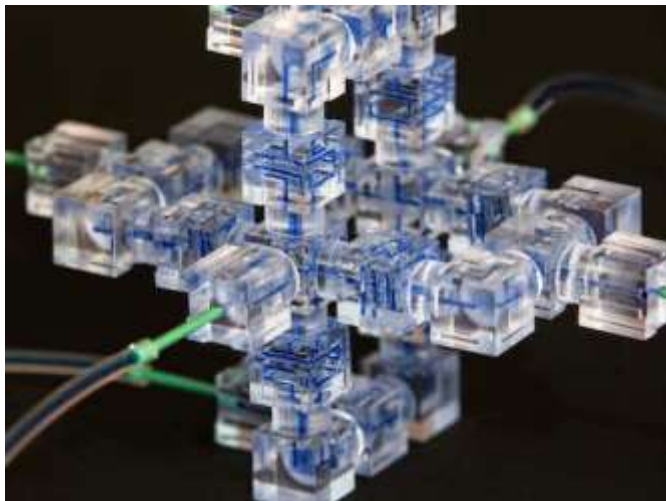


A 3D-nyomtató felbontását a rétegek vastagsága és a réteg síkjában használt felbontás adja. A szokásos rétegvastagság körülbelül 100  $\mu\text{m}$  (250 dpi), a réteg síkjában a felbontás pedig a lézernyomatókéhoz hasonló (50-100  $\mu\text{m}$ ), azaz lényegesen rosszabb, mint az általunk (és a legtöbb mikrofluidikai kutatócsoport által) használt lágy litográfias módszernél, ahol a néhány mikrométertől néhány száz nanométerig terjedő tartományban alakíthatók ki különböző formák. Ezért, bár ismeretesek az irodalomban 3D-nyomtatással készített mikrofluidikai eszközök, ezek többnyire legalább 100  $\mu\text{m}$  méretű csatornákat és alakzatokat tartalmaznak, és a kisebb elérhető felbontás miatt a csatorna mintázatok is egyszerűbbek. Egy tipikus példa ezekre az eszközökre az Erkal és mtsai. által nemrég bemutatott mikrocip (J.L. Erkal és mtsai., Lab Chip, 2014, 14, 2023). Jól látható, hogy a mikrocipen akár a "chip-to-world" csatlakozó elemek (PEEK csavarok) szivárgás mentes fogadására alkalmas menetek is könnyen kiképezhetők, ami gyakran nehézkes a hagyományos mikrofabricációs módszerekkel.



3D device used for electrochemical detection. A–B) 3D renderings of the device in Autodesk software; C–D) printed 0.5 mm-wide channel device in VeroClear material. The Pt-electrode is screwed into the electrode port, showing alignment of both Pt wires with the 0.5 mm channel (panel C). In panel D, the device is shown with the Pt-electrode, electrode leads, and the fittings used to integrate the device with a syringe pump. (J.L. Erkal és mtsai., Lab Chip, 2014, 14, 2023)

Mások (K.C. Bhargava, B. Thompson, N. Malmstadt, PNAS, 2014, 111, 15013-1501), egy érdekes, a LEGO játékok inspirálta ötlet alapján 3D-s nyomtatóval standardizálható, cserélhető mikrofluidikai építőelemeket készítettek, melyek belső térfogata nagyjából 1 mL körüli, és komplex fluidikai rendszerek alakíthatók ki:



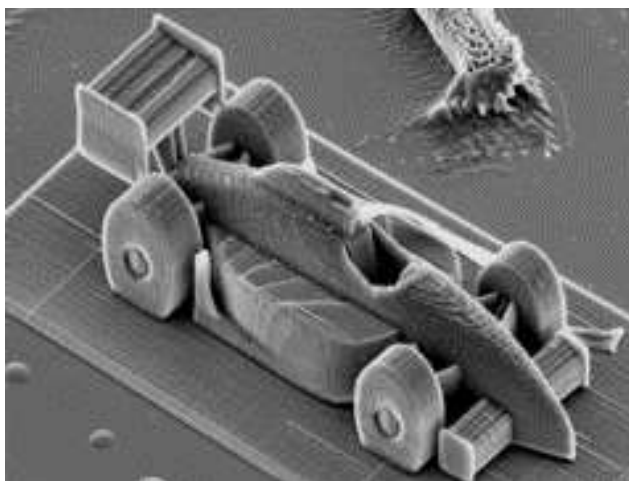
Néhány éve a Magyarországon elérhető, legjobb felbontásúnak mondott 3D-s nyomtatót (Varinex Kft., <http://3dnyomtatás.varinex.hu>) mi is teszteltük, ha nem is közvetlenül mikrocipet, de a mikrocip előállításához szükséges öntőformát nyomtattunk ki, azonban a kapott csekély felbontás miatt nem tudtuk felhasználni a 100  $\mu\text{m}$ -nél kisebb mintázatú mikrocipek készítésére. Ahhoz, ugyanis hogy az 5  $\mu\text{m}$  nagyságú kromatográfiás gyöngyökből, vagy a még kisebb, porított és szuszpendált szilika aerogél részecskékből töltetet alakítsunk ki 10-15  $\mu\text{m}$ -es szűkület kialakítására lenne szükség. Az is probléma volt, hogy a felületek simasága messze elmaradt a lágy litográfiás módszerrel készített öntőformák simaságától (az öntőformákat "atomi" simaságú Si lapkákra alakítjuk ki a lágy litográfiánál). Laborunk akkor tudná felhasználni a 3D-nyomtatás lehetőségeit, ha ezek az említett problémák megoldódnának.



3D-nyomtatással készített öntőformáról készített PDMS mikrocsip

Ugyanazon AutoCAD csatornamintázatról 3D-nyomtatással, illetve a litográfias eljárással készített öntőformák (a csatornák szélessége 1 mm)

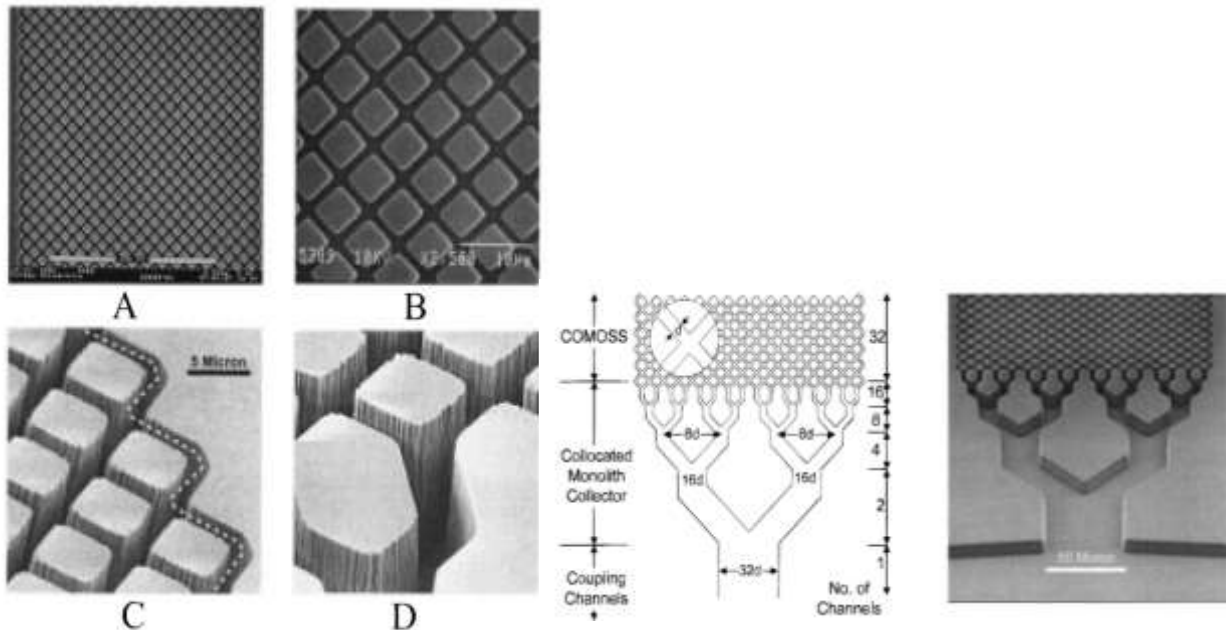
A nem távoli jövőben az elérhető felbontás bizonyára jelentősen javulni fog. A Bécsi Műszaki Egyetem két éve mutatta be azt a nagy sebességű, nagy pontosságú 3D-nyomtatót, amellyel már  $16\ \mu\text{m}$  vékonyságú rétegeket képeztek. Elképzelhetőnek tartom, hogy idővel nemcsak az öntőformákat, de magukat a mikrocsipeket is 3D-nyomtatással készíthetjük.



3D nyomtatással készített,  $285\ \mu\text{m}$  méretű eszköz (forrás: nanotech-now.com)

Fentiek alapján úgy gondolom, hogy a tisztelt Bíráló felvetése, a csatornában található, nem folyadék komponensek 3D-nyomtatással történő elkészítése is lehetséges. Elvileg az is lehetséges, hogy magát a kromatográfias gyöngyöket, azaz a komplett kromatográfias töltetet "belenyomtassuk" a mikrocsip csatornájának megfelelő részébe. Ez a rendszer nagyon hasonlítana a Regnier és mtsai. által kvarclapban

kialakított (kimart) – a monolitokat vagy kromatográfiás tölteteket utánzó – rendszerhez (COMOSS, collocated monolith support structures), ahol az  $5 \times 5 \mu\text{m}$  méretű kimart alakzat éppen egy kromatográfiás gyöngynek, részecskének feleltethető meg. Regnier munkája ugyan nagyon ötletes, de maga is elismerte, hogy az így kifejlesztett kromatográfiás, illetve elektrokromatográfiás rendszer elválasztási hatékonysága nem túl jó (a kromatográfiás részecskék felülete ugyanis porózus, így nagyobb fajlagos felülettel rendelkezik egy hagyományos töltet, mint a COMOSS rendszerek).



**Figure 4.** Scanning electron micrographs of microfabricated collocated monolith support structures: (A) a section of the COMOSS column, (B) higher resolution micrograph showing high degree of homogeneity of the COMOSS monolith structures and the channels, (C) the column-wall interface (The similarity to the design model should be noted.) and (D) high-magnification SEM image showing the surface roughness of the COMOSS monolith structures.

B. He, N. Tait, F. Regnier, *Anal. Chem.* 1998, 70, 3790-3797

5,

Az analitikában gyakran elhangzik, hogy "a legjobb mintaelőkészítés, ha nincs mintaelőkészítés". Ebben persze van túlzás, hiszen mintaelőkészítés sok esetben elkerülhetetlen és hasznos, de az is igaz, hogy a különböző mintaelőkészítési eljárásokban sokféle olyan hibaforrás jelenik meg, ami egyes mintakomponensek elvesztését, vagy új, esetleg a detektálást zavaró anyagok mintába jutását eredményezheti. Ráadásul a mintaelőkészítési eljárások sok esetben költségesek és jelentősen megnövelik az analízis időtartamát. A mintaelőkészítés célja az elválasztástechnikában lehet az elválasztóegység védelme, megfelelő működésének biztosítása, a meghatározandó komponensek elválasztásának vagy detektálásának megkönnyítése, illetve a zavaró komponensek eltávolítása vagy maszkírozása, stb.

Amint az értekezésemben ezt több alkalmazáson keresztül bemutattam, a kapilláris elektroforézis egyik nagy előnye a kromatográfiás módszerekkel szemben, hogy általában csak minimális mintaelőkészítést kíván. Ennek oka, hogy az elválasztóegység a kapilláris elektroforézisnél csak egy kvarckapilláris, amit

nem tesz tönkre egy erősebben savas vagy lúgos vagy nagy fehérjetartalmú mintaoldat. Ráadásul a kapilláris elektroforézis, mint az egyik legnagyobb felbontóképességű elválasztástechnikai módszer, a minta komponenseit jó eséllyel elválasztja a mérés során, így ezt követően már csak a tiszta komponensek detektálása történik. A nagy só- és/vagy fehérjetartalmú klinikai mintáknál (vizelet, szérum, különböző váladékok) csak minimális mintaelőkészítést (kvázi "direkt injektálást") alkalmaztunk, olyanokat amelyek valamilyen egyszerű fizikai műveletnek tekinthetők, vagy például egy komponenst/adalékot kis térfogatban adtunk a mintához.

A kapilláris elektroforézisnél általánosan használt fizikai jellegű mintaelőkészítés a mintaoldatok centrifugálása annak érdekében, hogy az oldat esetleges szilárd szennyezőit leválasszuk az oldat tároló edényke aljára (apró szilárd részecskék eltömhetik a kapillárist). Másrészt a mintaoldatokat és pufferoldatot/háttérelektrolitot vákuum alatt vagy ultrahangos fürdőben rövid ideig tartva az oldatot buborék mentesíteni szükséges. Mind a szilárd szennyezők, mind a buborékok eltávolítására megfelelő módszer az is, ha az oldatokat 0,45 µm pórusméretű fecskendőszűrőn lassan átnyomjuk. Ha ezeket az egyszerű, rövid műveleteket elhagyjuk, akkor az elektroferogramokon nagyon keskeny, de akár nagy intenzitású csúcsok (zajok) jelenhetnek meg a detektorablakban a detektálás során elhaladó mikroszkópikus szilárd részecskék vagy buborékok miatt, amik zavarhatják a későbbi mennyiségi kiértékelést.

Több olyan klinikai minta elemzését mutattam be, ahol olyan reagenst kellett a mintaoldathoz adni, amellyel a meghatározandó komponens koncentrációját tudtuk állandósítani (pl. a nyál minták vételekor kevés tömény NaOH-val az oldat pH-ját 11 fölé vittük a nitrit/nitrát tartalom meghatározásakor, hogy a nyálban levő baktériumok ne változtassák meg a nitrit/nitrát mennyiségét. A Hg-specieszek meghatározásakor az injektálás előtt a mintaoldathoz a származékképző tiolvegyületet kellett adagoljunk, a vérminták temozolomid tartalmának stabilitását pedig úgy értük el, hogy az oldat pH-ját 1-re állítottuk.). Az értekezésben is bemutattam, hogy a kapilláris elektroforézisnél különösen fontos, hogy használjunk belső standardot, és lehetőleg jól megválasztott kettőt. Azért, hogy a minta hígulása kis mértékű (elhanyagolható) legyen töményebb törzsoldatból érdemes kisebb térfogatot adalékolni.

A klinikai minták esetén az egyik leggyakoribb mintaelőkészítés általában a minták fehérjementesítése (pl. acetonitril és a minta 1:1 arányú összekeverése után a felülúszót vizsgálják), ennél a lépésnél azonban fennállhat annak a veszélye, hogy a meghatározandó komponensek (pl. gyógyszervegyület, metabolit, stb.) egy részét a kicsapódott fehérjék magukkal viszik. Az értekezésben több példát hoztam arra, hogy a fehérjementesítés szinte mindig kikerülhető kapilláris elektroforézisnél.

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

Debrecen, 2015. szeptember 23.

Dr. Gáspár Attila