

Új típusú mikrofluidikai eszközök előállítása és vizsgálata elektroforetikus, elektrokratográfiás, illetve folyadékkromatográfiás elválasztásokhoz

OTKA projekt záró beszámoló (K75286, 2008.10-2013.10)

Mikrofluidikai laboratórium kialakítása

A rendelkezésre álló csekély költségvetés ellenére, laboratóriumunkban fontos fejlesztések történtek (Zeiss gyártmányú inverz mikroszkóp nagyfelbontású Zeiss digitális kamerával, pontosan szabályozható perisztaltikus és fecskendő pumpák, programozható nagyfeszültségű tápegységek, spincoater, száloptikás spektrométer, plasma treamer) az OTKA támogatás, illetve a Cetox Kft. támogatása révén. Mindezek segítségével nagyszámú PDMS-ből készült mikrofluidikai csipet terveztünk és készítettünk. Tanulmányoztuk az öntőforma és a chip előállításának optimalizálását (UV lámpával való besugárzás időtartama és intenzitása, a PDMS keverési aránya, fűtési hőmérséklet és időtartama, a spincoater fordulatszáma, a mikrofluidikai csatorna mélysége, szélessége, stb.). A laboratóriumunk (http://inorg.unideb.hu/gaspar_labor) alkalmassá vált a legkülönbözőbb mintázatú PDMS mikrocsipek előállítására.

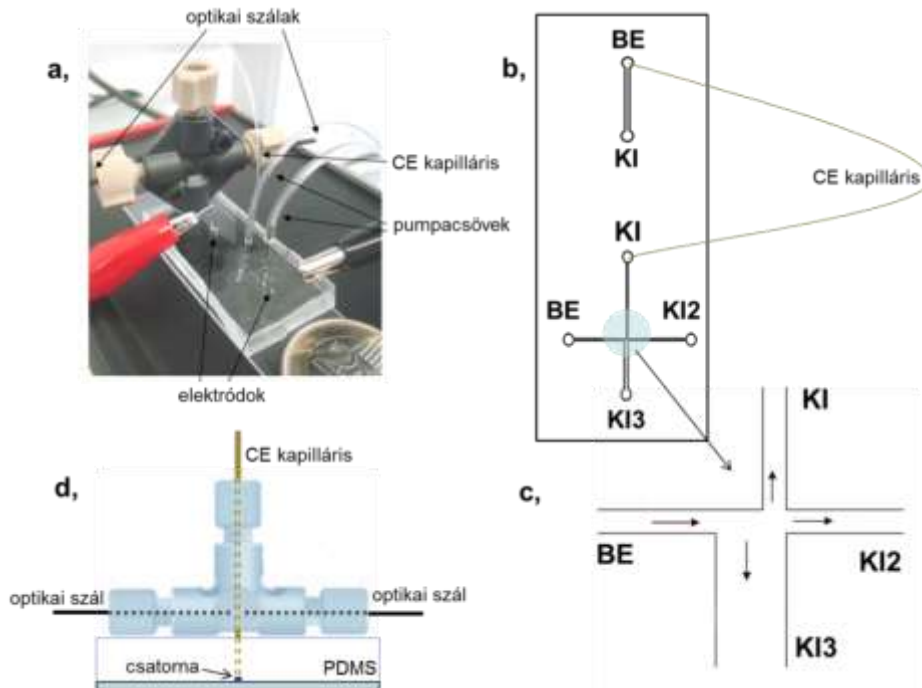
Elektroforetikus elválasztások mikrocsipben folyadékmegosztásos mintainjektálás alkalmazásával [1]

A mikrofluidikai kutatásaink egyik célja az volt, hogy injektálási módszert dolgozzunk ki a néhány száz pikoliternyi térfogatú folyadékminták csipbe való injektálásához, hogy ily módon érthessünk el hatékony zónaelektroforetikus elválasztást. Ellentétben az irodalomban található nagyszámú, elektrokinetikus elven történő injektálási módszerrel, munkánk során olyan új, nyomással történő injektálási eljárás kidolgozását tűztük ki célul, melynél nem jelentkeznek az elektrokinetikus injektálásokra jellemző, mennyiségi meghatározások pontosságát csökkentő hibák.

Az általunk kidolgozott folyadékmegosztásos mintainjektálás a Hagen-Poiseuille törvényen 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. Amennyiben a mikrocsipben a szélesebb csatorna szélessége négyszer nagyobb a többihez (keskenyebbekéhez) képest, a szeparációs csatorna hossza pedig tízszerese a többi csatornáénak, akkor mindezekből következik, hogy ha a csatornába beinjektált minta térfogata 1 μ l, akkor a szeparációs csatornába jutott minta mennyisége csupán 0,39 nL, amely a 10 cm hosszúságú csatorna térfogatának 0,26 %-a (260 μ m hosszúságú mintadugó, a csatorna mélysége mindenütt 30 μ m), ami optimális térfogat a kapilláris elektroforetikus elemzések tapasztalatai alapján.

Miniatürizált kapilláris elektroforetikus rendszer kialakítása [2, 3]

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 (1. 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).



1. 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, pumpacsővek, elektródok csatlakoztatása közvetlenül a rugalmas műanyag portjaiba történik (a.).

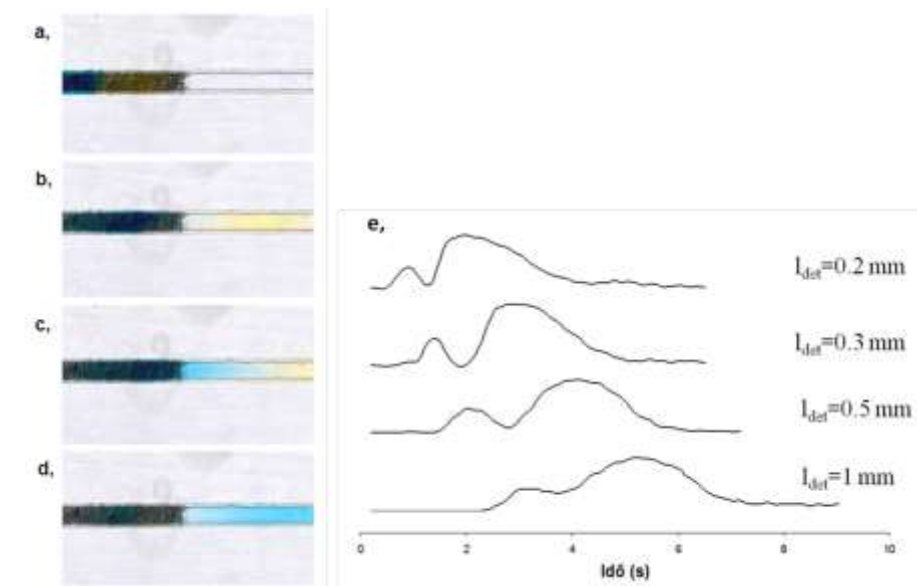
A μ CE rendszerben a kefalosporinokat 8,5 perc alatt alapvonalon sikerült egymástól elválasztani. A rövid effektív kapilláris hosszak ellenére az elméleti tányérszámok mindkét rendszerben 5 000-15 000 között változtak.

Kromatográfias töltetek kialakítása mikrofluidikai csipekben [4-6]

Kromatográfias töltetet tartalmazó mikrocsipeket terveztünk, előállítottunk és tanulmányoztunk. Kromatográfias töltet kialakításához a hagyományos szilikát és C18 láncokkal módosított szilikát töltetek mellett finoman porított aerogél is használtunk. Mindezen töltetek kromatográfias és elektrochromatográfias sajátságait teszteltük és jelenleg is vizsgáljuk. A kromatográfias részecskéket nem egy ideiglenes, hanem egy maradandó kialakítású szűkület segítségével tartottuk vissza. A szűkület a

fotolitográfias maszkra rajzolt vonal hatására jött létre. (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. 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. Természetesen minél szélesebb a szűkület, annál kisebb a töltet stabilitása. Ha a szűkület nagyobb, mint a visszatartandó részecske négyszerese, az így kapott töltet nem lesz elég stabil, nagyobb nyomás alkalmazása esetén a töltet összeomlik. 5 μm -os részecskék esetén, ha a szűkület hossza legalább 10 μm , a szűkület hosszának nincs hatása a töltet kialakítására.

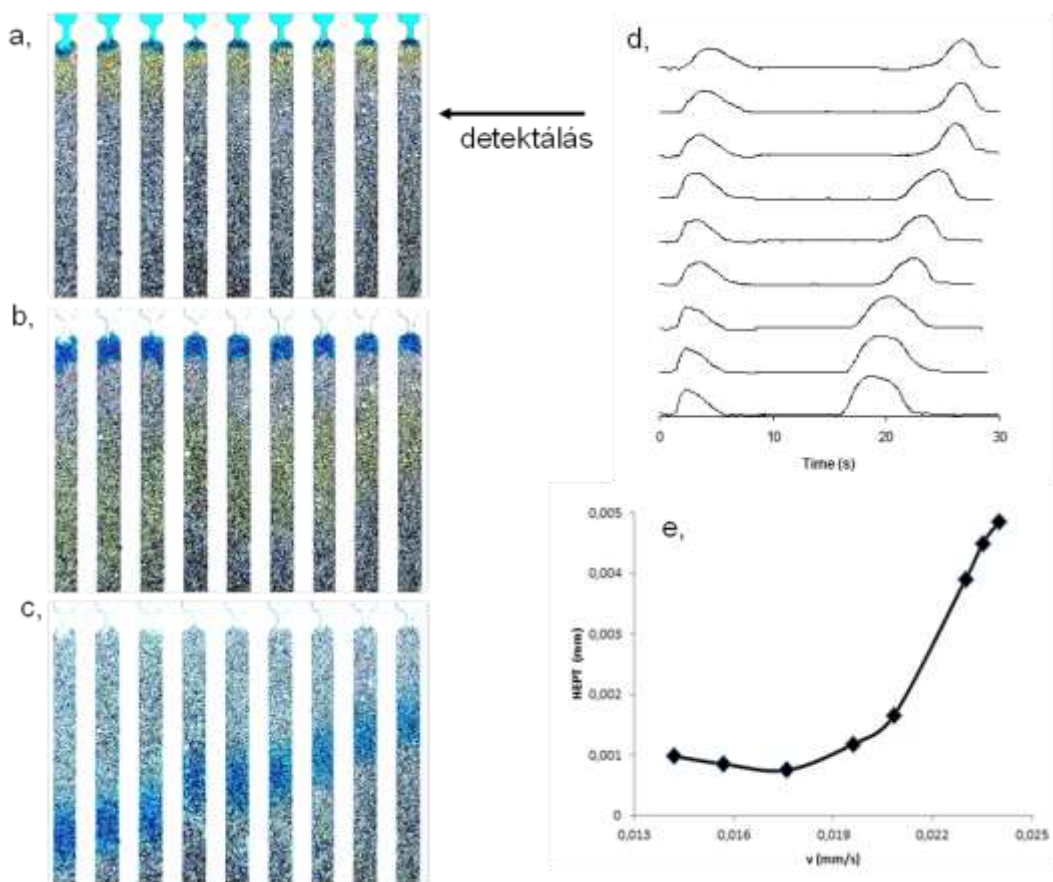
Az elkészült töltet kromatográfias tulajdonságainak tanulmányozását festék komponensek tölteten való elválasztásának, dúsításának vizsgálatával végeztük. A kék és sárga ételfesték keveréket injektálva a töltetre a kék komponenst megkötődött, míg a sárga komponens szabadon áthaladt rajta. A két festék izokratikus körülmények között is elválasztható volt, 35% metanol-víz eleggyel a festékek egymásután eluálhatók a töltetről. A töltet 0,5 mm hosszú szakasza már elegendő volt az 1 nL térfogatú (250 μm hosszúságú) minta elválasztásához. 3 bar nyomást alkalmazva nagyon gyors, 7 s-nál gyorsabb elválasztást akkor értük el, amikor közvetlenül a töltet legvégén detektáltunk. Mivel a töltet vastagsága az átlátszó PDMS mikrocsipben csupán 35 μm , így a töltet maga is viszonylag átlátszó, a festékek a tölteten is vizuálisan megfigyelhetők, színintenzitásuk detektálható (2. ábra).



2. ábra Mikroszkópos fényképek kék és sárga ételfestékek C18 szilika-aerogél tölteten történő elválasztásáról, 35% 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).

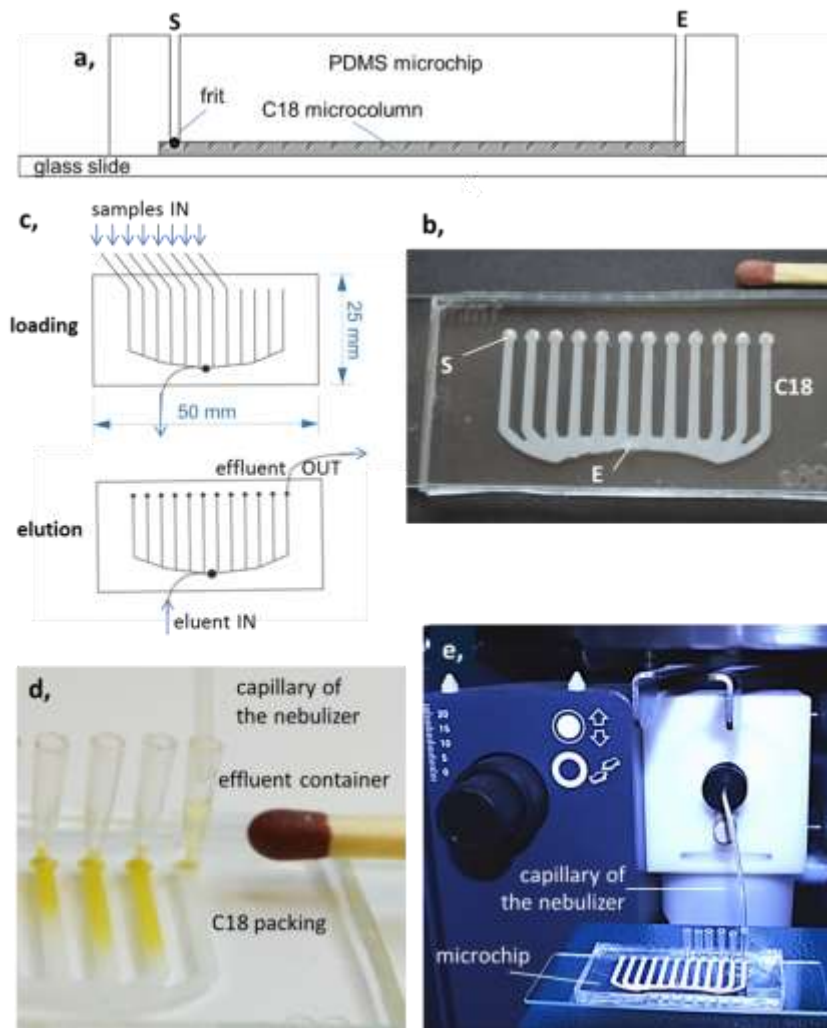
Többcsatornás kromatográfiás töltetek kialakítása mikrofluidikai csipekben [7, 8]

Olyan párhuzamosan folyó, szimultán elemzéseket lehetővé tevő mikrocsipeket fejlesztettünk ki, melyekben 3 vagy 12 szeparációs csatornában azonos típusú (C18) töltetet alakítottunk ki a csatornabeli szűkületek segítségével. A szűkületet (azaz egy csupán 8-10 mikrométer széles, 50 μm hosszú csatornát) eleve megrajzoltuk a litográfiai maszkon az öntőforma készítéséhez. A mikrocsipben így kialakított szűkület a folyadék szempontjából átjárható, de a kromatográfiás részecskéket visszatartja. Ezen rendszerek egyik legnagyobb előnye a párhuzamos mérések végrehajtásának lehetősége. Ha a párhuzamos csatornában azonos kromatográfiás tölteteket hozunk létre, különböző mintákat elemezhetünk egyszerre. Azonban egyetlen mintát több tölteten is elemezhetünk egyidejűleg, ha a csatornába különböző típusú kromatográfiás tölteteket integrálunk.



3. 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) diagram, melyet a kék festéknek a párhuzamos tölteteken való elúciói alapján határoztunk meg (e).

Legújabb [8] a több kromatográfiai töltet tartalmazó PDMS mikrocsipet az irodalomban először alkalmaztuk on-line kapcsolós lángspektrometriás detektálással Cr(VI) dúsítására és meghatározására (4. ábra).

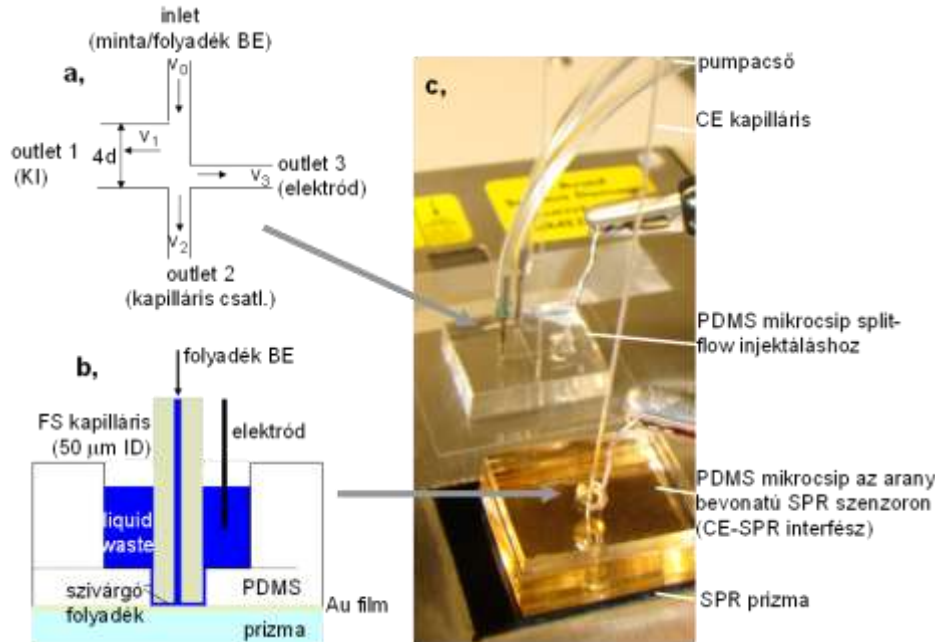


4. ábra C18 kromatográfiai tölteteket tartalmazó PDMS mikrocsip sematikus (nem mérhető) rajza (a,) és fényképe (b,) (20 mm x 1 mm x 0.1 mm, 5- μ m részecskék, az S port a minta bejuttására és az effluens kivezetésére; az E port pedig az eluens bevezetésére szolgál). (c.) A minták párhuzamosan injektálhatók a mikrotöltetekre az S porton keresztül, majd az adszorbeált Cr(VI) a közös E port felől eluálható. (d,) A Cr(VI) kromatográfiai tölteten történő dúsításáról készült fénykép. Az effluens tartályból közvetlenül szívja fel a mintát a FAA spektrométer porlasztó kapillárisa (e,) A FAA spektrométerhez kapcsolt mikrocsip elrendezése.

Felületi plazmon rezonancia spektroszkópia alkalmazása elektroforetikus rendszerekben egyes komponensek detektálásához, illetve felületi adszorpciós vizsgálatokhoz [9, 10]

Egy miniatürizált kapillaris elektroforézis rendszert felületi plazmon rezonancia (SPR) spektroszkópiás detektálással kapcsoltunk össze. A CE-SPR rendszerben a szeparációs 20 cm hosszú kvarckapilláris végeit PDMS mikrocsipekhez csatlakoztattuk. Az egyik mikrocsipben spit-flow injektálást alkalmaztunk a kb. 1 nL

mintatérfogat kialakítására, a másik mikrocsipet közvetlenül az SPR készülék aranyfilmmel bevont szenzorára helyeztük, és ebben alakítottunk ki egy csupán 1 nL térfogatú detektorcellát. Az SPR univerzális detektálást biztosít, így nem-UV aktív komponenseket (pl. glikolt) is meghatározhattunk (LOD: 1-10 pmol).



5. 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 miniaturizált CE-SPR rendszer elrendezése (c.)

Az SPR spektroszkópiát alkalmazhattuk a legkülönbözőbb anyagok (szervetlen ionok, kisebb neutrális poláris és apoláris vegyületek, detergensek, fehérjék) PDMS felületén történő adszorpciójának közvetlen vizsgálatára is, amennyiben az aranybevonatú szenzor felületét 100 nm-nél vékonyabb PDMS réteggel vontuk be (a PDMS-t 300-szorosan hígítottuk hexánban, majd spincoater-t alkalmaztunk). Azt találtuk, hogy a nagymolekulák (fehérjék, cellulóz) gyakorlatilag irreverzibilisen kötődtek nem-specifikus adszorpcióval a porózus, hidrofób PDMS felületére, de a több aromás csoportot tartalmazó molekulák, vagy kisebb detergensek (pl. CTAB, SDS) adszorpciója is jelentős. Ez utóbbi tapasztalatunk alapján igazoltuk, hogy a PDMS-el bevont kvarckapillárisban dinamikus réteg alakítható ki a detergensek segítségével.

Egyéb, az OTKA kutatási témához kapcsolódó mikrofluidikai vagy elektroforetikus vizsgálataink

Bizonyítottuk, hogy az atomspektrometriás kiértékeléshez használatos mikrofotométerek kiválóan alkalmazhatók mikrocsipeken a mikrofluidikai csatornák apró szakaszain a nanoliternyi térfogatú áramló

folyadékszegmensek, illetve a csatornavégeken kialakított portokban nagyobb térfogatú mintarészletek nagyobb érzékenységgű spektrofotometriás detektálására [11].

Kifejlesztettünk egy új, PDMS alapú, miniatürizált, kényszeráramoltatott papírkromatográfiás módszert, melyet jelenleg mikrofluidikai eszközökkel kombinálunk, illetve elektroforetikus elválasztásokhoz alkalmazunk [12].

Elektroforetikus elválasztási módszerek kidolgozása gyógyszervegyületek (temozolomid, kefalosporinok) és MRI kontrasztanyagok meghatározásához klinikai mintákban (szérum, vizelet, tumor). A CZE és MEKC elemzések precizitásának vizsgálata, és javítása több belső standard egyidejű alkalmazásával [13].

Az ún. peptid térkép vizsgálatoknál a tripszin önméztését kiküszöbölhetjük, ha valamilyen felületen immobilizáljuk, így nagyobb koncentrációban alkalmazhatjuk, tehát gyorsabb emésztést érhetünk el. A PDMS áttetsző, porózus, nagy fajlagos felületű, hidrofób polimer, közismert, hogy számos anyag, különösen a nagy makromolekulák kiválóan adszorbeálódnak felületére, ezért alkalmas alapanyag lehet tripszin immobilizálásához. Nemcsak PDMS mikrocseppek csatornáiban, de PDMS-sel bevont CE kapillárisokban vizsgáltuk a tripszin PDMS-en történő adszorpcióját. A tripszin adszorpciójának erősségét a PDMS felületére AFM, UV ill. SPR spektroszkópiás technikákkal vizsgáltuk. Miután megállapítottuk, hogy az adszorpció gyakorlatilag irreverzibilis, az enzim aktivitását vizsgáltuk UV spektrometriás és CE mérésekkel. Ezen eredmények alapján a rendszer alkalmas lehet mikrofluidikai csipben történő gyors fehérjebontásra peptid térkép vizsgálatokhoz (CE vagy MALDI-MS), jelenleg ebbe az irányba folytatjuk munkánkat.

Micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfiás (MEKC) módszert dolgoztunk ki a semleges és ionos Gd³⁺-tartalmú kontrasztanyagok (klinikai vizsgálatokban már használt illetve bevezetés alatt álló Gd³⁺-tartalmú MRI kontrasztanyagot [Gd-DTPA-BMA (Omniscan), Gd-HPDO3A (ProHance), Gd-DOTA (Dotarem), Gd-AAZTA, Gd-BOPTA (Multihance) és Gd-DTPA (Magnevist)]) egyidejű meghatározására spektrometriás detektálással. Az alkalmazott MEKC technika UV spektrofotometriás detektálással lehetővé tette az MRI vizsgálatokhoz használt kontrasztanyag, a Gd(DTPA-BMA) tartalom közvetlen in vivo meghatározását betegek vizelet- és szérummintáiban [14].

MEKC módszerrel meghatároztuk a temozolomidot (daganatellenes gyógyszer) és azok bomlástermékeit (MTIC, AIC), és követhető volt a viszonylag gyors ($t_{1/2}$ szérumban: 33 perc) átalakulás modell oldatokban és szérumban. Betegektől vett szérummintákból mind a temozolomid, mind az AIC, agydaganatokból pedig a temozolomid volt kimutatható. A MEKC-el rugalmasan változtatható kísérleti körülményekkel lehetőség van akár 1 percnél belüli gyors elválasztásokra, akár a mérendő komponensek egymástól, illetve a komplex matrixtartalmú minta sokfajta komponensétől való nagyfelbontású elválasztására [15, 16].

Az OTKA projektet 1 évre szüneteltettük, mivel a témavezető egy HAESF ösztöndíjjal az OTKA kutatási témámhoz kapcsolódó témában dolgozhatott Prof. Frank A. Gomez laboratóriumában (Miniatürizált felületi plazmon rezonancia szenzor kifejlesztése, Department of Chemistry, California State University, Los Angeles) az OTKA pályázat kutatási céljainak sikeres teljesítése érdekében.

- [1] A.Gaspar, P.Koczka, H.Carmona, F.A.Gomez, Hydrodynamic split-injection for microchip electrophoresis, *Microchem. J.*, 2011, 99, 180-185.
- [2] 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.
- [3] P. I. Koczka, A. Gaspar, Application of a capillary-assembled microfluidic system for separation of cephalosporins, *Electrophoresis*, közlésre beküldve
- [4] A.Gaspar, L.Hernandez, S.Stevens, F.A.Gomez, Electrochromatography in Fritless Chromatographic Microchips Packed with Conventional Reversed-Phase Silica Particles, *Electrophoresis*, 2008, 29, 1638-1642
- [5] A.Gaspar, A.Nagy, I.Lazar, Integration of ground aerogel particles as chromatographic stationary phase into microchip, *J.Chromatogr.A.*, 2011, 1218, 1011-1015.
- [6] A.Gaspar, M. Salgado, S.Stevens, F.A.Gomez, Microfluidic "Thin Chips" for Chemical Separations, *Electrophoresis*, 2010, 31, 2520-2525.
- [7] A. Nagy, A. Gaspar, Packed multi-channels for parallel chromatographic separations in microchips, *J.Chromatogr. A.*, 2013, 1304, 251-256
- [8] A. Nagy, E.Baranyai, A. Gaspar, Interfacing microfluidic chip based chromatography with flame atomic spectrometry for determination of chromium (VI), *J.Anal.At.Spectrom.*, közlésre beküldve
- [9] A.Gaspar, 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.
- [10]A.Gaspar, A. Kecskemeti, 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.
- [11]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.
- [12]A.Gaspar, I.Bacsi, Forced flow paper chromatography: A simple tool for separations in short time, *Microchem J.*, 2009, 92, 83-86.
- [13]M.Andrasi, A.Gaspar, Application of internal standards for the determination of temozolomid using capillary electrophoresis, közlés alatt
- [14]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.
- [15]M.Andrási, B.Törzsök, Á.Klekner, A.Gáspár, Determination of temozolomide in serum and brain tumor with micellar electrokinetic capillary chromatography, *J.Chromatogr.B*, 2011, 879, 2229-2233.
- [16]M.Andrasi, R.Bustos, A.Gaspar, F.A.Gomez, A.Klekner, Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis, *J.Chromatogr. B*, 2010, 878, 1801-1808.