Elektroforetikus elválasztások kapillárisban és mikrocsipben

MTA doktori értekezés

Gáspár Attila

Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

> Debrecen 2014

Aspár 9213: MT4 doktori értekezés

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	7
2. Irodalmi összefoglaló	9
2.1 Kapilláris elektroforézis	9
2.1.1 Mintainjektálási technikák	11
2.1.2 Indirekt UV detektálás	13
2.1.3 Klinikai minták közvetlen vizsgálata	14
2.2 Mikrocsip elektroforézis	16
2.2.1 A mikrofluidikai csipek előállítása	16
2.2.2 Mintainjektálási technikák	18
2.2.3 Zónaelektroforetikus elválasztások mikrocsipben	19
2.2.4 Kromatográfiás töltetek kialakítása és elektrokromatográfiás	
elválasztások mikrocsipben	21
3. Célkitűzés	23
4. Alkalmazott készülékek és módszerek	24
4.1 Készülékek	24
4.2 Mikrofluidikai csipek készítése	25
5. Eredmények és diszkusszió	26
5.1 Elektroforetikus elválasztások kapillárisban	26
5.1.1 Elektrokinetikus injektálás alkalmazásának lehetőségei és korlátai kapilláris zónaelektroforézisnél	26
5.1.2 Kapilláris elektroforézis alkalmazása szervetlen vegyületek meghatározására	40
5.1.3 Kapilláris elektroforézis alkalmazása gyógyszerészeti és biológiai minták elemzéséhez, az eredmények orvosdiagnosztikai felhasználása	50
5.2 Elektroforetikus elválasztások mikrocsipben	73
5.2.1 Nyomással történő injektálás kidolgozása mikrofluidikai csipekhez	73
5.2.2 Miniatürizált kapilláris elektroforetikus rendszer kialakítása	86
5.2.3 Kromatográfiás töltetek kialakítása mikrofluidikai csipekben	90

Afspár 91213: MT 4 doktori értekezés

	5.3 Felületi plazmon rezonancia spektroszkópia alkalmazása elektroforetikus	
	rendszerekben egyes komponensek detektálásához, illetve felületi adszorpciós	
	vizsgálatokhoz	109
	5.4 Mikro-spektrofotométer alkalmazása mikrocsipen történő detektáláshoz	119
6.	Összefoglalás	124
7.	Köszönetnyilvánítás	133
8.	Irodalomjegyzék	135
	8.1 Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	135
	8.2 További saját közlemények kapilláris elektroforézis témakörben	138
	8.3 Az értekezésben felhasznált irodalom	140

Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

AAZTA	1,4-bisz-(acetát)-6-[bisz-(acetát)]-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepin			
ACE	affinitás kapilláris elektroforézis (affinity capillary electrophoresis)			
AIC	5-amino-imidazol-4-karboxamid			
ANA-a	anatoxin-a			
BGE	háttérelektrolit (background electrolyte)			
BOPTA	(9R,S)-2,5,8-trisz(karboximetil)-12-fenil-11-oxa-2,5,8-triazadodekán-1,9-diacetát			
CCE	királis kapilláris elektroforézis (chiral capillary electrophoresis)			
CE	kapilláris elektroforézis (capillary electrophoresis)			
CEC	kapilláris elektrokromatográfia (capillary electrochromatography)			
CGE	kapilláris gélelektroforézis (capillary gelelectrophoresis)			
CITP	kapilláris izotachoforézis (capillary isotachophoresis)			
CMC	kritikus micellaképződési koncentráció			
COMOSS	collocated monolithic stationary phase support system			
CTAB	cetil-trimetil-ammónium-bromid			
CYN	cilindrospermopszin			
CYS	cisztein			
CZE	kapilláris zónaelektroforézis (capillary zone electrophoresis)			
C18	18 szénatom hosszúságú láncot tartalmazó szilika kromatográfiás állófá			
DDAB	didodecil-dimetil-ammónium bromid			
DMA	dimetil-arzénessav (dimethyl arsinic acid)			
DMSO	dimetilszulfoxid			
DNS	dezoxiribonukleinsav			
DOTA	1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraacetát			
DTPA-BMA	N,N"-bisz(metilkarbamoilmetil)-karboximetilimino-bisz(etilénediimino)- diacetát			
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediaminetetraacetic acid)			
EK	elektrokinetikus			
eof	elektroozmotikus áramlás (electroosmotic flow)			
FI	áramlási injektálás (flow injection)			
FIA	áramlási injektálásos analízis (flow injection analysis)			
GC	gázkromatográfia (gas chromatography)			
GLU	glutation			
HD	hidrodinamikus			
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (high-performance liquid chromatography)			
HPMC	hidroxipropilmetil-cellulóz			

Aspár 9213: MT 4 doktori értekezés

ICP-MS	induktív csatolású plazma - tömegspektrométer (inductively coupled				
ID	plasma - mass spectrometry)				
ID 10	belső átmérő (inner diameter)				
IS	belső standard (internal standard)				
ITP	izotachoforézis				
IUS	belső univerzális standard (internal universal standard)				
LIF	lézer indukált fluoreszencia				
LOD	kimutatási határ (limit of detection)				
LOQ	meghatározási határ (limit of quantitation)				
LVSS	nagy térfogatú mintadúsítás (large volume sample stacking)				
MAA	merkapto-ecetsav				
MCY-LR	mikrocisztin-LR				
MEKC	micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia				
MIC	minimális gátló koncentráció (minimum inhibitory concentration)				
MNA	2-merkapto-nikotinsav				
mTAS	micro total analysis system				
MTIC	monometil-triazénoimidazol-karboxamid				
o-APA	o-aminofenil-arzénessav (o-aminophenyl-arsinic acid)				
OD	külső átmérő (outer diameter)				
PAA	fenil-arzénessav (phenylarsinic acid)				
p-APA	p-aminofenil-arzénessav (p-aminophenyl-arsinic acid)				
PDMS	polidimetilsziloxán				
PEEK	poli(éter-éter-keton)				
RSD	relatív standard deviáció				
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulphate)				
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát polakrilamid gélelektroforézis				
SPE	szilárd fázisú extrakció (solid phase extraction)				
SPR	felületi plazmon rezonancia (surface plasmon resonance)				
TMZ	temozolomid (temozolomide)				
TR	átviteli arány (transfer ratio)				
UV	ibolyántúli (ultraviolet)				
μCΕ	mikro kapilláris elektroforézis, miniatürizált kapilláris elektroforézis (micro capillary electrophoresis)				
μFIA	mikro áramlási injektálásos analízis (micro flow injection analysis)				

1. Bevezetés

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 gyakran komplex mátrixú mintákból. Emiatt a modern analitikai elválasztási módszerek egyre fontosabb szerephez jutnak a tudományos kutatásokban és a legkülönbözőbb ipari alkalmazási területeken.

kapilláris elektroforézis (CE) teljesítőképességű А egy olyan nagy 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, alkalmazható fémionok, szervetlen 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 jelenleg a nagyhatékonyságú kromatográfiás módszerek legfontosabb alternatívája, melynek alapkutatása még jelenleg is folyik. A CE jelentőségét napjainkban a fehérjealapú gyógyszerek analitikájában vagy a proteomikai vizsgálatokban betöltött fontos szerepe is jelzi.

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 méreteinek 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 egyetemein és a különböző fejlesztő cégekben.

Többen azt tartják, hogy az ember élete hétéves ciklusokból áll és minden hetedik év végén kezdődik egy új szakasz. Az én szakmai életemben bizonyosan fellelhetők ezek a hétéves ciklusok, amelyek valamilyen módon mindig kapcsolódtak egymáshoz. Egyetemi hallgatóként, doktori ösztöndíjasként és kezdő kutatóként az atomspektrometria mintabeviteli problémáival és egyes elemspecieszek meghatározásával foglalkoztam. 2000-től egy számomra teljesen új területen, a kapilláris elektroforézis módszerrel kezdtem előbb elemspecieszeket, majd más vegyületeket elválasztani és (az ennél az analitikai módszernél is kritikusnak

Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

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

Az értekezésben az elmúlt 14 év során kapillárisban és mikrofluidikai csipben végzett elektroforetikus elválasztásokkal kapcsolatos kutatásaimat foglaltam össze.

Értekezésem két fő fejezetből áll, melyek a kapillárisokban, illetve a mikrocsipekben végzett elektroforetikus elválasztásokat összegzik. 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. Ezek а elektroforetikus mintainjektálási kutatások jelentik az elválasztások, meghatározások elméletét érintő vizsgálatainkat. Mivel az analitikusok sokszor befolyásolják munkájának, kutatásainak irányát а változatos tudományterületekről érkező analitikai feladatok, magam is sokféle vegyülettípus (pl. szervetlen ionok, elemspecieszek, toxinok, gyógyszervegyületek) meghatározására fejleszthettem ki analitikai módszereket a legkülönbözőbb mintatípusokra (pl. szérum, vizelet, tumor) kapilláris elektroforézist alkalmazva. Mikrofluidikai kutatásainkban elsősorban a különböző csatornarendszerek tervezésére, a kromatográfiás töltetek újfajta módszerrel történő kialakítására, illetve párhuzamosan végezhető analitikai elválasztások kifejlesztésére törekedtünk.

Bár a bemutatott eredmények - a téma természeténél fogva - kissé szerteágazóak, az elválasztások elvének hasonlósága és a mindkét módszernél központi kérdésként jelentkező mintainjektálás együttes tárgyalhatósága miatt közös irodalmi részt készítettem. Ugyanakkor egyes fejezetek elején, ahol azt szükségesnek tartottam, egy-egy rövid irodalmi bevezetést, áttekintést adtam az adott témáról.

Az értekezésben bemutatott kapilláris elektroforetikus kutatást kizárólag tanszékünkön végeztük, míg a mikrofluidikai témájú eredmények egy kisebb részét kétévnyi külföldi tanulmányutam alatt értem el.

Az elmúlt másfél évtizedben végzett kapilláris elektroforetikus kutatásainknak nem voltak előzményei egyetemünkön, mikrofluidikai analitikai területen pedig hazánkban is csak alig. A következő időszakban előttem álló egyik legfontosabb feladatnak a mikrofluidika analitikai tárgyú kutatásának hazai megerősítését és továbbvitelét tartom.

2. Irodalmi összefoglaló

2.1 Kapilláris elektroforézis

A jelenleg leghatékonyabb elválasztási technikák többnyire az elektroforézis elvén alapulnak, mely szerint az oldat töltéssel rendelkező részecskéi elektromos erőtér hatására elmozdulnak. Az elektroforézist elválasztástechnikai célra először Tiselius [1] alkalmazta 1937-ben (mozgó-határfelületi elektroforézis). Később az elválasztások hatékonyságát papír [2] és gél [3] hordozókon sikerült jelentősen javítani. Az 50-es évek végétől az agarózgélben, illetve az akrilamidgélben végzett gélelektroforézis a DNS fragmentumok, illetve a fehérjék elválasztásának legfontosabb módszerévé vált [4]. A gélelektroforézis technikáknál azonban a gél elkészítése, a zónák mennyiségi kiértékelése meglehetősen idő- és munkaigényes műveletek.

A zónaelektroforézist oldatokban először Hjertén írta le 1967-ben [5]. Ő a zónaelektroforézist olyan 1-3 mm belső átmérőjű kvarccsövekben végezte és az anyagkonvekciót a cső forgatásával igyekezett csökkenteni. Később egyre inkább a kis belső átmérőjű csövek alkalmazása került előtérbe, mivel a nagyobb keresztmetszet/felület aránnyal rendelkező elválasztóegységben a hődisszipáció nagyobb mértékű [6-8]. A kapilláris elektroforézis alapelve jó ideje ismert volt már, de különböző technikai jellegű problémák miatt alkalmazására csupán Jorgenson és munkatársai [9, 10] eredményeit követően kerülhetett sor a 80-as évek elejétől.

A kapilláris elektroforézisnél az elektroforézis egy vékony, általában 25-75 μ m belső átmérőjű, pufferoldattal töltött kapillárisban történik. A kapilláris alkalmazásának előnye, hogy nagy elektromos ellenállásánál fogva a rendkívül nagy térerő (100-500 V/cm) alkalmazását csekély hőfejlődés mellett teszi lehetővé. A nagy elektromos térerő használata rövid mérési időt, nagy elválasztási hatékonyságot és felbontást biztosít. Az elméleti tányérszám a kapillárison belüli elektroozmotikus áramlás dugószerű profiljának köszönhetően sok esetben meghaladja a 10⁶ értéket.

A kapilláris elektroforézis módszer fogalma különböző technikákat foglal magába, melyek közül a legalapvetőbbek a *kapilláris zónaelektroforézis* (CZE), a *kapilláris* gélelektroforézis (CGE), a micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia (MEKC), a kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF), a kapilláris elektrokromatográfia (CEC) és a kapilláris izotachoforézis (CITP).

Az elektroforézis során egy ion sebességét az ion töltése, mérete, az alkalmazott térerősség nagysága, illetve a közeg viszkozitása szabja meg. Ha homogén E elektromos térben i töltött részecskére az F_e elektromos erő gyorsítólag hat, akkor

Cáspár 91213: MT4 doktori értekezés

$$\mathbf{F}_{\mathbf{e}} = \mathbf{z}_{\mathbf{i}} \cdot \mathbf{e} \cdot \mathbf{E} \tag{1}$$

 z_i = az i komponens töltésszáma, e= az elemi töltés [1,602[·]10⁻¹⁹ A's=C], E= az elektromos térerősség [V[·]cm⁻¹]

A részecskére azonban az oldószer molekulákkal való súrlódás miatt egy F_s visszatartó erő is hat, mely egyenesen arányos a mozgása sebességével és a közeg viszkozitásával:

$$\mathbf{F}_{s} = \mathbf{k} \cdot \boldsymbol{\eta} \cdot \mathbf{v}_{i}^{0} \tag{2}$$

k= állandó [cm], η = az oldat viszkozitása [Pa's], v_i^0 = az i komponens vándorlási sebessége a végtelen híg oldatban [cm's⁻¹]

Ha az F_e gyorsító erő és a vele ellentétes irányú F_s egymással egyenlő, akkor a (gömbszerű) i ionok állandó sebességgel mozognak és így felírható, hogy:

$$v_{i}^{0} = \frac{z_{i} \cdot e}{6\pi\eta r_{i}} \cdot E$$
(3)

Az i ion r_i hidrodinamikai sugara az ion szolvatált (vizes oldatban hidratált) alakjának sugarát jelenti, mely különbözik a kristálytani sugártól. Az ionatmoszférának a mozgékonyságra gyakorolt hatása miatt bevezették az effektív mozgékonyság fogalmát, melyben az elméleti töltés helyett a kisebb effektív töltés, a hidrodinamikai sugár helyett pedig az adott ionnak ellenionjaival együtt vett alakzat effektív sugara szerepel:

$$\mu_{i} = \frac{Q_{\text{eff}}}{6\pi\eta R} \tag{4}$$

 μ_i az effektív elektroforetikus mozgékonyság [cm²V⁻¹s⁻¹], Q_{eff} az ion effektív töltése [C], R az ion teljes sugara [cm]

A kapilláris elektroforézis működésének egyik fontos eleme az elektroozmotikus áramlás (EOF), ami a folyadék kapillárisbeli tömegtranszportja, mely a kapilláris belső falán kialakult felületi töltések (kettős réteg) következménye. Mivel az áramlás hajtóereje egyenletesen oszlik el a kapillárisban, az áramlás teljesen egyenletesnek tekinthető. Az EOF szabályzásához elsősorban a kapilláris felületi töltésének, illetve a puffer pH-jának vagy viszkozitásának megváltoztatása szükséges. Ezenkívül az EOF változtatható a kapilláris falának módosításával (sokféle dinamikus vagy statikus réteg kialakításával) is [11-15].

A kapilláris elektroforézis módszere valamennyi területének irodalmi áttekintésére jelen munkában nincs szükség, az alábbiakban csupán azokat a területeket tekintem át, melyekkel a kutatómunkánkban részletesebben foglalkoztunk.

2.1.1 Mintainjektálási technikák

A kapilláris elektroforézis gyakorlatában alapszabálynak számít, hogy a nagy elválasztási hatékonyság elérése érdekében csak nagyon kis mintatérfogatot szabad a kapillárisba juttatni. A kapillárisba bejuttatott minta (injekciós dugó) hosszának kisebbnek kell lennie, mint a kapilláris effektív hosszának 1-2 százaléka. Ez azt jelenti, hogy az injektálás hosszúsága a kapilláris hosszától és belső átmérőjétől függően csupán néhány milliméter, vagyis a minta térfogata 1-50 nL. E rövid zónaszélességnél nagyobb injektálási hossz arányosan szélesebb csúcsokat eredményez, másrészt növelheti az elektromos tér inhomogenitását és ily módon eltorzult alakú csúcsokat okozhat.

A két leggyakrabban használt mintabeviteli módszer a hidrodinamikus (HD) és az elektrokinetikus (EK) injektálás.

A hidrodinamikus injektálás a legáltalánosabban használt CE mintabeviteli módszer. A minta beviteléhez a kapilláris injektálási végénél nyomást, vagy a kapilláris másik végénél vákuumot alkalmazunk, vagy a mintát tartalmazó edénykét megemeljük a kapilláris másik végének a szintjéhez képest. Az injektált minta térfogata a Hagen-Poiseuille egyenlet alapján kiszámítható:

$$V = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} \tag{5}$$

V: az injektált minta térfogata [m³], ΔP: nyomáskülönbség a kapilláris két vége között [Pa], d: a kapilláris belső átmérője [m], t: az injektálás időtartama [s], η: a puffer viszkozitása [Pa·s], L: a kapilláris hossza [m]

Az elektrokinetikus injektálás sajátsága, hogy a kapillárisba juttatott mennyiség függ az egyes részecskék elektroforetikus mozgékonyságától. Egyfajta pozitív diszkrimináció figyelhető meg az ionos részecskék esetén, mivel a mozgékonyabb ionok nagyobb mennyiségben jutnak a kapillárisba, mint a kevésbé mozgékony ionok és töltés nélküli részecskék. Az injektált mennyiség (Q) a következőképpen számolható ki [16]:

Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

$$Q = \left(\frac{k_{BGE}}{k_s}\mu_e + \mu_{EOF}\right)\frac{U\pi r^2 ct}{L}$$
(6)

Q: injektált mennyiség [mol], μ_e : a részecske elektroforetikus mozgékonysága [cm²V⁻¹s⁻¹], μ_{EOF} : az EOF mozgékonysága [cm²V⁻¹s⁻¹], k_{BGE} : a háttérelektrolit (BGE) vezetőképessége [S], k_s: a minta vezetőképessége [S], U: feszültség [V], r: a kapilláris sugara [cm], c: a részecske koncentrációja [mol dm⁻³], t: az injektálás időtartama [s], L: a kapilláris teljes hossza [cm]

Az egyenletből kitűnik, hogy az injektált komponensek mennyisége a komponensek mozgékonyságától, a mintaoldat és a pufferoldat vezetőképességeinek arányától függ. Az előbbi az ún. "mobility bias"-t (a komponensek eltérő mozgékonyságai miatt jelentkező hiba), az utóbbi a "matrix bias"-t (a mintaoldatok eltérő mátrixtartalma (és így eltérő vezetőképessége) miatt jelentkező hiba) [17-19] okozza. Emiatt az elektrokinetikus injektálás általában kevésbé megbízható mennyiségi meghatározást tesz lehetővé, mint amilyen a hidrodinamikus injektálással elérhető. A "matrix bias" miatt a külső standard kalibrációs eljárások szinte lehetetlenek, csak meglehetősen komplikált eljárások használhatók. Az elektrokinetikus injektálásnak azonban megvan az az előnye, hogy nagyon egyszerű, nagyon érzékeny elemzéseket tesz lehetővé, előnyösen alkalmazható nagyon kis koncentrációjú minták, viszkózus minták, gélek elemzésénél, amikor a hidrodinamikus injektálás már nem használható. Az elektrokinetikus injektálás jelentősége elsősorban azért nőtt meg, mert bizonyos esetekben az alkalmazása lehetővé teheti a minták egyes komponenseinek akár 10-100-szoros dúsítását, s így a CZE elemzés érzékenységének jelentős javítását. Az EK injektálás elméletével, alkalmazásának előnyeivel és problémáival számos közlemény foglalkozik [17-23]. Az univerzális kalibrálás [23] általános elve az, hogy csupán egyetlen standardot használnak a különböző komponensek mennyiségi meghatározására. Az univerzális kalibrálás lehetőségét először Yeung írta le az indirekt UV detektálást alkalmazó ionkromatográfiás elemzéseknél [24, 25]. E meghatározásokat azonban nagyban megnehezítették a kromatogramon gyakran megjelenő rendszercsúcsok. Az univerzális kalibráció előnyeit és lehetőségeit a kapilláris elektroforézisnél Jandik és munkatársai vizsgálták [23], de ennek alkalmazásáról különböző mátrixú minták esetén nem találtunk közlést. Yeung és mtsai. több ismeretlen komponens mennyiségének meghatározását egyetlen kalibrációs görbe alapján végezték. Ha a vizsgálandó minta összes-ion tartalma nanomólos koncentrációtartományban volt, akkor a minta vezetőképességét adalékok hozzáadásával növelték meg, így biztosítva az oldatok vezetőképességeinek azonos értékeit [18, 26].

2.1.2 Indirekt UV detektálás

Indirekt UV detektálásnál a pufferhez adott, UV tartományban elnyelő ionok egy meghatározott abszorbanciájú háttérjelet állítanak elő. A mintaionok a puffer ionjainak kiszorításával a háttérabszorbanciát csökkentik, így egy negatív csúcs keletkezik. Az elektroneutralitás megmaradása érdekében az elektrolitban a töltéskicserélődés a mintaionok és az abszorbeáló pufferanyag közötti töltéssűrűségnek megfelelően történik [27]. Ha például a pufferanyag egyszeres, a minta részecske pedig kétszeres töltésű, akkor közelítéssel az igaz, hogy a minta minden egyes részecskéje a háttérelektrolit két molekuláját cseréli ki, tehát a kapott jel arányos az elektrolit és a mintaionok közötti töltésaránnyal.

A c_X koncentrációjú vizsgálandó ion jelenléte következtében a háttérelektrolit UVaktív ionja (B) koncentrációjának megváltozása (Δc_B) a következőképpen adható meg:

$$\Delta c_{\rm B} = - \, \mathrm{TR} \, c_{\rm X} \tag{7}$$

A TR egy olyan úgynevezett átviteli arány (transfer ratio), mely a Kohlrauschtörvény és az elektroneutralitás elvéből vezethető le. A Kohlrausch-féle szabályozó funkció szerint:

$$\omega = \sum_{i} \frac{c_{i} z_{i}}{\mu_{i}} = konst.$$
(8)

ahol c_i , z_i és μ_i az adott rendszerben található ionok koncentrációját, töltésének és effektív mozgékonyságának abszolút értékeit jelenti. Ezen elv szerint ω a kapilláris minden egyes részében konstans. Az elektroneutralitás elve az anionos komponensek és a kationos komponensek effektív töltéseinek egyenlőségét jelenti, ahol c_a és c_k az anionok és a kationok koncentrációja, a z_a és z_k pedig az anionok és a kationok töltéseinek abszolút értéke:

$$\sum_{a} c_a z_a = \sum_{k} c_k z_k \tag{9}$$

Mindezek alapján nyilvánvaló, hogy az adott ionra érvényes TR az összes résztvevő ion mozgékonyságától függ, beleértve a háttérelektrolit ellenionjainak mozgékonyságát (μ_{ellen}) is [28]:

$$TR = \frac{\mu_B}{\mu_x} \cdot \frac{\mu_x - \mu_{ellen}}{\mu_{ellen} - \mu_B}$$
(10)

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

Ez a TR az egyszeresen töltött (teljesen disszociált) ionokra vonatkozik és a legegyszerűbb elektrolitokra (ahol csak 3 ion van jelen a kapillárisban) érvényes. A Kohlrausch-féle szabályozó funkció érvényessége a TR meghatározásában elméletileg és kísérletesen [29-33], illetve számítógépes szimulációval [34-36] is bizonyított.

A TR szükségszerű alkalmazásának azonban látszólag ellentmond az a megfigyelés, hogy például az alkáli- és alkáliföldfémek kalibrációs görbéi indirekt UV detektálás alkalmazásakor gyakorlatilag megegyeznek az egyszeres töltésű kationoknál, és ugyanígy a kétszeres töltésű kationoknál is, bár azok effektív mozgékonysága nagyban különbözik ($\mu_{Na+}=46,4 \text{ mm}^2/\text{kVs}$ és $\mu_{K+}=69,5 \text{ mm}^2/\text{kVs}$). Emellett a kétszeres vegyértékű kationok görbéjének meredeksége pontosan kétszerese az egyszeres vegyértékűek görbéinek meredekségének, míg az azonos vegyértékű ionok kalibrációs egyeneseinek meredeksége pontosan megegyezett [23]. Hasonló megállapításokat tettek a szervetlen anionok kalibrációs görbéire is [26]. Az elmélet és a gyakorlat közötti ezen ellentmondásra eddig még nem adtak egyértelmű magyarázatot.

2.1.3 Klinikai minták közvetlen vizsgálata

Számos cikk, összefoglaló közlemény [37-39] és szakkönyv [40, 41] bizonyítja, hogy a CE hatékonyan és előnyösen alkalmazható klinikai minták közvetlen elemzésére. A legtöbb vizsgálat természetesen a legkönnyebben hozzáférhető mintatípusokra (szérum, vizelet) irányult. A vér/szérum minták direkt injektálása esetén a legnagyobb nehézség abban rejlik, hogy a minta nagy mennyiségű fehérjét (~ 75 g/L plazma esetén) tartalmaz, melyek csúcsai zavarhatják (elfedhetik, torzíthatják) a meghatározandó komponensek csúcsait. Másrészt, a fehérjék neutrális vagy gyengén bázikus/savas körülmények között erősen adszorbeálódhatnak a kvarckapilláris felületére. A hagyományos módszerekkel végzett off-line mintaelőkészítési eljárások (pl. fehérjementesítés) a CE által nyújtott mikroanalitikai lehetőségeket korlátozhatják. A nagyobb térfogatban rendelkezésre álló mintáknál (pl. vér, vizelet) ugyan használhatók ezek az eljárások, de az egyes, kisebb térfogatban nyerhető mintatípusoknál (pl. tumor, könny, liquor) a különféle mintaelőkészítési procedúrák alkalmazásának több hátránya lehet, mint haszna [42, 43]. A mintaelőkészítési eljárások elhagyása érdekében a legegyszerűbb és gyakran használt megoldás az, ha SDS-t adagolunk a háttérelektrolitba. Az SDS erősen adszorbeálódik a fehérjék felületére nagy nettó negatív töltést kialakítva a fehérjén, emiatt a SDS-fehérje asszociátumok a vizsgálandó komponensek után jelennek meg az elektroferogramon. Bár többen MEKC módszer alkalmazásaként kezelik az SDS adalékolt elektrolitban történő elektroforézist [40], az ionos komponensek elválasztódása más komponensektől

Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

nem MEKC, hanem CZE elválasztási mechanizmus szerint történik. A biológiai mintákból történő fehérjementesítés végezhető acetonitrilnek a mintához adásával is, amikor dúsítási effektusok is elősegítik az érzékenyebb detektálást [44, 45]. Ismeretes a különböző bevonatos kapillárisok alkalmazása a fehérjék adszorpciójának csökkentése érdekében [46-48].

A klinikai minták közvetlen injektálásai esetén különösen fontos a mintaelemzések között a kapilláris felületének megfelelő öblítése, hogy a felületen erősen megkötődő fehérjét teljesen eltávolítsuk a következő CE elemzés megindítása előtt. A különböző mosási eljárásokat többen is vizsgálták, és különösen fontosnak találták a nagy koncentrációjú detergensek alkalmazását a szokásos savas vagy lúgos mosások mellett [40, 49]. Kunkel és munkatársai [50] ugyanakkor acetonitriles mosást javasoltak, mellyel 1-2% RSD-t (n=20) értek el 1 napon belül, illetve 3% RSD-t (n>80) több héten keresztül végezve a méréseket.

A nagy sótartalmú klinikai minták, mint például a vizelet elemzése esetén a csúcsalakok torzulásáról és a migrációs idők eltolódásáról számoltak be. Az ilyen klinikai minták közvetlen elemzéséhez nagy ionerősségű pufferek használata [51, 52], vagy szilárd fázisú extrakciós (SPE) sótartalom eltávolítás [40] javasolt. Egyes minták esetén, melyek nagy mennyiségben tartalmaznak kloridokat lehetőség van bizonyos komponensek tranziens izotachoforetikus dúsítására [53, 54].

Bár a CE módszerek klinikai vizsgálatokban történő alkalmazásuk során sok esetben kevésbé érzékenyek a HPLC-hez hasonlítva, a CE igen egyszerű alkalmazhatósága és a minimális mintaelőkészítési szükséglete mégis vonzóvá teheti más módszerekhez képest. A klinikai minták elemzésekor szükség esetén a detektálás érzékenységét jelentősen javítani lehet lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektálás alkalmazásával [55-57], nagy térfogatú minta dúsításával (LVSS-CE) [58, 59], vagy elektrokinetikus injektálással [60, 61].

A gyógyszervegyületek és metabolitjainak elemzésén kívül a kapilláris elektroforézis különböző módszerei (CZE, ACE, CCE) előnyösen alkalmazhatók az adott komponensek más vegyülethez való kötődésének vizsgálatára, optikai és más izomerek analízisére, vagy fizikai-kémiai paraméterei meghatározására [62].

2.2 Mikrocsip elektroforézis

A XXI. században a modern analitikai kémia, a genomika, proteomika rohamosan növekvő igényeinek megfelelően a miniatürizálás az elválasztástechnikák körében is egyre inkább teret hódít, mivel egyre kisebb térfogatú, ugyanakkor nagyszámú minta kis helyen történő, gyors analízisére van szükség. A mikrofluidikai csipek (lab-on-a-chip) kifejlesztése és analitikai alkalmazása 1990-től indult [63]. Ezeken a csipeken jelenleg a leggyakrabban alkalmazott elválasztástechnikai módszer az elektroforézis (mikrocsip elektroforézis).

2.2.1 A mikrofluidikai csipek előállítása

A mikrofluidikában használatos csipek mikrofabrikációs eljárásokkal készülnek. eljárások az elektronikai Ezek az iparban használatos szilíciumalapú technológiához kidolgozott módszereken, illetve azok mára továbbfejlesztett változatain alapulnak, melyekkel az 1 µm és 1 mm közötti mérettartományban készíthetünk különböző alakzatokat. A mikrofabrikálás egyik legfontosabb lépése a fotolitográfia, amikor egy hordozó felületére felvitt vékony, fényérzékeny réteget világítunk át egy maszkon keresztül. А fotolitográfiás módszereket csoportosíthatjuk aszerint, hogy milyen típusú sugár(fény)forrással történik a réteg megvilágítása (röntgen, elektron, foton). Bár a kisebb hullámhosszúságú sugárforrásokkal nagyobb mikrofabrikálási pontosság érhető el, a gyakorlatban leggyakrabban az optikai litográfiás (fotolitográfiás) módszerek használatosak, ahol 300-450 nm hullámhossztartományú fényforrást (pl. Hg-gőz lámpákat) használnak. A mikrofabrikálási eljárások között két csoportot különböztethetünk meg: a szilícium-, üveg- vagy kvarcalapú kemény technológiák és az elasztomereket, műanyagokat felhasználó lágy technikák csoportjait [64].

A kemény módszerek alkalmazása során a mikrocsipek alapjaként szilícium-, üvegvagy kvarclapkákat használnak. A csatornák mintázatának kialakítására maratási eljárásokat alkalmaznak. Míg a nedves maratás során folyadékfázisú kémiai anyagokkal kezelik a felület azon részeit, amelyeket nem fed (véd) maszk, addig a száraz maratás során a felületet gáz- vagy plazmafázisban lévő ionos részecskékkel támadják. A kimart alakzat a nedves maratáshoz hasonlóan itt is lehet izotróp vagy anizotróp. A kemény módszerek alkalmazásakor a mikrofabrikációs lépések lassúak, a felhasznált alapanyagok törékenyek és többnyire túl drágák ahhoz, hogy az elkészített mikrocsipek eldobhatóak legyenek. A kimart mikrofluidikai csatornák lezárásának legegyszerűbb formája az üveg/kvarc/szilíciumlapkák megfelelő összeolvasztása, de használnak UV fényre megkötő ragasztóanyagokat is.

A lágy technikák használatakor a mikrocsip anyagául speciális műanyagokat használnak [65]. A módszert, amely segítségével a polidimetilsziloxánból (PDMS) készült mikrofluidikai csipek kevesebb, mint 24 óra alatt elkészíthetőek, először

Cáspár 923: MT 4 doktori értekezés

Effenhauser [66] és Whitesides [67] kutatócsoportjai írták le. Az öntőforma ún. lágy litográfiás módszer segítségével készül: egy hordozó (általában szilícium) lap felületén először egy vékony réteget alakítanak ki fényérzékeny anyagból, majd erre helyezik rá a csatornák mintázatát tartalmazó litográfiás maszkot (a csatornamintázat átlátszó a fekete alapú maszkon), amit UV fénnyel besugároznak, majd a mintázatot "előhívják". Ezzel a litográfiás eljárással a maszk mintázata átvihető az öntőformára, az öntőforma pedig egy 3 lépésből álló eljárást használva alkalmas a PDMS csipek készítésére (1. ábra).





A csatornák lezárása során a műanyagot üvegre vagy műanyagra "ragasztják", amely történhet reverzibilisen [68] vagy irreverzibilisen [67]. Effenhauser és társai az elkészített PDMS csipeket ragasztás nélkül használták DNS fragmensek és más kis molekulák elválasztására [66, 68]. Az elkészült műanyag csipet egy vékony PDMS laphoz illesztették. A két felületet a közöttük létrejött erős hidrofób kölcsönhatások tartják össze. Ennek a módszernek az egyik fő előnye, hogy a már használt csipek újrahasználhatók. Az irreverzibilis ragasztás (sealing) többnyire oxigénplazmával való kezeléssel történik. Ez az eljárás jól használható a PDMS-ből készült csipek esetén, viszont nem alkalmazható a poli(metil-metakrilát)-ból, a poliimidből vagy polikarbonátból készült mikrofluidikai csipekhez [67, 69]. Jelenleg a PDMS-t használják kedvező fizikai tulajdonságai miatt legelterjedtebben a mikrofluidikai csipek alapanyagaként [70, 71]. Lézerablációval lehetőség van a mikrocsip közvetlen megmunkálására is, amikor egy intenzív lézersugár segítségével elszublimáltatják a műanyagot, így kialakítva a csatornák hálózatát. Ezzel a módszerrel a kívánt mintázatok néhány mikrométeres pontossággal alakíthatóak ki [72].

2.2.2 Mintainjektálási technikák

A 2.1.1 fejezetben részletesen tárgyaltuk a kapilláris elektroforézisnél leggyakrabban alkalmazott két mintainjektálási módszert, a hidrodinamikus és az elektrokinetikus módszereket. Mikrofluidikai csipeknél szinte kizárólagosan az elektrokinetikus (EK) injektálási módszert alkalmazzák [71, 73]. A kereskedelmi forgalomban megjelent, legjobban bevált mikrofluidikai csipekben (pl. 2100 Bioanalyzer, Agilent; LabChip GX-II, Perkin Elmer) is csak EK injektálás alkalmazására van lehetőség mintabeviteli opcióként. A bejuttatott minta térfogata jóval kisebb, mint a hagyományos CE-nél injektált mennyiség, mindössze pikoliternyi nagyságrendű. Az irodalomban leggyakrabban kétféle EK injektálási módszert használnak, a kiszakításos (pinched) [74, 75] és a kapuzott (gated) [76] injektálást. Mindkét módszernél a csatornák keresztalakú kereszteződése segítségével végzik az injektálást úgy, hogy a kereszt hosszabbik (szeparációs) csatornájának elejére juttatják a parányi mintadugót, majd ebben a csatornarészben kezdődik az elektroforetikus elválasztás.

Kiszakításos injektáláskor [74] először a rövidebb csatornavégekre kapcsolnak feszültséget, míg az egyik csatornavég portjánál levő mintaoldatból a másik csatornavég (másik elektród) felé áramló minta teljesen kitölti a két rövid csatornát. Ezt követően a hosszabb, szeparációs csatorna végeire nagyobb feszültséget kapcsolnak, így a kereszteződésben lévő mintadugó a szeparációs csatorna felé mozog ("kiszakad") és megkezdődik a zónaelektroforetikus elválasztás. A kiszakításos injektálás hátránya, hogy a csatorna kereszteződésében a kis mintadugó körül sok esetben szivárgás (leaking) lép fel különböző diffúziós és konvektív jelenségek miatt [77-79]. Ez a szivárgás elhúzódó végű (ún. tailinges) csúcsokat eredményez az elektroferogramon [80]. A szivárgás úgy csökkenthető, hogy két szomszédos csatornából puffert áramoltatnak, segítve a mintadugó kialakulását és az utánfolyás megszüntetését.

A kapuzott injektálásnál a mintabeviteli csatornára és az arra merőleges, pufferrel töltött szeparációs csatornára egyszerre kapcsolnak feszültséget. A csatornák kereszteződésénél az áramoltatott puffer "megszakítja" egy rövid időre a minta áramlását, ezáltal kis mintadugó keletkezik, amely továbbhalad a szeparációs csatornában.

Az EK injektálással viszonylag jó reprodukálhatóság érhető el, Effenhauser kísérleteiben a migrációs idők szórásai 0,1 RSD%, a csúcsterületek szórásai pedig 2 RSD% körül voltak [81]. Az elektrokinetikus injektálási módszerek hátránya

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

azonban, hogy az injektálásra hatással vannak a mintában levő eltérő elektroforetikus mozgékonyságú egyéb komponensek, mátrixanyagok (lásd 2.1.1 fejezet). A kvantitatív meghatározásoknál jelentkező problémák kiküszöbölhetők, ha az EK helyett nyomás alkalmazásán alapuló hidrodinamikus injektálást használnak.

Az irodalomban csak kevés mikrocsipekben alkalmazott hidrodinamikus injektálási módszert közöltek, amelyek ráadásul viszonylag bonyolult műszerezettséget igényelnek [82, 83]. Solignac és mtsai. [84] egy olyan rendszert állítottak össze, melyben mechanikus eszközzel gyakoroltak nyomást a mintatartó edénykében lévő membránra. Mások a mintabevitelt egy szeleppel ellátott kettős fecskendő pumpával [85], vagy egy beépített diafragma pumpával [86] hajtották végre. E komplikált berendezések/eljárások alkalmazásakor azonban elveszíthetjük a mikrocsipek olyan vonzó sajátságait, mint az egyszerű és olcsó kialakíthatóságot, vagy az egyszer használatos, eldobható jelleget.

2.2.3 Zónaelektroforetikus elválasztások mikrocsipben

Elektroforetikus elválasztásokat mikrofluidikai csipekben elvileg nagyon hatékonyan lehet végrehajtani, mert a csipekben jó a hődisszipáció és nagyon kicsiny (rövid) mintadugót lehet reprodukálhatóan beinjektálni. A rövidebb szeparációs csatornára kapcsolt viszonylag nagy elektromos térerő miatt gyors elválasztásokhoz juthatunk. A mikrocsipben ráadásul megvan a párhuzamos vagy egymást követő sorozatmérések végrehajtásának lehetősége minimális minta- és reagensfelhasználás mellett.

Legalább hat tényező (a mintainjektálás, (σ_{inj}^2) ; a mikrocsipen való detektálás, (σ_{det}^2) ; a molekuláris diffúzió, (σ_{dif}^2) ; a csatorna görbületének geometriája, (σ_{turn}^2) ; Joule-hő képződés, (σ_{joul}^2) ; felületi adszorpció, (σ_{ads}^2)) okozta zónaszélesedés járul hozzá a teljes csúcsszélesedéshez (σ^2) a mikrocsip elektroforézis esetén [87]. Ezek a tényezők ismeretesek a kapilláris elektroforézis gyakorlatából: a mintainjektálás, a mikrocsipen történő detektálás (detektorcella) és a molekuláris diffúzióból származó szórásnégyzetek hozzájárulását a tányérmagassághoz ugyanúgy kell számolni, mint kapilláris elektroforézisnél:

$$\sigma^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{dif}^2 + \sigma_{turn}^2 + \sigma_{joul}^2 + \sigma_{ads}^2$$
(11)

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{l_{inj}^2}{12}; \ \sigma_{det}^2 = \frac{l_{det}^2}{12}; \ \sigma_{dif}^2 = 2Dt,$$
(12)

ahol l_{inj} és l_{det} a kezdeti mintadugó hossza és a mikrocsipbeli detektorcella hossza, D a diffúziós koefficiens és t az elválasztás ideje. Az első mikrofluidikai csipen történő zónaelektroforetikus elválasztást Harrison és mtsai. [88] végezték el, akik kalcein (egy fluoreszcein származék) és fluoreszcein keverékét választották el egymástól. Később kevesebb, mint 15 s alatt sikerrel határoztak meg hat, fluoreszceinnel jelzett aminosavat, melyeket lézer-indukált fluoreszcenciás (LIF) módszerrel detektáltak. Az üvegből készült mikrocsip csatornájának mélysége 10 µm, a szélessége 30 µm volt [89]. Néhány évvel ezt követően pedig Jacobson és mtsai. [90] Rodamin B és diklórfluoreszcein elektroforetikus elválasztását hajtották végre 200 µm szeparációs távolságon, 0,8 ms időtartam alatt.

Már az első mikrocsip alapú elektroforetikus elválasztások végrehajtása során azt tapasztalták, hogy az elválasztás sikeres megvalósításához szükséges lehet a mikrofluidikai csipek felületének megfelelő detergensekkel történő módosítása. A PDMS hidrofób sajátságú, emiatt képes adszorbeálni a legtöbb biopolimert, kisméretű hidrofób molekulákat. Sokféle felületaktív anyagot vizsgáltak, hogy milyen hatást gyakorolnak a mikrocsipben kialakuló EOF-re, így a töltés nélküli n-dodecil-β-D-maltozidot [91], a TWEEN-20-at, a kationos felületaktív anyagok közül a CTAB-t (cetil-trimetil-ammónium-bromid) és DDAB-t (didodecil-dimetil-ammónium-bromid) [92] vagy a hidrofób kopolimert, a PSMA-t (poli(sztirol-maleinsavanhidrid)) is [93]. A legismertebb anionos detergens, az SDS (nátrium-dodecil-szulfát) alkalmazásával aminosavakat, fehérjéket lehetett szétválasztani egymástól [94, 95]. A PDMS felületére pozitív töltésű aminodextránt adszorbeáltatva stabil EOF alakult ki, és emellett a fehérjék adszorpciójának csökkenését is megfigyelték [96].

A PDMS hibrofób felülete UV besugárzás, HCl-H₂O₂ elegybe mártás vagy levegő plazmával történő kezeléssel hidrofillé tehető, melynek során aktív szilanol csoportok keletkeznek és így lehetővé válik különböző hidrofil polimerek megkötése a PDMS felületén [97, 98]. Lin és mtsai. [99] epoxigyantával módosított hidrofil polimereket adszorbeáltattak az oxidált PDMS felületére. A keletkezett bevonat nagyon stabilnak bizonyult, a mikrocsipekben DNS fragmenseket és fehérjéket lehetett nagy hatékonysággal elválasztani.

Az első kereskedelmi forgalomban is elérhető lab-on-a-chip rendszerek, melyek fehérjék méret szerinti elválasztását valósították meg, 2002-ben jelentek meg a piacon [100, 101]. A fehérje komponensek mikrocsipben történő festési és festékmentesítési (SDS hígítási) eljárásai 0,1 s-nál rövidebbek, azaz 10⁴-szer gyorsabb, mint a klasszikus SDS-PAGE [100].

A megfelelően érzékeny detektálás megvalósítása jelenleg még a kapilláris elektroforézisnél is kihívásnak számít a kutatók számára, de a mikrocsipben az elválasztást követően kapott pikoliter nagyságrendű mintazóna-térfogatok érzékeny, univerzális detektálása különösen nehéz feladat. Jelenleg a hullámvezetők vagy száloptika segítségével történő lézer indukált fluoreszcens

detektálást [102, 103], az elektrokémiai detektálást [104, 105] vagy a speciális interfészt alkalmazó MS detektást [106, 107] tartják a legígéretesebb detektoroknak.

2.2.4 Kromatográfiás töltetek kialakítása és elektrokromatográfiás elválasztások mikrocsipben

A leggyakrabban alkalmazott kromatográfiás módszer a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, amikor a mintát nagy nyomáson a mozgófázissal nyomják át az állófázison. A kromatográfiás körülmények megfelelő megválasztásával sokféle vegyületcsalád elválasztására, azonosítására és mennyiségi meghatározására mód van. Az állófázis többnyire gömb alakú részecskékből áll, de elterjedten használnak porózus monolitból készült kolonnákat is [108, 109].

A kapilláris elektrokromatográfia (CEC) a kapilláris elektroforézis egyik olyan módszere, ahol az elválasztás a komponensek és az állófázis közötti kromatográfiás kölcsönhatásokon, illetve a komponensek különböző elektroforetikus viselkedésén alapszik [11, 22]. A CEC módszernél a kereskedelemben is rendelkezésre álló, töltött kapillárisokat alkalmaznak, a töltet anyagai általában a HPLC-nél is használt állófázisok. A feszültség hatására elektroozmotikus áramlás indul meg a kapillárisban. Ez az elektroozmotikus áramlás szállítja a komponenseket. Az elválasztandó minta komponensei különböző erősséggel lépnek kölcsönhatásba az állófázissal, így eltérő idők alatt jutnak át a tölteten. A feszültséggel történő áramoltatás miatt egyenes (lapos) sebességprofil alakul ki, amely csökkenti a csúcsszélesedést és nagyobb elválasztási hatékonyságot eredményez [22]. Az elválasztás szelektivitása az álló- és a mozgófázis közötti megoszlástól, illetve a komponensek elektroforetikus sajátságaitól függ. A CEC egyik lényeges előnye a HPLC-vel szemben, hogy rövidebb analízis idő mellett is nagyobb elválasztási hatékonyság érhető el.

Bár nyilvánvalóan nagy igény mutatkozik a miniatürizált folyadékkromatográfiás technikák iránt, jelenleg még csak kevés mikrocsip alapú kromatográfiás rendszert fejlesztettek ki. Ennek legfőbb okai technikai problémákban, a mikroszkópikus méretű töltetek kialakításának, illetve a töltetnek a mikrocsatornában való megfelelő rögzítésének nehézségeiben rejlenek [110, 111].

Érdekes kísérletet írt le Regnier a kromatográfiás kölcsönhatásokon alapuló elválasztások alkalmazására nyitott csatornarendszerű mikrocsipben, amikor egy ún. összerendezett monolitikus állófázis-mintázat (incollocated monolithic stationary phase support systems (COMOSS)) tervezésével és kvarclapon való kialakításával a hagyományos kromatográfiás tölteteket "utánozta le" [111]. (A mikrocsip tényleges kromatográfiás részecskéket nem tartalmazott, így e mikrocsipekben minimális hidrodinamikai ellenállás mellett tudott CEC

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

elválasztásokat elvégezni. Természetesen nagyobb mintakapacitást és jobb elválasztási hatékonyságot lehet elérni, ha nagyobb fajlagos felületű kromatográfiás részecskéket töltenek a mikrocsip csatornájába.

Manz és társai írták le először egy folyadékkromatográfiás kolonna szilícium csipbe való integrálását, amikor is 5 µm-es C8-as részecskéket tartottak vissza egy oszlopban frit alkalmazásával [112]. A frit használatának több hátrányos tulajdonsága is van: a csip előállítása komplikáltabb és a frit egyfajta katalizátorként szolgál a csatornában a buborékok képződéséhez.

Hjertén és mtsai. kimutatták, hogy a töltési eljárások nehézségei kiküszöbölhetőek, ha egy folytonos polimerágyat hozunk létre a monomer töltetanyagnak *in situ* csatornába polimerizáltatásával [113]. A kis viszkozitású monomer oldat könnyen bejuttatható a csatornába, ahol megtörténik a polimerizáció, így a töltet kialakításához nincs szükség fritre.

Sato és mtsai. fritszerű anyagot használtak a mikrocsatornában, hogy a töltet részecskéit megállítsák, az így kialakított töltet felületén pedig immunpróbát végeztek [114]. Egy másik közleményben egy olyan új eljárásról olvashatunk, ahol a kapilláris elektrokromatográfiához a kapilláris hagyományos, szemcsés állófázisokkal történő töltéséhez nem volt szükség a részecskék frittel történő eltorlaszolására, hanem a kapilláris elszűkítésével érték el az állófázis részecskéinek visszatartását [115]. A 3 µm-es átmérőjű részecskék töltését vákuumban végezték el és a töltetet hőkezeléssel stabilizálták.

A kromatográfiás tölteteknek mikrocsipben való kialakítására néhány éve elegáns megoldást mutatott be az Agilent cég [116, 117] a tömegspektrométerhez illesztett HPLC-chip rendszer (1260 Infinity HPLC-Chip/MS) bevezetésével. Ez a mikrofluidikai HPLC-chip hatékonyan integrál egy dúsító előtöltetet, analitikai szeparációs töltetet, kapillárisok csatlakozó portjait és egy nanospray emittert. A rendszer hatékonyságát számos ismert alkalmazás bizonyítja. Sajnos e több poliimidrétegből álló mikrocsip high-tech megmunkálásának eljárásai (nagy pontosságú lézerabláció, frit kialakítása speciális mikrofabrikációs eljárással) [118] a kutatók számára nem elérhetők.

3. Célkitűzés

Az előzőekben bemutatott irodalmi összefoglalóból is kitűnik, hogy a kapilláris elektroforézis mára már egy viszonylag jól kidolgozott módszerré vált, ezért a kutatások jórészt speciális analitikai meghatározások vagy újfajta kiértékelési módszerek kidolgozására irányulnak. Az alig húsz éve megszületett analitikai mikrofluidika területén viszont még számos alapvető probléma (pl. érzékeny univerzális detektálás, a komplett mérőrendszer miniatürizálása, injektálási nehézségek, a megfelelő elemzési reprodukálhatóság biztosítása) gátolja a mikrocsipek széleskörű, rutinszerű analitikai használatát, emiatt hónapról hónapra újabb és újabb érdekes, analitikai alkalmazhatóságát tekintve ígéretes jelenségekről és módszerekről jelennek meg közlemények. Leegyszerűsítve az állítható, hogy míg az analitikai kutatások a CE-nél az új alkalmazásokra, addig a mikrofluidika területén a technikai fejlesztésekre, az újfajta analitikai lehetőségek feltárására irányulnak.

Mindezek alapján a következő főbb célokat fogalmaztam meg az elmúlt 15 évben munkám során:

- a kis vezetőképességű minták érzékeny kapilláris elektroforetikus elemzéseit lehetővé tevő elektrokinetikus injektálás alkalmazása esetén olyan kiértékelő eljárások kidolgozása, mellyel az ionos komponensek mennyiségi meghatározásainak hibái csökkenthetők;
- a mikrocsipben végrehajtandó elektroforetikus elválasztásokhoz nanoliternél is kisebb térfogatú minták reprodukálható, injektálási hibáktól mentes bejuttatására egyszerű hidrodinamikus injektálási eljárás kidolgozása;
- olyan kapilláris elektroforetikus módszerek kidolgozása, melyek ezzel a módszerrel eddig nem vizsgált szervetlen komponensek vagy gyógyszervegyületek elválasztására vagy speciális mintatípusokból történő közvetlen elemzésére irányulnak;
- miniatürizált kapilláris rendszerek kifejlesztése elektroforetikus elválasztásokhoz;
- új detektálási lehetőségek alkalmazhatóságának tanulmányozása;
- kromatográfiás töltetek kialakítása mikrocsipekben, és azok alkalmazása folyadékkromatográfiás és elektrokromatográfiás elválasztásokhoz.

4. Alkalmazott készülékek és módszerek

4.1 Készülékek

Kísérleteinkhez HP ^{3D}CE és 7100 CE (Agilent) kapilláris elektroforézis készülékeket használtunk. A mintákat elektrokinetikus vagy hidrodinamikus injektálással (100 mbars) juttattuk a kapilláris anódos végébe. Az elválasztáshoz többnyire 64,5 cm (effektív hossz: 56 cm) hosszú, 50 μm belső átmérőjű poliimid külső bevonatú kvarckapillárist (Polymicro Technology) használtunk. A detektálás spektrofotometriásan történt, és a diódasoros detektor alkalmazása miatt lehetőség volt 195-600 nm között spektrum felvételére is. Az elektroferogramokat ChemStation 7.01 programmal (Agilent) értékeltük ki. A klinikai minták elemzése során a készülék mintatartóját +15°C-on termosztáltuk (Julabo F12).

Egyes klinikai mintákat (sputum, tumor) -18°C-on vákuumban 12 órán keresztül liofilizáltuk (Lyovac GT2, Leybold).

A potenciometriás titrálásokat egy Radiometer pHM 93 készülékkel végeztük, melyhez egy Metrohm kombinált üvegelektród (típus: 6.0234.100) és egy Metrohm 715 Dosimat büretta tartozik.

A felületi plazmon rezonancia (SPR) méréseket 2-csatornás érzékelővel és 670 nmes lézerdiódával ellátott BI-3000 SPR készülékkel (Biosensing Instrument Inc., Tempe, AZ, USA) végeztük. Az SPR szenzorlapkát (50 nm vastagságú aranyfilmmel bevont üveglapka, Biosensing Instrument Inc.) egyes vizsgálatainkhoz vékony PDMS réteggel vontuk be. A 200 µL térfogatú mintaoldatokat 60 µL/perc sebességgel fecskendőpumpa segítségével juttattuk a detektorcellába. Más esetekben saját fejlesztésű, nagyon kis térfogatú, PDMS-ből készült detektorcellát alkalmaztunk.

A mikrocsip csatornáiban a folyadékokat perisztaltikus pumpa (IPC, Ismatec) 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), illetve kép/videó rögzítő és feldolgozó szoftvert (AxioVision 4.6.3, Zeiss) használtunk. A mikroszkóp kamerájával és a szoftverbe épített modullal a mikrocsip csatornájának egy adott pontján a színintenzitás-változásokat időben detektálva felvehettük színes komponensek elektroferogramjait/kromatogramjait. A mikrofluidikai csipeken a kromatográfiás töltet kialakítását, és a hidrodinamikus mintainjektálást perisztaltikus pumpa (IPC, Ismatec) segítségével végeztük. A mikrocsipen való elektroforézishez nagyfeszültségű tápegységeket (0,5-2,5 kV, Microply-30, Cetox Kft., illetve 10-30 kV: Spellman, Ithaka, NY, USA) használtunk.

A mikrocsipen, illetve a kvarckapillárison a detektálást száloptikás UV spektrofotométerrel (Avaspec-2048-2, Avantes, Hollandia) közvetlenül a csatorna/kapilláris falán keresztül végeztük.

4.2 Mikrofluidikai csipek készítése

A PDMS csip készítéséhez az ún. lágy litográfiás technikát [67] használtunk. A mikrocsip 50-100 µm széles csatornáinak mintázatát AutoCAD szoftver segítségével rajzoltuk meg. A csatornarendszer hossza és alakja többféle volt (kereszt alakú mintázat egyenes, illetve szerpentines szeparációs csatornával, sokcsatornás rendszerek). A csatornamintázatot nagyfelbontással (5 000 dpi, Képpont Kft. Debrecen) egy átlátszó fóliára (fotolitográfiás maszk) nyomtattuk. A szilícium lapkára (Silicon Quest, Santa Clara, CA) 35 µm vastag fényérzékeny réteget (SU-8 2025 negatív-típusú fotoreziszt, Microchem, Newton, MA) vittünk fel spincoater segítségével (3000 fordulat/perc), amit ezt követően 15 percre 95°Cos kemencébe (Memmert) tettünk. A fotográfiás maszkot ezután a szilíciumlapon megszilárdult bevonatra helyeztük, majd a réteget UV fénnyel (365 nm) 2 percen át besugároztuk a maszkon keresztül. A besugárzott lapot 5 percre 95°C-os kemencébe helveztük, ezután SU-8 előhívószerrel (Microchem, Newton, MA) a nem besugárzott részeken található fotorezisztet eltávolítottuk, így megkaptuk a kész öntőformát. A PDMS oligomert és a térhálósító adalékot (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI) 10:1 arányban összekevertük, és vákuum segítségével gázmentesítettük. Ezt a keveréket az öntőformára öntöttük, majd egy órára 65°C-os kemencébe tettük, ahol megkeményedett. A kész PDMS réteget óvatosan lehúztuk a szilícium lapról, megkapva az öntőforma lenyomatát a PDMS felületén. Ezt a PDMS darabot megfelelő méretre vágtuk, és a csatornák végeinél lyukasztással kialakítottuk a 300 µm átmérőjű portokat, ahová pumpacsöveket vagy elektródokat csatlakoztathattunk. A mintázatot tartalmazó PDMS darab és az üveglapka megfelelő felületeit 2 percig kisnyomású, nagyfrekvenciás térben, levegő plazmában (PDC-32G, Harrick) történő aktiválás után egymásra helyeztük, melyek így pillanatokon belül irreverzibilisen egymáshoz kötődtek.



2. ábra. Mikrocsipek előállításához készített öntőforma, melynél a nagyon sima Si lapka síkjából 35 μm magasságban emelkedik ki a csatornamintázat (baloldali fotó) és az elekroforetikus elválasztásokhoz alkalmas, egy üveglaphoz irreverzibilisen kötött PDMS mikrocsip (jobboldali fotó).

5. Eredmények és diszkusszió

5.1 Elektroforetikus elválasztások kapillárisban

5.1.1 Elektrokinetikus injektálás alkalmazásának lehetőségei és korlátai kapilláris zónaelektroforézisnél [I, II]

Elektrokinetikus injektáláskor a minta komponensei az elektroozmózis és az elektroforézis együttes hatásával jutnak be a kapillárisba, következésképpen a meghatározandó ion beinjektált mennyisége függ az ion mozgékonyságtól (ha együtt vándorol az EOF-fel, akkor nagyobb mennyiségben jut be). Ha például a meghatározandó mintában ugyanolyan koncentrációban vannak jelen az eltérő mozgékonyságú ionok, akkor azok különböző mennyiségben fognak bejutni a kapillárisba, aminek a következtében eltérő csúcs nagyságokat kapunk. Külső kalibráció esetén csak akkor nem jelentkeznek problémák a mennyiségi meghatározáskor, ha a minták vezetőképessége megegyezik (bár nyilvánvalóan a reális mintáké általában különbözik). Mivel a meghatározandó minta koncentrációjának meghatározásakor kapott jel nagysága függ a minták és a háttérelektrolit vezetőképességének kapcsolatától, az EK injektálás miatt fellépő különböző mátrixhatás nem küszöbölhető ki a szokásos kalibrációs módszerekkel.

A mintaoldat vezetőképessége gyakorlatilag nem befolyásolja az EOF-t (mivel elektrokinetikus injektáláskor a kapilláris szinte teljesen meg van töltve a háttérelektrolittal), viszont az ion vándorlása (az injektálás során) függ a minta vezetőképességétől. A beinjektált *a* komponens n_a teljes mennyisége a következőképpen adható meg [23]:

$$n_a = \frac{1}{4}\pi d^2 \left(\mu_{EOF} \pm \frac{k_{BGE}}{k_s} \mu_a\right) \frac{U_{inj}}{L} t_{inj} c_a$$
(13)

ahol a d a kapilláris átmérője, a μ_{EOF} az EOF mozgékonysága, a μ_a meghatározandó komponens mozgékonysága, U_{inj} az injektáláshoz használt feszültség, L a kapilláris teljes hossza, t_{inj} az injektálás ideje, c_a a meghatározandó komponens moláris koncentrációja, k_{BGE} és k_s a háttérelektrolit (BGE) és a minta oldat vezetőképessége. A komponens és az EOF mozgékonysága meghatározható a komponens és egy töltés nélküli anyag (t_{EOF}) migrációs ideje ismeretében:

$$\mu_{EOF} = \frac{L_{eff}L}{Ut_{EOF}} \qquad \text{és} \qquad \mu_a = \frac{L_{eff}L}{Ut_a} \qquad (14)$$

ahol az U az alkalmazott feszültség és Leff a kapilláris effektív hossza.

Ha az így kifejezett mozgékonyságokat a (13) egyenletbe helyettesítjük be, akkor

$$n_a = \left[\frac{1}{t_{EOF}} \pm \frac{k_{BGE}}{k_s} \left(\frac{1}{t_a} - \frac{1}{t_{EOF}}\right)\right] \frac{U_{inj} t_{inj} L_{eff} \pi d^2}{4U} c_a$$
(15)

Munkánk során azt tapasztaltuk, hogy míg a hidrodinamikus injektáláskor a kapott jelek intenzitása lineáris kapcsolatban vannak a meghatározandó komponensek koncentrációjával (10-100 µM) (3.a ábra), addig az elektrokinetikus injektáláskor egy nagyon rövid kezdeti lineáris szakasz után kapott kalibrációs görbe hirtelen a vízszintes tengely felé görbül (3.b ábra). A görbülés oka valószínűleg az, hogy a standardok koncentrációjának növekedésével az oldat összes-ion tartalma egyre nagyobb lesz. egyre összehasonlíthatóbbá válik а háttérelektrolit és vezetőképességével. A 15 µM koncentrációjú standardokat tartalmazó minta vezetőképessége körülbelül 1%-a a háttérelektrolit vezetőképességének. Ahogy a mintaoldatok vezetőképessége egyre nagyobb lesz, kisebb és kisebb mennyiségben jutnak be a meghatározandó komponensek a kapillárisba (lásd (15) egyenlet). Amíg egy minta összes-ion koncentrációja kisebb, mint kb. 50 µM az oldatot nagyon híg (kvázi végtelen híg) oldatnak tekinthetjük, amely speciális fizikai-kémiai jellemzőkkel bír. Ha megnöveljük a mintaoldataink vezetőképességét azáltal, hogy konstans mennyiségben adagolunk az oldatokhoz sót (pl. 2 mM nátriumkarbonátot), akkor megfelelő linearitású kalibrációs diagramokat kapunk ($R^2 >$ 0,99), ugyanakkor meghatározásaink érzékenysége jelentősen romlik (3.c. ábra).

Az is megfigyelhető a 3. ábra diagramjain, hogy az összes egyenes meredeksége követi a meghatározandó komponensek töltésszámát: a bromid, klorid, nitrit, nitrát ionokra kapott meredekségek gyakorlatilag a kísérleti hibán belül megegyeznek, a kétszeres töltésű szulfátion meredeksége pedig kétszerese az egyszeres töltésű ionokhoz képest.

Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés



3. ábra. A bromid (1), klorid (2), szulfát (3), nitrit (4), nitrát (5) és foszfát (6) kalibrációs diagramjai HD (a,), illetve EK (b, és c,) injektálást alkalmazva. (c) esetben a mintaoldatok 2 mM nátrium-karbonátot is tartalmaztak.

Körülmények: 64,5 cm×50 μ m I.D., BGE: 5 mM kromát, 0,2 mM CTAB, pH: 8,0, U: -25 kV, λ = 275 nm (indirekt UV), HD injektálás: 50 mbar 15 s, EK injektálás: -2,5 kV 15 s.

Mint azt már korábban említettem, lényeges eltéréseket kaphatunk a csúcsterületekben, ha HD vagy EK injektálásokat használunk a különböző koncentrációjú mátrixanyagot, de egyforma koncentrációjú mérendő komponenst tartalmazó mintaoldatok elemzésére. A 4. ábra illusztrálja a mintaoldat mátrixtartalmának (0-5 mM nitrát) hatását a 0,05 mM klorid EK, illetve HD

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

injektálásával történő elemzésére. A diagramból az is jól látszik, hogy a kis vezetőképességű minták EK injektálásakor nagyon érzékeny meghatározásokra nyílik lehetőség.



4. ábra. A 0,05 mM kloridion mintaoldat mátrixtartalmának (0-5 mM nitrát) hatása a EK, illetve HD injektálásával kapott jelnintenzitásokra. A körülmények ugyanazok, mint a 3. ábránál.

Abban az esetben, ha a mintaoldat vezetőképessége sokkal kisebb, mint a háttérelektrolité (5 mM kromát, 0,2 mM CTAB), a k_{BGE}/k_S nagyon naggyá válik, ezért a (15) egyenlet első tagja elhanyagolható lesz. A gyakorlatban ez az egyszerűsítés akkor érvényes, ha a BGE vezetőképessége legakább 100-szor nagyobb, mint a minta vezetőképessége ((16) egyenlet):

$$n_a = \frac{k_{BGE}}{k_s} \left(\frac{1}{t_a} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \frac{U_{inj} t_{inj} L_{eff} \pi d^2}{4U} c_a$$
(16)

Az n_a és a A_a csúcsterület egymással arányosak, az *S1* és *S2* mintaoldatokból injektált *a* komponens mennyiségei a következőképpen aránylanak egymáshoz:

$$\frac{A_{a,S1}}{A_{a,S2}} = \frac{n_{a,S1}}{n_{a,S2}} = \frac{k_{S2}}{k_{S1}} \frac{c_{a,S1}}{c_{a,S2}}$$
(17)

A (16) és (17) egyenletekből következik, hogy még a kis vezetőképességű mintákban is az injektált mennyiség függ a minta vezetőképességétől és az ebből eredő hiba (mátrix bias) nem elhanyagolható (ellentétben mások következtetéseivel [119]). A (17) egyenlet szerint külső kalibrálás csak akkor lehet megfelelő, ha egyaránt tekintetbe vesszük a minták és a külső standard oldatok vezetőképességeit.

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

Azonban, ha a (17) egyenletet próbáljuk meg alkalmazni a minták vezetőképességének mérésén keresztül, az elektroferogramokból megállapítható csúcsterület arányok ($A_{a,S1}/A_{a,S2}$) nagyban eltérnek a konduktométerrel mérhető vezetőképességek hányadosától ($k_{S2}c_{a,S1}/k_{S2}c_{a,S2}$). A probléma oka feltevésünk szerint a konduktométeres mérésekben keresendő. Mint ismeretes, az elektrolitok ionkoncentrációja széles tartományban egyenesen arányos a vezetőképességel. Nagyobb elektrolit koncentrációnál (<100 mM) azonban a vezetőképességi egyenes elhajlik az abszcissza felé, másrészt nagyon kis koncentrációnál (kvázi végtelen híg oldatban) egy kezdeti hiperbolikus szakasz figyelhető meg.

Az oldatok vezetőképességének konduktometriás meghatározásakor váltóáramot alkalmaznak, hogy elkerüljék az elektródok polarizációját és az elektrolízist. Megvizsgáltuk annak lehetőségét, vajon a vezetőképesség meghatározható-e a mintával töltött CE kapillárisban állandó feszültségen mért áramerősségen keresztül. Az elektromos vezető rendszer speciális geometriájának köszönhetően (kapilláris hosszának és keresztmetszetének aránya nagy, az ionáram az elektrolittartályok térfogatához képest nagyon kicsi) a polarizáció és az elektrolízis hatása a mért áramerősségre elhanyagolható. Az oldat összetétele (vagyis az oldattal töltött kapilláris Ra ellenállása) a kapillárisban állandónak tekinthető a feszültség alkalmazásának kezdeti (30-40 s) szakaszában. Ebben az időszakban (az első 1 s-ot leszámítva) az Ia áramerősség konstans. Azt találtuk, hogy a mért áramerősséget az elektrolit koncentráció függvényében ábrázolva nagyon hasonló görbét kaptunk, mint amit a konduktometriás vezetőképesség mérésével is, igazolva azt a várakozást, hogy ka és Ia között egyértelmű arányosságnak kell lennie (Ia =U/R_a). Az áramerősség-görbének is van egy hiperbolikus kezdeti szakasza, mint a vezetőképesség-görbének, de sokkal kisebb mértékben változik a koncentrációval. Amennyiben a megfelelő áramerősségek hányadosát használtuk a (17) egyenletben a konduktométerrel mért vezetőképességi értékek hányadosa helyett ((18) egyenlet), a kiszámolt $n_{a,S1}/n_{a,S2}$ értékek jól egyeztek az elektroferogramokból meghatározható A_{a,S1}/A_{a,S2} csúcsterületek arányával.

$$\frac{A_{a,S1}}{A_{a,S2}} = \frac{n_{a,S1}}{n_{a,S2}} = \frac{I_{S2}}{I_{S1}} \frac{c_{a,S1}}{c_{a,S2}}$$
(18)

Bár e tapasztalatra egyértelmű magyarázatot nem tudunk adni, valószínűleg arról van szó, hogy a CE kapillárisban mért áramerősségek aránya jobban leírja a mintaoldatok vezetőképességei közötti különbséget, mint a konduktométerrel mért vezetőképességi arányok.

Összehasonlítva a 3 külső kalibrációs eljárással kapott koncentrációkat, a valódi értékekkel leginkább egyező eredményt adó eljárás az volt, amely az áramerősség

Cáspár 9213: MT 4 doktori értekezés

arányokon alapult. Jelentősebb eltérést találtunk a valódi koncentráció értéktől, amikor az összes-ion koncentráció meghaladta a 150 μ M koncentrációt, mert ekkor a k_{BGE}/k_s nem lesz annyira nagy, hogy elhanyagolhassuk a (15) egyenlet első tagját. Az 5. ábrán a különböző külső kalibrációs eljárások alapján számolt koncentrációk eltéréseit ábrázoltuk 3 különböző komponens esetén. 130 μ M összes-ion koncentrációig az áramerősség arányok alapján számolt koncentrációk relatív hibája 3-4%-on belüli volt, ami elfogadhatónak számít kis koncentrációk CE meghatározásakor.

Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés



5. ábra. Különböző külső kalibrációs eljárások alapján számolt koncentrációk eltérései a valódi értékektől 3 különböző komponens esetén (a,: Br⁻; b,: Cl⁻; c,: SO₄²⁻).

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

A szervetlen komponensek kapilláris elektroforézissel történő meghatározása esetén az indirekt UV detektálás univerzális detektálási módszernek számít [120, 121]. Ha emellett EK injektálást is alkalmazunk, akkor mint azt korábban láttuk a hagyományos kalibrációs módszerek pontatlan eredményeket adnak, de ún. belső univerzális kalibrációs standardot alkalmazva egy egyszerű számítással helyes kvantitatív eredményekhez juthatunk. Ez a kalibrációs eljárás *belső* abban az értelemben, hogy a referencia komponenst közvetlenül a mérendő mintához adjuk, és egyúttal *univerzális* is, hiszen a mintában jelenlevő valamennyi komponens mennyisége meghatározható az egyetlen referencia komponens válaszjele alapján. Előnye az eljárásnak, hogy olyan komponensek mennyiségei is meghatározhatók, amelyek (minőségileg) nincsenek azonosítva.

E belső univerzális kalibrálás alkalmazásához megfelelő standardot (belső univerzális standard, IUS) kellett keresnünk. A belső standarddal szemben támasztott általános követelményeknek vizsgálataink szerint a tioszulfátion jól megfelel. A tioszulfát mozgékonyságának értéke közeli az általunk vizsgált anionok mozgékonyságának értékeihez és nagyobb, mint a leggyakrabban vizsgált ionok mozgékonysága. Az 1. táblázat az ismertebb szervetlen anionok effektív mozgékonysági adatait, pK és TR_{IUS}/TR_X értékeit tartalmazza. (Az irodalmi bevezető részben (2.1.2. fejezet) tárgyaltam a TR használatának fontosságát a teljesen disszociált anionok kvantitatív analízisénél EK injektálás esetén.)

Méréseink során megfelelő elválasztást értünk el: a tioszulfátion csúcsa jelent meg leghamarabb és teljesen elvált a többi komponens csúcsától. Fontos, hogy a mintaoldatok szokásos pH-ján a belső standard töltése jól definiált és állandó legyen. A tioszulfát ezt a követelményt is kielégíti, pH=2 felett töltése állandó és kétszeresen negatív.

A 6. ábra a tioszulfát és a többi vizsgált anion (klorid, bromid, szulfát, nitrit, nitrát elektrokinetikus és foszfát) hidrodinamikus és injektálással kapott elektroferogramjait mutatja be. Minden komponens azonos koncentrációjú (25 μM), és az elektrolit 10-es pH-ján a vizsgált anionok közül a bromid, klorid, nitrit és nitrát egyszeresen negatív, míg a tioszulfát, szulfát és foszfát kétszeresen negatív töltésű volt. Ezen a pH-n a reális mintákban a legtöbb anion teljesen disszociált állapotban van, kivéve azokat, melyek pK értéke 10 felett van (ilyen például a karbonát pK₂=10,2, a foszfát pK₃=12,7 vagy az arzenit pK₂=13,5). Első ránézésre a két elektroferogram nagyon hasonló, különbség a leginkább eltérő mozgékonyságú komponensek (például a tioszulfát és foszfát) csúcsterület arányában látható. Ez a különbség kisebb olyan komponensek esetén, melyeknek a mozgékonysága kevésbé eltérő.

	$\mu_{eff} (mm^2/kV^{\cdot}s)^*$	pK ₁	pK ₂	TR _{IUS} /TR _X
tioszulfát (IUS)	-76,903	0,6	1,72	
kromát (kromofor-ion)	-70,975	0,745	6,49	
kálium (ellen-ion)	+69,541			
Vizsgált anionok:				
bromid	-76,316	-2		0,995
klorid	-74,496	-2		0,983
szulfát	-72,365	-3	1,921	0,970
nitrit	-70,181	3,22		0,955
nitrát	-69,701	-1,37		0,952
foszfát	-53,239	2,16	7,21	0,820
Egyéb anionok:				
klorát	-62,878	-2,7		
klóracetát	-40,337	2,865		
klorit	-50,238	1,96		
cianid	-62,878	3,47		
fluorid	-53,622	3,173		
oxalát	-67,179	1,271		
perklorát	-65,571	-2		
permanganát	-59,412	-2		
perjodát	-52,752	1,55		
szalicilát	-32,232	3,107		
tiocianát	-64,321	0,848		
triklóracetát	-34,679	0,635		

 táblázat. A munkánk során vizsgált és egyéb anionok effektív mozgékonysága*, pK és TR_{IUS}/TR_x értéke. (Az adatokat a PeakMaster 5.1 segítségével számoltuk [34-36].)

*Az effektív mozgékonyságok a BGE elektrolitra vonatkoznak (pH:10, I=15 mM)



6. ábra. A tioszulfát és a vizsgált anionok elválasztása reális mintákban HD (a) és EK (b) injektálás esetén.

Injektálási paraméterek: HD injektálásnál 50 mbar·2s, EK injektálásnál -3 kV · 2 s. Csúcsok: tioszulfát (1), bromid (2), klorid (3), szulfát (4), nitrit (5), nitrát (6) és foszfát (7). Mindegyik anion 25 μ M koncentrációjú volt. A háttérelektrolit 5 mM kromátot és 0,2 mM CTAB-t tartalmazott és pH-ja 10 volt.

Mivel hidrodinamikus injektálás esetén a mintaoldatban azonos moláris koncentrációban jelenlevő komponensek azonos koncentrációban jutnak a kapillárisba, ekkor az azonos töltésű és töltésszámú komponensekre azonos csúcsmagasságokat kapunk (csak a lassú migrációjú zónák diszperziója okozhat némiképp kisebb csúcsmagasságot). Mivel a csúcsterületek az adott komponensek vándorlási sebességeitől is függenek (a kevésbé mozgékony ionok több időt töltenek a detektor cellában, ezzel nagyobb csúcsterületet eredményezve) és a csúcsterületek megváltozása lineáris összefüggésben van a migrációs időkkel, az azonkal korrigált csúcsterületeknek elvileg meg kell, egyezniük az azonos vegyértékű komponensek esetén. Tehát hidrodinamikus injektálás esetén a (7-10) egyenletek alapján az x komponens c_x koncentrációja az alábbi összefüggéssel számítható:

$$c_x = c_{IUS} \frac{A_x \cdot TR_{IUS} \cdot t_{IUS}}{A_{IUS} \cdot TR_x \cdot t_x} \cdot n_{X,IUS}$$
(19)

ahol c_{IUS} a belső univerzális standard koncentrációja, A_X és A_{IUS} a vizsgált és a standard ion csúcsterülete, t_x és t_{IUS} pedig a vizsgált és a standard ion migrációs ideje (hasonló megfontolások alapján a [122]-es hivatkozásban bemutatott egyenlet a tx és tIUS migrációs időket fordítottan szerepelteti és nem tartalmazza a TR paramétereket). Ha a vizsgált és a standard ion töltésének nagysága nem azonos, egy n faktort kell bevezetnünk, mely a vizsgált és a standard ion töltésének hányadosa. A munkánk során, az elektrolitunk 10-es pH-ján ez a hányados 1 (pl. a szulfátra) vagy 2 (pl. a kloridra). Ez a formula abban a koncentráció-tartományban érvényes, ahol lineáris az összefüggés a detektorjel és a koncentráció között, mely HD injektálás esetén széles koncentráció-tartományban igaz. HD injektálás esetén a kalibrációs egyenesek szabályos tendenciát mutatnak (a meredekségek széles koncentráció-tartományban megegyeznek az azonos töltésű ionok esetében). A csúcsterület és a koncentráció között széles koncentráció-tartományban lineáris összefüggés van, ezért a belső univerzális kalibrációs egyenes megfelelő a különböző komponensek mennyiségi meghatározására. HD injektálás esetén külső univerzális kalibrálás (a mintaoldat adott komponensére kapott detektorjelet vonatkoztatjuk az univerzális standard kalibrációs egyenesének pontjaira) is lehetséges, mivel a mintamátrix okozta zavaróhatások ("matrix bias" [17]) nem lépnek fel.

EK injektálás használatakor a komponensek mozgékonyságuktól (melyek a migrációs időkkel arányosak) függő koncentrációkban jutnak a kapillárisba. A nagyobb mozgékonyságú (kisebb migrációs idejű) komponensek nagyobb mennyiségben fognak a kapillárisba bejutni, de az EK injektálás éppen kompenzálhatja azt a csúcsterület változást, melyet detektor cellában a sebességbeli különbségek okoznak. Ugyanis, két különböző mozgékonyságú komponens esetén a nagyobb mozgékonyságú komponensből arányosan több jut be ($\Delta \mu_{X1, X2}$), de a komponensekre kapott jelterületek pontosan fordítottan lesznek arányosak a komponensek mozgékonyságaival $(1/\Delta\mu_{X1,X2})$, mivel a detektorablakban különböző sebességgel fognak elhaladni. Ez azonban csak akkor lehet igaz, ha a vizsgált ionok effektív mozgékonysága megegyezik a mintaedényben és a kapillárison belül. Az effektív mozgékonyság függ a pH-tól, a hőmérséklettől és az ionerősségtől. A vizsgált komponensek mérete és töltése 4-es pH felett változatlan (lásd a pK értékeket az 1. táblázatban) és a legtöbb CE készülékben mind a mintaedény, mind a kapilláris azonos hőmérsékletre van termosztálva (szobahőmérsékletre). Így a felmerülő legnagyobb probléma az IUS alkalmazhatóságával kapcsolatosan a minta és a BGE oldatok ionerősségeinek különbözősége.
Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés



7. ábra. A mintaoldat ionerőssége és a vizsgált anionok effektív mozgékonyságának - a háttérelektrolitban kapott effektív mozgékonysághoz képesti – százalékos eltérése. (A számításokat PeakMaster 5.1 programmal végeztük. A körülmények és a mintakomponensek megegyeznek a 6. ábrán megadottakkal.)

ábrán a mintaoldat ionerőssége és a vizsgált anionok effektív 7. А mozgékonyságának - a háttérelektrolitban kapott effektív mozgékonysághoz képesti - százalékos eltérése közötti kapcsolatot kívántuk bemutatni (a számításokat PeakMaster 5.1-el [34-36] végeztük). Látható, hogy az ionerősség nincs nagy hatással a teljesen disszociált egyszeres töltésű anionok mozgékonyságára. Ekkor a mozgékonyság változása nem haladja meg a 6%-ot az ionerősségnek a 0,1-100 mM tartományában történő megváltozása miatt. Ez az érték összhangban van Friedl és munkatársai [123] megállapításával, miszerint 1-10 mM között az egyszeres töltésű ionok mozgékonysága közel állandó marad. Megfigyelhető, hogy a hasonló mozgékonyságú azonos vegyértékű anionok (bromid, klorid, nitrit, nitrát, illetve a szulfát és tioszulfát) görbéje szinte teljesen fedi egymást. A többszörös töltésű ionok mozgékonysága az ionerősség növekedésével nagyobb mértékben csökken, mint az egyszeres töltésűek esetén. A vizsgált anionok esetén az egyszeres töltésű anionok effektív mozgékonysága nem számottevően különbözik (< 6%), de a többszörös töltésű anionoknál ez maximum 15-20% is lehet. Ugyanakkor az ionerősség változása miatt a TR hányados (amely az ionok effektív mozgékonyságait tartalmazza) megváltozása kisebb mértékű, mint az effektív

mozgékonyságok megváltozása. A TR_{IUS} (
$$TR_{IUS} = \frac{\mu_B}{\mu_{IUS}} \cdot \frac{\mu_{IUS} - \mu_{ellen}}{\mu_{ellen} - \mu_B}$$
, lásd (10)

Cáspár 9213: MT 4 doktori értekezés

egyenlet) gyakorlatilag nem függ az ionerősségtől, mert mind a háttérion (kromát), mind a belső univerzális standard (tioszulfát) teljesen disszociált kétszeres töltésű, hasonló mozgékonyságú ion ($\mu_{IUS} = -76,90 \text{ mm}^2/\text{kVs}$; $\mu_B = -70,97 \text{ mm}^2/\text{kVs}$). Az ionerősségnek nagyobb hatása lehet a TR_X-re ($TR_x = \frac{\mu_B}{\mu_x} \cdot \frac{\mu_x - \mu_{ellen}}{\mu_{ellen} - \mu_B}$, lásd (10) egyenlet) egyszeres töltésű ionok esetén, de az ionerősség változása hasonlóan hat a számlálóra és a nevezőre. Ezért a $\frac{TR_{IUS}}{TR_x}$ csak kissé függ az ionerősségtől. Ennek következtében EK injektálásnál (a (7)-(10) és (13) egyenleteket felhasználva) az x komponens c_x koncentrációja IUS használatával az alábbi összefüggéssel számítható:

$$c_x = c_{IUS} \frac{A_x}{A_{IUS}} \cdot \frac{TR_{IUS}}{TR_x} n_{X,IUS}$$
(20)

ahol n_{X,IUS} a vizsgált ion töltésének és a standard töltésének a hányadosa. (Ez azért igaz, mert a vizsgált ionjaink és a standard ionok is teljesen disszociáltak, így az n_{X,IUS} a vegyértékek arányának tekinthető.) A mi vizsgálataink során az n_{X,IUS} értéke pontosan egy (például a szulfátra) vagy kettő (például a kloridra). A $\frac{TR_{IUS}}{TR_x}$ értéke jó közelítéssel 1, mert a vizsgált anionok, az IUS, a háttér co-ion és az ellenion mozgékonysága viszonylag hasonló. A vizsgált és más anionos komponensek effektív mozgékonysága, pK értéke és $\frac{TR_{IUS}}{TR_x}$ értéke látható az 1. táblázatban (az értékeket a PeakMaster 5.1 [34-36] adatbázisából kaptuk meg vagy a szoftverrel számítottuk ki). Az 1. táblázat adatai szerint a vizsgált ionok $\frac{TR_{IUS}}{TR_x}$ hányadosainak eltérése 5%-on belüli, kivéve a foszfátot, mely sokkal lassabban migrál a többi anionhoz képest. Mindezek alapján, ha az x komponens teljesen disszociált, és az effektív mozgékonyságának az eltérése a BGE ion, az ellenion és az IUS effektív mozgékonyságától nem nagyobb, mint 10% (így a $\frac{TR_{IUS}}{TR_x}$ értékek 1-től való eltérése legfeljebb ±5%), akkor a 20. egyenlet a következőképpen egyszerűsödik:

$$c_x = c_{IUS} \frac{A_x}{A_{IUS}} \cdot n_{X,IUS}$$
(21)

(Hasonló egyszerűsítést tehetünk a (19) egyenlet esetén is HD injektáláskor.)

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

A (21) egyenlet érvényességét és alkalmazhatóságát tanulmányoztuk olyan minták elemzésével, melyek ismert mennyiségben tartalmazták a vizsgált anionokat mátrixanyagok nélkül (2. táblázat) és nagyobb mennyiségű mátrixanyaggal (3. táblázat). Mindegyik esetben a tioszulfátot használtuk belső univerzális standardként, de bármelyik vizsgált anion alkalmas lehetett volna erre a célra. A kapott eredmények bizonyítják, hogy a javasolt kalibrációs eljárás a (21) egyenlet alkalmazásával legfeljebb 5%-os eltérés ad az aktuális valós értékektől.

anion			
	Csúcsterület	Valós koncentráció	A (21) egyenlettel számított
		(µM)	koncentráció (µM)
tioszulfát*	3,271	240	-
bromid	0,674	100	98,0
klorid	2,681	400	393
szulfát	2,730	200	200
nitrit	2,641	400	387
nitrát	5,470	800	802
foszfát	1,443	100	106

2. táblázat. A (21) egyenlet alkalmazhatóságának vizsgálata ismert koncentrációjú a	nionok
esetén. Belső univerzális standardként (IUS) a tioszulfátot használtuk.	

* IUS

3. táblázat. A (21) egyenlet alkalmazhatóságának vizsgálata ismert koncentrációjú anionok esetén mátrixanyag-tartalommal. Belső standardként (IUS) a tioszulfátot használtuk. Minden komponens 25 μM koncentrációjú volt.

anionok	A (21) egyenlettel számított koncentráció* (µM)			
+ karbonát (µM) a mintában	0	1 000	10 000	
bromid	25,0	25,0	23,4	
klorid	24,1	23,9	24,1	
szulfát	23,7	27,1	27,6	
nitrit	23,4	24,7	26,3	
nitrát	23,1	25,1	27,6	
foszfát	24,5	28,1	-	

* IUS: 25 µM tioszulfát

5.1.2 Kapilláris elektroforézis alkalmazása szervetlen vegyületek meghatározására [III-IX]

Bár a CE egy viszonylag új módszer, mostanáig az egyatomos, kis méretű ionoktól a nagy molekulatömegű biomolekulákig sokféle anyag elválasztását leírták már, s azt is megállapították, hogy a CE kiválóan alkalmazható szervetlen vegyületek meghatározásához [23]. Mivel a töltéssel rendelkező részecskék elválasztásához a legegyszerűbb CE technika, a kapilláris zónaelektroforézis (CZE) alkalmazható különösen előnyösen, nem meglepő, hogy az ismertetett módszerek majd mindegyikénél ezt a technikát használják a szervetlen vegyületek meghatározásához.

A fémionok, kis méretű szervetlen anionok mozgékonysága általában nagy. A zónák direkt fényelnyeléses detektálása azonban sokszor nem alkalmazható, mivel ezen ionok többsége nem nyel el fényt az UV vagy a látható tartományban. Emiatt vagy indirekt fényelnyeléses detektálást vagy másfajta detektálási módszert (pl.: vezetőképességmérés, ICP-MS stb.) kell használni. A vízoldható szervetlen kationok, anionok és azok komplexei meghatározásának elsősorban az ivóvizek, illetve a környezeti, klinikai és ipari minták esetén van nagy jelentősége.

Az alkáli- és alkáliföldfém ionok vizes oldatbeli töltés-méret viszonya kellően különbözik ahhoz, hogy CZE módszerrel könnyen, gyorsan, a legegyszerűbb elektrolit rendszerben elválaszthatók legyenek. Gyakran imidazol tartalmú oldatot használnak háttérelektrolitként, az imidazol kis hullámhosszaknál való nagy elnyelése és megfelelő ionmozgékonysága miatt [22]. Az átmenetifém, ritkaföldfém ionok elválasztásakor általában komplexképzőket (pl. EDTA, tejsav) adagolnak az elemzendő mintához vagy a pufferelektrolithoz. A CZE-t a lantanoidák elválasztásához például előnyösebben lehet használni mint az ionkromatográfiát, mert jobb elválasztási hatékonyságot, csúcsfelbontást és rövidebb mérési időt lehet elérni. CZE-vel akár az összes lantanoidát el lehet választani, ami ionkromatográfiás módszerrel nehéz feladat [23]. A CZE-nél a mintaelőkészítés rendkívül egyszerű, környezeti minták esetén általában csupán a minta szűrésére van szükség az elemzést megelőzően. Míg a legtöbb elválasztástechnikai módszernél a biológiai minták analizálása sokkal összetettebb mintaelőkészítést (pl. fehérjementesítés) igényel, a CZE-nél lehetőség van ezen minták közvetlen injektálására/elemzésére is. (Egy 100-szoros hígítású vérminta fehérjetartalma még 0,7 g/L felett van, mely így még mindig jelentős mátrixkomponensnek számít a legtöbb vizsgáló módszer esetén. Mindemellett a fémionok nehézség nélkül meghatározhatók CZE-vel, mert mozgékonyságuk jóval nagyobb, mint a mátrixkomponenseknek, és így a fehérjék csak a fémionokat követően érik el a detektort.)

Cáspár 91213: MT4 doktori értekezés

5.1.2.1 Arzénvegyületek [III]

A CZE kiváló felbontóerejének köszönhetően jól használható *fémspeciációs* analitikai célokra, amikor is ugyanazon fém különböző formáinak meghatározása a cél [124]. Az irodalomban több szervetlen és szerves arzén vegyület zónaelektroforetikus elválasztását leírták [125, 126]. Az As(III) és As(V) gyors, két percen belüli elválasztását rövid (40 cm) kapilláris alkalmazásával, az EOF



8. ábra. As(III) és As(V) gyors CZE elválasztása.

Körülmények: l_{eff} = 40 cm, U= -30 kV, puffer: 50 mM borát, 0,5 mM CTAB, pH: 9,3, λ = 200 nm



9. ábra. 6 arzénvegyület CZE módszerrel kapott elektroferogramja.

A puffer és körülmények megegyeznek a 8. ábránál megadottakkal, de U= -20 kV, l_{eff} = 56 cm. minta: 2 mM As(III), As(V) és DMA (dimetil-arzénessav), 0,5 mM PAA (fenil-arzénessav), o-APA (o-aminofenil-arzénessav), és p-APA (p-aminofenil-arzénessav)

irányának megfordításával, borát pufferben értük el (8. ábra). A rendszer paramétereinek kisebb megváltoztatásával pedig lehetőség volt több szerves arzénvegyület meghatározására is (9. ábra).

5.1.2.2 Higanyvegyületek [IV, V]

higanyvegyületek Szervetlen és szerves zónaelektroforézissel történő elválasztásakor a fő probléma az, hogy a higanyvegyületek többnyire csak kevéssé disszociálnak, gyakorlatilag töltésnélküli vegyületek és UV tartományban is alig van elnyelésük. Mivel a CZE elválasztás a részecskék eltérő töltés/méret arányán alapul, a higanyvegyületeket töltéssel rendelkezővé és UV-ban elnyelő komponenssé kell alakítani, ami megfelelő vegyületképzéssel oldható meg [127, 128]. A származékképzéshez tiolcsoportot tartalmazó ionos anyagokat, így ciszteint, glutationt, 2-merkapto-nikotinsavat és merkapto-ecetsavat használtunk. 9,3-as pH-n valamennyi származékolt Hg-vegyület anionos (a cisztein, a glutation és a merkapto-nikotinsav izoelektromos pontjai: 6,2; 2,8 és 7,2). A négy vizsgált higanyvegyület különböző származékképzők segítségével végzett elválasztásakor kapott elektroferogramokat a 10. ábrán mutatjuk be. Valamennyi bemutatott elektroferogramon megfigyelhető a mintában szabad formában jelen levő származékképző is. Az eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált komplexképzők mindegyike megfelelő lehet a higanyvegyületek CZE elválasztásához, és csak viszonylag kis mértékű eltérések mutatkoztak az egyes komponensek kimutatási határaiban, a meghatározás időtartamában, illetve az elválasztás hatékonyságában. A különböző higanyvegyületek ciszteines komplexeire UV spektrofotometriás detektálással (λ = 200 nm) elérhető 1 µg/mL körüli kimutatási határok lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektálással akár 2-3 nagyságrenddel is javíthatók megfelelő származékképzés után (pl. fluoreszcein izotiocianát segítségével).

Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés



10. ábra. Higanyvegyületek különböző származékképzőkkel megvalósított elválasztásának CZE elektroferogramjai

a, komplexképző: 1,8 mM 2-merkapto-nikotinsav (MNA), **b**, komplexképző: 7,5 mM merkapto-ecetsav (MAA), **c**, komplexképző: 4 mM glutation (GLU), **d**, komplexképző: 5 mM cisztein (CYS) (Körülmények: kapilláris: 64,5 cm x 50 μ m, 25 mM borát, pH= 9,2, +25 kV, 100 mbar's, λ = 200 nm, Et-Hg (etil-Hg): 108 μ g/mL; Me-Hg (metil-Hg): 172 μ g/mL; Ph-Hg (fenil-Hg): 57 μ g/mL; in-Hg (Hg²⁺): 50 μ g/mL)

Mivel a cisztein pI-je 6,2, a higanyvegyületek ciszteines komplexei savas közegben kationosak, míg pH=6,2 fölött negatív töltésűek. Mind a kationos, mind az anionos Hg komponensek elválaszthatók ugyanazon körülmény mellett (a negatív töltésű komponenseket is elviszi az EOF a katód irányába). A 11. ábra diagramja mutatja

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

négy Hg vegyület migrációs időinek függését a futtatópuffer (25 mM foszfát) pHjától. Amint az várható volt, a migrációs idők különbségei annál nagyobbak, minél távolabb van a puffer pH-ja a pI-től. 6-7 pH-tartományban teljes elválasztás nem volt lehetséges. Legnagyobb elektroforetikus mozgékonysága (akár negatív, akár pozitív) a Hg komponensek közül a Hg²⁺-nek van, mivel a Hg²⁺ 2 töltést hordozó ciszteinnel képez vegyületet.



11. ábra. Négy Hg vegyület és az EOF migrációs idejének függése a futtatópuffer (25 mM foszfát) pH-jától (EOF markerként benzil-alkoholt használtunk, a meghatározások körülményei megegyeznek a 10. ábránál megadottakkal.).

5.1.2.3 Krómkomplexek [VI]

A krómspeciációs CE elemzések szinte kizárólagosan a Cr(III) és Cr(VI) elválasztására irányulnak [129-130] és csak nagyon kevés munka ismeretes Cr(III) különböző komplexeinek az elválasztására [131]. A CrCl₃ vízben való oldásakor kapott 3 akvakomplex ($[CrCl_2(H_2O)_4]^+$ dikloro-tetraakva-króm(III), $[CrCl(H_2O)_5]^{2+}$ $[Cr(H_2O)_6]^{3+}$ és hexaakva-króm(III)) monokloro-pentaakva-króm(III) elválaszthatók CZE-vel. Az első két komplex direkt UV fotometriásan detektálható a foszfátpufferben, de a hexaakva-króm(III) komplexionok fényelnyelése nagyon kicsi, ezért indirekt UV detektálást szükséges alkalmazni (5 mM imidazolt adunk a futtatópufferhez). Indirekt UV detektáláskor a hexaakva-komplex negatív csúcsként, a másik két komlex pozitív csúcsként jelenik meg (12. ábra). A CrCl₃.6H₂O oldásakor keletkező/elbomló különböző Cr(III) komplexek

Cáspár 923: MT4 doktori értekezés

mennyisége CZE módszerrel nyomon követhető (12. és 13. ábrák). A leglassabb folyamat a $[CrCl(H_2O)_5]^{2+}$ bomlása, 300 órával a $CrCl_3.6H_2O$ oldása után (pH=1) az oldat csak $[Cr(H_2O)_6]^{3+}$ -t tartalmazott. A pH és néhány mátrix komponens hatása a komplexek képződésére/átalakulására jól vizsgálható volt kapilláris elektroforézissel.



12. ábra. A CrCl₃.6H₂O só 0,1 M salétromsavban történő oldásával kapott oldat CZE elektroferogramjai direkt és indirekt UV detektálás alkalmazásával. A minta oldatok injektálása 0,5, 5 és 60 órával a só oldását követően történt. $\mathbf{1} = [\text{CrCl}_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$, $\mathbf{2} = [\text{CrCl}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$, $\mathbf{3} = [\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$.

Körülmények: minta: 2 mM CrC1₃; λ = 200 nm; puffer: 20 mM foszfát (pH: 2,2), indirekt detektásnál a puffer 5 mM imidazolt is tartalmazott.

Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés



13. ábra. A különböző krómkomplexek koncentrációjának változása a CrCl₃.6H₂O 0,1 M salétromsavban történő oldását követően.

(Cr+: $[CrC1_2(H_2O)_4]^+$, Cr++ = $[CrCl(H_2O)_5]^{2+}$, Cr+++ = $[Cr(H_2O)_6]^{3+}$. A meghatározások körülményei megegyeznek a 12. ábránál megadottakkal.)

5.1.2.4 Gadolínium tartalmú kontrasztanyagok [VII]

Gadolínium tartalmú ionos kontrasztanyagok elválasztására többen használták már a CZE módszert [132, 133], de micelláris elektrokinetikus kapilláriskromatográfiás módszert elsőként mi alkalmaztunk töltés nélküli és ionos Gd³⁺-tartalmú kontrasztanyagok [Gd-DTPA-BMA (Omniscan), Gd-HPDO3A (ProHance), Gd-DOTA (Dotarem), Gd-AAZTA, Gd-BOPTA (Multihance) és Gd-DTPA (Magnevist)] egyidejű meghatározására. A Gd tartalmú kontrasztanyag komplexek nettó elektromos töltése elsősorban a ligandum karboxilát funkciós csoportjainak számától, de az elektrolit pH-jától is függ, mert kis pH értéken protonált komplexek jöhetnek létre. A [Gd(DOTA)]⁻, [Gd(AAZTA)]⁻, [Gd(BOPTA)]²⁻ és [Gd(DTPA)]²⁻ nettó töltése széles pH-tartományban negatív, de a kísérleti körülmények közt a migrációs sebességük kisebb az EOF-énél. CZE módszernél a semleges komponensek (a Gd(DTPA-BMA) és a Gd(HPDO3A)) az EOF-el együtt vándorolnak, és egyszerre érik el a detektort. A négy ionos Gd³⁺-tartalmú kontrasztanyag esetében a migrációs idők a vegyületek tömeg/töltés arányában változnak (14.a ábra).

A MEKC módszerrel a töltés nélküli komponensek is elválaszthatók, a Gd(HPDO3A) migrációs ideje azért lesz nagyobb, mint a Gd(DTPA-BMA)-é, mert hidrofób és így több időt tartózkodik a micellában, mint a pufferelektrolitban. A micellákban a komponensek lassabban vándorolnak a katód felé, mint a micellákon kívül, az elektrolitban. A kétszeresen negatív töltésű komplexek ([Gd(BOPTA)]²⁻, [Gd(DTPA)]²⁻) migrációját nem befolyásolják a micellák, ezek a komponensek méret/töltés arány szerint vándorolnak (14.b ábra).



14. ábra. Gd³⁺-komplexek vizsgálata (A) CZE (25 mM foszfát pH= 9,1) és (B)
MEKC módszerrel (25 mM foszfát 70 mM SDS, pH= 9,1)

Körülmények: U= 20 kV, 100 mbar's, λ = 200 nm, a komplexek koncentrációja: Gd(DTPA-BMA): 0,90 mM, Gd(HPDO3A): 9,0 mM, [Gd(DOTA)]⁻: 4,5 mM, [Gd(AAZTA)]⁻: 4,5 mM, [Gd(BOPTA)]²⁻: 0,22 mM, [Gd(DTPA)]²⁻: 0,90 mM

Ismeretes, hogy a belső standardok alkalmazása javíthatja a CE mérések precizitását. Mivel a kísérleti körülmények változásai (pl. injektálási hibák, a hőmérséklet és a viszkozitás változása, illetve az oldószer mintatartó üvegcséből való kipárolgása) hasonlóan befolyásolják a mérendő anyagok és a belső standardok migrációját, ezek a változások kompenzálhatók e standardok használatával. A belső standardok alkalmazhatósága több tényezőtől is függ [134]. Annak érdekében, hogy a mérés alatt hatékonyan kompenzáljuk az EOF mértékének változásait, az alkalmazott belső standardot, DMSO-t és fahéjsavat használtunk, hogy lefedjük azt az időtartományt, amiben a komponensek vándorolnak. Bár viszonylag hasonló migrációs időket kaptunk korrekció nélkül is, a belső standardok alkalmazásának előnyei nyilvánvalóak (15. ábra). A 4. táblázatban láthatjuk, hogy a belső standardok migrációs idejéhez közel álló kontrasztanyagok esetében a legjobb a korrekció.

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés





IS1: DMSO (0,33 mM) and IS2: fahéjsav (0,04 mM) (koncentrációk: 1: Gd(DTPA-BMA): 1,5 mM, 2: Gd(HPDO3A): 9,0 mM, 3: [Gd(DOTA)]⁻: 4,5 mM, 4: [Gd(AAZTA)]⁻: 4,5 mM, 5: [Gd(BOPTA)]²⁻: 0,22 mM, 6: [Gd(DTPA)]⁻: 2,5 mM).

A 4. táblázatban foglaltuk össze a meghatározások analitikai teljesítőképességi adatait. Az UV detektálás érzékenysége különösen jó három kontrasztanyag esetén $[[Gd(BOPTA)]^{2^{-}}, [Gd(DTPA)]^{2^{-}}, Gd(DTPA-BMA)]$, ahol a LOD értékek 0,4 - 0,7 µM közt alakultak. A többi anyag esetén az elért kimutatási határok 8 és 20 µM között változtak. Megfelelő 2 belső standardot használva az egyes komponensek migrációs időinek precizitására kapott 0,027-0,34 RSD% értékek nagyon jónak számítanak. Nem találtunk lényeges különbséget azonban a csúcsterületek precizitás adataiban, amikor belső standardokat használtunk vagy éppen elhagytunk (Ez azt jelzi, hogy a mérőrendszer stabilan működött, a komponensek nem bomlottak, az oldatok párolgása elhanyagolható volt).

	LOD	Lineáris tartomány	R	SD%, id	ő ²	RSD%, jelterület ²	
	$(\mu M)^1$	(µM)	IS	$+ IS_1$	+ IS _{1,2}	IS	+ IS _{1,2}
			nélkül			nélkül	
Gd-DTPA-	0.683	5-200	0.252	0.019	0.054	2.20	1.15
BMA							
Gd-HPDO3A	20.5	100-5000	0.254	0.047	0.132	1.28	1.91
Gd-DOTA	13.3	100-5000	0.431	0.273	0.104	1.79	1.98
Gd-AAZTA	8.20	100-5000	0.602	0.457	0.102	2.05	2.72
Gd-BOPTA	0.402	5-200	0.692	0.583	0.027	1.90	2.06
Gd-DTPA	0.524	5-200	1.12	1.03	0.342	1.51	1.11

4. táblázat. Gadolínium tartalmú kontrasztanyagok MEKC meghatározásának analitikai teljesítőképességi adatai.

 $^{1}S/N=3$

 $^{2}c=1$ mM, n=10.

A kontrasztanyagoknak klinikai mintákban való vizsgálatáról további eredményeket az 5.1.3.6 fejezetben mutatok be.

5.1.3 Kapilláris elektroforézis alkalmazása gyógyszerészeti és biológiai minták elemzéséhez, az eredmények orvosdiagnosztikai felhasználása [VII, IX-XVII]

A klinikai minták elemzésekor a cél az, hogy megadjuk az egyes vegyületek koncentrációját a biológiai mintákban (pl. szérum, vizelet, liquor, nyál, egyes szövetek) és gyógyszerkészítményekben, és ezáltal a vegyületek hatékonyságát, metabolizmusát tanulmányozhassuk annak érdekében, hogy megfelelő módon és mennyiségben történjen a gyógyszerek adagolása. A CE módszer előnye más elválasztástechnikai módszerekkel szemben az, hogy itt lehetőség van a nagy fehérje- és szervesanyagtartalmú klinikai minták közvetlen (mintaelőkészítés nélküli) kapillárisba juttatására és elemzésére [40]. A nagy viszkozitású, inhomogén minták (szövetek, sputum, tumorok) minta-előkészítéséhez elegendő csupán liofilizálást alkalmaznunk.

5.1.3.1 Nitrit- és nitrátionok [X]

Nitrit- és nitrátionok CZE vagy CITP meghatározására számos módszert mutattak már be [135, 136]. A nyálban található nitrit- és nitrátionok mennyiségének orvosdiagnosztikában nagy fontosságú az [137]. Kapilláris ismerete zónaelektroforézissel és 214 nm-en történő UV detektálással a nitrit és nitrát mellett a nyálban viszonylag nagy mennyiségben megjelenő tiocianát is meghatározható 1-100 µg/mL koncentrációtartományban. A meghatározások pontosságának javítására molibdenát belső standardot is alkalmaztunk (16. ábra). A kidolgozott CZE módszerrel különböző betegektől, dohányos és nem dohányos személyektől, a szájüreg különböző helyeiről, illetve nyálmirigyekből (pl. a Wharton-vezetékből, illetve a Stenon-vezetékből) vett mintákat elemeztünk. A módszer nemcsak gyors és olcsó, hanem a minta-előkészítés is minimális, hiszen a nyálminta közvetlenül a kapillárisba injektálható. A nyálmintákban a nitrit és nitrát mennyisége gyorsan csökkent. A nitrát mennyisége gyorsabban csökkent, 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. Dohányos és nem dohányos személyektől vett nyálminták elemzésekor azt kaptuk, hogy a tiocianát koncentrációja átlagosan 5,4szer volt nagyobb a dohányosokénál (dohányosoknál átlagosan 63,1 µg/mL, nem dohányosoknál átlagosan 11,7 µg/mL), ugyanis a dohányfüst cianidtartalmát a szervezet detoxikáló enzimjei tiocianáttá alakítják.

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés



16. ábra. Nitritet, nitrátot, tiocianátot és molibdenátot (mint belső standardot) tartalmazó minta elektroferogramja.

Körülmények: 50 mM foszfát puffer, pH: 6,8, -25 kV, l_{eff} : 40 cm, λ = 214 nm, a nitrit, nitrát és tiocianát koncentrációja 15-15 µg/mL, a molibdát koncentrációja 25 µg/mL.



17. ábra. A szájüregből (a), a fültőmirigyből (b), és a submandibuláris nyálmirigyből (c) vett nyálminták CZE elektroferogramjai. (Körülmények megegyeznek a 16. ábránál megadottakkal)

5.1.3.2. Toxinok [IX]

A cianobakteriális toxinok a természetes toxinok egyik változatos csoportját alkotják. Ezek a toxinok lehetnek felelősek felszíni vizekből ivó házi és vadállatok mérgezéseiért, de számos emberi mérgezést és halálesetet is leírtak az irodalomban [138]. A cianobakteriális toxinokat leggyakrabban felszínivizek vízvirágzásaiban (cianobaktériumok által termelt tömegproduktum) mutatták ki, elsősorban HPLC módszerrel [139]. Az alkalmazott CE módszerekkel többnyire egy-egy toxin variánst határoztak meg [140].



18. ábra. Az anatoxin-a (1), a mikrocisztin-LR (2) és a cilindrospermopszin (3) standardok keveréke (a), egy tavi vízvirágzás minta (b) és 10 μg/mL toxin standardokkal adalékolt vízvirágzás minta (c) CZE elektroferogramjai (Körülmények: 25 mM borát, pH: 9,3, λ= 230 nm)

CZE és MEKC módszereket alkalmaztunk felszínivizek vízvirágzásaiból származó cianobaktérium extraktumok toxintartalmának meghatározására. A 18. és 19. ábrán a mikrocisztin-LR (MCY-LR), cilindrospermopszin (CYN) és anatoxin-a (ANA-a) toxinoknak modelloldatban és vízvirágzás mintában történő CZE és MEKC elválasztásakor kapott elektroferogramokat láthatjuk. Az elektroferogramokból kitűnik, hogy a cianotoxinok mindkét módszerrel jól elválaszthatók a nagyszámú mátrixkomponenstől. A CZE-nél az ANA-a és CYN gyorsan elválaszthatók anélkül, hogy a csúcsok közelében zavaró komponensek csúcsai jelennének meg. A MEKC módszernél pedig a MCY-LR csúcsa jelenik meg az elektroferogram egy viszonylag "tiszta régiójában", így nagy pontossággal integrálható. Emiatt a CZE és MEKC

módszerek egymást követő alkalmazása a komplex mátrixminták elemzésekor szükségessé válhat.



19. ábra. Az anatoxin-a (1), a mikrocisztin-LR (2) és a cilindrospermopszin (3) standardok keveréke (a), egy tavi vízvirágzás minta (b) és 10 µg/mL toxin standokkal adalékolt vízvirágzás minta (c) MEKC elektroferogramjai

Körülmények: 25 mM borát, 100 mM SDS, pH: 9,3, $\lambda = 230$ nm

A kimutatási határok spektrofotometriás detektálást alkalmazva a mikrocisztin, a cilindrospermopszin és az anatoxin esetében 1-4 µg/mL között alakultak. Az eredmények azt mutatták, hogy az adott vizsgálatokhoz vételezett magyarországi eredetű cianobakteriális vízvirágzás mintákból a MCY-LR toxin meghatározható volt, de a másik két toxin a hazai felszíni vizekben nem volt kimutatható. A 3 toxin részletesebb tanulmányozását és környezeti mintákban való meghatározásait Dr. Vasas Gábor kutatócsoportjával való együttműködésben végeztük [XXXI, XLII, XLVII].

5.1.3.3 Kefalosporinok [XI-XIV]

A különböző kefalosporinok elválasztására több CZE [141, 142] és MEKC [143, 144] módszert is közöltek. Az általunk kidolgozott CZE eljárás 14 különböző kefalosporin meghatározására alkalmas. Megvizsgáltuk az elválasztás különböző körülményeinek hatását az elválasztásra és meghatároztuk a kidolgozott módszer analitikai teljesítőképességi adatait. A kefalosporinok detektálását UV spektrofotometriásan 200 és 270 nm-en végeztük.



20. ábra. A vizsgált 14 kefalosporin CZE elválasztása két különböző időskálán. Körülmények: 25 mM foszfát puffer, pH= 6,8, +25 kV, 100 mbars, kapilláris: 64,5 cm x 50 μ m, λ = 270 nm, a kefalosporinok koncentrációja a keverékben 30 μ g/ml, COX: cefoxitin, CZO: cefazolin, CFM: cefamandol, CFP: cefoperazon, CTR: ceftriaxon, CFR: cefuroxim, CFC: cefaclor, CFL: cefalexin, CFD: cefadroxil, CZI: ceftazidim, CTA: cefotaxim, CIX: cefixim, CFB: ceftibuten, CCC: cefalosporin C)

Nagy mátrixtartalmú mintákban (klinikai minták, fermentlevek, stb.) a 270 nm-en való detektálás az előnyösebb, ekkor a kimutatási határok (jel/zaj viszony, S/N=3) 0,42 és 1,62 µg/ml között alakultak (a klinikai minták antibiotikumtartalma általában ezen értékek felett van). A kidolgozott módszer precizitása megfelel a modern analitikai módszerektől elvárt értékeknek, hiszen a migrációs idők szórása 1,0 RSD%, jelterületek szórása pedig 1,8 RSD%-nál kisebb.

Az antibiotikumok a vizes oldatokban különböző bomlástermékekké alakulnak át. Cefuroxim esetében az oldatkészítést követően 150 óráig követtük a főkomponens és a bomlástermékek koncentrációjának változását szobahőmérsékleten. A cefuroxim bomlása során négy ismeretlen bomlástermék keletkezett (D1, D2, D3 és D4). Míg az eredeti antibiotikum mennyisége csökkent, addig a bomlástermékek mennyisége növekedett. Amikor az eredeti komponens teljesen elbomlik a D1 (9,209 perc) bomlástermék is eltűnik az oldatból. A D2 (14,916 perc) bomlástermék az antibiotikum feloldását követően tíz óra múlva jelenik meg, a D3 (11,949 perc) és D4 (10,665 perc) bomlástermékek egyszerre, a feloldást követően ötven óra múlva képződnek (21. ábra). A bomlástermékek kémiai szerkezetét MS módszerrel azonosítottuk [145].



21. ábra. A cefuroxim bomlása során az oldatban jelenlevő bomlástermékek (D1, D2, D3, D4) mennyiségének időbeli változása. (Az első injektálások az oldatkészítést követő 20 percen belül megtörténtek, az így kapott jelterület (CFR) nagyságát vettük 100 %-nak.) (Körülmények ugyanazok, mint a 20. ábránál.)

Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

A kidolgozott módszert alkalmaztuk biológiai mintákban (vizelet, sebváladék, liquor, szérum, sputum) is a kefalosporinok meghatározására. A fehérjementes, illetve kis fehérjetartalmú mintákat (vizelet, liquor, sebváladék) direkt injektálásukat követően CZE-vel analizáltuk. Az elektroforézis után háromlépcsős posztkondícionálást (NaOH, SDS, puffer) alkalmaztunk. A magas fehérjetartalmú minták (szérum) elemzését direkt injektálásukat követően SDS-t tartalmazó pufferben végeztük. A posztkondícionálási lépésekkel a mérések során a kapilláris falára erősen adszorbeálódott anyagokat (fehérjéket, sókat) lehet eltávolítani, és így a mérések reprodukálhatóságát javítani. Az SDS jelentősen csökkenti a fehérjék elválasztásra gyakorolt zavaró hatását, javítva ezzel a mérés szelektivitását és reprodukálhatóságát [146-148].

A biológiai minták fő összetevői (fehérjék, sók) rendszerint csak 240 nm alatt nyelnek el, ezen a hullámhosszon végezve a detektálást a nagy mennyiségben jelenlevő fehérjék nagy abszorbanciájú jeleket eredményeznek a kefalosporinok jeléhez képest, 270 nm-en detektálva azonban a kefalosporinok csúcsai sokkal intenzívebbek, és a fehérjék elnyelése itt elhanyagolható (22. ábra).



22. ábra. Humán szérum minta elemzése SDS tartalmú pufferben két különböző hullámhosszon (Körülmények ugyanazok, mint a 20. ábránál, de a puffer 100 mM SDS-t is tartalmazott, a cefazolin koncentrációja 45 μg/ml.)

A szérum, mint nagy mennyiségű fehérjét tartalmazó minta kromatográfiás (HPLC, GC) elemzésekor általában elengedhetetlen a minták előzetes fehérjementesítése [149, 150]. Négy antibiotikumot (ceftazidim, ceftriaxon, cefotaxim, cefuroxim) tartalmazó szérum elemzése esetén, a ceftriaxon a szérum legnagyobb csúcsa, az albumint követően jelenik meg az elektroferogramon, míg a többi három kefalosporin a különböző szérumfehérjék (γ , β , α_1 , α_2), széles zónájában vándorol (23.a.b. ábra). A négy különböző kefalosporin jól azonosítható az

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

elektroferogramon, de a jelek kiszélesedtek, a csúcsok magassága kisebb az ugyanilyen koncentrációjú desztillált vizes oldatokhoz képest. A szérum hígítása desztillált vízzel (1:5) javított mind a csúcsok alakján és a meghatározás érzékenységén (23.c.d ábra). A hígított szérumban a kefalosporinok hamarabb jelennek meg az elektroferogramon, mivel a kefalosporinok és fehérjék közötti kölcsönhatások mérséklődtek és a kisebb fehérjetartalmú mintákból kevesebb fehérje adszorbeálódik a kapilláris falra, emiatt az EOF-et módosító hatás is kisebb.



23. ábra. Humán szérum minták CZE elemzése, A: nem hígított szérum, B: nem hígított szérum 4 kefalosporin hozzáadása után, C: ötszörösére hígított szérum, D: ötszörösére hígított szérum 4 kefalosporin hozzáadása után, kefalosporinok koncentrációi B, D esetben: 50 μg/ml (Körülmények ugyanazok, mint a 20. ábránál.)

Klinikai minták elemzésekor a hígítás többnyire nem célravezető megoldás, mert a meghatározandó gyógyszer koncentrációja a kimutathatósági határ alá csökkenhet. Amennyiben azonban anionos felületaktív anyagot, SDS-t adalékoltunk a puffer elektrolithoz, az SDS a fehérjék felületére történő adszorpciójának köszönhetően a fehérjék nettó negatív töltésre tesznek szert, így jóval később, az antibiotikumoktól elkülönülten jelennek meg az elektroferogramon, és nem zavarják az antibiotikumok meghatározását. Az SDS használatának további előnye, hogy a negatív töltésű fehérje-SDS asszociátumok nem adszorbeálódnak a (negatív töltésű) kvarckapilláris falára.

Míg a szérum-, liquor-, sebváladék- és vizeletminták mintaelőkészítés nélkül a kapillárisba injektálhatók és elemezhetők, addig a sputum (tracheobronchiális váladék) és más nagy sűrűségű klinikai minta direkt injektálása nem tett lehetővé reprodukálható méréseket nagy viszkozitásuk és inhomogenitásuk miatt (migrációs idők csúsztak, a kapilláris eltömődött). A hidrodinamikus injektálás (100 mbar·s) mellett kipróbáltuk az elektrokinetikus (20 kV·s) injektálást is, de mindkét mintainjektálási módszer esetén gyakran eldugult a kapilláris. A direkt injektálások nehézségei miatt ezért ezen mintáknál előzetes mintaelőkészítést kellett alkalmaznunk. A nagy viszkozitású sputum minták hatékony mintaelőkészítésére liofilizálási eljárást dolgoztunk ki. A kidolgozott mintakezelési módszer helyességéről a nagy viszkozitású mintákban visszanyerési vizsgálattal győződtünk meg.

Mivel a CE alkalmas kefalosporinok kvalitatív és kvantitatív meghatározására klinikai mintákban, ez az orvosi gyakorlatban segítséget nyújthat a racionális gyógyszerterápia megtervezésében. Az idegsebészeti gyakorlatban profilaktikusan adott antibiotikum terápiával a posztoperatív fertőzéseket kívánják megelőzni. Munkánk során profilaktikusan cefazolinnal kezelt, gerinc- és agyműtéten átesett beteg szérumában, kivezetett sebváladékában és agy-, gerincvelői folyadékban (liquor) határoztuk meg a cefazolin koncentrációját, hogy meggyőződjünk arról, az egyes testfolyadékokban az antibiotikum szintje elérte-e az eredményes terápiához szükséges MIC (baktérium pusztulásához szükséges legkisebb antibiotikum mennyiség, minimális gátló koncentráció) értéket.

Gerincműtét előtt egy betegnek beadott 1 g cefazolin koncentrációjának a változását követtük szérumban és dréncsőben összegyűlő sebváladékban (24. ábra). A cefazolin koncentrációja a beadást követően 4-12 óra elteltével csökkent a különböző kórokozókra meghatározott MIC érték (0,25-16 µg/ml) alá [151].

Cáspár 923: MT 4 doktori értekezés



24. ábra. 1 g cefazolin beadását követően a betegtől 0,5-12 órával később vett szérumminták CZE elektroferogramjai (Körülmények ugyanazok, mint a 22. ábránál.)

Az agyműtét hosszabb időt vesz igénybe, mint a gerincműtét, ezért agyműtét során egyszer adott antibiotikum nem biztosít védelmet a baktérium kolonizáció kialakulása ellen. Közvetlenül a műtét kezdetén és a műtét harmadik órájában adott 1 g intravénás cefazolin viszont kiküszöböli a fertőzésveszélyt, mert az antibiotikum szintje nem csökken a MIC érték alá a szérumban, liquorban, vagy a dréncsőben összegyűlő sebváladékban (25. ábra) a műtét kb. 8-10 órányi időtartama alatt. Ezen mintákban a meghatározott kefalosporin koncentráció a klinikai gyakorlatban segít a hatékony gyógyszeres terápia kialakításához, mert mint azt eredményeink alátámasztják, a megfelelő gyógyszerszint elérése a szérumban nem feltétlenül biztosít a központi idegrendszerbe kerülő baktériumok ellen is védelmet.



25. ábra. A cefazolin koncentrációjának változása a szérumban, drainben, liquorban idegsebészeti műtét kezdetén és a műtét harmadik órájában adott 1 g cefazolin beadását követően

Egy agyműtéten átesett, posztoperatív lábadozása során tüdőgyulladást kapott, intravénásan ceftriaxonnal (60 mg/kg/24 h) kezelt beteg szérum-, liquor- és sputum mintájában meghatároztuk a ceftriaxon mennyiségét (26. ábra). A ceftriaxon jelenlétét a mintákhoz adott ceftriaxon (standard addíciós) mérése is megerősítette. A ceftriaxon mennyisége a szérumban a legnagyobb, ettől kisebb a liquorban és a sputumban a legkisebb, ami jó egyezést mutat a gyógyszer különböző mátrixokban való penetrációjának és eloszlásának várható mértékével (26. ábra).



26. ábra. Ceftriaxonnal kezelt (60 mg/kg/24h) betegből származó klinikai minták direkt injektálást követő CZE elemzése, A: szérum, B: liquor, C: sputum, D: sputumhoz hozzáadott ceftriaxon standard (Körülmények ugyanazok, mint a 22. ábránál.)

Az antibiotikum kezelés ellenére a várt terápiás hatás sokszor elmaradt, és a mortalitási adatok nőttek a tüdőgyulladásban szenvedő betegek körében. Ez a probléma felvetette a gyógyszeres terápia során adott kefalosporinok penetrációjának a vizsgálatát a sputumba. Az 5. táblázat adatai foglalják össze az antibiotikum intravénás beadását követően hat órával később levett szérum és köpet mintákban az egyes kefalosporinok koncentrációit. A cefazolin, cefamandol, cefuroxim, ceftazidim, és a cefepim koncentrációja a köpetben 0,4-0,8 µg/ml alatt maradt (már nem tudtuk detektálni), míg a ceftriaxon koncentrációja 1,3-1,9 µg/ml között alakult. A ceftriaxon azért is volt kimutatható legnagyobb mennyiségben a sputumban, mert ezt az antibiotikumot hosszú ideig kapta a beteg, akkumulálódott, továbbá a ceftriaxonnak a legnagyobb a felezési ideje (8 óra), szemben a többi vizsgált antibiotikummal, melyeknél ez az érték jelentősen kisebb (1-3 óra). A baktériumok pusztulásához szükséges minimális gátló koncentráció (MIC) a vizsgált kefalosporinok esetében nagyobb, mint 2 µg/ml [151]. A méréseink azt mutatják, hogy a pneumóniában szenvedő betegek tracheobronchiális váladékában (sputum) az egyes antibiotikumok szintje elmarad a szérumban mért értéktől, és a baktériumok pusztulásához szükséges MIC értéktől. Az antibiotikum kis mértékű penetrációja a tracheobronchiális váladékba lehet az oka annak, hogy a terápia nem mindig hozott javulást a betegek állapotában.

	Mintoszóm	Koncentráció (µg/ml)		
	Willitaszaili –	Szérum	Sputum	
cefazolin	14	79,5 ±13,8	<0,5	
cefamandol	4	$41,5 \pm 10,6$	<0,6	
cefuroxim	5	$26,9 \pm 4,9$	<0,4	
ceftazidim	4	$9,5 \pm 3,4$	<0,8	
ceftriaxon	6	$64,9 \pm 28,9$	$1,9 \pm 1,3$	
cefepim	5	$20,7 \pm 4,1$	<0,5	

5.táblázat. Kefalosporinok koncentrációja betegektől vett szérumban és sputumban

5.1.3.4 Protonálódási állandók meghatározása [XIV]

A kapilláris elektroforézis módszer alkalmazásának alapja pK meghatározásánál az, hogy az elektroforetikus mobilitás függ a komponens ionizáltsági állapotától [152-154]. A CE használatának pH-potenciometriával szembeni előnye, hogy a minta kis anyagmennyisége elegendő és nem szükséges koncentrációjának pontos ismerete. CZE-vel történő pK meghatározáshoz az ionerősség, és a hőmérséklet állandó értéken való tartása fontos, mivel mindkettő befolyásolja az effektív elektroforetikus mozgékonyságot [155, 156]. Munkánk során 6 kiválasztott kefalosporin pK értékét CZE-vel határoztuk meg. A CZE méréseket állandó hőmérséklet és ionerősség mellett pH 2,0-11,0 közötti tartományban végeztük.

A pK érték megadja, hogy a komponensnek az adott pH értéken milyen lesz a töltése. Egy amfolit a pK értékénél magasabb pH-n negatív töltésű, ezért az EOF után jelenik meg az elektroferogramon, míg a pK értékénél alacsonyabb pH-n pozitív töltésű lesz, és így az EOF előtt vándorol az elektroforézis során. Például lúgos pH-n a cefalexin karboxil csoportja deprotonálódik és anionos karakterének köszönhetően a töltés nélküli marker, az EOF után jelenik meg az elektroferogramon. A pH csökkentésével a cefalexin effektív mozgékonysága nő, 4,5-ös pH-n ikerionos lesz és a töltés nélküli markerrel együtt egy csúcsként eluálódik. A pH további csökkentésével a cefalexin aminocsoportja protonálódik, effektív mozgékonysága pozitív előjelűvé válik, és az EOF előtt jelenik meg az elektroferogramon (27. ábra).

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

A számolt effektív elektroforetikus mozgékonysági adatokat ábrázolva a pH függvényében megkaptuk a cefalexin mozgékonysági görbéjét, melyből Matlab program segítségével kiszámoltuk a pK értékeket (28. ábra). Az első pK érték (2,93) a karboxil csoport, a második pK érték (7,18) az amino csoport deprotonálódásához tartozik. Ezek az értékek megfelelnek a vegyület szerkezetéből adódó sav-bázis tulajdonságnak, valamint egyezést mutatnak korábbi irodalmi adatokkal [157].



27. ábra. A puffer pH-jának hatása a cefalexin migrációs idejére (elektroforetikus mozgékonyságára)

Körülmények: 48,5 cm (41 cm a detektorig) x 50 μ m-es kapilláris, 50 mM foszfát puffer, +25 kV, 100 mbar·sec, 25 °C, λ = 270 nm, cefalexin koncentrációja: 0,1 mg/ml, EOF marker: benzil alkohol.

Cáspár 9213: MT 4 doktori értekezés



28. ábra. A cefalexin elektroforetikus mozgékonysága a pH függvényében (Matlab)



29. ábra. A cefalexin CZE meghatározása különböző mátrixokban. (A körülmények megegyeznek a 27. ábránál megadottakkal, de 25 mM foszfátpuffert (pH= 6,8) használtunk)

Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

A CE alkalmazásának további előnye, hogy nemcsak tiszta, vizes oldatban, hanem több komponensű biológiai mintákban, gyógyszeripari termékekben és szerves oldószerben is lehetséges a pK meghatározása. Mindezek mellett bomlékony, szennyezett anyagok pK-ja is meghatározható. Különböző mátrixokban való lehetnek fontosak, gyógyszerészeti vizsgálatok azért mert kutatások, farmakokinetikai vizsgálatok során gyakran nem tiszta vizes oldatokat használunk. A pK-nak CE-vel történő meghatározásakor nem szükséges a vizsgálandó komponens extrakciója és tisztítása. A cefalexin elektroforetikus vándorlását összehasonlítva 0,9 %-os NaCl-oldatban, fermentlében és szérumban, azt tapasztaltuk, hogy a mátrix különféle komponenseinek nincs jelentős hatása a cefalexin migrációs idejére, csak a csúcs alakja torzult (29. ábra). A sóoldat esetében a kloridion nagy elektroforetikus mobilitása miatt torzult a cefalexin csúcsának alakja (leading). A szérum és fermentlé esetén a fehérjék és egyéb szerves komponensek kapilláris falára való adszorpciója okozta a cefalexin csúcs alakjának változását. A cefalexin különböző mátrixokban felvett elektroforetikus mobilitási görbéi hasonlóak a tiszta vizes oldatban meghatározott mobilitási görbéhez (30. ábra), tehát a számolt pK értékek sem különböznek számottevően.



30. ábra. A cefalexin elektroforetikus mozgékonysága a pH függvényében különböző mátrixokban (A körülmények megegyeznek a 29. ábránál megadottakkal.)

A hat kefalosporint tartalmazó oldat különböző pH-n készült elektroferogramjai alapján számolt effektív mozgékonysági adatokat felhasználva számoltuk ki a pK értékeket, és összevetettük a pH-potenciometriával meghatározott értékekkel, valamint az irodalmi adatokkal (6. táblázat). Eredményeink igazolják, hogy a CZE jól alkalmazható pK meghatározásához.

	Irodalmi adatok		Saját mérések		
	CZE ^a	potenciometria ^a	CZE	potenciometria	
cefalexin	$3,11 \pm 0,16^{b}$	$2,34 \pm 0,09$	$2,93 \pm 0,11$	$2,53 \pm 0,01$	
	$6,79 \pm 0,27^{\rm b}$	$7,08 \pm 0,06$	$7,\!18\pm0,\!07$	$7,13 \pm 0,01$	
cefaklór	$2,69 \pm 0,09^{b}$	-	$1,74 \pm 0,38$	< 1,5	
	$7,38 \pm 0,66^{b}$	$7,19 \pm 0,06$	$7,19 \pm 0,03$	$7,\!07\pm0,\!02$	
cefadroxil	$2,86 \pm 0,18^{b}$	$2,65 \pm 0,05$	$2,52 \pm 0,14$	$2,48 \pm 0,03$	
	$7,14 \pm 0,20^{b}$	$7,59 \pm 0,18$	$7,\!65\pm0,\!07$	$7,37 \pm 0,02$	
		-	-	$9,64 \pm 0,01$	
cefotaxim	$2,09 \pm 0,21$	$2,09 \pm 0,21^{a}, 2,93^{c}$	-	$2,30 \pm 0,01$	
		3,07 ^c	$3,20 \pm 0,19$	$3,37 \pm 0,03$	
		10,87 ^c	-	-	
cefoperazon	-	-	$3,13 \pm 0,27$	-	
	-	-	$8,99 \pm 0,44$	$9,\!15\pm0,\!02$	
cefoxitin	-	-	$3,15 \pm 0,24$	$2,75 \pm 0,04$	

6. táblázat. Kefalosporinok CZE-vel és pH-potenciometrikusan meghatározott pK
értékeinek összehasonlítása

^aY, Mrestani és mtsai., [157]

^bY, Ishihama és mtsai., [153]

^cM, Aleksic és mtsai., [158]

5.1.3.5 Temozolomid [XV-XVI]

A temozolomid (TMZ), egy rákellenes gyógyszer [159] meghatározására elsőként alkalmaztuk a MEKC módszert. A temozolomid először gyors kémiai reakcióval monometil-triazénoimidazol-karboxamiddá (MTIC), majd ebből 5-amino-imidazol-4-karboxamiddá (AIC) alakul át [160, 161]. Mivel az átalakulások viszonylag gyorsak, megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy egy CE készülékkel milyen körülmények között (pl. a kapilláris detektálási végénél injektálva ("short-end" injektálás), extra hidrodinamikai nyomást vagy magasabb (40°C) hőmérsékletet alkalmazva) érhetjük el a lehető leggyorsabb elválasztást (31. ábra). A kidolgozott MEKC módszerrel a TMZ és bomlástermékei akár 1,2 percen belül is meghatározhatók voltak megfelelő felbontás mellett (31.b. ábra).



31. ábra. A temozolomid és bomlástermékei (TMZ, MTIC és AIC) elválasztása MEKC módszerrel hagyományos injektálás (l_{eff}: 60 cm) (a,); "short-end" injektálás (l_{eff}: 8 cm) (b,); "short-end" injektálás (l_{eff}: 8 cm) és +50 mbar nyomás (c,); illetve "short-end" injektálás (l_{eff}: 8 cm), +50 mbar nyomás és 40°C (d,) alkalmazásával. Az egyes injektált minták esetén a komponensek mennyiségének aránya eltérő volt, de a migrációs sorrend nem változott.

Körülmények: 25 mM foszfát, 45 mM SDS, pH=6,8, U=25 kV, 100 mbar.s, λ =214 nm, minta: 180 µg/mL TMZ (a 3 komponens aktuális koncentrációja a mérések alkalmával nem volt azonos a TMZ és az AIC bomlása miatt).

6-8 pH-tartományban a pH kis változása is jelentős hatással volt a 3 komponens koncentrációeloszlására. A 32. ábrán a TMZ vízben való oldását követően (0,5-952 perc) kapott MEKC elektroferogramok láthatók. Míg ezen a 6,8-as pH-n a TMZ és

Cáspár 923: MT4 doktori értekezés

a MTIC felezési idői 28, illetve 13 perc, addig 9,1 pH-n ugyanezen értékek 9, illetve 11 perc voltak. Az elektroferogramokon látható, ahogyan a TMZ és a MTIC mennyisége folyamatosan változik idővel, ugyanakkor az AIC mennyisége 4 óra elteltével állandósul. Következtetésképpen levonható, hogy az AIC állandósuló mennyisége megegyezik a TMZ kezdeti koncentrációjával, és ez jóval nagyobb, mint a MTIC-nél mérhető maximális koncentráció.



32. ábra. TMZ vízben való oldását követően (0,5-952 perc) kapott MEKC elektroferogramok

Körülmények: 25 mM foszfát, 45 mM SDS, pH: 6,8, U= 25 kV, l_{eff} : 8 cm, 100 mbar.s, λ = 214 nm, $c_{0,TMZ}$: 180 µg/mL.

Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

A gyógyszervegyületek stabilitása a gyógykészítményben, oldatban, biológiai mátrixokban, különböző pH-kon és hőmérsékleteken eltérő, ennek vizsgálata CE módszerrel egyszerű és gyors. A kapott LOQ értékek (0,31 µg/mL és 0,93 µg/mL az AIC-re, illetve a TMZ-re) és a betegektől vett szérummintákra kapott eredmények igazolták, hogy a módszer közvetlen mintainjektálással és egyszerű UV detektálással is alkalmas TMZ terápiás koncentrációinak szérummintákban való meghatározására.

A 33. ábrán egy olyan daganatos beteg vérének elektroferogramja látható, akitől a 400 mg-os TMZ adag bevétele után egy órával vettek vért. A szérumot (1 ml) azonnal 10 µl cc.HCl-oldattal kezelték. 200 nm-en végezve a detektálást (33.a ábra) a szérum több komponense detektálható, 325 nm-en (33.b ábra) viszont csak a TMZ csúcsa jelenik meg. A többi komponensnek ezen a hullámhosszon nincsen elnyelése, ezért klinikai mintáknál ezen a hullámhosszon érdemes detektálni. A 33.c ábrán a TMZ spektruma látható, ez alapján biztonsággal lehetett azonosítani.



33. ábra. Daganatos betegtől vett vérminta elektroferogramja 400 mg-os Temodal kapszula bevétele után egy órával (a) 200 nm és (b) 325 nm-en detektálva. (c): a temozolomid spektruma. (A kísérleti körülmények megegyeznek a 32. ábra körülményeivel)

A TMZ koncentráció *in vivo* szérumbeli koncentrációja követésének jelentősége abban rejlik, hogy megállapíthatunk egy időintervallumot, amíg a vérben megfelelő a TMZ koncentrációja. A betegeknek ez idő alatt meg kell kapniuk a sugárkezelést, hiszen a sugárzás segíti a TMZ átjutását a véragygáton. A 34. ábrán bemutatott TMZ koncentrációgörbékről is leolvasható csúcskoncentrácók (8,2-10,1 μ g/mL) és T_{max} értékek (44-65 perc) hasonlóak a mások által [162, 163] közölt értékekkel.



34. ábra. Két beteg vérében a TMZ koncentrációgörbéje (A kísérleti körülmények megegyeznek a 32. ábra körülményeivel)

Kisebb TMZ koncentrációk (<1 µg/mL, ami kb. a TMZ csúcskoncentráció 10%-a alatti koncentrációnak felel meg) meghatározásához etil-acetátos extrakciós elődúsítást alkalmaztunk.

A szilárd halmazállapotú tumor minták esetében a mintainjektáláshoz szükség volt mintakezelésre, liofilizálásra. A kis mennyiségű (<1 g) agytumor mintákat a liofilizálásuk után extrahálással tisztítottuk, dúsítottuk a meghatározandó komponensre nézve. Az oldószer eltávolítása után a csupán 10 μ L-nyi térfogatba oldott anyagot elemeztük (35. ábra). Az agytumorban talált TMZ koncentrációk 0,061-0,117 μ g/g voltak. A TMZ koncentrációk tumormintákban történő meghatározásával igazolható volt, hogy a TMZ eljut a célhelyre, az agytumorba.



35. ábra. Liofilizált és extrakcióval dúsított agytumor minta (a,) és a 0,4 μg/mL TMZ-vel adalékolt minta (b,) MEKC elektroferogramjai. Az agytumort 165 perccel azután operálták ki, hogy a beteg 400 mg TMZ dózist kapott. (A kísérleti körülmények megegyeznek a 32. ábra körülményeivel, de , l_{eff}: 60 cm; 200 mbarˈs; λ=325 nm)

Gáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

5.1.3.6 Gd-alapú kontrasztanyagok [VII]

A szabad Gd³⁺-ion rendkívül toxikus, ezért in vivo vizsgálatok során poliaminopolikarbonsav ligandumokkal képződő stabil komplexeit használják, amelyek nem metabolizálódnak а szervezetben. А Gd(DTPA-BMA)-t (Omniscan) alkalmazásával elvégzett MRI vizsgálatok során a betegek vizeletmintáiban Gd(DTPA-BMA)-n kívül nem találtak más Gd³⁺-vegyületet [164]. Más kísérletek azt mutatták ki, hogy a Gd(DTPA-BMA) több, mint 90 %-a főként vesén keresztül választódik ki a szervezetből, amelynek felezési ideje $t_{1/2}=1,5$ óra [165, 166]. Vizsgálatainkhoz 16 mmol Omniscan dózissal kezelt betegektől a vizsgálat előtt, a vizsgálat után 40 és 180 perccel vett vizelet-, és szérummintákat használtuk. Mint azt korábban már kimutattuk, a különböző kromatográfiás módszerekkel ellentétben a CE-nél a szérum- és vizeletmintákat közvetlenül injektálhattuk a CE kapillárisba.



36. ábra. 16 mmol Omniscan-nel kezelt betegektől vizsgálat előtt (a), vizsgálat után 40 perccel (b) és vizsgálat után 180 perccel (c) kapott vizeletminták elektroferogramjai (A körülmények megegyeznek a 14.b ábránál megadottakkal.)

A 36. ábrán látható, hogy a Gd(DTPA-BMA) jól elkülönül a vizelet többi összetevőitől. A mintákhoz Omniscant adtunk, így meggyőződhettünk arról, hogy milyen migrációs időnél vándorol a vizsgált komponens.

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

Mivel vizeletürítések alkalmával kapott vizeletminták komponenseinek koncentrációja különböző, a kontrasztanyag csúcsát a vizelet egyéb összetevőinek csúcsaihoz viszonyítva vizsgáltuk. Ezen mérésekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a Gd(DTPA-BMA) mennyisége a kontrasztanyag beadása után 3 órával fokozatosan csökkent. Az Omniscan-el kezelt betegektől a vizsgálat után 40 és 180 perccel kapott vizeletmintákban a Gd(DTPA-BMA)-tartalom 12,43 \pm 0,29 és 3,74 \pm 0,10 mM volt.

Mivel a pufferelektrolithoz adott SDS a fehérjék felületéhez kötődik, ezért a szérum mintákban található Gd-tartalmú kontrasztanyagot közvetlenül elemezni tudtuk, hiszen a kontrasztanyag az SDS-el asszociátumokat képező fehérjék előtt vándorol (37. ábra). Így, bár a szérumban a Gd(DTPA-BMA)-nál nagyságrendekkel nagyobb koncentrációjú fehérje is megtalálható, mégsem zavarja az elválasztást (37.d ábra). Ezért a Gd³⁺ tartalmú komplexek MEKC meghatározásánál a szérummintákat csak centrifugálnunk kellett, hogy eltávolítsuk azokat a szilárd részecskéket, amelyek eltömíthetnék a kapillárist. Az Omniscan-el kezelt betegektől a gyógyszerbeadást követően 40 és 180 perccel levett szérummintákban a Gd(DTPA-BMA) tartalom $0,12 \pm 0,015$ mM és $0,075 \pm 0,0032$ mM volt.




5.2 Elektroforetikus elválasztások mikrocsipben

5.2.1 Nyomással történő injektálás kidolgozása mikrofluidikai csipekhez [XVII-XIX]

A mikrofluidikai kutatásaink egyik célja az volt, hogy injektálási módszert dolgozzunk ki a néhányszor száz pikoliternyi térfogatú folyadékminták csipbe való injektálásához, hogy ily módon érhessünk el hatékony zónaelektroforetikus elválasztást. Ellentétben az irodalomban található nagyszámú, EK elven történő injektálási módszerrel [71-75] (a 38. ábrán egy két komponensű festékkeverék ilyen módszerrel történt EK injektálását és CZE elválasztását mutatjuk be), munkánk során olyan új, nyomással történő injektálási eljárás kidolgozását tűztük ki célul, melynél nem jelentkeznek az EK injektálásokra jellemző, mennyiségi meghatározások pontosságát csökkentő hibák (lásd 2.1.1 fejezet).



38. ábra. Két komponensű festékkeverék EK injektálásának és CZE elválasztásának lépései. Először a keresztalakú csatornarendszer rövidebbik csatornájának két végére kapcsolunk feszültséget oly módon, hogy a negatív töltésű elektródot a mintát tartalmazó csatornavéghez illesztjük. Miután a feszültség hatására a föld elektród felé áramló minta kitölti a kereszteződést, feszültséget kapcsolunk a másik (hosszabbik) csatornavégekre úgy, hogy a negatív elektródot a rövidebb csatornavéghez kapcsoljuk, így a kereszteződésben levő parányi mintarészlet "kiszakad" a szeparációs (hosszabbik) csatornaszakaszba, miközben a komponensek eltérő sebességgel vándorolnak a föld elektród felé. (A PDMS mikrocsip csatornáinak szélessége 50 µm, a pufferelektrolit: 25 mM foszfát, pH: 6,8, az alkalmazott feszültség 400 V, illetve 800 V, minta: kék és sárga ételfesték keveréke)

5.2.1.1 Mágneses szeleppel történő mintainjektálás [XVII-XVIII]

A mikrofluidikai kutatások egyik legfontosabb iránya a kezdetektől a különböző mikrofluidikai komponensek (keverők, pumpák, kapcsolóelemek, szelepek) kifejlesztése. A mikroszelepek segítségével a csatornákban a folyadékok áramlását lehet manipulálni (leállítani vagy újraindítani), aminek eredményeképpen nagyon kis térfogatú folyadék részletet is bejuttathatunk egy szeparációs csatornába. Mindezidáig sokféle aktív vagy passzív működésű mikroszelepet leírtak, melyek mechanikai, nem-mechanikai vagy külső rendszerűek [167-175]. Az általunk kifejlesztett mikroszelep azon az elven alapul, hogy egy folyadékcsatorna vékony, rugalmas PDMS fala összenyomható egy mágnes és egy fémtest segítségével, így egy folyadékcsatorna reverzibilisen nyitható vagy zárható.



39. ábra. Egy olyan PDMS-ből készült mikrocsip fényképe, amelyben egy keresztalakú folyadékcsatorna két oldalcsatornáján mágneses szelep működtethető (a,). A PDMS membrán rugalmasságát illusztráló mikroszkópos fényképfelvétel (b,). Egy 30 μm vastagságú PDMS membránt egy mágnesnek a membrán (fémtest) irányába történő mozgatásával deformáltuk. A mágneses szelep keresztmetszeti fényképe működés (csatorna elzárása) közben (c,).

A mágneses szeleppel ellátott mikrofluidikai csip két egymásra illesztett PDMS lapból áll. A felső, vastagabb PDMS lap tartja a mágneses szelepek fémtest részeit, és ehhez a laphoz lehet csatlakoztatni a folyadék pumpacsövek, illetve az elektródok csatlakozásait is. A lyukasztással kialakított ~1 mm átmérőjű (a szelepek fémtestjeinél kissé nagyobb) nyílásokba helyezhetők el a fémtestek (jól mágnesezhető fémhuzal 3-4 mm hosszú, 0,7 mm átmérőjű darabjai). Az alsó

vékonyabb PDMS lap (membrán) tartalmazza a keresztalakú mikrofluidikai csatornát, melynek magassága 25 µm, szélessége 100 µm. A két PDMS lapot mikroszkóp alatt helyeztük megfelelő pozícióban egymásra, majd egy vékony üveglapkához (200 µm vastag mikroszkópiás fedőlemez, VWR) irreverzibilisen rögzítettük levegő plazma segítségével. A mágneses szelep működtetéséhez 3 x 3 x 1,5 mm méretű NdFeB állandó mágnest (K&J Magnetics, Inc., Jamison, PA, USA) használtunk.

A mágneses szelep működtetése során egy 25 µm vastagságú, a mikrofluidikai csatorna fölött található, rugalmas PDMS réteg deformálása történik egy állandó mágnes felé mozgó parányi fémtest által (40. ábra). A csatorna nyitásához a mágnest kb. 5 mm távolságra kell elhúzni a mikrocsip aljától, míg a szelep zárásához a mágnest a mikrocsip (az üveg fedőlemez) aljához kell tolni. A mágneses szelepet jelenleg manuálisan működtetjük, de elvileg automatizált működtetés is lehetséges elektromágnesek alkalmazásával. A mágneses szelepek közötti távolság legalább 4 mm kell legyen, a parányi mágnesek erőterei közötti lehetséges zavarások elkerülése miatt. A mágnes segítségével elérhető maximális deformációt oly módon tanulmányoztuk, hogy egy 30 µm vastagságú PDMS membránt egy mágnesnek a membrán (fémtest) irányába történő mozgatásával deformáltuk, a membrán legnagyobb deformálását jelentő pozíció a nyugalmi ponttól 7 mm-re volt (39.b ábra).



NYITÁS



A PDMS membrán deformációjának mértéke függ a membrán vastagságától is. A különböző vastagságú membránokat spincoater segítségével készítettük (különböző sebességgel forgattuk meg a készülék forgó lapkájára öntött nyers PDMS folyadékot). A kapott PDMS film vastagsága fordítottan arányos a forgatás sebességével [175]. A 41. ábra mutatja, hogy a PDMS membrán esetén elérhető deformáció nagyban növekszik, amennyiben a membrán vastagsága 100 µm alá csökken. Ezek alapján hatékony mágneses szelep abban az esetben működtethető a csipben, ha a folyadékcsatorna feletti PDMS réteg vastagsága nem haladja meg az 50 µm-t. Bár a nagyon vékony PDMS membránnal a szelep hatékonyan működtethető, a gyakorlatban 50 µm-nél lényegesen vékonyabb, csekély mechanikai stabilitású polimerfilmet rendkívül nehéz áthelyezni a spincoater forgólapkájáról az üveg fedőlemez hordozóra, ezért a mágneses szelephez 50-75 µm vastag PDMS réteget készítettünk (a csatorna magassága 25 µm).



41. ábra. Különböző vastagságú PDMS rétegek esetén elérhető maximális deformáció. A maximális deformációt úgy határoztuk meg, hogy a mágnest a fémtestet tartalmazó PDMS membrán felszínéhez vittük, majd a mágnest lassan addig mozgattuk a membránnal ellentétes irányba, míg a mágnes és a PDMS réteg el nem vált egymástól.

A mágneses szelep működésének hatékonyságát a 42. ábrán bemutatott mikroszkópos fényképfelvételekkel igazoljuk. Egy mikrofluidikai csip keresztalakú csatornája két oldalcsatornájában alakítottunk ki mágneses szelepeket. Az átlátszó vizet és a kék festéket állandó sebességgel áramoltattuk perisztaltikus pumpával. Miközben az egyik mágneses szelep nyitott állapotú, a másik mágneses szelep egymást követő nyitásával és zárásával az egyik csatornaszakaszban mintadugót alakíthatunk ki. Jól megfigyelhető, hogy a szelep zárásakor a festék egyáltalán nem szivárog át a szelepen keresztül (42. ábra). A szelepet egy egyenes csatornában elhelyezve 100 kPa nyomás 30 percig történő alkalmazásával a festék nem jutott át a zárt szelepen.

A kialakított mintadugók hossza a mágneses szelep nyitásának és zárásának időbeni alakulásától (frekvenciájától) függ. Az injektáláskor kapott festékek szegmenseit spektrofotométerrel detektáltuk (43. ábra). A szelep kellően gyors (1-2 s) zárása/nyitása nanoliter nagyságrendű mintadugót eredményez, mely alkalmas lehet a mikrocsipben történő elektroforetikus elválasztásokhoz is.

A mágneses szeleppel nem teljes (részleges) zárás is elérhető, ilyenkor az áramoltatott folyadék átjut ugyan a szelep alatt, de a szelep alatti szűkület alkalmas kromatográfiás részecskék (pl, 10 µm átmérőjű C18 részecskék) visszatartására és így kromatográfiás töltet kialakítására (lásd 5.2.3. fejezet).



42. ábra. Mikroszkópos fényképek egy mikrocsip keresztalakú csatornarendszere két oldalcsatornájában kialakított mágneses szelep működéséről. A vizet (**A**) és festéket (**B**) 0,5 μ L/perc sebességgel pumpáltuk a nyíllal jelölt irányokból. Miközben a jobboldali (**C**) csatornaszakaszon található mágneses szelep nyitott, az alsó (**D**) csatornaszakaszon levő mágneses szelepet egymást követően nyitjuk (**b**, **c**) és zárjuk (**a**,), így az alsó (**D**) csatornaszakaszban mintadugót alakíthatunk ki.





5.2.1.2 Folyadékmegosztásos mintainjektálás [XIX]

Mikrocsip elektroforézis esetén (éppen úgy, ahogyan kapilláris elektroforézisnél is) az optimális injektálási eljárással szemben támasztott fontos követelmény, hogy a mintabevitel ne legyen hibával terhelt, a feszültség alkalmazása pedig azért is kerülendő, mivel az elektródon történő elektrokémiai folyamatok változást okozhatnak a mintaösszetételben, illetve az elektrolízis miatt a puffer pH-jában is. A PDMS mikrocsipekbe történő injektálásra olyan módszert fejlesztettünk ki, amely hidrodinamikus elven alapult és egy egyszerű perisztaltikus vagy fecskendőpumpa segítségével megvalósítható. A mintaoldat áramlása, a kis mintadugó kialakulása és a zónaelektroforézis szemléltetése érdekében festékeket használtunk. Az általunk kidogozott, nyomással történő injektálás elve hasonlít a gázkromatográfiás (GC) gyakorlatban használt *split* (megosztásos, lefúvatásos) injektáláshoz [176, 177]. (A GC-nél split injektáláskor a gőzfázisba vitt minta az injektorban összekeveredik a vivőgázzal, majd két részre oszlik: a kisebbik része a vivőgázzal a kromatográfiás kolonnára jut, a többi egy nyíláson keresztül kifúvódik. A megosztási arány általában 1:10 és 1:1000 közötti.) A split injektálás elvét az LC-ben gyakorlatilag nem használják.

Az általunk kidolgozott folyadékmegosztásos mintainjektálás a Hagen-Poiseuille törvényen ((5) egyenlet) alapul, mely számszerűen jellemzi az áramlási viszonyokat a mikrofluidikai csipben (vízszintes csatorna, lamináris áramlás). A törvényből következik, hogy a csatorna szélességétől rendkívül nagymértékben (*d* a negyedik hatványon szerepel) függ a csatornába injektált minta térfogatának (térfogati áramlási sebességének) eloszlása a különböző szélességű csatornák között. Az is nyilvánvaló a törvény alapján, hogy fordított arányosság áll fenn a szeparációs





csatornába jutott minta térfogata és a csatorna/kapilláris hossza között, tehát az egyforma szélességű csatornák közül a hosszabb csatornába jut kevesebb minta. A 44. ábrán látható, hogy az injektálási port (inlet) felől érkező mintatérfogat hogyan oszlik meg a különböző szélességű és hosszúságú csatornák (outlet 1-3 felé menő csatornaszakaszok) között.

A 44. ábrán bemutatott csatornakereszteződésben érvényes térfogatáramlási viszonyok leírása a (22) egyenlet alapján történhet:

$$\frac{V_3}{V_0} = \frac{\frac{d_3^4}{L_3}}{\frac{d_3^4}{L_3} + \frac{d_2^4}{L_2} + \frac{d_1^4}{L_1}}$$
(22)

Amennyiben a mikrocsipben a szélesebb csatorna szélessége négyszer nagyobb a többihez (keskenyebbekéhez) képest, a szeparációs csatorna hossza pedig tízszerese a többi csatornáénak, azaz

$$d_1 = 4d \quad \text{és} \quad d_0 = d_2 = d_3 = d, \quad \text{illetve}$$
(23)

$$L_3=10L$$
 és $L_0=L_1=L_2=L$, (24)

akkor mindezekből következik, hogy

$$V_3 = \frac{V_0}{4^4 \cdot 10}, \text{ azaz } V_3 = \frac{V_0}{2560}$$
 (25)

Ez azt jelenti, hogy ha a csatornába beinjektált minta térfogata (V₀) 1 µl, akkor a szeparációs csatornába jutott minta mennyisége (V₃) csupán 0,39 nL, amely a 10 cm hosszúságú csatorna térfogatának 0,26 %-a (260 µm hosszúságú mintadugó, a csatorna mélysége mindenütt 30 µm), ami optimális térfogat a kapilláris elektroforetikus elemzések tapasztalatai alapján. Az ilyen elméleti megfontolások után elkészített mikrocsipben a mintainjektálás bemutatására két komponensből álló festékkeveréket használtunk, hogy az áramlási viszonyokat, a kialakuló mintadugót, valamint a mintabevitelt követő elektroforetikus elválasztást mikroszkóppal követhessük.



45. ábra. Nyomással történő, folyadékmegosztás elvén alapuló mintainjektálás (a-d) és az injektálást követő zónaelektroforetikus elválasztás (e-f) mikroszkópos fényképei.

Körülmények: 25 mM foszfát, pH= 6,8, az elektroforézishez alkalmazott feszültség: 800 V, minta: kék és sárga ételfesték.

A kidolgozott injektálási módszer jelentőségét az adja, hogy jelenleg alig ismert olyan mintabeviteli módszer, amellyel pusztán nyomás alkalmazásával, egyszerű eszközök felhasználásával lehetne ilyen kis térfogatú minta beinjektálását elvégezni mikrofluidikai csipekbe. A csatornák szélességének és hosszainak változtatásával az előzőekhez képest kisebb vagy nagyobb mintadugó injektálása is megoldható. Egy nagyobb mintadugó injektálását követően elektrodúsítást érhetünk el, vagy a zónaelektroforetikus elválasztás helyett izotachoforetikus dúsításra nyílhat lehetőség. Kis minta mennyiségnél (rövid mintadugó hosszúságnál) gyors, rövid csatornahosszon történő elektroforetikus elválasztást lehet elérni. Fontos kiemelni, hogy az injektált mintadugó térfogata elvileg nem függ a pumpa sebességétől, kizárólag a csatornák átmérőinek aránya és hossza, illetve az eredeti minta térfogata számít.

A folyadékmegosztásos injektálás precizitását az határozza meg, hogy milyen a mikrocsip inlet portjába egy mikroinjektor segítégével bejuttatott elsődleges mintarészlet injektálásának precizitása. Manuális, két állású mikroinjektort (Rheodyne 7520) alkalmazva a 0,5 µL térfogatú mintának az inlet portba injektálásához, a csatornák kereszteződésében kialakított és a szeparációs csatornába juttatott ~0,5 nL térfogatú minta többszöri injektálásának szórása a

csúcsmagasságok és csúcsterületek esetén 4,8, illetve 3,7 RSD% (N=6) volt (46. ábra).



46. ábra. Egy mintaoldatnak a folyadékmegosztásos módszerrel történő többszöri injektálása és a mikrocsip szeparációs csatornájába juttatásával kapott jelek. (minta: kék ételfesték (brillantkék FCF); mikrocsipbe bejuttatott mintatérfogat: 0,5 μL; szeparációs csatornába juttatott és detektált mintatérfogat 0,5 nL; a színintenzitás-változás detektálása a mikroszkóp kamerájával történt.)

A 45. ábrán bemutatott elválasztásnál a festékkeverékben található sárga és kék komponensek a 6,8-as pH-jú elektrolitban anionosak, ezért mindkettő a pozitív elektród felé mozog feszültség hatására. Mivel a sárga festék elektroforetikus mozgékonysága nagyobb (a töltés/méret aránya nagyobb), így az elektroforézis során a kék komponens előtt halad az anód felé (45. ábra e-f). Bár az elváló komponensek azonos irányba, az elektroozmotikus áramlás (EOF) irányával ellentétesen mozognak, a komponensek eredő mozgékonysága az EOF változásával nagymértékben változhat, akár a vándorlásuk iránya is megfordulhat (A hidrofób falú PDMS mikrocsipben az EOF viszonylag kicsi).

Ismert, hogy a PDMS anyaga képes adszorbeálni a legkülönbözőbb anyagokat, így a mintában, illetve a pufferben lévő komponenseket is (erről részletesen lesz szó a 5.3 fejezetben). Emiatt az elemzések során a felületi töltésviszonyok állandóan változhatnak, ami az EOF változásával járhat. Bár az irodalomban ellentmondásos közlések találhatók a kezeletlen PDMS felületi töltését illetően, a legtöbb munkában csekély katódirányú EOF-t írtak le [178-181], és magunk is hasonló tapasztalatokat szereztünk ezzel kapcsolatban. А jól reprodukálható elválasztásokhoz a csatorna falának egységes, állandó töltésű és minőségű felülettel kell rendelkeznie. Ennek kialakításához különböző anionos (nátrium-dodecilszulfát (SDS)), kationos (cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB)), illetve neutrális (metil-cellulóz) felületaktív anyagokat alkalmaztunk (47. ábra). A felületmódosító anyagok 1 mM koncentrációjú oldatával 1 percig öblítettük a

mikrocsip csatornáját és az elválasztások között félóránként az átöblítést megismételtük. A megkötődött felületmódosítókat szerves oldószerrel (pl. metanol) könnyen, vízzel csak lassan lehet eltávolítani.



47. ábra. A vizsgált komponensek (sárga (S) (tartrazin) és kék (K) (brillantkék FCF) ételfesték) és az EOF mozgékonyságainak illusztrálása és a csatorna falának különböző detergensekkel való előkondícionálása (mosása) után kapott elektroferogramok. A csip

csatornáit 1 mM SDS-sel (a), CTAB-vel (b) és metil-cellulózzal (c) öblítettük az elektroforézis előtt 1 percig. Az alkalmazott puffer: 25 mM foszfát, pH 6,8, szeparációs távolság: 10 mm. Az elválasztott zónák színintezitását a mikroszkóp kamerájával mértük.

Az SDS anionos detergens lévén negatív töltésűvé teszi a PDMS felületét, ezáltal megnövelve a katód irányú EOF sebességét. Ilyen körülmények között a komponensek vándorlásának irányai módosulnak az anionos detergenssel nem kezelt csipben tapasztalthoz képest: az EOF nagyobbá válhat az anionok elektroforetikus sebességénél, így az EOF irányával megegyezően vándorolnak a

komponensek. Ebben az esetben a komponenseket akkor detektálhatjuk, ha (az előzőektől eltérően) a szeparációs csatorna végére a negatív feszültséget kapcsoljuk. Mivel a kevésbé anionos kék komponens mozgékonyságának és az EOF mozgékonyságának (előjeles) összege nagyobb, mint a sárga komponensre vonatkozó ugyanezen érték, a kék komponens halad a szeparációs csatornában elől, melyet a sárga komponens követ (47.a. ábra).

A kationos detergenssel történő felületkezeléskor a töltésnélküli vagy negatív töltésű csatorna fala pozitív töltésűvé válik a CTAB adszorpciója miatt. Ez azt eredményezi, hogy az EOF értéke nemcsak csökken, hanem irányt is válthat, azaz az elektroozmotikus áramlás anód irányú lesz. Mivel a sárga és kék komponensek is az anód irányába vándorolnak, a sebességek összegződnek. Az elektroforézis során a nagyobb elektroforetikus mozgékonyságú sárga komponens halad elől, a kék pedig utána (47.b. ábra). Ebben az esetben a jelentőssé vált EOF hozzáadódása a komponensek vándorlásához nem előnyös, mert a gyorsabban mozgó komponensek hamar, a teljes elválasztódás előtt elérik a detektálás helyét.

A töltéssel nem rendelkező metil-cellulóz polimer részecskék a PDMS falára adszorbeálódva megszüntetik a negatív felületi töltést és ezáltal az elektroozmotikus áramlás is gyakorlatilag megszűnik a rendszerben. Így az elektroforetikus elválasztás szempontjából kizárólag a komponensek eltérő elektroforetikus mozgékonyságai lesznek a meghatározók. A szeparációs csatorna végére a pozitív feszültséget kapcsolva a rövid szeparációs szakasz ellenére a teljes elválasztás megtörténik, vagyis a legjobb elválasztási hatékonyságot a metilcellulózzal történő felületmódosítás után végzett elektroforézis során kaptuk (47.c. ábra).

A 48. ábrán bemutatott mikrocsip elektroforetikus elválasztásokat a csatorna kereszteződésétől 10 mm távolságra detektáltuk. Ez volt az a legkisebb távolság ahol a komponensek éppen teljesen elváltak egymástól, és ehhez csupán 15 s-ra volt szükség (48.a. ábra). A felbontás természetesen növelhető, ha a kereszteződéstől távolabb detektáltunk, de a hosszabb szeparációs távolsághoz arányosan nagyobb elemzési idő is társul (48.b. ábra).

A hagyományos CE-nél a készülékek geometriai elrendezéséből adódóan a lehetséges legkisebb effektív elválasztási hosszúság 85 mm (ún. "short end" injektálást alkalmazva az Agilent készülékeknél). Itt, a nagyobb effektív hosszúság alkalmazása miatt nagy felbontás érhető el, de ehhez legalább 130 s analízisidő szükséges. (48.c. ábra). A 48. ábra elektroferogramjain látható, hogy mind a csipen, mind a CE-vel végzett elemzéseknél nagyon hasonló az elválasztási profil, ami érthető is, hiszen az alkalmazott pufferrendszer, illetve az elválasztás mechanizmusa (CZE) megegyezett, különbség csak az EOF eltérő hozzájárulása, vagy az esetlegesen fellépő, eltérő fali adszorpciós hatások miatt várható.

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés



48. ábra. Ételfestékek (FD&C red#40 és FD&C blue#1)) CZE elválasztásával PDMS mikrocsipen 10 mm (a) és 45 mm (b) elválasztási hosszúságnál, illetve Agilent CE készülékben, kvarckapillárison 85 mm effektív hosszúság mellett (c) kapott elektroferogramok. (Az alkalmazott puffer: 25 mM foszfát, pH 6,8. A PDMS mikrocsip csatornáját az elektroforézis előtt 1 mM metilcellulózzal öblítettük át 1 percig. Az elválasztott zónákat a mikroszkóp kamerájával (a, és b,), illetve 200 nm-es hullámhosszon fotometriásan (c,) detektáltuk)

A kidolgozott mintainjektálási eljárással nemcsak a legkülönbözőbb vegyületek injektálhatók töltésüktől és méretüktől függetlenül a mikrocsip csatornájába, de emellett sikeresen injektáltunk akár nagyobb méretű részecskéket, sejteket is (49. ábra). Kísérleteinkből azt állapítottuk meg, hogy a különböző sejtek feszültség hatására eltérő sebességgel, vagy akár eltérő irányokba mozoghatnak, illetve, hogy az azonos fajú, de különböző életkorú sejtek elektroforetikus mozgékonysága is különböző.



49. ábra. Nyomással történő, folyadékmegosztás elvén alapuló mintainjektálás alkalmazása sejtek (Microcystis aeruginosa) szeparációs csatornába juttatására (a,). A 0,5 nL térfogatú kis mintadugóban áramoltatott sejtek a csatornában (b,). (A csatorna szélessége 50 μm)

5.2.2 Miniatürizált kapilláris elektroforetikus rendszer kialakítása [XX-XXI]

Munkánk során egy olyan mikrocsip alapú kapilláris elektroforézis rendszert fejlesztettünk ki, melynél a mintainjektálás a mikrocsipben, az elektroforetikus elválasztás pedig - hasonlóan, mint a hagyományos CE készülékekben - egy kvarckapillárisban történik (50. ábra). Célunk az volt, hogy ne csak az elektroforetikus elválasztást miniatürizáljuk, de a komplett rendszer hordozható, kis méretű legyen (attól, hogy egy elektroforetikus elválasztás parányi mikrocsipben történik, maga a teljes berendezés még sokszor súlyos, nagyméretű (pl. Bioanalyzer 2100, Agilent)). A hordozható miniatürizált CE rendszer (μ CE) kiépítéséhez új típusú injektorra, illetve a nagyfeszültségű tápegység és a detektor miniatürizálására volt szükség. Ennek megfelelően a rendszer felépítéséhez az egyetemi spin-off cégünk (CEtox Kft.) által kifejlesztett, akkumulátorról üzemeltethető, kis méretű, nagyfeszültségű (0,2 - 2,5 kV) tápegységet és miniatürizált száloptikás spektrofotométert (Avantes) használtuk.

A miniatürizált CE rendszer hordozójaként szolgáló PDMS alapú mikrocsipben a néhány nL-nyi mintadugó kialakításához az 5.2.1.2 fejezetben ismertetett, kis nyomással történő, folyadékmegosztás elvén alapuló mintabevitelt alkalmaztuk. Mivel a mintainjektálást egy 200 μ m és három 50 μ m széles csatorna kereszteződésében végeztük (50.c ábra), és mert a kereszteződés után a KI porthoz csatlakozó kvarckapilláris hússzor hosszabb, mint a többi csatorna, a BE portnál beinjektált 2 μ L minta hozzávetőlegesen ötezredrésze (~0,5 nL) távozik a kereszteződésből a szeparációs kapilláris felé (KI port felé).

A PDMS mikrocsip nem csupán a mintainjektálást teszi lehetővé nanoliter tartományban, de a rugalmas műanyaghoz a kvarckapillárisok végei - maximum 1 bar nyomás alkalmazása esetén - szivárgásmentesen, egyszerűen csatlakoztathatók (a port átmérője kb. 300 µm, valamivel kisebb, mint a kvarckapilláris külső átmérője (360 µm)), így maga a műanyag mikrocsip tartja a kapillárist (20 cm hosszú, belső/külső átmérők: 50 µm/365 µm) (50.a ábra). A Pt elektródokat a CE kapilláris két végéhez közel, a mikrocsip KI2 és KI portjaiban helyeztük el (50.b. ábra). Az elektródnál viszonylag nagy puffertartályt érdemes kialakítani, mert az elektroforézis során jelentkező elektrolízis megváltoztathatja puffer pH-ját, és így az EOF mértékét.

A spektrofotometriás detektálás megvalósítása gyakorlatilag megegyezett a hagyományos CE készülékeknél ismert konstrukcióval, ugyanis ez közvetlenül a kvarckapillárison történt. A spektrofotometriás detektor optikai szálait (egyik a fényforrás felől a fényt vezeti a detektorcellaként használt kapilláris szakaszhoz, a másik a kapillárison áthaladt fényt továbbítja detektorba) egy háromágú PEEK adapterben az alsó részén egy 400 µm átmérőjű lyukat fúrtunk a CE kapilláris kivezetéséhez) egyvonalba pozícionáltuk úgy, hogy közöttük csupán a kapilláris

volt. Az optikai szálak érintették a kapilláris felületét (50.d ábra), hogy a fény minél nagyobb része jusson a kapilláris belsejébe, vagy azon túl a másik (detektáló) optikai szálba.



50. ábra. A miniatürizált kapilláris elektroforetikus rendszer felépítése (a). A PDMS mikrocsipben (b,) történik a folyadékmegosztás elvén (c,) alapuló mintainjektálás. A CE kapilláris végén egy PEEK adapterben, száloptikák segítségével történik a detektálás (d). A CE kapilláris, pumpacsövek, elektródok csatlakoztatása közvetlenül a rugalmas műanyag portjaiba történik (a,).

Az összeállított PDMS-alapú mikrocsip - kvarckapilláris (μCE) rendszerbe a korábban, a hagyományos CE technikára kidolgozott analitikai módszerek elvileg változtatás nélkül átvihetők, hiszen az elválasztóegység (kvarckapilláris) és az elektrolitrendszer (puffer) ugyanaz. A rendszert a korábbi munkánkban már részletesen optimált és vizsgált hat kefalosporin antibiotikum CZE elválasztásával [XI, XII] teszteltük, és nagyon hasonló körülmények között, CE készülékben elvégzett elemzéssel hasonlítottuk össze (51. ábra). A μCE rendszerben a kefalosporinokat 8,5 perc alatt alapvonalon sikerült egymástól elválasztani. A rövid effektív kapillárishosszak ellenére az elméleti tányérszámok mindkét rendszerben 5 000-15 000 között változtak. A két különböző rendszerben végzett elválasztás során

megjelenő csúcsok sorrendje, a csúcsok alakja hasonló. A két elemzéskor a csúcsmagasságok arányában jelentkező eltérések a kefalosporinok vizes oldatban való bomlásával magyarázhatóak. A μ CE rendszernél 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 μ CE rendszerben tapasztalt rossz érzékenység oka, hogy a fényforrás felől érkező fény széttart a száloptikából 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.) A jövőben a fény megfelelő fókuszálását és a csatorna közvetlen közelében rés kialakítását tervezzük.





Körülmények: 50 mM foszfátpuffer, pH= 6,8, U= +15 kV, λ = 270 nm, minta: 2 mg/mL cefadroxil (CFD), cefaclor (CFC), ceftazidim (CZI), cefuroxim (CFR), ceftriaxon (CTR), cefixim (CIX)

CE: L_{eff} = 22 cm, 50 mbar 2s,

 μ CE: L_{eff}= 18 cm, folyadékmegosztásos injektálás (0,5 μ L \rightarrow ~ 200 pL)

A kétféle módszert összehasonlítva megállapítható, hogy az egyszerű és olcsó eszközökből, illetve az általunk tervezett/elkészített mikrocsip és kidolgozott injektálási módszer alkalmazásával összeállított miniatürizált és hordozható kapilláris elektroforézis rendszer alkalmas akár kémiailag nagyon hasonló komponensek gyors, hatékony elválasztására. Az elválasztási hatékonyságokat jellemző elméleti tányérszám értékek jó egyezést mutattak a két rendszer esetén (amit jó eredménynek tartunk a miniatürizált rendszer házilagos összeállítását tekintve). Természetesen jobb hatékonyság lett volna elérhető, igaz jóval hosszabb analízis idő alatt, amennyiben a hagyományos CE-nél általánosan használt, 2-3-szor hosszabb kapillárisokat használnánk.

A kifejlesztett miniatürizált CE rendszerben a folyadékmegosztásos mintabevitelt alkalmazva úgy van lehetőség sorozatos mintainjektálásra, hogy az az elektroforézis közben akár megszakítás nélkül is végezhető (a CE készülékekben egyidejűleg mintainjektálást és elektroforézist nem tudunk végezni). Megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy egy kétkomponensű mintát (cefadroxil és cefuroxim) többször egymás után injektálva a komponensek reprodukálhatóan elválaszthatók-e. A folyamatos elektroforézis mellett a mintákat két perces időközönként injektáltuk be (52. ábra). A 3-4 másodpercig tartó injektálás (kétállású mintainjektor injektálástöltés pozíciói közötti időtartam) alatt lekapcsolhatjuk az elektroforetizáló feszültséget, hogy pusztán a hidrodinamikai hatások érvényesüljenek az injektálás pillanatában (e rövid időtartamú nyomás jelenléte a szeparációs kapillárisban elhanyagolható hatású az elválasztásra). Azonban az elektroforetizáló feszültség fenntartása mellett is injektálhatunk, ugyanis a folyadéknak a bemeneti portból a csatornák kereszteződésébe történő áramoltatása döntően a nyomás hatására történik, a feszültség hatása - a mikroszkópos vizuális megfigyelés alapján elhanyagolható. Az elektroferogramon látható, hogy az elemzés idejének előrehaladása során egyre növekszik a két komponens csúcsa közötti távolság, annak ellenére, hogy mindig azonos időközönként injektáltunk, a 4. injektálást követően a CFD csúcsa pedig már részlegesen összeolvad az előző sorozat utolsó komponensével. Ez a jelenség az EOF folyamatos és gyors változásával magyarázható, a folyamatosan csökkenő EOF egyre lassabban szállítja a komponenseket a detektor felé. Az EOF gyors változására pedig az adhatott módot, hogy PDMS mikrocsipbe kialakított elektrolittartályok térfogatai túl kicsik (100 μL), így viszonylag rövid idejű elektroforéziskor az elektrolittartályban fellépő elektrolízis is képes megváltoztatni az elektrolit pH-ját, ami aztán bejutva a szeparációs kapillárisba eltérő mértékű EOF-et és elektrolit pH-t eredményezett, emiatt a komponensek migrációs sebességei változnak. Ezen vizsgálatok hívták fel a figyelmet arra, hogy a mikrocsip, illetve a miniatürizált rendszerekben a teljes kapilláris/csatorna rendszer térfogatát kb. 1000-szeresen meghaladó térfogatú elektrolittartályokra (a mi rendszerünben kb. 500 µL) van szükség.



52. ábra. Sorozatinjektálás miniatürizált CE rendszerben.

Körülmények: 50 mM foszfát, pH: 6,8, L_{eff} = 18 cm, +20 kV, folyadékmegosztásos injektálás 2 percenként (0,5 μ L \rightarrow ~200 pL), λ = 270 nm, n= 4, minta: 2 mg/mL cefadroxil (CFD), cefuroxim (CFR).

5.2.3 Kromatográfiás töltetek kialakítása mikrofluidikai csipekben [XXII-XXVI]

A mikrofluidikai analitikai kutatások egyik iránya a kromatográfiás elválasztási technikák miniatürizálása, a különféle kromatográfiás töltetek csipben való kialakítása és alkalmazása. A kialakított tölteten természetszerűen elektrokromatográfiás elválasztásra is lehetőség van.

5.2.3.1 Egycsatornás töltetek kialakítása [XXII-XXIV]

Több olyan eljárásról is beszámoltunk, ahol a hagyományos kromatográfiás állófázisok (pl. C18) PDMS-ből készült csipbe történő integrálása frit kialakítása nélkül lehetséges. A kromatográfiás töltet kialakítása úgy történik, hogy a folyadékcsatorna kiválasztott pontja felett a rugalmas PDMS csip tetejét enyhén lenyomjuk (kemény tárggyal [XXII] vagy mágneses szeleppel [XVII, XVIII]), aminek hatására a csatorna magassága az adott helyen az eredeti magasság 10-20%-ára csökken (a 35 µm magas csatorna megközelítőleg 6 µm-re szűkül). Az ily módon ideiglenesen kialakított szűkület felé áramoltatott részecskék visszatartódnak, míg a folyadék szabadon átáramlik (53.a ábra).



53. ábra. Kromatográfiás töltetek kialakítása a PDMS mikrocsip 50 μm széles, 35 μm magas csatornájában a rugalmas mikrocsip csatornájának összenyomásával és a kromatográfiás részecskék (5 μm, C18) áramoltatásával a kialakított szűkület felé (a). Mikroszkópos fényképek a kialakított töltetekről (b, c). A (b) fényképen a szűkületet egy a kép jobb szélén található mágnes szeleppel alakítottuk ki.

Az elkészült töltet esetén különböző stabilizáló hatásokat figyeltünk meg. Az egyik ilyen hatás az ún. zárókő-hatás (54. ábra), ahol a szűkület felé áramoltatott részecskék közül az elülső részecskék megszorulnak a csatornában és ezek tartják vissza a mögöttük jövő részecskéket, egyfajta zárókő szerepét betöltve.



54. ábra. A kromatográfiás részecskéknek egy csatorna szűkületénél jelentkező visszatartásakor fellépő zárókő-hatás sematikus illusztrálása

Egy másik ilyen stabilizáló hatás az ún. bilincs-hatás (55. ábra). Ekkor a folyadék pumpálásakor (kb. 2-3 bar nyomás hatására) a csatorna fala kiszélesedik. Ezt a megnövelt térfogatot a részecskék teljes mértékben kitöltik, majd amikor a folyadék

pumpálását leállítjuk, a rugalmas falú csatorna újra összehúzódik, a töltet körül egy folyamatos feszültség, összeszorító erő alakul ki. Ez a feszültség a fő oka a töltetek stabilitásának a rugalmas anyagú csipekben.



55. ábra. A kromatográfiás részecskék csatornában való visszatartásakor fellépő bilincshatás sematikus illusztrálása

A töltet stabilitásához a részecskék és a hidrofób tulajdonságú fal között jelentkező erős kölcsönhatások is hozzájárulnak. A PDMS fal 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) (56. ábra). E legszélső részecskék beágyazódásának mértéke nagyban függ a töltés során alkalmazott nyomás nagyságától, illetve a PDMS fal elasztikusságának mértékétől. (A PDMS elasztikus, rugalmas sajátságait a mágneses szelep kidolgozása kapcsán az 5.2.1.1. fejezetben tanulmányoztuk.)



56. ábra. A horgony-hatást illusztráló mikroszkópos fénykép. A kromatográfiás töltet legkülső részecskéi (5 μm, C18) deformálják a rugalmas fal alakját, részlegesen behatolnak a falba.

A folyadékkromatográfiában a fal-hatás annak a következménye, hogy egy merev (kolonna) fal közvetlen közelében az állófázis részecskéi közötti üres terek nagyobbak, mint a töltet belsejében (57. ábra), emiatt a mobilfázis a fal mellett gyorsabban áramlik [182, 183]. E fal-hatás következménye az elválasztott komponensek sávjainak kiszélesedése, ami a puha, könnyen deformálható PDMS falú csatornákban kialakított töltetekben nyilvánvalóan kisebb.



57. ábra. A fal-hatás illusztrálása kemény anyagú kapillárisokban/kolonnákban (a), illetve puha PDMS-ből készült mikrocsipek (b) esetén.

Kutatásaink folytatásaként a kromatográfiás részecskéket nem egy ideiglenes, hanem egy maradandó kialakítású szűkület segítségével tartottuk vissza [XXIV]. A szűkület a fotolitográfiás maszkra rajzolt vonal hatására jött létre (58.a ábra). (A szűkület a maszkon létrehozott vonal miatt alakul ki az öntőforma készítése során.) A szűkület helyén a csatorna átmérője kb. 20 µm szélesre szűkült, miközben a csatorna magassága is jelentősen csökkent. Ez a szűkület a folyadék szempontjából szintén átjárható volt, de az apró részecskék megragadtak benne, így tartva vissza az egész töltetet (58.d ábra). A hagyományos, 5-10 µm méretű kromatográfiás részecskéken kívül új, C18 módosított szilika aerogélből is ki tudtunk alakítani tölteteket (58. ábra). A golyósmalomban elporított aerogélt metanolban szuszpendáltuk, ekkor 1 µm-nél kisebb részecskéket kaptunk.



58. ábra. A fotolitográfiás maszkra rajzolt 4 μm széles vonal (a,) segítségével alakítható ki szűkület a mikrocsip csatornájában (c,). A töltéskor a kromatográfiás részecskék (C18 szilika aerogél) metanolos szuszpenzióját *O* port felől áramoltatjuk a szűkület felé. A mintaoldatokat az *I* port felől injektáljuk a mikrocsipbe, miközben az *O1* és *O2* portok felé folyik el a felesleg (b). A szűkülettel nyert kromatográfiás töltet mikroszkópos fényképe (d,).

Legújabban a kromatográfiás részecskék visszatartására azt a módszert használjuk, hogy már a csatornamintázat tervezése során megrajzoljuk a szűkületet a csatornákban a kiválasztott helyekre [XXV]. A szűkületeknél az 50-100 µm-es csatornaátmérő a 10%-ára csökkent, ami elégnek bizonyult a részecskék visszatartásához, viszont a folyadék szempontjából átjárható volt. Ahhoz, hogy 5-10 µm szélességű csatornaszűkületeket alakíthassunk ki a mikrocsipben, kellően nagy felbontás elérésére volt szükség a mikrofabrikálási eljárás során. Az öntőforma készítés során részletesen vizsgáltuk és optimáltuk a fotoreziszt vastagságának (és ezért a spincoater sebessége, forgatás ideje); valamint a intenzitásának, időtartamának és távolságának besugárzás hatását а csatornamintázat elért felbontására [184].

Mivel a szűkület hidrodinamikai ellenállása elhanyagolható, a folyadék könnyen átáramoltatható a szűkületen, de a kromatográfiás részecskék visszatarthatók. Amint az előbb, az 54. ábra kapcsán már röviden tárgyaltam, amikor a kellően nagy sűrűségű szuszpenzió kromatográfiás részecskéi elérik a szűkület elejét, az elülső részecskék egymásnak támaszkodva lezárják a szűkületet ("zárókövek") és visszatartják a mögöttük jövő részecskéket (éppen úgy, ahogyan az építészetben a zárókő az összehajló boltívet mintegy bezárja és azoknak nyomását felfogja és kiegyenlíti). Amint az első részecskék visszatartódnak a szűkületben, az ezt követően érkező részecskék hozzáépülnek a már visszatartott részecskékhez, folyamatosan növelve a töltet hosszát. A zárókőhatást illusztráljuk az 59.a-d ábrán (25 µm széles, 25 µm hosszú) szűkületet tartalmazó 100 µm szélességű mikrofluidikai csatornában áramoltatott 10 µm méretű C18 módosított szilika részecskék esetére. Hasonló zárókő-hatásról (keystone effect) számoltak be mások kemény falú, elszűkített (kihúzott) kvarckapillárisokban [185, 186]. A zárókőhatás fontos következménye, hogy a visszatartandó részecskék méreténél akár háromszor nagyobb méretű szűkület is alkalmazható a töltetek kialakításához.

A különböző magasságú csatornák olyan öntőformák segítségével alakíthatók ki, melyek készítése során különböző vastagságú fotoreziszt réteget viszünk fel a Si hordozóra (különböző forgatási sebességet és időt használva). A különböző vastagságú fotoreziszt azonos időtartamú besugárzásával különböző szélességű szűkület nyerhető, a vékonyabb fotoreziszten szélesebb lesz a szűkület (59.e-g ábra). Természetesen minél szélesebb a szűkület, annál kisebb a töltet stabilitása. Ha a szűkület nagyobb, mint a visszatartandó részecske méretének négyszerese, az így kapott töltet nem lesz elég stabil, nagyobb nyomás alkalmazása esetén a töltet összeomlik (59.e ábra). 5 µm-es részecskék esetén, ha a szűkület hossza legalább 10 µm, a szűkület hosszának nincs hatása a töltet kialakítására. (Az 59.b-g és a 60.b-d ábrák mutatják, hogy a töltet elülső részecskéi csak nagyon kis részen foglalják el a szűkület elülső szakaszát.) Amikor a C18-as részecskéket a csupán 15 um magasságú csatornában áramoltatjuk, a részecskék nem tudnak aggregálódni nagyobb méretű részecskékké (59.e ábra), de egy magasabb csatornában az aggregációra nagyobb az esély (59.g ábra) és ekkor a töltet kialakítása is könnyebb. Mindezek alapján a szűkület optimális szélessége, magassága és hosszúsága, mellyel a részecskék bizonyosan stabilan visszatarthatók, legfeljebb kétszer nagyobb, mint a visszatartandó részecske. Ha a részecskék nagyobb részecskékké aggregálódnak (1%-nál nagyobb sűrűségű szuszpenziók esetén gyakran tapasztaltuk C18 részecskék esetén), akkor nagyobb szűkületek is alkalmazhatók.

A 15 és 40 µm magasságú csatornákban visszatartott részecskék különböző vastagságú tölteteket eredményeztek (59.h és 59.i ábrák). A 15 µm magas csatorna 1-2 rétegben tölthető meg 10 µm méretű C18 részecskékkel, ezért a töltet csaknem átlátszó (59.e ábra), lehetőség nyílik színes anyagok közvetlen, vizuális detektálására a tölteten. A 40 µm magas csatorna 4-5 rétegben tölthető. Az 59. ábra fényképei igazolják, hogy az azonos méretű kromatográfiás részecskékből a pumpálás hatására a rugalmas falú csatornában homogén, tömör és stabil töltet nyerhető.



59. ábra. 10 µm méretű C18 részecskék áramoltatása 30 µm-es szűkület felé. A zárókőhatást illusztráló mikroszkópos fényképek 0,5 s-onként készültek (**a**)–(**d**). 15 µm (**e**), 30 µm (**f**) és 40 µm (**g**) magasságú csatornákban kialakuló töltetek mikroszkópos fényképei. 15 µm (**h**) és 30 µm (**i**) magasságú csatornákban kialakított (ily módon ugyanilyen vastagságú) töltetek mikroszkópos fényképei. A mikrocsipek elkészítésekor a litográfiás maszk ugyanaz volt, de az öntőformákon a fotoreziszt különböző idejű besugárzása miatt a csatornamintázat magassága eltért. A litográfiás maszkon a szűkület 25 µm széles és 25 µm hosszú volt.



60. ábra. Csatornaszakaszok kromatográfiás részecskékkel töltésének folyamata (csatornaátmérő: 100 μm, kromatográfiás részecskék mérete: 5 μm)

5.2.3.2 Többcsatornás töltetek kialakítása [XXV-XXVI]

A többcsatornás mikrofluidikai rendszerek tervezése során először meg kellett vizsgáljuk, hogy milyen közel kerülhet egymáshoz két (például 50 µm széles) csatorna, hogy azokban folyadékokat nyomással áramoltatva a csatornák között ne legyen átszivárgás. Az általunk tervezett csatornamintázatoknál minden esetben legalább 50 µm (egy csatornányi) távolság választja el egymástól a csatornákat.



61. ábra. Három, egymással kapcsolatban lévő, párhuzamos csatornából álló mintázatot tartalmazó öntőforma fényképe (felső kép), és az öntőforma segítségével készített PDMS mikrocsip csatornáiban kialakított kromatográfiás töltetek egy részletének mikroszkópos felvétele (a csatornák szélessége 100 μm) (alsó kép).

Mint azt az 5.2.3.1 fejezetben tárgyaltuk, a szűkületeknek a részecskék visszatartására vonatkozó hatékonysága függ a szűkület szélességétől és a csatorna magasságától. Az öntőformák készítése során a fotorezisztek különböző idejű (azaz energiamennyiségű) besugárzása különböző szélességű szűkületeket eredményezett ugyanazon litográfiás maszk alkalmazása esetén. Amennyiben a maszk 20 µm-es szűkületet tartalmazott, az 1, 2 és 6 percig tartó fénybesugárzás különböző, azaz 5, 10 és 30 µm szélességű szűkületekhez vezetett (62.a-c ábra). A

hosszabb besugárzási idő növelte a csatornák teljes szélességét, így csökkentette a kapott csatornamintázat felbontását.



62. ábra. Az öntőforma készítése során különböző (1 perc (**a**); 2 perc (**b**) and 6 perc (**c**)) besugárzási idők alkalmazásával kapott, többcsatornás rendszerek mikroszkópos fényképei (A litográfiás maszk ugyanaz volt, 25 µm széles és 25 µm hosszú szűkületet tartalmazott.)

A mikrofluidika által nyújtott előnyök egyik legfontosabbika, hogy sok analitikai rendszer - például kromatográfiás elválasztóegységek - helyezhetők el egyetlen mikrocsipen, így egyidejűleg több kromatográfiás elválasztás is végrehajtható. A 63. ábrán a párhuzamos kromatográfiás töltetek kialakítására alkalmas többcsatornás mikrocsipek készítésére használható litográfiás maszkmintázatok főbb típusai láthatók. Egyrészt lehetőség van arra, hogy több, különböző mintát egymástól függetlenül injektáljunk a mikrocsip egy-egy töltetére (63.a, b, és e, ábrák), bár 10 különböző mintához 10 pumpacső kezelése meglehetősen nagy kihívás (63.e, és h, ábrák). Ugyanakkor lehetőség van arra is, hogy egyetlen mintaoldatot injektáljunk a mikrocsipbe (63.c, d, és f, ábrák), amely aztán több egyenlő részre osztható a töltetek előtt. A 3-töltetes rendszerekben a szeparációs csatornák végei összefuthatnak (egyesülhetnek) egyetlen kimeneti portba (63.b, és c, ábrák), vagy maradhatnak egymástól teljesen függetlenek (63.a, és d, ábrák).

$def{eq:argenta} def{eq:argenta} = def{eq:argenta} def{eq:arg$

Utóbbi esetben a párhuzamos csatornák egymástól függetlenül (egyik a másik után) tölthetők meg különböző kromatográfiás részecskékkel. Mivel már egy néhány mm hosszúságú töltet is alkalmas lehet komponensek elválasztására vagy dúsítására [XXII], nagyszámú (pl. 10-12) párhuzamos töltet helyezhető el egyetlen mikrocsipen (63.e, f, h, i, ábra). A mikrocsipen elhelyezhető töltetek maximális számát tulajdonképpen nem is maguk a töltetek, hanem a csatlakozó portok száma korlátozza. A 63.h ábrán látható mikrocsipen 10 csatornára külön-külön injektálható egy-egy minta. Általános szabályként azt alkalmaztuk, hogy a ki/bemeneti portok egymástól legalább 4 mm távolságra legyenek.

Nagy számú csatorna egyidejűleg tölthető, ha közös kimeneti portjuk van, ahonnan a kromatográfiás részecskék szuszpenziójának egyetlen beinjektált részlete áramoltatható a csatornák szűkületei felé.



63. ábra. Több, párhuzamos csatornát tartalmazó, párhuzamos kromatográfiás elválasztásokra alkalmas mikrocsipek litográfiás maszkjainak mintázatai (a)–(f). A mintázatok szűkületeinek nagyobb nagyítása (g). Egymástól függetlenül, 10 párhuzamos csatornába injektálható minták egyidejű elválasztására alkalmas mikrocsip fényképe (a csatornák kék festékkel vannak megtöltve) (h). 12 kromatográfiás töltetet tartalmazó mikrocsip részletének fényképe (i).

Az egyetlen minta beinjektálására alkalmas, közös kimeneti portú sokcsatornás rendszerek párhuzamos csatornáiban a folyadék áramlási sebessége fokozatosan csökken csatornáról csatornára (63.i ábra). EPANET szoftverrel [187] végzett számítások alapján a 12 csatornás rendszerben a két szélső csatornában az áramlási sebességek aránya 2,2, amit kísérleti eredményeink is igazoltak (Az EPANET szoftver csőrendszerekben folyó víz áramlásának modellezésére alkalmas.).



64. ábra. 12 párhuzamos csatornát, illetve egyetlen bemeneti és egyetlen közös kimeneti portot tartalmazó mikrocsipben (a,) áramoltatott folyadék sebességeloszlásának modellezése EPANET szoftverrel (b,). A csatornaszakaszokon feltüntetett sebességek láb/s egységben értendők.

Mivel az analitikai feladatoknál fontos lehet, hogy az áramlási sebességek azonosak legyenek a párhuzamos csatornákban, az EPANET szoftver segítségével olyan csatornamintázatokat terveztünk, amelyekben ez megvalósítható. Az egyik lehetőség a "függőleges" párhuzamos csatornák feletti "vízszintes" csatornaszakasz alakjának optimálása (65. ábra). Az áramlási sebességek 1%-nál kisebb eltérését kaptuk a párhuzamos csatornák között, amikor a "vízszintes" csatornaszakasz egyik vége (d₁) nyolcszorosa volt a másik végének (d₂) (lásd 65.a-d ábra).



65. ábra. 12 párhuzamos csatornát, illetve egyetlen bemeneti és egyetlen közös kimeneti portot tartalmazó mikrocsipek csatornamintázatai (a,-d,). A d₁ és d₂ a "függőleges" párhuzamos csatornák feletti "vízszintes" csatorna két vége szélességeinek felel meg (lásd d,). A d1/d2 aránya rendre 1 (a,), 2 (b,), 4 (c,) és 8 (d,) volt. A folyadék bejuttatása a jobb felső portban történt (c, rajzon "BE"-ként jelölve) és az alsó közös porton távozott (c, rajzon "KI"-ként jelölve). A csipekben áramoltatott folyadék sebességeloszlásának modellezése EPANET szoftverrel történt. A párhuzamos csatornákban számolt legkisebb és legnagyobb sebességek hányadosát a mintázat alatt tüntettük fel, és ábrázoltuk a d₁/d₂-től való függését (e,).

5.2.3.3 Kromatográfiás és elektrokromatográfiás elválasztások mikrocsipben [XXII-XXVI]

A mikrocsipben kialakított kromatográfiás töltetek teszteléséhez ételfestékeket használtunk. 1 μ L festék(keveréket) juttattunk be a mikrocsip mintabemeneti portjába, amely aztán 3-felé oszlik el egy keresztalakú csatornakereszteződésben (66. ábra), a 3 különböző ágban a folyadékok áramlási sebessége az egyes csatornákban jelentkező hidrodinamikus ellenállástól függ. Mivel a kromatográfiás töltetet tartalmazó csatornaágban az ellenállás jóval (pl. 1000-szer) nagyobb, mint a többi nyílt csatornaágban, csupán a szükséges 1 nL-nyi mintarészlet jut a töltetre.



66. ábra. 1 nL-nyi térfogatú mintadugó kialakítása mikrocsipben a kromatográfiás töltet előtt. A kereszteződésbe balról beinjektált (kb. 1 μL) minta 3-felé oszlik a keresztalakú csatorna-kereszteződésben, a jobb oldali csatornaágban a nagyobb hidrodinamikai ellenállású kromatográfiás töltet felé a folyadék áramlása sokkal kisebb, mint a másik két csatornaágban, így 4 s-al a kereszteződésbe injektálást követően a szeparációs csatornában kialakul a kb. 1 nL-nyi térfogatú mintarészlet (a jobboldali csatornában található töltet nem látszik a képeken). A csatornák szélessége 50 μm.

Hasonlóan történik az injektálás a sokcsatornás mikrocsipekben is. Itt is csatornák kereszteződéseit használhatjuk arra, hogy csak a kereszteződésbe bejutó eredeti minta töredékei jussanak az egyes csatornaszakaszokba (lásd 66. ábra). Abban az esetben, ha ugyanazt a mintát akarjuk nagyszámú csatornába bejuttatni, akkor használhatjuk a 67. ábrán látható csatornamintázatot, amelynél egyetlen 1 µL mikrocsipbe injektált minta kb. 1 %-a áramlik a szűkület utáni nagy hidrodinamikai ellenállású kromatográfiás töltetek felé, a 12 töltetre kb. 1 nL térfogatú mintarészletek jutnak.



67. ábra. 12 csatornás, szűkületeket tartalmazó mikrocsipek készítéséhez alkalmas litográfiás maszk részlete. Egyetlen mikrocsipbe injektált minta nagyrésze a jobb oldali csatornavég felé áramlik és a szűkület utáni nagy hidrodinamikai ellenállású kromatográfiás töltetekre azonos és kellően kis térfogatú (kb. 1 nL) térfogatú mintarészletek juttathatók.

Az elkészült töltet kromatográfiás tulajdonságainak vizsgálatát festékkomponensek tölteten való megkötésének, dúsításának vizsgálatával kezdtük. Híg kék ételfesték oldatot vittünk fel a töltetre 300 s-on keresztül (kb. 100 nL térfogatú minta). A kék komponens folyamatosan kötődött meg a tölteten, amit aztán a desztillált vizes folyadékáram csak minimálisan mozgatott (68. ábra). A megkötött festéket metanol segítségével 8 s alatt (kb. 2 nL effluens térfogatban) teljesen le lehetett eluálni a töltetről, így a dúsítási faktor 50-nek adódott.



68. ábra. Az aerogéltölteten megkötött kék festék mikroszkópos fényképe (A C18 módosított szilika aerogélből készült tölteten 100 nL minta injektálása 300 s-on keresztül.)

A komponensek megkötése/dúsítása mellett a tölteten több komponens egymástól való elválasztása is lehetséges. A kék és sárga festékek keverékét injektálva a töltetre a kék komponens megkötődött, míg a sárga komponens szabadon áthaladt rajta. A vizes mobilfázist metanolra cserélve a megkötött kék komponens is eluálódott, így 20 s-on belüli elválasztás volt elérhető (69. ábra).



69. ábra. Sárga (1) és kék (2) ételfestékek elválasztása C18 módosítású szilika aerogéltölteten. A víz mobilfázist metanolra cseréltük, amint a minta zónája elérte a töltetet (v= 0,2 nL/s)

A két festék izokratikus körülmények között is elválasztható volt, 35% metanol-víz eleggyel a festékek egymás után eluálódtak a töltetről. A töltet 0,5 mm hosszú szakasza már elegendő volt az 1 nL térfogatú (250 μ m hosszúságú) minta komponenseinek elválasztásához (70. ábra). Nagy elválasztási hatékonyságot rövid tölteten csak úgy lehet elérni, ha az injektált mintadugó hosszát (l_{inj}), illetve a detektálási hosszat (l_{det}) minimalizáljuk. Az l_{det} a mikroszkópos színintenzitással könnyen minimális értéken tartható, hiszen néhány képpontban (pixelben) is mérhetők az RGB értékek. Az elméleti tányérmagasság (H) megadható:

$$H = H_{diff} + H_{inj} + H_{det} = \frac{2D_m}{u} + \frac{l_{inj}^2}{12L_{eff}} + \frac{l_{det}^2}{12L_{eff}}$$
(26)

ahol H_{diff}, H_{inj} és H_{det} a diffúziótól, az injektálási mintahossztól és a detektálási hossztól függő hozzájárulások a teljes tányérmagassághoz [188], D_m a komponens diffúziós együtthatója, u a lineáris sebesség és L_{eff} az elválasztás effektív hossza. Viszonylag nagy nyomást alkalmazva (kb. 3 bar, ami a perisztaltikus pumpával elérhető maximális nyomás) igen gyors elválasztást értünk el. 7 s-nál gyorsabb elválasztást akkor kaptunk, amikor közvetlenül a töltet legvégén (l_{eff}=0,5 mm) detektáltunk. Mivel a töltet vastagsága az átlátszó PDMS mikrocsipben csupán 35 µm, és a szilika aerogélrészecskék töltete maga is viszonylag átlátszó, a festékek a tölteten is vizuálisan megfigyelhetők, színintenzitásuk detektálható (70.a-d ábra). Míg a csupán 200 µm hosszúságú tölteten áthaladva (70.e ábra, l_{eff}=0,2 mm) a

komponensek még nem váltak szét teljesen, addig 300 μ m (70.e ábra, l_{eff}=0,3 mm) töltetszakasz után az elválasztás már teljesnek vehető. A detektálást a 0,5 mm hosszúságú töltettől 0,5 mm-rel távolabb végezve az elválasztás hatékonysága romlott a diszperziós hatások miatt (70.e ábra, l_{eff}=1 mm).



70. ábra. Mikroszkópos fényképek kék és sárga ételfestékek 0,5 mm hosszú C18 szilikaaerogél tölteten történő elválasztásáról, 35:65% metanol-víz mobilfázist alkalmazva. (Az a és d felvételek közötti időtartam 8 s, az áramlási sebesség 2 nL/s volt.) Az elválasztás kromatogramjait a töltet elejétől mért különböző (0,2; 0,3; 0,5 és 1 mm) távolságokra a színintenzitások regisztrálásával kaptuk (e).

A kialakított töltetek kromatográfiás vizsgálatát 3 kefalosporin antibiotikum (ceftriaxon, cefazolin és ceftazidim) elválasztása esetén is elvégeztük. A komponenseket először foszfátpufferes vivőközegben vittük a C18-as töltetre nyomás segítségével, de a komponensek elválasztása nem volt teljes (71.a ábra). Abban az esetben, amikor ugyanazon a tölteten ugyanazt a mintát injektáltuk és feszültséget is alkalmaztunk elektrokromatográfiás (CEC) elválasztást használva, a komponensek szeparációja teljessé vált (71.b ábra). A kromatográfiás és elektrokromatográfiás elválasztások során az eluált komponensek sorrendje eltért, jelezvén, hogy az elválasztások mechanizmusa eltért a két módszer esetén. Mivel a kefalosporinok elválasztásakor a zónaelektroforézis hozzájárulása a CEC

elválasztásban jelentősebb, mint a fordított fázisú kromatográfiás hozzájárulás, először a legkisebb (negatív) töltésű komponens eluálódik, míg az RP-LC elválasztások esetén először a leginkább poláris komponens eluálódik.



71. ábra. Kefalosporin antiobiotikumok elválasztása C18-as tölteten LC (a) és CEC (b) módszerrel

Körülmények: 1: ceftriaxon, 2: cefazolin, 3: ceftazidim, c= 10 mg/mL, a száloptikás fotometriás detektálás 265 nm-en történt, 2 mm-re a töltetet követően, elektrolit: 50 mM foszfát, pH= 6,8, CEC: U= 750 V, LC: 0,4 nL/s

Az 5.2.3.2 fejezetben bemutatott többcsatornás mikrocsipek töltetein végrehajtható elválasztásokat is festékkeverékekkel teszteltük. Amint azt az előzőekben is részleteztem, míg a kék festék a C18 tölteten teljesen visszatartódik (72.a ábra), addig a sárga festék akadálytalanul áthalad rajta (72.b ábra). A víz mobilfázist metanolra váltva a kék festék gyorsan eluálható (72.c ábra), így a két festék 30 s-on belül elválasztható. Az elválasztott komponensek detektálása - a töltet elejétől 0,5 mm-re - az RGB szín intenzitások mikroszkóp kamerájával történő mérésén alapult. Mivel a 72. ábrán bemutatott többcsatornás kromatográfiás töltetet tartalmazó mikrocsipben az áramlási sebességek fokozatosan változnak töltetről töltetre, így egyetlen minta (ételfesték keverék) beinjektálása a mikrocsipbe 12 különböző sebességű, egyidejű elválasztást eredményez. Ezáltal a van Deemter diagram

könnyen felvehető, és az optimális áramlási sebesség meghatározható (72.e ábra). A legjobb hatékonyságot (0,75 µm tányérmagasság) 0,0176 mm/s (4,2 nL/min) áramlási sebesség mellett kaptuk (a 72.a-c. ábrákon jobbról a 3. töltet). A kapott 1330000/m elméleti tányérszám hasonló nagyságrendű, mint amit Hansen és mtsai. kaptak másfajta kromatográfiás mikrocsipen [189, 190]. Bár a párhuzamos tölteteken az áramlási sebességek tartománya viszonylag szűk (0,014-0,024 mm/s), a bemutatott kísérletben a van Deemter diagram görbéjének minimuma világosan meghatározható.

Az mikrooszlopok közötti reprodukálhatóságot 3 párhuzamos, azonos C18 töltetet tartalmazó mikrocsipben határoztuk meg, mivel itt az áramlási sebességek a tölteteken azonosak voltak. A kék festék elúciója során a retenciós idők szórása 3,6 RSD% volt (N=6). A komponenst 13-szor injektálva egy mikroinjektor-csappal a kapott szórás 5,6 RSD% (csúcsmagasság), illetve 5,1 RSD% (retenciós idő) volt.

Mivel a C18-módosított szilikarészecskék széles körben használt fordított fázisú állófázisok a HPLC és SPE módszereknél, a bemutatott mikrocsip alapú kromatográfiás rendszernek sokféle alkalmazása (pl. elődúsítás, tisztítás, elválasztás) lehet. A csipben alkalmazott töltet (5 μ m C18) visszatartási kapacitása a kék festékre (brillantkék FCF) nézve 7,5 x 10⁻¹² mol/(töltet)mm-nek adódott. A mikrocsip csupán 1 mm hosszúságú töltetén 50x dúsítást tudtunk elérni egy mikroliternél is kisebb mintatérfogat felhasználásával.

12 mikrotöltetet (C18, 5 μm) tartalmazó mikrocsipek egy általunk kifejlesztett változatával elsőként demonstráltuk a mikrocsip alapú kromatográfiának a lángatomabszorpciós spektrometriával (FAAS) való kapcsolásának lehetőségét elemspecieszek gyors elválasztására vagy dúsítására és meghatározására. A kapcsolt rendszert Cr(VI) meghatározásával teszteltük. A mikrotölteten adszorbeált Cr(VI)-ot 30 μL metanollal eluáltuk a töltetek végén kialakított edénykékbe. Az effluenst diszkrét oldatként ún. mikroinjektálási technikával porlasztottuk a spektrométerbe. 12 minta elválasztásához/dúsításához és FAAS meghatározásához kevesebb, mint 5 percre volt szükség, mivel az elválasztások/dúsítások és elúciók párhuzamosan (egyidőben) végezhetők. A mikrotöltet (C18, 5 μm részecskék, 20 mm x 1 mm x 0,1 mm) kapacitása 0,45 μg/mm-nek adódott a Cr(VI)-ra nézve. A 80 μL térfogatú mintaoldatot vive a mikrocsip töltetére és a 30 μL-nyi metanolos effluenst porlasztva a FAA spektrométerbe a kimutatási határ 0,0031 μg/mL-nek adódott.



72. ábra. Mikroszkópos fényképek kék és sárga festékek keverékének elválasztásáról 12 párhuzamos C18-as tölteten (p: 0,5 bar, V: 0,5 μL). A mikrocsipbe injektált egyetlen minta 12 egyenlő részre oszlik a töltetek előtt (a). Míg a kék festék teljesen megkötődik a töltet elején, a sárga festéket a vizes mobilfázis szállítja (b). A mobilfázist metanolra cserélve a kék festék is eluálódik (c). A kromatogramokat a töltet elejétől 0,5 mm-re (nyíllal jelölve), a színintenzitások mérésével kaptuk (d). Az elméleti tányérmagasságnak a lineáris áramlási sebességtől való függését bemutató (van Deemter) diagramot a kék festéknek a párhuzamos tölteteken való elúciói alapján határoztuk meg (e).
5.3 Felületi plazmon rezonancia spektroszkópia alkalmazása elektroforetikus rendszerekben egyes komponensek detektálásához, illetve felületi adszorpciós vizsgálatokhoz [XXVII-XXVIII]

A kapilláris elektroforetikus elválasztás és a felületi plazmon rezonancia (SPR) spektroszkópiás detektálás sikeres kapcsolásához több problémát kellett megoldani. A hatékony elektroforetikus elválasztáshoz elengedhetetlen, hogy kellően kis térfogatú mintadugót lehessen bejuttani az elválasztó kapillárisba. A kapilláris végén (off-capillary) történő detektálás pedig nagyon kis térfogatú detektorcella alkalmazását kívánja meg. Az általunk kifejlesztett miniatürizált kapilláris elektroforetikus rendszert mikrofluidikai platformok segítségével kapcsoltuk az SPR szenzorhoz.

Két egyszerű mikrofluidikai platformot terveztünk és készítettünk el PDMS-ből a CE-SPR kapcsolás megvalósításához. Az egyik PDMS egységben а folyadékmegosztásos injektálási módszert alkalmaztuk a néhány nL-nyi mintadugó kialakítására és a CE kvarckapilláris bemeneti végéhez való továbbítására (73.a és 73.c ábra). Az 5.2.1.2 fejezetben részletezett folyadékmegosztás elvén történő injektálást egy 200 µm és három 50 µm széles csatorna kereszteződésében végeztük. Mivel az outlet-1 négyszer szélesebb csatorna mint a többi, és mert a kvarckapilláris tízszer hosszabb, mint a többi csatorna, a csatornába beinjektált 2 µL minta hozzávetőlegesen 2500-ad része (0,8 nL) távozik a kereszteződésből a szeparációs kapilláris felé (outlet-2).

A másik mikrofluidikai platform egy nagyon kis térfogatú átfolyócella szerepét tölti be az SPR detektálásnál (73.b ábra), amit közvetlenül az SPR szenzorra helyezünk és ami egyúttal a CE kapilláris kimeneti végéhez is csatlakozik. Ez az átfolyócella két PDMS lapból készült. Az alsó, vékonyabb (2 mm) lap 0,3 mm átmérőjű nyílásába a CE kvarckapilláris vége szorosan csatlakoztatható. A felső PDMS lap 3 mm széles nyílása elektrolitos edényként szolgált azt követően, hogy a két PDMS lapot (a két nyílást egymásra illesztve) plazmakezeléssel irreverzibilisen rögzítettük (73.b ábra). A PDMS átfolyó cellát az SPR aranyfilmmel bevont szenzorlapkájára simítottuk. A PDMS kis felületi energiája (20 erg/cm² [191]) lehetővé teszi, hogy a cellát reverzibilisen kössük a szenzor felületéhez a mikrocsatornák torzulása, és a CE-SPR mérésekhez szükséges legfeljebb 1 µL/s sebességgel áramoltatott folyadék elszivárgása nélkül.

A két PDMS platform nem csupán a nanoliter tartománybeli mintainjektálást és detektálást teszi lehetővé, de tartják a (15 cm hosszú, 50 µm x 365 µm) CE kapillárist is (73.c ábra). A Pt elektródokat az egyik PDMS platform outlet-3 portjába, illetve az detektorcella elektrolitedényébe helyeztük. Hasonló miniatürizált CE rendszert fejlesztettünk ki on-line UV spektrometriás detektálással (5.2.2 fejezet, [XX]).



73. ábra. PDMS mikrocsip a mintadugó kialakításához és CE kvarckapillárisba való bejuttatása a folyadékmegosztás elvén alapuló injektálási módszerrel (a,). Az SPR szenzor felületére helyezett, a CE kimeneti kapillárisát fogadó PDMS platform, ami magába foglalja az SPR detektáláshoz szükséges átfolyócellát is (b,). A miniatürizált CE-SPR rendszer elrendezése (c,)

Az SPR detekálást a szeparációs kapilláris végén (off-capillary) lehet alkalmazni. Bár az SPR csupán az aranyfilmmel bevont szenzorlapka feletti 100-200 nm vastag folyadékfilmet "érzékeli", az egyes gyártók átfolyócelláinak belső csatornatérfogata viszonylag nagy, 0,2-2 μL [192-194]. Mint ismeretes, a kapilláris elektroforézisnél a detektálási hossznak (l_{det}) nem szabad meghaladnia az elválasztott zóna hosszát. Mivel a CE-nél tipikusnak számító 5 mm hosszú zóna térfogata 10 nL, a 10 nL-nél nagyobb belső térfogatú detektorcellák jelentős diszperziót okozhatnának a detektáláskor.

Az általunk kidolgozott rendszerben rendkívül kicsiny térfogatú átfolyócellát fejlesztettünk ki. Azt találtuk, hogy ha a szeparációs kapilláris végét az SPR szenzorra helyezett PDMS platform nyílásába toltuk egészen a szenzorlapkáig, akkor a kapillárisban áramoltatott folyadék elérve a kapilláris végét onnan lassan, egyenletesen szivárgott a kapilláris körül fölfelé, a kisebb hidrodinamikai ellenállás felé (73.b ábra). A CE-SPR alkalmazásoknál szokásos 1 μL/s sebesség alkalmazása alatt nem tapasztaltunk a szenzorlapka síkjával párhuzamosan szivárgást, a CE mérések során ez nem is várható, hiszen az outlet elektródot a kapillárist körülvevő

elektrolittartályba helyeztük (73.b ábra). Az így kialakított "átfolyócellában" a detektálási térfogat tulajdonképpen a PDMS lap nyílásában a kapillárisvég alatti vékony szivárgó folyadékfilm. Abban az esetben, amikor a kapilláris vége érintkezik a szenzor felületével, a kapilláris alatti folyadékfilm vastagsága 10 µm-nél vékonyabb, így a detektorcella térfogata 1 nL-nél is kisebb.

A CE kapillárist fölfelé mozdítva növelhető a detektorcella térfogata (1 mm-el elmozdítva a kapillárist fölfelé a cella térfogata 100 nL-re nő). A megnövelt cellatérfogat a mintazónák nagyobb diszperzióját okozza, azaz az adott komponens kimosása a cellából hosszabb öblítést kíván meg. A 74. ábrából kitűnik, hogy a legnagyobb SPR jelet a legkisebb térfogatú detektorcellával kaphatjuk (az érzékelő felület és a minta térfogata ugyanaz volt a mérések során). Ez a nagyon kis térfogatú SPR detektorcella lehetővé teszi, hogy a szokásos detektor cellák alkalmazásához szükséges mintatérfogat 1/10-részének megfelelő térfogatú (0,02 mL) mintát azonos érzékenységgel detektálhassunk (0,002% etanolra nagyon hasonló kimutatási határt kaptunk mindkét detektorcellával). A 75. ábrán bemutatott kalibrációs diagram alapján megállapítható, hogy az SPR detektálás érzékenysége nem függ a szenzor érzékelő felületének nagyságától. Ezek a kísérletek azt is igazolják, hogy a kidolgozott PDMS cella minimális (szubnanoliteres) belső térfogatánál fogva kiváló összekötőelem (interfész) lehet az SPR és a CE között, illetve jól alkalmazható mikro áramlási injektálásos analízishez (µFIA), ahol legfeljebb néhány mikroliternyi minta áll rendelkezésre.



74. ábra. Az SPR rendszerbe injektált 2 μL 2%-os etanol SPR jelei (a,) 1 nL, (b,) 100 nL, illetve (c,) 300 nL térfogatú PDMS átfolyócellát alkalmazva (az átfolyócella térfogata az SPR szenzorlapkája és a kvarckapilláris (100 mm hosszú, ID: 0,05 mm, OD: 0,37 mm) vége közötti térfogatnak felel meg). A mintát perisztaltikus pumpával 0,05 μL/s sebességgel áramoltattuk át a PDMS átfolyócellán, a vivőfolyadék víz volt.



75. ábra. Az etanol kalibrációs diagramjai 1 nL, ultra-kis térfogatú átfolyócellát (■) és a gyártó (Biosensing Instrument Company) 1000 nL térfogatú celláját alkalmazva (□). Az előbbi detektorcellához 20 µL, az utóbbihoz 200 µL térfogatú mintát injektáltunk.

A CE-nél széleskörűen alkalmazott, UV tartományban nem fényelnyelő puffereknek (pl. foszfát, borát) jelentős SPR jele van. Ezek a komponensek nem adszorbeálódnak az SPR szenzor felületén, így a mért SPR jel az oldatból származik. A PDMS platformban folyadékmegosztás elvén alapuló injektálással [XIX] kapott ~1 nL mintatérfogatot bejuttatva a szeparációs kapilláris elejére +2,5 kV feszültséget kapcsoltunk a kapillárisvégekre (73.c ábra). Mivel az elektroforetikus elválasztás nagyrészt a kvarckapillárisban (5%-nál kisebb részben a PDMS csatornában) történik, hasonló körülmények mellett lehet optimális elválasztást végezni, mint a hagyományos CE készülékekben kvarckapillárissal. A tesztkomponensek vagy anionosak (sárga és kék ételfesték) vagy töltésnélküliek (propilén-glikol) voltak, ezért az EOF miatt a katód felé vándorolnak. A hagyományos, UV spektrométerrel felszerelt CE készülékekben csak két komponenst lehetett detektálni, a kromoforcsoportot nem tartalmazó propilén-glikol fotometriásan nem volt detektálható.

A rövid szeparációs távolság (15 cm) ellenére a 3 komponens esetén megfelelő felbontás volt elérhető (76. ábra), ami igazolja, hogy a PDMS platformban kialakított megfelelően kicsi mintadugó a detektorcellába jutva minimális diszperziót szenvedett. Az SPR detektálás univerzális jellegének köszönhetően a festékek (LOD: 10 mM) mellett a nem UV-aktív propilén-glikol is detektálható volt (LOD: 8 mM). Bár a kapott kimutatási határok koncentráció egységben kifejezve nem számítanak érzékeny detektálási lehetőségnek, de abszolut

mennyiségben a kimutatható anyagmennyiség csupán 20 pmol-nak felelt meg a festékek esetén. Hasonló LOD adatokról számoltak be egy másik CE-SPR munkában nagy törésmutató indexű komponensek esetén [195].



76. ábra. Kereskedelmi forgalomban levő zöld ételfesték (1: 100 mM propilén glikol; 2: 50 mM FD & C blue#1; 3: 50 mM FD & C red#40) elektroferogramja ultra-kis térfogatú detektorcellás CE-SPR rendszerben végezve az elválasztást és detektálást.

Körülmények: elektrolit: 25 mM foszfát; pH, 6.8; +2.5 kV, kapilláris: 50 µm x 15 cm.

Az SPR leginkább az olyan anyagok érzékeny detektálására alkalmas, amelyek a szenzor felületéhez kötődnek. (Az SPR érzékenysége a szenzor felületétől távolodva exponenciálisan csökken, 500 nm távolságra SPR jelet pedig már gyakorlatilag nem kapunk [196].) A komponensek adszorpciója viszont nagyban csökkenti mindenféle elválasztás, így a CE elválasztási hatékonyságát is. A 76. ábrán bemutatott elválasztás mintaoldatának komponensei közül egyik sem kötődik a szenzor felületéhez, ami kisebb detektálási érzékenységet, de megfelelő felbontást eredményezett. A CE-SPR rendszert ezért a kevéssé adszorbeálódó komponensek vizsgálatára érdemes használni, az elemzések érzékenységét pedig elődúsító módszerekkel (elektrodúsítás, izotachoforézis) lehet javítani.

Az SPR-t kis méretű ionok és neutrális vegyületek, gyógyszermolekulák, fehérjék és detergensek PDMS felületeken megvalósuló reverzibilis vagy kvázi irreverzibilis adszorpciós folyamatainak valós idejű, jelölésmentes vizsgálatára is használtuk [XXVIII]. Az SPR szenzort oktánban oldott 0,2% (w/v) PDMS-el öblítettük, így 100 nm-nél vékonyabb PDMS filmet alakítottunk ki. E PDMS film felett áramoltattuk a FI rendszerbe dugószerűen beinjektált mintaoldatokat. Azt találtuk,

hogy az elektroforetikus elválasztások időskáláján a hidrofób részeket tartalmazó, de kis méretű neutrális vegyületek nem adszorbeálódtak a porózus, hidrofób PDMS-re, míg a nagyobb, vízoldható, polimerek (fehérjék, cellulóz) kvázi irreverzibilisen adszorbeálódtak rá. A kidolgozott eljárás alkalmas volt komponensek adszorpciós/deszorpciós kinetikájának vizsgálatára is (A teikoplanin PDMS felületen történő nem-specifikus adszorpcióját vizsgálva a disszociációs állandó (K_d) $32 \pm 2 \mu$ M-nak adódott.).



77. ábra. (**a**,) Az SPR szenzor (aranyfilmmel bevont üveglapka) és a PDMS filmmel bevont SPR szenzor felületére vitt 10 μ L térfogatú vízcseppek fényképei (A hidrofób PDMS-el bevont szenzoron a vízcsepp érintkezési szöge sokkal nagyobb). (**b**,) 2,5 %(v/v) etanol SPR jele az alapvonal SPR jelnagyság függvényében különböző vastagságú PDMS filmmel bevont szenzor alkalmazásakor. Az alapvonal mDeg jelnagysága arányos az SPR szenzoron levő PDMS filmvastagsággal. (**c**,) 2,5% etanol SPR jele a PDMS-el bevont szenzorral mérve, majd a PDMS-t oktanollal lemosva a mérést megismételtük. A nyilak jelzik, amikor az etanol minták elérik a szenzort.

A PDMS-el bevont szenzorral végzett SPR-el gyorsan és közvetlenül tudtuk vizsgálni a PDMS-ből készült mikrocsipek csatornáinak felületén a különböző anyagok adszorpcióját (78. ábra). E vizsgálatok fontosságát az adja, hogy az elektrolitból vagy a mintából a csatorna falára történő adszorpció alapvetően meghatározza az elektroforetikus elválasztás során kialakuló elektrozmotikus áramlás sebességét, vagy akár az áramlás irányát, illetve az elválasztások hatékonyságát (komponensek adszorpciója elnyúló csúcsokat eredményez). A CE-nél felületmódosításra használatos detergensek vizsgálatát mutatja a 78. ábra.



78. ábra. PDMS filmmel bevont SPR szenzorral különböző molekulákra kapott szenzorgramok. A dugószerűen a szenzor felületére injektált mintaoldatokra kapott jelek alakjából az adszorpció erősségére lehet következtetni. (Minták: 25 mM KCl, 0,5% DMSO, 2,5% etanol, 0,05% benzil-alkohol, 0,1% benzol, 10 mM KH-ftalát, 2 mM brillantkék, 1 mM fluoreszcein, 0,1 mM vankomicin, 0,01 mM teikoplanin, vivőközeg: 60 μL/perc víz, mintatérfogat: 200 μL))

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. Bár a HPMC dinamikus bevonatként való alkalmazását már többen leírták [197-199, az irodalomban nem találtunk olyan alkalmazást, ahol statikus bevonatként használták volna, pedig ez lenne az egyik legegyszerűb módja a PDMS felület hidrofillé alakításának. Úgy gondoljuk, hogy a hosszú láncokból álló HPMC esetén diffúz adszorpciós mechanizmus [200] biztosítja az adszorbeálódott HPMC film hosszú idejű tartósságát. A diffúz adszorpció "polimer a polimeren" felületeken alakulhat ki, amikor az egyik polimer (HPMC) lánca összefonódik a vele érintkező másik polimer láncaival (PDMS). Bár a hidrofób-hidrofób kölcsönhatások nagyon gyengék, de ha ugyanazon molekulán belül sok helyütt alakulnak ki, akkor a kölcsönhatás erőssége sokszorozódik. Ráadásul, ha a "polimer a polimeren" felületeken molekuláris, egymásba ágyazódó hurkok alakulnak ki (ami lehetséges a porózus PDMS-en adszorbeálódott dextrán esetén) akkor a van der Waals kötőerők akár egy nagyságrenddel is erősebbé válhatnak [200]. Ezek a kölcsönhatások eredményezhetik a makromolekulák, polimerek (pl. cellulóz [201], fehérjék [202])

erősebb adszorpcióját a PDMS bevonatokon, a bevonat nélküli arany vagy kvarc felületekkel összevetve. Az adszorbeálódott HPMC etanollal könnyen leoldható.

A 79. ábra szenzorgramjai igazolják az ionos CTAB és SDS erős adszorpcióját a PDMS felületére (410 pg/mm² és 150 pg/mm² az SDS, illetve a CTAB esetén). A hidrofób PDMS az ionos detergensek alkilláncaival lép kölcsönhatásba. Az adszorbeálódott detergensek lassú mobilizálása (pufferrel/vízzel való mosása) legalább négyszer olyan hosszú időt vesz igénybe, mint amennyi idő alatt az adszorbeálódott réteget kialakítottuk. A CTAB és SDS esetén kapott eltérő alakú asszociációs/disszociációs görbék valószínűleg azzal függhetnek össze, hogy adott detergensek alkalmazott koncentrációjának a CMC-hez való arányai eltérnek (a CTAB és az SDS CMC értékei 0,2 mM [203] és 8 mM [204]). A 79. ábrán bemutatott SPR jeleket a CTAB esetén a CMC érték felett, az SDS esetén pedig a CMC érték körül kaptuk. Amennyiben az oldatban micellák vannak jelen akkor több detergens ion (micella) egyszerre adszorbeálódhat, míg a CMC alatt a detergense ionok egyenként adszorbeálódnak [205]. A vizsgált detergensek mindegyike hidrofillé teszi a PDMS felületét.

A PDMS-el bevont kvarckapillárisban az EOF hozzávetőlegesen a felére csökken elektroforézis során [206]. Az SDS, mint anionos detergens a PDMS felületre adszorbeálódva növeli a felületi töltést, így az EOF-et is. Az SPR mérések megmutatták (79. ábra), hogy az adszorbeálódott SDS réteg jónéhány percig stabilan jelen van a PDMS felületen akkor is, ha SDS-t nem tartalmazó oldattal mossuk a felületet, ez pedig felvetette az SDS részlegesen statikus (szemipermanens) adszorpcióját.



79. ábra. Különböző detergensek SPR szenzorgramjai PDMS-el bevont szenzorlapkát alkalmazva.

Körülmények: minták: 0,1 mg/mL hidroxipropilmetil-cellulóz (HPMC), 2 mM cetiltrimetilammónium-bromid (CTAB), 5 mM nátrium-dodecilszulfát (SDS) (és összehasonlításképpen 5% etanol (EtOH)); áraml. sebesség 60 μL/min; mintatérfogat: 200 μL.

Az SDS fali adszorpciójának hatását a CZE elválasztásokra a 80. ábrán mutatjuk be. A 80.a ábra elektroferogramját kation, anion és neutrális komponensek kvarckapillárisban végzett elválasztásakor kaptuk, valamennyi komponens 8 perc alatt detektálható volt. A PDMS-el bevont kvarckapillárisban az anionos komponens még 30 perc alatt sem érte el a detektort az EOF elnyomása miatt (80.b ábra). Ekkor az EOF markernek tekinthető neutrális komponens migrációs ideje 73%-al nőtt, ugyanilyen mértékben csökkent az EOF. A PDMS film felületére szemipermanens SDS-t adszorbeáltatva (50 mM SDS-t 3 percig, majd a futtatópuffert 5 percig áramoltatva a minta injektálását és CZE elválasztását megelőzően) az EOF csak 10%-al csökkent a bevonat nélküli kapillárisban jelenlevő EOF-hez képest, emiatt "visszakaptuk" az eredeti elektroferogramot (80.c ábra). Ezek a kvarckapilláris belsejében levő PDMS filmen kialakított szemipermanens SDS bevonattal kapott elválasztások megegyeznek a PDMS mikrocsipekben várható elválasztásokkal. A szemipermanens bevonat alkalmazása akkor lehet előnyös, ha a detergens jelenléte a pufferelektrolitban (dinamikus rétegképzés esetén) nem kívánatos, mert zavarja az elválasztást, vagy megváltoztatná az elválasztás mechanizmusát.



80. ábra. CZE elválasztás (a) kvarckapillárisban és (b, c) PDMS-el bevont kvarckapillárisban. A (c,) esetben a PDMS-el bevont kapilláris felületét SDS-el kezeltük (3 percig 50 mM SDS oldattal, majd 5 percig foszfátpufferrel (futtatóelektrolit) öblítettük).

Körülmények: minták: (1) imidazol (kation); (2) benzil-alkohol (neutrális); (3) benzoesav (anion). Kapilláris: 50 μ m x 64 cm; puffer: 25 mM foszfát, pH= 6,8; U= 20 kV, λ = 214 nm; mintainjektálás: 50 mbar² s.

5.4 Mikro-spektrofotométer alkalmazása mikrocsipen történő detektáláshoz [XXIX]

Bár a legegyszerűbb, univerzális és viszonylag olcsó detektálás az UV-látható spektrofotometria, ennek alkalmazása a mikrocsipeken általában nem vezet kellően érzékeny detektáláshoz a rövid optikai fényút miatt. Emiatt az irodalomban csak viszonylag kevés [207-216] mikrocsip alapú UV spektrometriás detektálással találkozhatunk. Az optikai fényút növelésére ismeretes az a megközelítés, hogy a sugárforrás fényét nem a csatornán keresztül (radiálisan), hanem egy egyenes csatornaszakasz teljes hosszában bocsátják a csatornát kitöltő folyadékra [215-216]. Néhány esetben optikai szálak alkalmazása helyett magában a mikrocsipben alakították ki az optikai fényvezetőt (waveguide) [213, 214].

A már-már elfeledett spektrográfiás gyakorlatban a színképlemezek mennyiségi kiértékelésére használt mikro-spektrofotométert alkalmaztuk a mikrofluidikai csipekben komponensek fotometriás detektálására. Bár a mikrofotométer készülék fizikai méretében kevéssé illeszkedik a miniatürizált rendszerek koncepciójába (hasonló probléma ismeretes más, a mikrofluidikában használatos egyéb detektorok (pl. MS, LIF) esetén is), az egyszerű külső, univerzális detektálás lehetősége sok esetben előnyös. A mikrofotométer alkalmazásával az analitikai fénysugár felhasználásának hatékonyságát tudjuk növelni a mikrocsip 50-400 µm széles kimeneti portja belsejében, illetve a mikrofluidikai csatorna 50-100 µm széles belsejében áramló nanoliternyi térfogatú mintadugóban történő detektálás során. Végső soron egy mikrocsipen "külsőleg" (nem egy külön detektorcellát kialakítva a mikrocsipben) történő abszorbancia méréshez egy projekciós mikroszkópot és egy spektrofotométert kombináltunk (81. ábra). A javasolt kísérleti rendszerben a fény és a vizsgálandó komponens közötti kölcsönhatás azért hatékonyabb, mert a nagyított, kivetített kép ernyőjén állítható résekkel maximalizálni tudjuk a fénnyel besugárzott területet (vagyis a nanoliternyi mintadugó teljes területét) a mikrocsip csatornájában, így a detektorba jutó fény előzőleg kizárólag a mintadugón halad át és nem a mintadugón, illetve a csatornán kívüli részeken (81. ábra, jobboldali kép).



81. ábra. A mikrocsipen történő spektrofotometriás detektáláshoz használt mikrofotométer felépítése (Schnellphotometer, Carl Zeiss, Jena). A száloptikás spektrofotométert (Avaspec-2048-2, Avantes) a képernyő mögött helyeztük a megfelelő pozícióba. Egy mikrocsip csatornarészletének nagyított, a réssel ellátott ernyőre kivetített képe az ábra jobb oldalán látható.

Az érzékenység jelentősen javítható, ha a mikrofotometriás mérést nem a 40 μm vastagságú folyadékot tartalmazó mikrocsatornán, hanem a csatorna kimeneti portjának belsejében végezzük, hiszen ekkor a fényút hossza a mintában akár több mm is lehet (82. ábra). Természetesen ebben az esetben már többszáz nanoliternyi térfogatú mintára van szükség a méréshez, ami már túl nagy injektálási térfogat a mikrocsipen végzett elektroforetikus elválasztásokhoz.



82. ábra. PDMS-ből készült mikrocsip oldal- (a,) és felülnézeti (b,) ábrázolásai. A 0,5 mm átmérőjű E kimeneti portot vékony (0,2 mm széles, 0,05 mm mély és 5 mm hosszú) csatornát is tartalmazó PDMS réteggel zártuk le, hogy az elmenő folyadékot elvezessük a mikrocsipből. E csatorna egyik végét az E kimeneti porthoz, másik végét pedig a W elvezető porthoz igazítottuk. A nyilak jelzik a külső mikrofotometriás detektálás lehetséges pozícióit. A folyadékokat szállító pumpacsövek 0,3 mm átmérőjű C (vivőfolyadék), illetve a S (mintaoldat) portokhoz csatlakoztathatók.

A 83. ábrán a mikrofotométerrel 60 s-ig mért abszorbciós jeleket hasonlítjuk össze különböző (2-40 μ m²) területű réseket használva a kivetítő ernyőn (a kivetített kép a mikrocsipen levő terület 10⁴-szerese), amikor a mikrocsip csatornájában festéket áramoltattunk. Bár - ahogyan az a Lambert-Beer törvényből is várható - a kapott abszorbanciaértékek nem térnek el, jelentős különbségeket találhatunk az egyes esetekben az analitikai jel zajának (standard deviációja) mértékében. 20 μ m²-ről 400 μ m²-re növelve a fénnyel besugárzott területet, a zaj, azaz a jel standard deviácója 0,015-ről 0,0017-re csökkenthető.

Cáspár 923: MT 4 doktori értekezés



83. ábra. Mikrofotométerrel mért abszorbciós jelek különböző (**a**,) 2, (**b**,) 4, (**c**,) 20 és (**d**,) 40 μ m² területű réseket használva a kivetítő ernyőn (a kivetített kép a mikrocsipen levő terület 10⁴-szerese. (Minta:brillantkék FCF, λ = 640 nm, standard deviációk: 0,015 (a), 0,0049 (b), 0,0015 (c), and 0,0014 (d))

 $0,2 \ \mu$ L térfogatú mintaoldatokat perisztaltikus pumpával juttattuk be a mikrocsipbe az **S** porton keresztül. Az 5-100 μ M koncentrációjú molibdénkék komplexbe vitt foszfát standardoldatok jelei a 84. ábrán láthatók, mely szerint még a néhány mikromólos koncentráció-tartományban is reprodukálhatóan végezhetők foszfátmeghatározások.

A kifejlesztett rendszerben (a mikrofluidikai csip csatornáján és a kimeneti portjában) végezve a detektálást a foszfátion koncentrációjának meghatározásának kimutatási határait a 7. táblázatban adtuk meg és hasonlítottuk össze hagyományos spektrofotometriás mérésekkel. Míg a detektálást a kimeneti portban végezve az elérhető érzékenység alig ötször rosszabb, mint hagyományos spektrofotometriával végezve, a mikrofotometriás méréshez kevesebb, mint 10 000-szer kisebb térfogatú minta szükséges. A kimeneti porton keresztül végezve a detektálást, több mint 50-szer érzékenyebb detektálást érhetünk el, mint a folyadékcsatorna kis szakaszán keresztül detektálva, hiszen a kimeneti portban jóval vastagabb mintaoldaton halad át a fény.



84. ábra. 2 μL térfogatú 5-100 μM koncentrációjú foszfát mintaoldatok abszorpciós jelei mikrofotométerrel detektálva (a foszfát molibdénkék komplexben volt jelen).

7. táblázat. Molibdénkék komplexben jelenlevő foszfát meghatározásának kimutatási határai közvetlenül a csatornán, illetve a kimeneti portban végezve a detektálást spektromikrofotométerrel. Összehasonlításképpen hagyományos spektrofotometriás méréseket is végeztünk (λ =640 nm).

		LOD (µM)	A detektáláshoz használt minta térfogata (nL)
csatornán detekta	álva ¹ :		
$20 \ \mu m^2$		50	0,6
$40 \ \mu m^2$		38	1,2
$200 \ \mu m^2$		5,6	6,0
$400 \ \mu m^2$		5,3	12
kimeneti detektálva ²	portban	0,78	120
hagyományos fotometriával detektálva ³		0,16	1 000 000

¹ a mikrocsipen megvilágított terület 20 - 400 μm^2

² a kimeneti port magassága: 2,5 mm

³ a küvettában a mintaoldatot magassága: 1 cm, fényúthossz :1 cm

6. Összefoglalás

Az értekezésben bemutatott kutatási eredmények két fő területre oszthatók: a kapillárisokban, illetve a mikrofluidikai csipekben végzett elektroforetikus elválasztások tanulmányozására. Bár az elektroforetikus elválasztások elve természetesen megegyezik a két rendszerben, az általános hasonlóságok mellett az elválasztások gyakorlati megvalósításában (pl. mintabevitel, az elválasztóközeg geometriája, párhuzamos elemzések lehetősége, alkalmazható detektálási módszerek, kapcsolás más módszerekkel, stb.) nyilvánvaló különbségek is fellelhetők.

Mind a kapillárisban, mind a mikrocsipben végzett elektroforézis 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. Tanulmányoztuk az indirekt UV spektrometriás detektálással kapott jelek nagysága és az elektrokinetikusan injektált különböző vezetőképességű minták koncentrációja közötti kapcsolatot. Azt találtuk, hogy a mérendő mintával megtöltött CE kvarckapillárisban mért áramerősség értékek megfelelő korrekciós tényezőket szolgáltatnak a külső kalibrációs eljáráshoz. Ezt felhasználva a kis vezetőképességű minták mennyiségi elemzéséhez egy egyszerű külső kalibrációs eljárást javasoltunk. 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 elektroforézisénél az elemzés nagy érzékenységét biztosító elektrokinetikus injektálás alkalmazásakor is használható az egyszerű külső kalibrációs mennyiségi meghatározási módszer.

Ismeretes, hogy 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 számításos korrekcióval helyes kvantitatív eredményekhez juthatunk. Ez a kalibrációs eljárás *belső* abban az értelemben, hogy a referencia komponenst közvetlenül a mérendő mintához adjuk, és egyúttal *univerzális* is, hiszen a mintában jelenlevő több komponens mennyisége is meghatározható az egyetlen referencia komponens válaszjele alapján. Azt találtuk, hogy a tioszulfát, mint belső univerzális standard jól alkalmazható az olyan teljesen disszociáló komponensek mennyiségi meghatározására, amelyek elektroforetikus mozgékonysága legfeljebb 10%-ban különbözik a kromofor háttérion (pl. kromátion), az ellenion (pl. káliumion) és a belső univerzális standard (pl. tioszulfátion) mozgékonyságától. A javasolt kalibrációs eljárással meghatározott koncentráció értékek kevesebb, mint 5%-al

tértek 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 érzékenységének meghatározására, hiszen az indirekt detektálás miatt a meghatározandó komponensek koncentrációjával arányos válaszjelét a háttérelektrolit kromofor ionja szolgáltatja.

Bár ezeket a kalibrációs módszereket kapillárisos rendszerekben fejlesztettük ki, mikrocsipekben - az elektrokinetikus injektálást az adott körülmények között végezve - ugyancsak alkalmazhatók.

A különböző tudományterületekről érkező analitikai feladatok megoldásához sokféle vegyülettípus meghatározására fejlesztettünk ki CZE vagy MEKC módszereket. Bár a fémek különböző vegyületei, komplexei, specieszei rendkívül változatos formában lehetnek jelen töltésük, méretük, oldékonyságuk vagy éppen detektálhatóságuk szempontjából, a kapilláris elektroforézis univerzális jellegénél fogva jól alkalmazható ezen komponensek elválasztására és meghatározására.

- Hat szervetlen és szerves arzénvegyület elválasztásával demonstráltuk, hogy az elemek szervetlen és szerves vegyületei különböző ionos formáinak meghatározására a CZE egy egyszerű és gyors (akár 2 percen belüli) lehetőséget nyújt.
- 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 CrCl₃ vízben való oldásakor kapott 3 akvakomplex ([CrCl₂(H₂O)₄]⁺, [CrCl(H₂O)₅]²⁺ és [Cr(H₂O)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.
- Abban az esetben, ha a szervetlen vegyületek csak kevéssé ionosak és/vagy kevéssé nyelnek el fényt, a vegyületek származékképzése vagy a MEKC módszer alkalmazása lehet célravezető. Négy higanyvegyületnek (Hg²⁺, metil-Hg, etil-Hg, fenil-Hg) négy különböző tiolvegyülettel (cisztein, glutation, 2-merkapto-nikotinsav, merkapto-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.

 Hat ionos, illetve töltésnélküli Gd tartalmú kontrasztanyag elválasztására elsőként dolgoztunk ki MEKC módszert, és megmutattuk, hogy megfelelően kiválasztott 2 belső standard (dimetil-szulfoxid, fahéjsav) egyidejű alkalmazásával a komponensek migrációs időinek kis relatív szórása (0,027-0,34 RSD% (c= 1 mM, N= 10)) érhető el.

Kihasználva a CE azon speciális előnyét, hogy komplex, jelentős mátrixanyagot tartalmazó minták is közvetlenül, mintaelőkészítés nélkül beinjektálhatók a szeparációs csatornába a legkülönbözőbb, elsősorban klinikai minták elemzéseire fejlesztettünk ki CE módszereket, és vontunk le gyógyászati szempontból értékes következtetéseket.

- A szájüreg különböző helyeiről, illetve nyálmirigyekből vett minták nitrit, nitrát és tiocianát tartalmát elemezve azt találtuk, hogy a nyálmintákban a nitrit és nitrát mennyisége gyorsan csökkent, 90 perccel a mintavételezést követően a teljes nitrit és nitrát eltűnt a nyálmintákból, míg a tiocianát koncentráció viszonylag állandó maradt. Dohányos személyektől vett nyálminták tiocianát koncentrációját átlagosan 5,4-szer nagyobbnak találtuk a dohányosokénál.
- 14 kefalosporin antibiotikum elválasztására CZE módszert fejlesztettünk, mellyel a migrációs idők 1,3 RSD%-nál kisebb relatív szórása és 0,42-1,62 kimutatási határok µg/mL voltak elérhető. А kefalosporinok koncentrációjának időbeni alakulását CZE módszerrel meghatározva a származó szérumban, kivezetett sebváladékban (drain), betegektől agyvízben (liquor), vizeletben és bronchiális váladékban (sputum) megmutattuk, hogy mely esetekben marad el az egyes kefalosporinok koncentrációszintje a baktériumok pusztulásához szükséges (MIC) érték mögött. A kapilláris zónaelektroforézist először mi alkalmaztuk viszkózus, nagy sűrűségű bronchiális váladék minták elemzésére. Bár e nagy sűrűségű mintáknál 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.
- 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 agytumor mintákban is meghatároztuk (0,061- 0,117 µg/g), igazolva, hogy a temozolomid átjut a tumorba.

Hat kefalosporin antibiotikum CZE módszerrel történő pК értékeinek meghatározásán keresztül bemutattuk, hogy egyetlen mintából, egyidejűleg több, akár bomlékony komponens pK 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 értékek megegyeznek. A CZE további előnye a potenciometriás pK meghatározásokhoz képest, hogy akkor is alkalmazhatók, ha csak kevés (<30 µL) mintamennyiség áll rendelkezésre, vagy ha a komponenssel együtt más anyagok is jelen vannak. Igazoltuk, hogy a CZE-vel meghatározott pK értékek jól egyeznek a potenciometriás módszerrel kapott értékekkel, de azt is kimutattuk, hogy az egymáshoz közeli pK értékek potenciometriásan nagyobb pontossággal határozhatók meg.

Mikrofluidikai kutatásainkban olyan újfajta mikrocsipeket terveztünk és készítettünk el, melyekben elektroforetikus vagy elektrokromatográfiás módszereket alkalmazva végezhetünk analitikai meghatározásokat. Munkánkban nagy hangsúlyt helyeztünk a több csatornában egyidejűleg végrehajtható elválasztások kifejlesztésére, hogy ilyen módon az elemzések sebességét jelentősen növelhessük (ezzel együtt az elemzések költségét csökkentsük).

A Hagen-Poiseuille törvényre támaszkodva kidolgoztuk egy *folyadékmegosztás elvén alapuló, nyomással történő injektálás*i módszert a csatornák olyan mintázatú kereszteződése segítségével, ahol az egyik csatorna szélessége négyszer nagyobb volt, mint a szeparációs csatorna szélessége. Ellentétben az irodalomban található túlnyomórészt elektrokinetikus elven történő mikrocsip-injektálási módszerrekkel, a kidolgozott nyomással történő injektálási eljárásnál nem jelentkeznek az elektrokinetikus injektálásokra jellemző, mennyiségi meghatározások pontosságát csökkentő hibák. Ez az injektálási módszer lehetővé teszi 100-300 µm hosszúságú mintadugók (~200 pL) kialakítását, de a csatornák szélességének és hosszainak változtatásával kisebb vagy nagyobb mintadugók is létrehozhatók.

Megállapítottuk, hogy az injektált mintadugó térfogata a pumpa sebességétől nem, csak a csatornák átmérőinek arányától és hosszától, illetve az eredeti minta térfogatától függ. A csatornák kereszteződésében kialakított és a szeparációs csatornába juttatott ~0,5 nL térfogatú minta többszöri injektálásakor a csúcsmagasságok és csúcsterületek esetén 4,8, illetve 3,7 RSD% (N=6) relatív szórás volt elérhető. Ezt az injektálási módszert használtuk a miniatürizált kapilláris elektroforetikus rendszerben, illetve a CE-SPR kapcsolt rendszernél is.

Igazoltuk, hogy a folyadékmegosztás elvén alapuló, nyomással történő injektálás alkalmazható zónaelektroforetikus elválasztások végrehajtására a mikrocsipekben. Bár az irodalomban ellentmondásos közlések találhatók a kezeletlen PDMS felületi hogy a hidrofób töltését illetően, megállapítottuk, PDMS-ből készült mikrocsipekben katódirányú elektroozmotikus áramlás lép fel. A csatorna egységes, állandó töltésű és minőségű felületét különböző detergensek fali adszorpciójával alakítottuk ki. A detergensekkel csak a mintainjektálást megelőzően öblítettük át a csatornarendszert, a pufferelektrolit nem tartalmazta a detergenseket. A legjobb zónaelektroforetikus elválasztást akkor kaptuk, amikor az elektroozmotikus áramlást csökkentve a PDMS mikrocsip csatornái falát metilcellulózzal kezeltük, ekkor a két vizsgált anionos vegyület 15 s-on belül elválasztható volt 1 cm-nyi szeparációs távolságon.

A folyadékmegosztás elvén alapuló injektálást alkalmaztuk *miniatürizált CE rendszer*ben is, ahol az elválasztás egy rövid kvarckapillárisban történt, melynek végei egy PDMS mikrocsiphez csatlakoztak. Ebben a miniatürizált rendszerben hat kefalosporin antibiotikumot választottunk el hasonló elválasztási hatékonyság mellett (N= 5 000 - 15 000), mint a hagyományos CE készülékben. 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.

Folyadékmegosztás elvén alapuló mintabevitelt alkalmazva megoldottuk a kapilláris elektroforézis kapcsolását *felületi plazmon rezonancia spektroszkópiá*hoz két PDMS-ből készült mikrofluidikai platform segítségével. Az egyik mikrocsipben néhány nanoliternyi mintadugót alakítottunk ki és továbbítottunk a szeparációs kvarckapillárisba, 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 toltuk 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 tulajdonképpen 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.

Az SPR spektroszkópiával kapcsolatos kutatásaink során a technikát az irodalomban elsőként használtuk arra, hogy az SPR szenzor lapkát egy 100 nm-nél vékonyabb PDMS filmmel bevonva különböző komponensek (kis méretű ionok, neutrális komponensek, gyógyszermolekulák, fehérjék, detergensek) 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 áramás 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 HPMCvel statikus bevonatok kialakítására nyílik lehetőség. Bemutattuk, hogy ezek a jól hasznosíthatók a PDMS mikrocsipekekben jelentkező vizsgálatok elektroozmotikus áramlás változásainak, illetve egyes komponensek adszorpciós jelenségeinek (elnyúló csúcsalakok) megértéséhez.

Kifejlesztettünk egy mikrofluidikai csipekben alkalmazható *mágneses szelep*et, 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 μ m alá csökken. A szelep működtetése során egy 25 μ m vastagságú, a mikrofluidikai csatornarendszer fölött található, rugalmas PDMS réteg deformálása történik egy kis méretű állandó mágnes felé mozduló parányi fémtest által. A szelepek megfelelő nyitásával/zárásával nanoliter nagyságrendű mintadugók alakíthatók ki a mikrocsipben. Igazoltuk, hogy a mikrofluidikai rendszerekben tipikus 0,01-1 μ L/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.

A mikrocsipekben a *kromatográfiás töltetek*nek hagyományos fritek nélküli kialakítására több módszert közöltünk. Demonstráltuk, hogy a kromatográfiás

részecskéket a csatorna bármely szakaszán visszatarthatjuk a rugalmas PDMS mikrocsip 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 csökentjük), a rugalmas falú csatorna újra összehúzódik, a töltet körül egy folyamatos összeszorító erő alakul ki (bilincshatás). 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). Szilikaaerogél részecskékből először mi alakítottunk ki kromatográfiás töltetet mikrocsipben.

Bizonyítottuk, hogy az 5-10 µm méretű kromatográfiás részecskékből oly módon is kialakítható töltet a mikrocsipben, 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 mikrocsipben, kellően nagy felbontás elérésére érdekében a mikrofabrikálási eljárást részletesen optimáltuk. A különböző magasságú csatornák olyan öntőformák segítségével alakíthatók ki, melyek készítése során különböző vastagságú fotoreziszt azonos időtartamú besugárzásával különböző szélességű szűkület nyerhető, a vékonyabb fotoreziszten szélesebb lesz a szűkület.

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. Nagyszámú mikrotöltet is kialakítható egyidejűleg, ha a csatornáknak egyetlen közös portja felől áramoltatjuk a kromatográfiás részecskék szuszpenzióját a csatornák szűkületei felé. Megmutattuk, hogy egyetlen mikrocsipen elhelyezhető elektroforetikus szeparációs

130

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 szimulálhatók az áramlási sebességek alakulása a komplex mikrofluidikai rendszerekben és a szoftver segítségével olyan csatornamintázatokat terveztünk, amelyekben megvalósítható, hogy az áramlási sebességek azonosak legyenek a párhuzamos csatornákban.

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 belüli teljes elválasztás is elérhető. A kialakított tölteten (5 µm, C18) egy festékkomponensre (Brillantkék FCF) vonatkozó visszatartási kapacitás 7,5.10⁻¹² mol/mm-nek adódott, és kevesebb, mint 1 µL mintaoldat felhasználásával 50x el. Kefalosporin antibiotikumok elválasztásán dúsítás érhető 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 3 különböző töltetre vihetők és választhatók el egyidejűleg, így az adott analitikai feladathoz gyorsan kiválasztható az optimális kromatográfiás állófázis.

Egy, 12 mikrotöltetet (C18, 5 μ m) tartalmazó mikrocsippel elsőként demonstráltuk a mikrocsip alapú kromatográfiának a lángatomabszorpciós spektrometriával (FAAS) való kapcsolásának lehetőségét elemspecieszek gyors elválasztására/dúsítására és meghatározására. 80 μ L térfogatú mintaoldatnak a mikrocsip kromatográfiás töltetén való átáramoltatásakor megkötött Cr(VI)-ot 30 μ L-nyi metanollal eluálva és a lángatomabszorpciós spektrométerbe porlasztva a Cr(VI) kimutatási határa 0,0031 μ g/mL-nek adódott.

Jelenleg a kapilláris elektroforetikus és a mikrocsip alapú elektroforetikus rendszerek tanulmányozása és fejlesztése egyaránt fontos területe az analitikai kémiai kutatásoknak. Bár a kapilláris elektroforézist már 30 éve alkalmazzák a legkülönbözőbb területeken, és az utóbbi években a fehérje-alapú gyógyszerek, monoklonális antitestek fejlesztése és gyártása kapcsán a technika reneszánszát éli, és bár a csupán 2 évtizede elkezdett mikrofluidikai rendszerek analitikai célú

fejlesztése jelenleg nagyobb intenzitással folyik, jelenleg nem egyértelmű, hogy a leginkább kapillárisban vagy mikrocsipben fognak jövőben történni az elektroforetikus elválasztások. А kapillárisban történő elektroforetikus elválasztások előnye, hogy egyelőre a nagyobb méretű készülékekben jobb reprodukálhatóság érhető el (jelenleg a hatékony injektáló módszerek, nyomás- és hőmérsékletszabályzó rendszerek, szenzorok még nem a szükséges mértékben miniatürizáltak), az elválasztóegység anyagának (kvarc) felületi tulajdonságai viszonylag jól ismertek. A mikrocsipben történő elválasztások során a legnagyobb probléma az elérhető csekély reprodukálhatóság (különösen, ha nem viszkózus polimer mátrixszal töltjük meg a mikrocsip csatornáit) és az érzékeny, univerzális detektálás hiánya.

Hosszabb távra (több évtizedre) vizionálva, úgy gondolom, hogy a mikrofluidikai csipek fejlesztése eljuthat arra a szintre, hogy olyan laboratóriumi lapkák (lab-on-achip) lesznek elérhetők, amelyekbe sokféle mintakezelési, analitikai lépést integrálnak, és a komplett rendszer (energiaforrással, mintabevivő egységgel, detektorral, kijelzővel, stb.) valóban kis méretű lesz, nem csupán az egyes elemei. Az analitikai kutatások hosszú távú célja az lehet, hogy a bárki számára könnyen elérhető, csupán mobiltelefon méretű komplex analitikai eszközök képesek legyenek egyetlen csepp vérből nagyszámú diagnosztikai, akár molekuláris genetikai vizsgálatokat is elvégezni másodpercek alatt. A remények szerint kifejlesztésre kerülő mikrocsipek parányi minták sokaságával is képesek párhuzamosan kémiai reakciókat lejátszatni és komponenseket analizálni, így akár egy egyén teljes genomját rövid időn belül feltárni. A nagy gyógyszergyártó cégek hasonló elvű, kicsit "ipari" változatú mikrofluidikai csipjeinek párhuzamos elemzőegységeiben pedig egyszerre ezernyi lehetséges gyógyszervegyületet szintetizálhatnak és határozhatják meg biokémiai sajátságait óránként csupán nanoliternyi reagensoldatokat felhasználva, ily módon drámaian csökkentve a költségeket és fokozva az elemzési sebességet.

7. Köszönetnyilvánítás

Egy MTA doktori értekezés egy kutató addigi szakmai életének összefoglalása, a pálya egy olyan lépcsőfoka, ahova csak jónéhány korábbi lépcsőfok leküzdésével lehet eljutni. Még akkor is, ha maga az értekezés egy rövidebb időszak közleményeire támaszkodik, az értekezés nem születhetne meg a család, a kiváló gimnáziumi és egyetemi tanárok, a tudományos munkákban együttműködő kollégák és hallgatók, tudományos alapok, alapítványok együttes támogatása és hozzájárulása nélkül.

Mindenek előtt hálásan köszönöm szüleimnek, feleségemnek és lányaimnak a megértést, hogy együtt alkalmazkodva segítették tudományos pályafutásom és hogy otthon átsegítettek a tudományos munka nehéz időszakain.

Köszönetet mondok témavezetésem alatt dolgozó korábbi hallgatóimnak, elsősorban Andrási Melindának, Nagy Andreának, Koczka Péter Istvánnak, Kecskeméti Ádámnak, Kovács Otiliának, Törzsök Brigittának, Juhász Péternek, Gábor Lillának, Dudás Enikőnek, Kardos Szilviának, Széles Évának, Páger Csillának, a TDK- és diplomamunkájuk lelkiismeretes elkészítéséért. Külön köszönet illeti Dr. Andrási Melindát, akinek szorgalmára és precíz, gondos munkájára már több, mint 10 éve számíthatok. E közös munkák adták az értekezés kísérleti anyagának legnagyobb részét.

Kutatói pályám elején, atomspektrometriás területeken sokat tanulhattam diploma-, majd doktori munkám témavezetőjétől, Prof. Posta Józseftől (DE), majd posztdoktori ösztöndíjaim során a laboratóriumába fogadó Harald Berndt (ISAS, Dortmund) professzortól. Frank A. Gomez (CSU Los Angeles, USA) professzornak azért vagyok hálás, mert laboratóriumában sajátíthattam el a mikrofluidikai kutatómunka alapjait. Prof. Kilár Ferenctől (PTE) a kapilláris elektroforézis terén kaptam sokszor tanácsokat. Ezúton is köszönöm mindannyiuknak, hogy kutatói pályán való elindulásomat elősegítették.

Tudományos munkámat egyetemi hallgató koromtól kezdve mindvégig a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia tanszékén végeztem, köszönöm a tanszékem vezetőinek, Prof. Brücher Ernőnek, Prof. Sóvágó Imrének és Prof. Fábián Istvánnak, hogy mindvégig támogattak. Külön köszönöm jelenlegi tanszékvezetőmnek, Prof. Fábián Istvánnak, hogy támogatott önálló kutatói pályám kialakításában és hogy tanszéki feladataim elvégzését a 2,5 évnyi külföldi tanulmányutak időtartamára szüneteltessem.

Köszönettel tartozom tanszékem jelenlegi és korábbi munkatársainak azért a színvonalas és inspiráló szakmai légkörért, ami a tanszékünkön való kutató- és oktatómunkában mind a ma napig jelen van. Különösen hálás vagyok legközvetlenebb tanszéki kollégáimnak, Dr. Gyémánt Gyöngyinek, Dr. Lázár Istvánnak, Dr. Braun Mihálynak, Zékány Lászlónak, Dr. Buglyó Péternek akiket naponta kereshettem szakmai kérdéseimmel, problémáimmal.

Köszönöm, hogy az értekezésben bemutatott munkák klinikai, biológiai, fizikai és gyógyszerészeti területein együttműködött velem Dr. Klekner Álmos (DE-OEC), Dr. Vasas Gábor (DE-TTK), Dr. Bágyi Kinga (DE-OEC), Dr. Daróczi Lajos (DE-TTK), Prof. Gyéresi Árpád és Dr. Gabriel Hancu (MOGYE).

Köszönetet mondok mindazoknak a név szerint most nem említett hazai és külföldi kollégáknak, akikkel együtt dolgozhattam és hozzájárultak ahhoz, hogy ez a munka elkészülhessen.

Az értekezésben összefoglalt eredmények nem születhettek volna meg a DAAD ösztöndíj, az Európai Unió Marie Curie Posztdoktori ösztöndíja, a HAESF posztdoktori ösztöndíj, Országos Tudományos Kutatási Alap és a Cetox Kft. támogatása nélkül.

8. Irodalomjegyzék

8.1 Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények*

- [I] 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.
- [II] 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.
- [III] A. Gáspár, C. Sógor, J. Posta Separation of organic and inorganic arsenic species by capillary zone electrophoresis, *Chromatographia*, 2000, 51, 135-138.
- [IV] A. Gáspár, C. Páger Determination of mercury compounds by capillary electrophoresis, *Chromatographia*, 2002, 54, 115-120.
- [V] A. Gáspár, C. Páger
 Possibilities of determination of mercury compounds using capillary zone electrophoresis,
 Microchem.J., 2002, 73, 53-58.
- [VI] A. Gáspár, P. Buglyó Separation and kinetic study of chromium(III) chlorocomplexes by capillary electrophoresis, *Chromatographia*, 2000, 51, 143-147.
- [VII] M. Andrási, 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.
- [VIII] Gáspár A. A kapilláris elektroforézis alkalmazása szervetlen vegyületek meghatározásásra, Anyagvizsgálók lapja, 2003, 391-94.
 - *A közlemények mindegyikének levelező vagy első szerzője vagyok.

- [IX] Gáspár A., Andrási M.
 Elektroforetikus elválasztások kapillárisban és mikrocsipben Magy.Kém.Foly., 2011, 117, 47-50.
- [X] 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.
- [XI] 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.
- [XII] A. Gáspár, S. Kardos, M. Andrási, Á. Klekner Direct determination of cephalosporins in clinical samples using capillary electrophoresis *Chromatographia*, 2002, 54, 109-115.
- [XIII] M. Andrási, A. Gáspár, Á. Klekner Determination of cephalosporins in sputum samples using capillary electrophoresis J.Chromatography B., 2007, 846 355-358
- [XIV] 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
- [XV] 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.
- [XVI] 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.
- [XVII] A. Gáspár, M.E. Piyasena, L. Daróczi, F.A. Gomez Magnetically Controlled Valve for Flow Manipulation in Polymer Microfluidic Devices *Microfluid.Nanofluid.*, 2008, 6, 523-531.

- [XVIII] 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
 - [XIX] A. Gáspár, P. Koczka, H. Carmona, F.A. Gomez
 Hydrodinamic split-injection for microchip electrophoresis
 Microchem.J., 2011, 99, 180-185
 - [XX] P.I. Koczka, A. Gáspár
 Application of a capillary-assembled microfluidic system for separation of cephalosporins
 Electrophoresis, 2014, 35, 2534-2537
 - [XXI] 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.
- [XXII] 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.
- [XXIII] A. Gáspár, L. Hernandez, S. Stevens, F.A. Gomez Electrochomatography in Fritless Chromatographic Microchips Packed with Conventional Reversed-Phase Silica Particles *Electrophoresis*, 2008, 29, 1638-1642.
- [XXIV] A. Gáspár, A. Nagy, I. Lázár Integration of ground aerogel particles as chromatographic stationary phase into microchip *J.Chromatogr. A.*, 2011, 1218, 1011-1015.
- [XXV] A. Nagy, A. Gáspár Packed multi-channels for parallel chromatographic separations in microchips, J.Chromatogr. A., 2013, 1304, 251-256
- [XXVI] 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.

- [XXVII] 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.
- [XXVIII] 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.
- [XXIX] A. Gáspár, I. Bácsi, E.G. Garcia, M. Braun, F.A. Gomez Application of external micro-spectrophotometric detection to improve sensitivity on microchips *Anal.Bional.Chem.*, 2009, 395, 473-478.

8.2 További saját közlemények kapilláris elektroforézis témakörben

- [XXX] G. Vasas, A. Gáspár, C. Páger, G. Surányi, C. Máthé, M.M. Hamvas,
 G. Borbély: Application of capillary electrophoresis in analysis of cyanobacterial toxins (Anatoxin-a, Cylindrospermopsin, Microcystin-LR), *Electrophoresis*, 2004, 25, 108-115.
- [XXXII] S. Baros, M. Karsayová, K. Jomová, A. Gáspár, M. Valko: Free radical scavenging capacity of Papaver Somniferum L. and determination of pharmacologically active alkaloids using capillary electrophoresis, *J.Microbiol.Biotech.Food Sci.*, 2012, 1, 725-732.
- [XXXIII] A. Gáspár, M. Salgado, S. Stevens, F.A. Gomez: Microfluidic "Thin Chips" for Chemical Separations, *Electrophoresis*, 2010, 31, 2520-2525.
- [XXXIV] A. Gáspár, I. Bácsi: Forced flow paper chromatography: A simple tool for separations in short time, *Microchem J.*, **2009**, 92, 83-86.
- [XXXV] K. Bágyi, A. Haczku, I. Márton, J. Szabó, A. Gáspár, M. Andrási, I. Varga, J. Tóth, A. Klekner: Role of pathogenic oral flora in postoperative pneumonia following brain surgery: effects of preoperative cefazolin treatment, *BMC Infectious Diseases*, 2009, 9, 104.
- [XXXVI] K. Bágyi, I. Márton, J. Szabó, M. Andrási, A. Gáspár, I. Varga, L. Bognár, A. Klekner: Efficacy of pre-operative cephalosporin prophylaxis in controlling pathogenic oral bacterial growth in comatose patients, *J.Med.Microbiol.*, 2008, 57, 128-129.

- [XXXVII] G. Hancu, A. Gáspár, A. Gyéresi: Separation of oxazepam enantiomers by cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography, *Farmacia*, 2008, 56, 381-392.
- [XXXVIII] G. Hancu, A. Gyéresi, A. Gáspár: Micellar electrokinetic capillary chromatography of 1,4-benzodiazepine derivates and their degradation products, *Revista de Chimie*, 2008, 341, 164-173.
 - [XXXIX] A. Gáspár, S. Baghdachi, M. Goldberg, S. Stevens, J. Torres, M. Salgado and F.A. Gomez: Fritless Chromatographic Microfluidic-Based Columns for Chemical Separations, *American Laboratory*, 2008, 40, 13-16
 - [XL] G. Hancu, Á. Gyéresi, A. Gáspár: 1,4-Benzodiazepinek elválasztása micelláris kapilláris elektroforézissel ciklodextrinek segítségével, Orvostudományi Értesítő, 2007, 80, 58-61.
 - [XLI] G.Hancu, A.Gáspár, Á.Gyéresi: Separation of 1,4– Benzodiazepines by Micellar Elektrokinetic Capillary Chromatography, *J.Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, 69, 251-259.
 - [XLII] G. Vasas, D. Szydlowska, A. Gáspár, M. Welker, M. Trojanowicz, G. Borbély: Direct Determination of Microcystins in Environmental Samples Using Capillary Electrophoresis, *J.Biochem.Biophys.Methods*, 2006, 66, 87-97.
 - [XLIII] I. Bácsi, G. Vasas, G. Surányi, M. M-Hamvas, C. Máthé, E. Tóth, I. Grigorszky, A. Gáspár, S. Tóth, G. Borbely: Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate- or phosphate-starved cyanobacterium Aphanizomenon ovalisporum, *FEMS Microbiol.Lett.*, 2006, 259, 303-310.
 - [XLIV] Á. Klekner, K. Bágyi, L. Bognár, A. Gáspár, M. Andrási, J. Szabó: Effectiveness of cephalosporins in the sputum of patients with nosocomial bronchopneumonia, *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44, 3418.
 - [XLV] G. Hancu, A. Gáspár, Á. Gyéresi: 1,4-Benzodiazepin származékok elválasztása kapilláris elektroforézissel, *Orvostudományi Értesítő*, 2005, 78, 191-195.
 - [XLVI] Á. Klekner, A. Gáspár, S. Kardos, J. Szabó, G. Csécsei: Cefazolin prophylaxis in neurosurgery monitored by capillary electrophoresis, *J.Neurosurg.Anesth.*, 2003, 15, 249-254.
 - [XLVII] G. Vasas, A. Gáspár, G. Surányi, G. Batta, G. Gyémánt, M. Hamvas, C. Máthé, I. Grigorszky, E. Molnár, G. Borbély: Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from Aphanizomenon ovalisporum by plant test (Blue- Green Sinapis Test), Anal.Biochem, 2002, 302, 95-103.

8.3 Az értekezésben felhasznált irodalom

- [1] A. Tiselius, *Transactions of the Faraday Society*, 1937, 33, 524.
- [2] A.L. Levy, Nature (London), 1954, 174, 126.
- [3] O. Smithies, *Biochem.J.*, 1955, 61, 629.
- [4] B.D. Hames, *Gel Electrophoresis of Proteins*, Oxford University Press, Oxford, 1998.
- [5] S. Hjertén, Chromatogr. Rev., 1967, 9, 122.
- [6] F.M. Everaerts, J.L. Beckers, Th.P.E.M. Verheggen (szerk.), Isotachophoresis – Theory, Instrumentation and Applications, Elsevier, Amsterdam, 1976.
- [7] R.Virtanen, Acta Polytechnica Scand., 1974, 123, 1.
- [8] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, Th.P.E.M. Verheggen, J.Chromatogr., 1979, 169, 11.
- [9] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, J. Chromatogr., 1981, 218, 209.
- [10] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, Science, 1983, 219, 1281.
- [11] J.P. Landers, *Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*, CRC Press, Boca Raton, 2008.
- [12] I. Strelec, V. Pacáková, Z. Bosáková, P. Coufal, V. Guryca, K. Stulík, *Electrophoresis*, 2001, 23, 528.
- [13] J. Horvath, V. Dolnik, *Electrophoresis* 2001, 22, 644–655.
- [14] V. Dolník, Electrophoresis, 2004, 25, 3589.
- [15] C.A. Lucy, A.M. McDonald, M.D. Gulcev, J. Chromatogr A., 2008, 1184, 81.
- [16] F. Foret, L. Krivánková, P. Bocek: Capillary Zone Electrophoresis, VCH-Weinheim, 1993
- [17] Lee, T.T.; Yeung, E.S. Anal. Chem., 1992, 64, 1226.
- [18] M.C. Breadmore, P.R. Haddad, Electrophoresis, 2001, 22, 2464.
- [19] M. Gong , K.R. Wehmeyer ,A.P. Limbach ,W.R. Heineman, Anal.Chem., 2006, 78, 6035.
- [20] P. Jandik, R.J. Jones, *Chromatographia*, 1991, 546, 431.
- [21] P.E. Jackson, P.R. Haddad, J. Chromatogr. 1993, 640, 481.
- [22] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, *Capillary Electrophoresis*, Vieweg & Sohn Verlags. mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1996.
- [23] P. Jandik, G. Bonn, Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions, VCH Publishers, Weinheim, 1993.
- [24] E.S. Yeung, Acc. Chem. Res. 1989, 22, 125.
- [25] R.E. Synovec, E.S. Yeung, Anal. Chem., 1983, 55, 1599.
- [26] G. Bondoux, P. Jandik, W.R. Jones, J. Chromatogr., 1992, 602, 79.
- [27] F. Foret, S. Fanali, L. Ossicini, P. Bocek, J.Chromatogr. A., 1989, 470, 299.
- [28] J.L. Beckers, J.Chromatogr. A., 1999, 844, 321.

- [29] J. Collet, P. Gareil, J. Chromatogr.A, 1995, 716, 115.
- [30] J.L. Beckers, J.Chromatogr.A, 1996, 741, 265.
- [31] M.W.F. Nielen, J. Chromatogr., 1991, 588, 321.
- [32] P. Doble, P.R. Haddad, J. Chromatogr.A, 1999, 834, 189.
- [33] W. Kok (szerk.): *Capillary Electrophoresis: Instrumentation and Operation*, Chromatographia, S51, 2000.
- [34] http://www.natur.cuni.cz/~gas
- [35] M. Jaros, T. Soga, T. van de Goor, B. Gas B, *Electrophoresis*, 2005, 26, 1948.
- [36] Jaros M, Hruska V, Stedry M, Zuskova I, Gas B, *Electrophoresis*, 2004, 25, 3080.
- [37] W. Thormann, S. Molteni, J. Caslavska, K. Schmutz, *Electrophoresis*, 1994, 15, 3.
- [38] Z. Deyl, F. Tagliaro, I. Miksik, J. Chromatogr., 1994, 656, 3.
- [39] D.K. Lloyd, J.Chromatogr.B., 2008, 866, 154.
- [40] K.D. Altria, Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis, Springer, Wiesbaden, 1998.
- [41] J.R. Petersen, A.A. Mohammad, *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*, Humana Press Totowa, 2001.
- [42] I. Morita, J.I. Sawada, J. Chromatogr. A., 1993, 641, 375.
- [43] H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo, J. Chromatogr. A., 1995, 515, 245.
- [44] M. Friedberg, Z.K. Shihabi, J.Chromatogr.B., 1997, 695, 193.
- [45] M. Friedberg, Z.K. Shihabi, J.Chromatogr.A., 1998, 807, 129.
- [46] P.G. Righetti, C. Gelfi, R. Sebastiano, A. Citterio, J.Chromatogr.A., 2004, 1053, 15.
- [47] J.K. Towns, F.E. Regnier, Anal. Chem., 1991, 63, 1126.
- [48] E. Cordova, J. Gao, G.M. Whitesides, Anal. Chem., 1997, 69, 1370.
- [49] D.K. Lloyd, H. Watzig, J. Chromatogr. B., 1995, 663, 400.
- [50] A. Kunkel, S. Gunter, H. Watzig, J. Chromatogr. B., 1997, 768, 125.
- [51] L.L. Garcia, Z.K. Shihabi, J.Chromatogr., 1993, 652, 465.
- [52] M. Shirao, R. Furuta, S. Suzuki, H. Nakazawa, S. Fujita, T. Maruyama, *J.Chromatogr. A.*, 1994, 680, 247.
- [53] L. Krivankova, P. Pantuckovai, P. Gebauer, P. Bocek, J. Caslavska, W. Thormann, *Electrophoresis*, 2003, 24, 505.
- [54] J.C. Waterval, C.J. la Porte, R. van 't Hof, J. Teeuwsen, A. Bult, H. Lingeman, W.J. Underberg, *Electrophoresis*, 1998, 19, 3171.
- [55] I.H. Lee, D. Pinto, E.A. Arriaga, Z. Zhang, N.J. Dovichi, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 4546.
- [56] Y.F. Cheng, N.J. Dovichi, *Science*, 1988, 242, 562.

- [57] M.C. Ruiz-Martinez, J. Berka, A. Belenkii, F. Foret, A.W. Miller, B.L. Karger, Anal.Chem., 1993, 65, 2851.
- [58] G. Mcgrath, W.F. Smyth, J.Chromatogr.B., 1996, 681, 125.
- [59] N.E. Baryla, C.A. Lucy, *Electrophoresis*, 2001, 22, 52.
- [60] C.X. Zhang, Y. Aebi, W. Thormann, Clin.Chem., 1996, 42, 1805.
- [61] R.L. Chien, D.S. Burgi, J. Chromatogr. A., 1991, 559, 141.
- [62] L.A. Holland, N.P. Chetwyn, M.D. Perkins, S.M. Lunte, *Pharm.Res.*, 1997, 14, 372.
- [63] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, Sens. Actuators, 1990, 1, 244.
- [64] M.J. Madou, *Fundamentals of microfabriation*, CRC Press, Boca Raton, 2002.
- [65] P. Tabeling, Introduction to microfluidics, Oxford UP, Oxford, 2005.
- [66] C.S. Effenhauser, G.J.M. Bruin, A. Paulus, M. Ehrat, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 3451.
- [67] C.D.J. Duffy, C. McDonald, J.A.O. Schueller, G.M. Whitesides, *Anal. Chem.* 1998, 70, 4974.
- [68] R.S. Martin, A.J. Gawron, S.M. Lunte, Anal. Chem. 2000, 76, 3196.
- [69] V. Lindner, E. Verpoorte, W. Thormann, N.F. de Rooij, H. Sigrist, *Anal.Chem.* 2001, 73, 4181.
- [70] W. Schrott, M. Svoboda, Z. Slouka, M. Pribyl, D. Snita, *Microelectr.Engin*, 2010, 87, 1600.
- [71] C.D. García, K.Y. Chumbimuni-Torres, E. Carrilho, *Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis*, Wiley, New Jersey, 2013.
- [72] F. Bianchi, F. Wagner, P. Hoffmann, H.H. Girault, *Anal.Chem.*, 2001, 73, 829.
- [73] A. Manz, D.J. Harrison, E.M.J. Verpoorte, J.C. Fettinger, A. Paulus, H. Lűdi, H.M. Widmer, J.Chromatogr. 1992, 593, 253.
- [74] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, A.W. Moore, J.M. Ramsey, *Anal.Chem.*, 1994 66, 4127.
- [75] S.R. Wallenborg, C.G. Bailey, Anal. Chem., 2000, 72, 1872.
- [76] S.C. Jacobson, R. Hergenröder, L.B. Koutny, R.J. Warmack, J.M. Ramsey, *Anal.Chem.*, 1994, 66, 1107.
- [77] K. Seiler, D.J. Harrison, A. Manz, Anal. Chem., 1993, 65, 1481.
- [78] B.E. Slentz, N.A. Penner, F. Regnier, Anal. Chem., 2002, 74, 4835.
- [79] J.P. Alarie, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, Electrophoresis, 2001, 22, 312.
- [80] Z.H. Fan, D.J. Harrison, Anal. Chem., 1994, 66, 177.
- [81] C.S. Effenhauser, A. Manz, H.M. Widmer, Anal. Chem., 1993, 65, 2637.
- [82] R.M. Saito, W.K. Coltro, D.P. de Jesus, *Electrophoresis*, 2012 33, 2614.
- [83] D. Sinton, L. Ren, D. Li, J.Colloid.Interf.Sci., 2003, 266, 448.

- [84] D. Solignac, M.A.M. Gijs, Anal. Chem., 2003, 75, 1652.
- [85] Z. Wu, H. Jensen, J. Gamby, X. Bai, H.H. Girault, Lab Chip, 2004, 4, 512.
- [86] M. Karlinsey, J. Monahan, D.J. Marchiarullo, J.P. Ferrance, J.P. Landers, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 3637.
- [87] D. Wu, J. Qin, B. Lin, J. Chromatogr.A., 2008, 1184, 542.
- [88] D.J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Lüdi, H.M. Wildmer, *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1926.
- [89] D.J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C.S. Effenhauser, A. Manz, *Science*, 1993, 261, 895.
- [90] S.C. Jacobson, C.T. Culbertson, J.E. Daler, J.M. Ramsey, *Anal.Chem.*, 1998, 70, 3476.
- [91] B. Huang, H.K. Wu, S. Kim, R.N. Zare, Lab Chip, 2005, 5, 1005.
- [92] B.F. Liu, M. Ozaki, H. Hisamoto, Q.M. Luo, Y. Utsumi, T. Hattori, S. Terabe; *Anal.Chem.*, 2005, 77, 573.
- [93] H. Makamba, Y.Y. Hsieh, W.C. Sung, S.H. Chen, Anal. Chem., 2005, 77, 3971.
- [94] G.T. Roman, K. McDaniel, C.T. Culbertson, Analyst, 2006, 131, 194.
- [95] H. Han, X. Chen, *Electrophoresis*, 2012, 33, 765.
- [96] S.K. Bergstrom, N. Edenwall, M. Laven, I. Velikyan, B. Langstrom, K.E. Markides, *Anal.Chem.* 2005, 77, 938.
- [97] D.P. Wu, Y. Luo, X.M. Zhou, Z.P. Dai, B.C. Lin; *Electrophoresis*, 2005, 26, 211.
- [98] I.J. Chen, E. Lindner, *Langmuir*, 2007, 13, 3118.
- [99] D.P. Wu, J.H. Qin, B.C. Lin, Lab Chip, 2007, 7, 1490.
- [100] L. Bousse, S. Mouradian, A. Minalla, H. Yee, K. Williams, R. Dubrow, *Anal.Chem.*, 2001, 73, 1207.
- [101] N.T. Tran, I. Ayed, A. Pallandre, M. Taverna, *Electrophoresis*, 2010, 31, 147.
- [102] J.M.K. Ng, I. Gitlin, A.D. Stroock, G.M. Whitesides, *Electrophoresis*, 2002, 23, 3461.
- [103] L.J. Jin, B.C. Giordano, J.P. Landers, Anal. Chem., 2001, 73, 4994.
- [104] J. Wang, A. Ibanez, M.P. Chatrathi, A. Escarpa, *Anal.Chem.*, 2001, 73, 5323.
- [105] D.J. Fischer, K. M. Hulvey, A.R. Regel, S.M. Lunte, *Electrophoresis*, 2009, 30, 3324.
- [106] B. Zhang, H. Liu, B.L. Karger, F. Foret, Anal. Chem. 1999, 71, 3258.
- [107] A.D. Zamfir, J. Chromatogr. A., 2007, 1159, 2.
- [108] J.H. Ko, Y.S. Baik, S.T. Park, W.J. Cheong, *J.Chromatogr.A.*, 2007, 1144, 269.

- [109] W.J. Lough, I.W. Wainer (eds.), High performance liquid chromatography, Chapman & Hall, Glasgow, 1996.
- [110] A. de Mello, *Lab. Chip* 2002, 2, 48N-54N.
- [111] B. He, N. Tait, F. Regnier, Anal. Chem., 1998, 70, 3790.
- [112] G. Ocvirk, E. Verpoorte, A. Manz, M. Grasserbauer, H.M. Widmer, *Anal.Methods Instrum.*, 1995, 2, 74.
- [113] C. Ericson, J. Holm, T. Ericson, S. Hjertén, Anal. Chem, 2000, 72, 81.
- [114] K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, M.Nakao, T. Kitamori, Anal.Chem., 2000, 72, 1144.
- [115] L. Ceriotti, N.F. de Rooij, E. Verpoorte, Anal. Chem, 2002, 74, 639.
- [116] S. Ehlert, K. Kraiczek, J.A. Mora, G.P. Rozing, U. Tallarek, *Anal.Chem.*, 2008, 80, 5945.
- [117] S. Ehlert, L. Trojer, M. Vollmer, T. van de Goor, U. Tallarek, J.Mass Spectrom., 2010, 45, 313.
- [118] H. Yin, K. Killeen, R. Brennen, D. Sobek, M. Werlich, T. van de Goor, Anal.Chem. 2005, 77, 527.
- [119] Z. Krivácsy, A. Gelencsér, J. Hlavay, J. Chromatogr.A., 1999, 834, 21.
- [120] F. Foret, S. Fanali, A. Nardi, P. Bocek, *Electrophoresis*, 1990, 11, 780.
- [121] W. Beck, E. Engelhardt, Chromatographia, 1992, 33, 313.
- [122] X. Huang, J.A. Luckey, M.J. Gordon, R.N. Zare, Anal.Chem., 1989, 61, 766.
- [123] W. Friedl, J.C. Reijenga, E. Kenndler, J. Chromatogr.A. 1995, 709, 163.
- [124] E. Dabek-Zlotorzynska, E. P. C. Lai, A. R. Timerbaev, *Anal.Chim. Acta* 359, 1 (1998).
- [125] M. Albert, C. Demesma, J.L. Rocca, *Fresenius' J.Anal.Chem.*, 1995, 351, 426.
- [126] H. Gresehonig, M.G. Schmid, G. Gübitz, Fresenius' J.Anal.Chem., 1998, 362, 218.
- [127] I. Medina, E. Rubi, M.C. Mejuto, R. Cela, Talanta 1993, 40, 1631.
- [128] T.H. Lee, S.J. Jiang, Anal. Chim. Acta, 2000, 413, 197.
- [129] E. Pobozy, M. Knell, K. Kilian, R. Kataky, M. Trojanowicz, *Electrophoresis*, 2003, 24, 2259.
- [130] P. Kubán, P. Kubán, V. Kubán, Electrophoresis, 2003, 24, 1397.
- [131] B. Glod, E. Pobozy, S. Marczak, M. Trojanowitz, Acta Chromatogr. 1996, 6, 39.
- [132] J. Künnemeyer, L. Terborg, S. Nowak, L. Telgmann, C. Brauckmann, *Electrophoresis*, 2009, *30*, 1766.
- [133] C. Campa, M. Rossi, A. Flamigni, E. Baiutti, A. Coslovi, L. Calabi, *Electrophoresis*, 2005, 26, 1533.
- [134] H. Wätzig, M. Degenhardt, A. Kunkel, *Electrophoresis*, 1998, 19, 2695.
Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

- [135] Y. Tanaka, N. Naruishi, J. Chromatogr.A., 2004, 1051, 193.
- [136] E. Szökő, T. Tabi, A.S. Halász, M. Palfi, K. Magyar, J.Chromatogr.A., 2004, 1051, 177.
- [137] G. Ellis, I. Adatia, M. Yazdanpanah, S.K. Makela, *Clin.Biochem.*, 1998, 31, 195.
- [138] S.G. Bell, G.A. Codd, Rev.Med.Microbiol., 1994, 5, 256.
- [139] N. Akira, A. So, J. Pawliszyn, J. Chromatogr.A., 2002, 963, 295.
- [140] H. Sirén, M. Jussila, H. Liu, S. Peltoniemi, K. Sivonen, M. Riekkola, J.Chromatogr.A., 1999, 839, 203.
- [141] H. Fabre, P.G. Penalvo, J.Liq.Chromatogr., 1995, 18, 3877.
- [142] Y. Mrestani, R. Neubert, J. Schiewe, A. Hartl, J. Chromatogr.B., 1997, 690, 321.
- [143] H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto, S. Terabe, *J.Chromatogr.*, 1989, 477, 259.
- [144] P. Emaldi, S. Fapanni, A. Baldini, J. Chromatogr.A., 1995, 711, 339.
- [145] Andrási M., *Kefalosporinok vizsgálata elektroforetikus technikákkal*, PhD értekezés, 2010, Debrecen.
- [146] D.K. Lloyd, J.Chromatogr.A., 1996, 735, 29.
- [147] D. Perrett, G.A. Ross, J. Chromatogr.A., 1995, 700, 179.
- [148] D.K. Lloyd, J.Chromatogr.A., 2008, 866, 154.
- [149] M. Contin, S. Mohamed, F. Albani, R. Riva, A. Baruzzi, J.Chromatogr.B., 2008, 873, 129.
- [150] T.A. Vermeij, P.M. Edelbroek, J. Chromatogr. B., 1994, 662, 134.
- [151] A. Klekner, A. Gaspar, S. Kardos, J. Szabo, G. Csecsei, *J.Neurosurg.Anesth.*, 2003, 15, 249.
- [152] J.A. Cleveland, M.H. Benkö, J.Chromatogr.A., 1993, 652, 301.
- [153] Y. Ishihama, Y. Oda, N. Asakawa, J. Pharmac. Sci., 1994, 83, 1500.
- [154] S.J. Gluck, K.P. Steele, M.H. Benkö, J.Chromatogr.A, 1996, 745, 117.
- [155] E. Örnskov, A. Linusson, S. Folestad, J.Pharmac.Biomed.Anal., 2003, 33, 379.
- [156] S.K. Poole, S. Patel, K. Dehring, H. Workman, C.F. Poole, *J.Chromatogr.A.*, 2004, 1037, 445.
- [157] Y. Mrestani, R. Neubert, A. Munk, M. Wiese, J. Chromatogr.A., 1998, 803, 273.
- [158] M. Alkesic, V. Savic, G. Popovic, N. Buric, V. Kapetanovic, J.Pharm.Biomed.Anal., 2005, 39, 52
- [159] M.J.M. Darkes, G.L. Plosker, B. Jarvis, Am.J.Cancer, 2002, 1, 55.
- [160] B.J. Denny, R.T. Wheelhouse, M.F.G. Stevens, L.L.H. Tsang, J.A. Slack, *Biochemistry*, 1994, 33, 9045.
- [161] H.K. Kim, C.C. Lin, D. Parker, J. Chromatogr. B., 1997, 703, 225.

Cáspár 91213: MT 4 doktori értekezés

- [162] C.D. Britten, S.D.B. Rowinsky, Clin. Cancer Res., 1999, 5, 1629.
- [163] D.M. Park, D.D. Shah, M.J. Egorin, J.H. Beumer, J.Neuro-Oncol., 2009, 93, 279.
- [164] J. Künnemeyer, L. Terborg, S. Nowak, S., Anal. Chem., 2008, 80, 8163.
- [165] V. Loreti, J. Bettmer, Anal.Bioanal.Chem., 2004, 379, 1050.
- [166] H.J. Weimann, R.C. Brasch, W.R. Press, G.E. Wesbey, Am.J.Roentgenol., 1984, 142, 619.
- [167] K.W. Oh, C.H. Ahn, J.Micromech.Microeng., 2006, 16, R13.
- [168] M.A. Unger, H. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S.R. Quake, *Science*, 2000, 288, 113.
- [169] S.C. Terry, J.H. Jerman, J.B. Angell, *IEEE Trans.Electron Devices*, 1979, 26, 1880.
- [170] D. Bosh, B. Heimhofer, B. Muck, H. Seidel, U. Thumser, W. Welser, *Sens.Actuat.A.*, 1993, 37, 684.
- [171] B. Bae, N. Kim, H. Kee, S. Kim, Y. Lee, S. Lee, K. Park, *J.Microelectromech.Syst.*, 2002, 11, 344.
- [172] K.W. Oh, R. Rong, C.H. Ahn, Proc.microTAS, 2001, 407.
- [173] C. Fu, Z. Rummler, W. Chomburg, J.Micromech.Microeng., 2003, 13, S96.
- [174] A.C. Siegel, S.S. Shevkoplyas, D.B. Weibel, D.A. Bruzewicz, A.W. Martinez, G.M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 6877.
- [175] W.Y. Zhang, G.S. Ferguson, S. Tatic-Lucic, 17th IEEE international conference on MEMS, 2004, 741.
- [176] C.F. Poole, The essence of chromatography, Elsevier, Amsterdam, 2003.
- [177] H.J. Hübschmann, Handbook of GC/MS, Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [178] H. Makamba, J.H. Kim, K. Lim, N. Park, J.H. Hahn, *Electrophoresis*, 2003, 24, 3607.
- [179] J. Liu, M.L. Lee, *Electrophoresis*, 2006, 27, 3533.
- [180] I. Wong, C.M. Ho, *Microfluid.Nanofluid.*, 2009, 7, 291.
- [181] J. Zhou, A.V. Ellis, N.H. Voelcker, *Electrophoresis*, 2010, 31, 2.
- [182] B. He, N. Tait, F. Regnier, Anal. Chem., 1998, 70, 3790.
- [183] J.H. Knox, J.F. Parcher, Anal. Chem., 1969, 41, 1599.
- [184] Nagy A., *Többcsatornás mikrofluidikai csipek fejlesztése kromatográfiás elválasztásokhoz*, MSc diplomadolgozat, Debrecen, 2012.
- [185] G.A. Lord, D.B. Gordon, B.W. King, J.Chromatogr.A., 1997, 768, 9.
- [186] L. Ceriotti, N.F. de Rooij, E. Verpoorte, Anal. Chem., 2002, 74, 639.
- [187] http://www.epa.gov/nrmrl/wswrd/dw/epanet.html
- [188] J.C.Giddings, Dynamics of Chromatography, Part I: Principles and Theory, Marcel Dekker, New York, 1965.
- [189] J. Huft, C.A. Haynes, C.L. Hansen, Anal. Chem., 2013, 85, 1797.
- [190] J. Huft, C.A. Haynes, C.L. Hansen, Anal. Chem., 2013, 85, 2999.

Cáspár 91213: MT4 doktori értekezés

- [191] M.K. Chaudhury, G.M. Whitesides, *Langmuir*, 1991, 7, 1013.
- [192] www.biacore.com
- [193] www.ti.com/spr
- [194] www.biosensor.com
- [195] R.J. Whelan, R.N. Zare, Anal. Chem., 2003, 75, 1542.
- [196] B. Liedberg, I. Lundstrom, E. Stenberg, Sens. Actuators B., 1993, 11, 63.
- [197] C.S. Effenhauser, G.J.M. Bruin, A. Paulus, M. Ehrat, Anal. Chem., 1997, 69, 3451.
- [198] F. Dang, L. Zhang, H. Hagiwara, Y. Mishina, Y. Baba, *Electrophoresis*, 2003, 24, 714.
- [199] M. Viefhues, S. Manchada, T.C. Chao, D. Anselmetti, J. Regtmeier, A. Ros, *Anal.Bioanal.Chem.*, 2011, 401, 2113.
- [200] N. Maeda, N. Chen, M. Tirrell, J.N. Israelachvili, Science, 2002, 297, 379.
- [201] D.J. Gardner, G.S. Oporto, R. Mills, A.S.A. Samir, *J.Adhes.Sci.Tech.*, 2008, 22, 545.
- [202] K.Y. Chumbimuni-Torres, R.E. Coronado, A.M. Mfuh, C. Castro-Guerrero, M.F. Silva, G.R. Negrete, R. Bizios, C.D. Garcia, *RSC Adv.*, 2011, 1, 706.
- [203] M.N. Khan, Z. Arifin, *Malaysian J. Sci.*, 1994, 15B, 41.
- [204] C.-E. Lin, M.J. Chen, H.C. Huang, H.W. Chen, J.Chromatogr.A., 2001, 924, 83.
- [205] R. Atkin, V.S.J. Craig, E.J. Wanless, S. Biggs, Adv. Colloid Interf. Sci., 2003, 103, 219.
- [206] G. Ocvirk, M. Munroe, T. Tang, R. Oleschuk, K. Westra, D.J. Harrison, *Electrophoresis*, 2000, 21, 107.
- [207] E. Verpoorte, A. Manz, H. Ludi, A.E. Bruno, F. Maystre, B. Krattinger, H.M. Widmer, B.H. Vanderschoot, N.F. Derooij, *Sens.Actuators B.*, 1992, 6, 66.
- [208] G.N. Doku, S.J. Haswell, Anal. Chim. Acta, 1992, 382, 1.
- [209] G.N. Greenway, S.J. Haswell, P.H. Petsul, Anal. Chim. Acta, 1999, 387, 1.
- [210] P.H. Petsul, G.M. Greenway, S.J. Haswell, Anal. Chim. Acta, 2001, 428, 155.
- [211] A. Manz, E. Verpoorte, C.S. Effenhauser, N. Burggraf, D.E. Raymond, H.M. Widmer, *Fresenius' J.Anal.Chem.*, 1994, 348, 567.
- [212] Z. Liang, N. Chiem, G. Ocvirk, T. Tang, K. Fluri, D.J. Harrison, *Anal.Chem.*, 1996, 68, 1040.
- [213] M.P. Duggan, T. McCreedy, J.W. Aylott, Analyst, 2003, 128, 1336.
- [214] J.M. Ruano, V. Benoit, J.S. Aitchison, J.M. Cooper, Anal. Chem., 2000, 72, 1093.
- [215] R.N.C. Daykin, S.J. Haswell, Anal. Chim. Acta, 1995, 313, 155.
- [216] A. Daridon, M. Sequira, H. Dirac, J.P. Krog, P. Gravesen, J. Lichtenberg, G. Diamon, E. Veerporte, N.F. de Rooij, *Sens.Actuators.B.*, 2001, 76, 235.