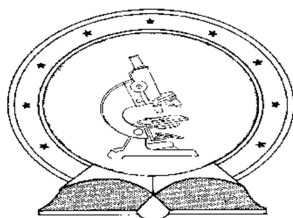


DE TTK



1949

NYOMÁSSAL TÖRTÉNŐ MINTABEVITEL ALKALMAZÁSA MIKROCSIP ELEKTROFORÉZISHEZ

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

a szerző neve: Koczka Péter István

témavezető neve: Dr. Gáspár Attila

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Kémiai Doktori Iskola
Debrecen, 2016

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémiai Doktori Iskola K/2 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2016. június 24.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Koczka Péter István** doktorjelölt 2012-2015 között a fent megnevezett Doktori Iskola K/2 programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2016. június 24.

a témavezető aláírása

NYOMÁSSAL TÖRTÉNŐ MINTABEVITEL ALKALMAZÁSA MIKROCSIP ELEKTROFORÉZISHEZ

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: Koczka Péter István, okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai doktori iskolája
(Koordinációs és analitikai kémiai programja, K/2) keretében

Témavezető: Dr. Gáspár Attila

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Bányai István	
tagok:	Dr. Péter Antal	
	Dr. Vasas Gábor	

A doktori szigorlat időpontja: 2015. október 2.

Az értekezés bírálói:

Dr. Lázár István	
Dr. Kilár Ferenc	

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr.	
tagok:	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	

Az értekezés védésének időpontja: 20... .. .

Tartalomjegyzék

Az értekezésben előforduló rövidítések listája.....	1
1. Bevezetés	3
2. Irodalmi előzmények.....	4
2.1. Elektroforetikus analitikai módszerek kapillárisban	4
2.2. Elektroforetikus analitikai módszerek mikrofluidikai rendszerekben.....	6
2.2.1. CZE és ITP mikrofluidikai csipekben.....	6
2.2.2. Mikrofluidikai csipek készítése.....	8
2.2.3. Mintabeviteli módszerek mikrofluidikai csipekhez	10
2.2.4. Mikrofluidikai csipekhez alkalmazható detektálási módszerek	12
3. Alkalmazott kísérleti körülmények.....	15
3.1. Vegyszerek, minták.....	15
3.2. PDMS mikrocsipek készítése.....	16
3.3. Mikrocsipek alkalmazása során használt eszközök.....	20
4. Az elért eredmények és értékelésük.....	22
4.1. Folyadékáram-megosztásos mintabevitel kidolgozása mikrocsipekhez	22
4.1.1. A folyadékáram-megosztásos injektálás elve	22
4.1.2. A folyadékáram-megosztásos injektálás alkalmazása folyadékminták mikrocsipbe történő bejuttatásához.....	24
4.1.3. COMSOL szimulációk alkalmazása mikrofluidikai csatornarendszerekben a folyadékáram-megosztásos injektálás modellezéséhez	26
4.2. A folyadékáram-megosztásos injektálást követő elektroforetikus elválasztások mikrocsipben.....	31
4.2.1. Zónaelektroforetikus elválasztások tanulmányozása a PDMS csip felületmódosítását követően.....	31
4.2.2. Miniaturizált CE rendszer kifejlesztése.....	37
4.2.2.1. Mikrocsip–kvarckapilláris kombinációjú elválasztó rendszer kifejlesztése száloptikás spektrofotometriás detektálás alkalmazásával	37
4.2.2.2. Kefalosporinok CZE elválasztása μ CE rendszerben.....	40
4.2.2.3. A μ CE és a kereskedelmi CE készülék analitikai teljesítőképességének összehasonlítása.....	43
4.2.3. Érintkezésmentes vezetőképességi detektálás alkalmazása mikrofluidikai csipekhez	47
4.2.3.1. Mikrocsipek tervezése és készítése C^4D detektáláshoz	47
4.2.3.2. C^4D alkalmazása CZE elválasztásokhoz.....	50
4.2.3.3. Valódi minták elemzése	53
4.2.3.4. Kapilláris C^4D szenzor és mikrofluidikai C^4D platform alkalmazása a detektorok analitikai teljesítőképességének vizsgálatához .	54

4.3. Mintadúsítás izotachoforézissel kereskedelmi CE készülékben és mikrofluidikai csipben.....	57
4.3.1. Az elektroosmotikus áramlás visszaszorítása dinamikus felületmódosítással.....	57
4.3.2. C^4D és UV detektálás alkalmazása kapilláris ITP-hez.....	58
4.3.3. ITP alkalmazása mikrocsipben.....	68
5. Összefoglalás	76
6. Summary.....	80
7. Irodalomjegyzék	84
8. Publikációk jegyzéke.....	91
9. Köszönetnyilvánítás.....	95

Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke:

BGE	háttérelktrolit (<i>background electrolyte</i>)
CE	kapilláris elektroforézis (<i>capillary electrophoresis</i>)
CGE	kapilláris gélelektroforézis (<i>capillary gel electrophoresis</i>)
CITP	kapilláris izotachoforézis (<i>capillary isotachophoresis</i>)
CTAB	cetil-trimetil-ammónium-bromid
CZE	kapilláris zónaelektroforézis (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
C ⁴ D	kapacitív módon kapcsolt érintkezésmentes vezetőképességi detektor (<i>capacitively coupled contactless conductivity detector</i>)
EK	elektrokinetikus
EOF	elektroosmotikus áramlás (<i>electroosmotic flow</i>)
E102	tartrazin (sárga ételfesték)
E133	Brillantkék FCF (kék ételfesték)
GC	gázkromatográfia (<i>gas chromatography</i>)
HEC	hidroxi-etil-cellulóz
HD	hidrodinamikus
HPMC	hidroxi-propil-metil-cellulóz
ID	belső átmérő (<i>inner diameter</i>)
ITP	izotachoforézis (<i>isotachophoresis</i>)
FEP	fluorozott etilén propilén
LC	folyadékkromatográfia (<i>liquid chromatography</i>)
LE	vezető elektrolit (<i>leading electrolyte</i>)
LIF	lézer indukált fluoreszcencia
LOD	kimutatási határ
MC	metil-cellulóz
MCE	mikrocsip elektroforézis
MEKC	micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia (<i>micellar electrokinetic capillary chromatography</i>)
MES	2-(N-morfolino)etánszulfonsav
MS	tömegspektrométer
PDMS	poli(dimetil-sziloxán)
PEEK	poli(éter-éter-keton)
PEO	poli(etilén-oxid)
PET	poli(etilén-tereftalát)
PMMA	poli(metil-metakrilát)
PTFE	poli(tetrafluor-etilén)
PVA	poli(vinil-alkohol)
PVP	poli(vinil-pirrolidon)
RSD	relatív standard deviáció

SDS	nátrium-dodecyl-szulfát
TE	záró elektrolit (<i>terminating electrolyte</i>)
UV/Vis	ibolyántúli/látható (<i>ultraviolet/visible</i>)
μCE	miniatürizált kapilláris elektroforézis (<i>miniaturized capillary electrophoresis</i>)
μTAS	miniatürizált teljes elemző rendszer (<i>micro total analysis system</i>)

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a mérőrendszerek méretét csökkentő, miniatürizációs technikák hatalmas fejlődésen mentek keresztül. Legelőször a számítástechnikában és az elektronika tudományában jelentek meg a legújabb vívmányok. A néhány cm^2 -nyi méretű integrált áramkörök kifejlesztésével soha nem látott mértékű technológiai fejlődés indult útnak, amely napjainkig is töretlenül folytatódik. Később más tudományágak is átvették a miniatürizációs tendenciákat, így fogalmazódott meg a kémiai tudományban is a 90-es évek elején egy kisméretű, komplett laboratóriumot magában foglaló, miniatürizált teljes elemző rendszer (micro total analysis system, lab-on-a-chip) létrehozásának koncepciója. Az elválasztóegység méretének csökkentésén túl további cél volt pontos mintabevitelt lehetővé tevő miniatürizált mintaadagolók, illetve érzékeny detektálást biztosító eszközök kidolgozása, amelyhez különböző területekről érkező szakemberek munkájára is szükség volt. Így mára a mikrofluidika egy dinamikusan fejlődő, interdiszciplináris tudományággá nőtte ki magát.

A mikroszipek analitikai kémiai célú felhasználásának számos előnye van. A miniatürizált rendszerekben végrehajtott elemzésekhez nagyon kis térfogatú mintára (gyakran nanoliternél is kevesebb), valamint oldószerre (néhány mikroliter) van szükség. Emellett lehetőség nyílik bennük gyors, egymást követő vagy akár párhuzamos, költséghatékony vizsgálatokra is. Kis méretüknek köszönhetően a lab-on-a-chip rendszerek hordozhatóak, olcsó és gazdaságos előállításuk pedig széles körű elterjedésüket is elősegíti. Annak ellenére, hogy a mikrofluidikában számos részterületen sikerült már áttörést elérni, még további fejlesztésekre van szükség a mintabeviteli és detektálási módszerek területén. Éppen ezért a lab-on-a-chipek létrehozása, tanulmányozása és alkalmazása továbbra is intenzíven folyik.

Munkánk során alapkutatás jellegű vizsgálatokat terveztünk és a mintabeviteli módszerek fejlesztéséhez kapcsolódva célul tűztük ki egy olyan egyszerű eszközökkel végrehajtható, nyomással történő módszer kidolgozását, amellyel lehetőség nyílik nagyon kis (néhány tized nanoliter) térfogatú minták gyors és reprodukálható, hibáktól mentes injektálására. Továbbá a kidolgozott injektálási módszer felhasználásával elektroforetikus elven működő, hordozható elválasztórendszerek létrehozását és azok átfogó vizsgálatát terveztük.

Az érzékenyebb detektálás elérése érdekében elektroforetikus mintadúsítási folyamat (izotachoforézis), valamint különféle kereskedelmi forgalomban elérhető detektorok mikroszipekhez való alkalmazhatóságát is vizsgálni kívántuk.

2. Irodalmi előzmények

2.1. Elektroforetikus analitikai módszerek kapillárisban

Az elektroforetikus technikák a legnagyobb elválasztási hatékonyságú, manapság is dinamikusan fejlődő analitikai módszerek közé tartoznak. Az elektroforézis alapja, hogy a töltéssel rendelkező részecskék elektromos erőterben, a rájuk ható vonzó és taszító kölcsönhatások révén különböző mértékben mozdulnak el, ezáltal lehetőség nyílik egymástól történő elválasztásukra.

Kohlrausch 1897-ben írta le az ionok elektrolit oldatban való vándorlásának törvényszerűségeit [1] (az ionok független vándorlásának törvényét és a moláris fajlagos vezetés elektrolitkoncentrációtól való függését), lefektetve ezzel az elektroforézis elméleti alapjait. Az elektroforézis első analitikai célú felhasználása Tiselius nevéhez fűződik (1937), aki fehérjéket vizsgált egy elektrolittal töltött U-csőben. A cső két végére kapcsolt feszültség hatására a komponensek eltérő elektroforetikus mozgékonyaságuk (tömeg/töltés arányuk) alapján részlegesen elválasztódtak egymástól. Úttörő jelentőségű munkájáért 1948-ban Nobel-díjjal tüntették ki. Később elsősorban biokémiai kutatásokban alkalmazták az elektroforézist, új hordozóként bevezették a papírt, illetve a különböző géleket (keményítő-, poliakrilamid- és agarózgél). Az első gélelektroforézist Smithies alkalmazta humán szérum fehérjék elválasztására [2]. A gélek készítése során felmerülő problémák miatt a figyelem később egyre inkább az oldatban történő elektroforézis kidolgozása felé irányult. Először Hjertén végzett oldatokban zónaelektroforézist [3], kísérleteiben 1-3 mm belső átmérőjű kvarccsöveket használt. A technológiai fejlesztéseknek köszönhetően egyre kisebb belső átmérőjű csöveket kezdtek alkalmazni: 1974-ben Virtanen 200-500 μm belső átmérőjű üvegcsövekben végzett zónaelektroforézist [4], Mikkers és mtsai. 200 μm -es tefloncsövekben választottak el egymástól kisméretű anionokat [5]. A kapilláris elektroforézis fejlődésében az igazi áttörésre a 80-as évekig kellett várni, mivel sokáig sikertelen maradt a kis belső átmérőjű csövekhez alkalmazható megfelelő érzékenységgű detektorok kifejlesztése, illetve az elektroforetikus elválasztás során fellépő EOF előnyös tulajdonságainak kihasználása. Az EOF-re sokáig problémaként tekintettek (Hjertén az EOF kizárására metil-cellulózzal bevont csövet használt), azonban Jorgenson és mtsai. éppen az elektromos térerő hatására fellépő EOF dugószerű áramlási profiljának (plug flow) előnyeit használták ki. 50 μm belső átmérőjű kvarckapillárisokban végeztek zónaelektroforézist, melynek során a kialakuló EOF nagyon kicsi diszperzióval szállította a részecskéket [6]. Az elektroforézis alapelvéből következik, hogy kizárólag töltéssel rendelkező komponensek elválasztására alkalmas módszer. Terabe és mtsai. 1984-ben azonban kidolgozták a micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfiát (MEKC), amellyel lehetőség

nyílt töltés nélküli komponensek elektroforetikus elválasztására is [7]. MEKC során a kritikus micellaképződési koncentrációnál (nátrium-dodecil-szulfátra $c_{cmc}=8,2$ mM) nagyobb mennyiségben felületaktív anyagot (SDS) adnak a pufferhez, amelynek hatására negatív töltésű micellák képződnek a pufferoldatban. A töltéssel nem rendelkező komponensek elválasztódásának alapelve, hogy különböző megoszlási hányadosuknak köszönhetően a micellák és a vizes mobilfázis között eltérő arányban oszlanak meg. Az első CE készülékek 1988-ban kerültek kereskedelmi forgalomba. 1991-ben Knox és Grant sikeresen ötvözte a kromatográfiás és az elektroforetikus technikák előnyeit, megalkotva a kapilláris elektrokromatográfiát (CEC) [8]. Az aktuális analitikai trendeknek megfelelően megjelentek az első miniatürizált mikrocip kapilláris elektroforézis rendszerek is [9]. Ezen módszerek alapjait a 2.2. fejezetben foglaljuk össze.

A kapilláris elektroforézis egy jól kidolgozott, fontos analitikai módszerré nőtte ki magát, mely nagy elválasztási hatékonyságot és gyors elemzést biztosít kismennyiségű mintafelhasználás mellett. A 90-es évektől rohamosan terjedtek el a CE készülékek a kémiai laboratóriumokban, alkalmazások százai születtek. Az elektroforetikus technikák közül kétségkívül a CZE a leggyakrabban használt módszer, mely alkalmazható többek között szervetlen ionok [10], szénhidrátok [11], aminosavak [12], vitaminok [13], gyógyszervegyületek [14], vagyis bármilyen töltéssel rendelkező komponens elemzésére. A MEKC módszer használható kisméretű töltött vagy töltéssel nem rendelkező komponensek, például peszticidek elválasztására [15], illetve szénhidrogén- és alkoholtartalom [16] meghatározására is. A CEC alkalmazási köre hasonló a hagyományos HPLC-hez, széles körben elterjedt biomolekulák (fehérjék, peptidek, szénhidrátok, nukleotidek, nukleozidek) elválasztására [17]. A CGE módszernél molekulaszűrő hatású géllal (sieving matrix) van töltve a kapilláris, amely nagymolekulák (fehérjék, nukleotidok) méret szerinti elválasztását teszi lehetővé [18]. Kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF) esetén amfolitokkal pH-gradienst alakítanak ki a kapillárisban, így különböző makromolekulák (fehérjék, huminsavak) izoelektromos pont szerinti elválasztása valósítható meg [19]. Kapilláris izotachoforézis esetében (CITP) nagyobb mennyiségű mintát juttatnak a kapillárisba egy nem folytonos pufferrendszer közé. Az első ITP elemzést egy házi készítésű berendezés segítségével hajtották végre az 1960-as években [20], vagyis jóval régebbi technika, mint a hagyományos CE módszer. Az ITP széles körű elterjedése annak köszönhető, hogy alkalmazásával százszoros, vagy akár ezerszeres koncentrációbeli dúsulás is elérhető töltéssel rendelkező komponensek esetében [21]. Így lehetőség nyílik a detektálási határ (LOD) javítására, valamint nagyon kis mennyiségben jelenlévő komponensek azonosítására is [22]. A CITP elemzéseket általában vékony belső átmérőjű (ID 200-800 μm) műanyag (például PTFE, FEP) csövekben végzik, ennek során (a vékonyabb ID 25-100 μm CE kapillárisokhoz képest) kisebb mértékű EOF alakul ki.

Az ITP elméleti háttéréről, megvalósításáról és alkalmazási köréről korábban több átfogó tanulmány jelent meg [20, 22, 23], az elmúlt években pedig új ITP módszereket (kétirányú ITP [24-25], tranziens ITP (tITP) [26], preparatív ITP [27-28]) dolgoztak ki.

2.2. Elektroforetikus analitikai módszerek mikrofluidikai rendszerekben

2.2.1. CZE és ITP mikrofluidikai csipekben

A mikrofluidika egy olyan multidiszciplináris kutatási terület, mely a különféle tudományágak (fizika, kémia, elektronika, mérnöki tudományok, biotechnológia) kutatási eredményeit integrálja különböző mikrofluidikai eszközök (mikrocsip, lab-on-a-chip) tervezéséhez és előállításához. Ezáltal lehetőség nyílik nanoliternél kisebb térfogatú mintamennyiségek kezelésére és áramoltatására, valamint a folyadékok viselkedésének mikroszkopikus mérettartományban való tanulmányozására. A legelső miniaturizációs törekvések a számítástechnikában jelentek meg a tranzistorok és integrált áramkörök kifejlesztésével. Később más tudományokban is alkalmazták ezt az új szemléletmódot, mely óriási fejlődést hozott többek között az analitikai rendszerek területén is. A mikrofluidika nyilvánvaló előnye az elemzés gyorsasága, a kis mintaszükséglet és vegyszerigény. A mikrocsipek műanyagokból olcsón is előállíthatók, tehát költséghatékony a módszer, a kicsi méretnek köszönhetően pedig könnyen mobilizálható a rendszer. Mikrocsipek használatával több kémiai, analitikai lépés integrálható, ezen kívül lehetőség nyílik egyidejűleg több, egymással párhuzamosan végrehajtható elemzésre is.

Az első mikrocsip analitikai rendszert 1979-ben a Stanford Egyetemen fejlesztették ki. Terry és mtsai. egy miniaturizált gázkromatográfot (GC) integráltak szilícium lapra [29]. Habár az elkészült rendszer soha nem került kereskedelmi forgalomba, a kutatók sikeresen demonstrálták, hogy lehetséges miniaturizált elválasztási rendszer készítése. 1990-ben Manz és mtsai. bevezették a μ TAS (micro total analysis system) koncepcióját. Ez a kisméretű rendszer tartalmazta a komplett elemzéshez szükséges berendezést, beleértve a minta-előkészítési, injektálási, elválasztási és detektálási lépéseket [30]. Két évvel később ugyanez a kutatócsoport kifejlesztett egy mikrocsip alapú CE (MCE) rendszert [9]. A legelső MCE elválasztás során, Harrison és mtsai. kalcein (egy fluoreszcein származék) és fluoreszcein keverékét vizsgálták [31]. Később egy üvegből készült mikrocsipen sikerrel szeparáltak hat, fluoreszceinnel jelzett aminosavat kevesebb mint 15 s alatt lézer indukált fluoreszcenciás (LIF) detektálással [32]. Jacobson és mtsai. rodamin B és diklórfloreszcein elektroforetikus szeparációját hajtották végre 200 μ m elválasztási úthosszon 0,8 ms időtartam alatt [33]. Az első kereskedelmi

forgalomban kapható elektroforetikus lab-on-a-chip rendszer 2002-ben jelent meg a piacon (Agilent, Bioanalyzer 2100).

Poli(dimetil-sziloxán) (PDMS) mikrocsip használatakor számos esetben kulcsfontosságú/szükséges az EOF csökkentése/stabilizálása, valamint a vizsgálandó komponensek fali adszorpciójának megakadályozása, melyet a csatorna felületének különféle detergensekkel történő kezelésével érnek el. A PDMS hidrofób tulajdonsága ellenére a polimer felülete negatív töltéssel rendelkezik, így jelentős mértékű EOF tapasztalható az ilyen anyagból készült mikrocsipekben. Sokféle felületaktív anyag – így a töltés nélküli n-dodecil- β -D-maltozid [34], a TWEEN 20, kationos felületaktív anyagként a CTAB (cetil-trimetil-ammónium-bromid) és DDAB (didodecil-dimetil-ammónium-bromid) [35], valamint a PSMA (poli(sztírol-maleinsavanhidrid)) hidrofób kopolimer [36] – EOF-re és a különböző komponensek megkötődésére gyakorolt hatását vizsgálták korábban. A leggyakrabban használt anionos detergens, az SDS (nátrium-dodecil-szulfát) alkalmazásával aminosavakat és fehérjéket választottak el egymástól [37]. A PDMS csatorna falára pozitív töltésű aminodextránt kötve stabil EOF alakul ki, és a fehérjék fali adszorpciójának mértéke is lecsökken [38]. A PDMS hidrofób felülete különböző módszerekkel (UV besugárzással, HCl-H₂O₂ elegybe mártással vagy plazmával történő kezeléssel) hidrofillé tehető. A folyamatok során aktív szilanol csoportok keletkeznek, így lehetővé válik különböző hidrofíl polimerek megkötése a PDMS felületén [39]. Lin és mtsai. epoxigyantával módosított hidrofíl polimereket adszorbeáltattak az oxidált PDMS felületére, a keletkezett nagy stabilitású bevonatnak köszönhetően DNS fragmenseket, fehérjéket lehetett hatékonyan elválasztani [40].

A miniaturizált rendszerek esetében a kismennyiségű minta elemzése miatt még nagyobb az igény az érzékenyebb detektálási rendszerek kifejlesztésére (lásd a 2.2.4. fejezetben). Emellett a detektálást megelőző különböző mintadúsítási módszereknek, így az ITP-nek is fontos szerepe van a detektálási érzékenység növelésében [41-43]. Az első mikrocsip alapú ITP elemzést Walker és mtsai. végezték el 1998-ban, melynek során különböző herbicideket vizsgáltak állandó feszültség mellett, normál Raman spektroszkópiás detektálással [44]. Prest és mtsai. alkálifémek keverékének ITP elválasztását hajtotta végre PDMS mikrocsipen vezetőképességi detektálással [45]. 2000-ben Kaniansky és mtsai. egy kolonnapcsolt PMMA mikrocsipet fejlesztettek ki érintkezéssel (direkt) vezetőképességi detektálással [46], amelyet ITP [47], ITP-ITP [48] és ITP-CZE [49] módban egyaránt lehetett használni. Ezt a rendszert később ételmintákban tartósítószer [50], ivóvízben bromát-ion [51] és borban szabad szulfid-ion mennyiségének [52] meghatározására is használták. Santiago csoportja az ITP zónák detektálásához fluoreszcens spacereket használt egy kereskedelmi forgalomban kapható Caliper mikrocsipen [53]. Ugyanez a csoport

boroszilikátból készült mikrocsipeken vérmintákból nyert ki és ITP-vel dúsított nukleinsavakat [54].

Az elmúlt években számos szimulációs programot fejlesztettek ki (GENTRANS [55], SPRESSO [56], SIMUL [57], CFD ACE+ és COMSOL Multiphysics) elektroforetikus módszerek vizsgálatára, melyek alkalmasak lehetnek a tömeg, impulzus és energia átadási folyamatok pontos feltérképezésére, az elektroforetikus zónák kialakulásának szimulálására, injektálási körülmények optimalizálására. Továbbá lehetőség nyílik annak megvizsgálására, hogy a mikrofluidikai csatornarendszer geometriájának milyen hatása van az elektroforetikus elválasztások hatékonyságára, ez pedig segítheti a mikrofluidikai csipek továbbfejlesztését.

2.2.2. Mikrofluidikai csipek készítése

A mikrofluidikai csipek készítéséhez „mikrofabrikálási” módszereket használnak, melyekkel 1 μm és 1 mm közötti méretű eszközöket lehet elkészíteni. A mikromegmunkálási módszereknek alapvetően két csoportjuk van, a szilícium- és üvegalapú technológiákra épülő ún. kemény technikák, illetve az elasztomereket, műanyagokat felhasználó lágy technikák.

A kemény technikákat az 1950-es évektől kezdték alkalmazni a mikroelektronikában, majd ezek továbbfejlesztése vezetett az 1990-es évek elején az első mikrofluidikai csipek kifejlesztéséhez. Az első olyan mikromegmunkálási eljárást, amely magában foglalta a kívánt csatornarendszer kimaratóását (etching), a csatlakozási pontok kialakítását és a mikrocsip ragasztását, szilíciumon végezték el [9]. A maratóási eljárások között megkülönböztetünk nedves és száraz maratóást. Nedves maratóás esetében a megmunkálni kívánt felületet folyadék fázisú anyaggal kezelik, a felület egyéb részeit pedig maszkkal védik a kémiai behatóástól. A kialakított csatorna alakját tekintve izotróp és anizotróp maratóási eljárások léteznek. Izotróp eljárást alkalmazva a maratóás a tér minden irányába azonos sebességgel történik, ezáltal gömbszerű mélyedések alakulnak ki a mikrocsip alapjául szolgáló szilícium- vagy üvegfelületben. Erre a célra leggyakrabban savak elegyét használják (például HF-HNO_3) [29]. Anizotróp maratóáskor a kimart térrészt síklapok határolják (V-alakú bemélyedés), mivel a kémiai behatóás az egyik kristálytani sík mentén preferáltabb lesz. Az ilyen típusú maratóást etiléndiamin és pirokatechin vizes oldatával [58] vagy tömény KOH-dal érik el [59]. Száraz maratóáskor a felületet gáz vagy plazmafázisban lévő ionos részecskékkal támadják, ilyen a reaktív ionmaratóás (RIE) [60] vagy a $\text{SF}_6\text{-C}_2\text{ClF}_5$ plazmamaratóás [61]. Egy zárt mikrofluidikai csatornahálózat létrehozásához a maratóási lépés után fontos az elkészített bemélyedések tökéletes lefedése (sealing). Ehhez gyakran anódos kötést alkalmaznak, mellyel az üveget a szilíciumhoz lehet „ragasztani” [62]. Később a szilícium helyett üveget kezdtek használni mikrocsipek készítésére a szilíciumnál

bemutatott mikromegmunkálási eljárásokhoz hasonló módszerekkel, fontos különbség azonban, hogy üveg használata esetén nem lehetséges anizotrópos maratás, annak amorf tulajdonsága miatt. Nedves maratáskor HF-t használtak [63].

A műanyagipar rohamos fejlődésével olyan új típusú anyagokat fejlesztettek ki, amelyek alkalmasak lehetnek mikrocsipek készítésére. A mikrofluidikai csipek másolatainak készítése történhet öntőformára öntéssel (molding), préseléses (casting) és mikroinjektációs lágy technikákkal. A molding módszernél a katalizátor és a polimer megfelelő arányú keverékét az öntőformára öntik és megemelt hőmérsékleten tartják. A műanyagot megkeményedése után lehúzzák a formáról, amely így a mintázat negatívját tartalmazza. A legelső ilyen eljárást 1998-ban Whitesides és mtsai. dolgozták ki, mellyel kevesebb mint 24 óra alatt sikerült elkészíteni egy komplett mikrofluidikai rendszert PDMS-ből [64]. A préseléses eljárásnál PMMA (poli(metil-metakrilát)) műanyagot alkalmaznak, mely kb. 170°C-os hőmérsékleten és 10-20 bar nyomáson deformálható, így a PMMA lapba a kívánt mintázat negatívja belepréselhető [65]. A mikroinjektálás esetében a felmelegített, folyékony halmazállapotú műanyagot az öntőformába injektálják, és a szétválasztást követően negatív mintázatot kapnak. Ez utóbbi módszert legelőször PMMA mikrocsipek készítéséhez alkalmazták [66]. Míg a molding módszernél egyszerű, műanyag öntőformákat használnak (ezeket például az IBM által kifejlesztett SU-8 fényérzékeny polimerből állítják elő [67]), a préseléses és mikroinjektációs eljárásoknál a nagyobb nyomás és hőmérséklet alkalmazása miatt fémből készült öntőformákat használnak. Manapság a PDMS-ből molding módszerrel készített mikrocsipek bírnak a legnagyobb jelentőséggel.

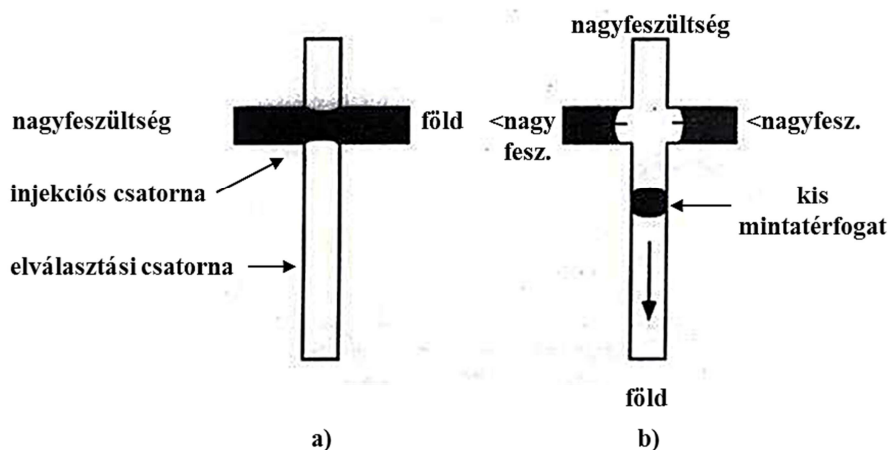
A PDMS számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik. Mivel átlátszó anyag, alkalmazásával lehetőség nyílik a mikrocsipben áramoltatott folyadék szabad szemmel vagy mikroszkóppal való követésére. Az elastomer mechanikai sajátsága (Young modulusa) a PDMS és a térhálósító adalék arányának változtatásával befolyásolható, attól függően, hogy milyen keménységű mikrocsipet kívánnak elkészíteni. Kis felületi energiája lehetővé teszi, hogy a megszilárdult réteg könnyedén lehúzható legyen az öntőformáról [68]. A PDMS alapvetően hidrofób tulajdonságú, átmenetileg azonban hidrofillé tehető a felület oxigén plazmával történő oxidációjával. A PDMS lap így üveghez vagy szilíciumhoz irreverzibilisen hozzáköthető [64].

Újabban a műanyagok közvetlen mikromegmunkálását lézerablációs technikával hajtják végre, melynek során a műanyagot egy intenzív lézersugárral elszublimáltatják. Általában UV (193 nm) [69] és CO₂ lézert (1060 nm) [70] használnak erre a célra. Az így elérhető pontosság mikrométeres tartományú, a kialakított felület durvasága pedig 0,2-0,5 µm körül alakul.

2.2.3. Mintabeviteli módszerek mikrofluidikai csipekhez

Mikrofluidikai csipekhez leggyakrabban az elektrokinetikus (EK) injektálási módszert alkalmazzák [9]. A bejuttatott minta térfogata jóval kisebb mint a hagyományos CE-nél injektált mennyiség (<1 nl). Alapvetően kétféle EK injektálási módszer ismert, a „kiszakításos” (pinched) és a „kapuzott” (gated) injektálás.

Kiszakításos injektáláskor (1. ábra) először a rövidebb, ún. injekciós csatornára kapcsolnak feszültséget egy kis időre, ekkor a csatorna keresztteződése feltöltődik a mintával. Ezt követően pedig a hosszabb, elválasztó csatornára adnak valamivel nagyobb feszültséget, így a keresztteződésben lévő mintából kiszakítódik egy kis térfogat, ami az elválasztási csatorna felé mozog, és megkezdődik az elektroforetikus elválasztás. A legegyszerűbb kiszakításos mintabevitel az egyenes kereszt (straight cross) csatornamintázatú mikrocsipeknél végezhető el. Léteznek dupla-T csatorna kialakítások is, különböző méretű „mintabemérő” résszel ($100\text{ }\mu\text{m}$, $250\text{ }\mu\text{m}$) [71]. A kiszakításos injektálás hátránya, hogy a csatorna keresztteződésében a kis mintatérfogat körül sok esetben szivárgás (leaking) lép fel különböző diffúziós és konvektív jelenségek miatt [72], amely elhúzódó végű (ún. tailinges) csúcsokat eredményez [73]. A szivárgás úgy csökkenthető, hogy két szomszédos csatornából puffert áramoltatnak, amely segíti a mintadugó kialakulását és az utánfolyás megszüntetését [74].

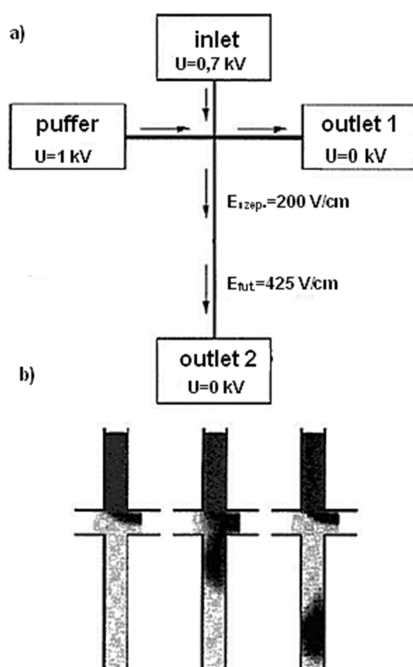


1. ábra

A kiszakításos injektálás sematikus ábrája. Az a) kép mutatja a minta betöltődését a keresztteződésbe, a b) kép a minta szeparációs csatornába való belökődését illusztrálja [71].

Kapuzott injektálás esetében (2. ábra) az injekciós csatornára (amely egyben a szeparációs csatorna is) és az arra merőleges, pufferral töltött csatornára egyszerre kapcsolnak feszültséget. A csatornák keresztteződésénél az áramló puffer egy rövid időre (injektálási idő) akadályozza a mozgó mintát, ezáltal kis mintatérfogat

keletkezik, amely továbbhalad az elválasztási csatornában. A kapuzott injektálással lehetővé válik az egymás utáni, többszöri mintabevitel is, ami a kiszakításos injektálással nem kivitelezhető [74].



2. ábra

A kapuzott (gated) injektálás. Az a) kép a rendszer felépítését mutatja be, a b) rész az injektálás lépéseit szemlélteti [74].

Összegzőképpen elmondható, hogy EK injektálás alkalmazásával jó reprodukálhatóság érhető el ugyanazon minta többszöri, egymást követő injektálása esetén: a migrációs idők RSD (relatív standard deviáció) értékei 0,1%, a csúcsterületek RSD értékei pedig 2%-nak adódtak Effenhauser kísérleteiben [75]. Az EK módszerek nagy hátránya ugyanakkor, hogy az injektálást a mintában lévő komponensek eltérő elektroforetikus mozgékonyasága befolyásolja. Ennek korrigálására hidrodinamikus (HD) injektálási/áramlási (folyadékok nyomáskülönbségének felhasználása) részlépést alkalmaztak az EK mintabetöltés után. Miután a minta elérte a kereszteződést, a feszültséget lekapcsolták, így érvényesülni tudtak a hidrodinamikai hatások, majd újra feszültséget kapcsolva a rendszerre létrejött a kis mintatérfogot [76].

Mostanáig csak néhány mikroszepekhez használható HD injektálási módszert dolgoztak ki. Solognac és mtsai. egy olyan rendszert állítottak össze, melyben mechanikus eszközzel gyakoroltak nyomást a mintatartó-edénykében lévő PDMS membránra [77]. Olyan mikrofluidikai rendszer is ismert, amelyben a mintabevitel

egy átváltó szeleppel ellátott kettős fecskendő pumpával [78], illetve egy beépített diafragma pumpával [79] hajtották végre. Az előzőekben említett eljárások mindegyike komplikált berendezéseket igényelt, ami miatt elvész a mikrocsipek egyszer használatos, eldobható jellege.

2.2.4. Mikrofluidikai csipekhez alkalmazható detektálási módszerek

Az egyik legnagyobb kihívást az olyan érzékeny detektálási módszerek fejlesztése jelenti, amelyek méretükben illeszkednek a miniatürizált elválasztóegységhez és ezáltal megfelelnek egy μ TAS rendszerrel szemben támasztott követelményeknek. A különféle mikrofabrikációs eljárásokkal készített mikrocsipek előállítási költsége alacsony, ezáltal gyakorlatilag egyszer használatos eszköznek is tekinthető. Ez egyben azt is jelenti, hogy a detektálási egységet nem érdemes közvetlenül a mikrocsipbe integrálni. A mikrocsipeknél leggyakrabban alkalmazott és egyben a legérzékenyebb (az igen magas jel/zaj aránynak köszönhetően) detektálási módszer a lézer indukált fluoreszcencia (LIF) [68, 80]. A LIF egy spektroszkópiai módszer, melyet különböző (fluorofór csoporttal rendelkező) anyagok detektálására, áramlási folyamatok szemléltetésére (injektálás) és vizsgálatára használnak. Hátrányt jelent azonban a külső sugárforrás (lézer) nagy mérete, illetve, hogy számos esetben akár többlépéses származékképzési reakcióra is szükség van az eredetileg fluorofór csoportot nem tartalmazó molekulák detektálásához [81]. A vizsgált anyag részecskéit lézer segítségével gerjesztik, ezt követően rövid időn belül (10^{-6} - 10^{-9} s) a gerjesztett részecskék ismét alapállapotba kerülnek, fényt kibocsátva magukból (nagyobb hullámhossznál, mint amilyen a gerjesztő lézersugár hullámhossza volt), melynek az intenzitását mérik. Chabinyi és mtsai. 25 nM koncentrációjú fluoresceint vizsgáltak PDMS mikrocsipen CZE módszerrel, LIF detektálással [82]. Weiller és mtsai. HDL (high density lipoprotein) és LDL (low density lipoprotein) elválasztását tanulmányozták üvegalapú mikrocsipen LIF detektálást alkalmazva [83].

Az UV/Vis detektálás is gyakran alkalmazott univerzális módszer főként kapillaris elektroforézisnél [84], de a mikrocsatornák miatt kialakuló rövid optikai úthossz, valamint a mikrocsipek készítéséhez használt anyagok fényelnyelése erősen korlátozza a megfelelő detektálási érzékenység elérését. Újabban megjelentek kisméretű LED-es fényforrások (fluoreszcens és UV detektáláshoz egyaránt), amelyek jobban alkalmazhatók a lab-on-a-chip rendszerekhez [85]. Az UV-Vis detektálás sokoldalú alkalmazhatósága miatt terjedt el. Olyan anyagok esetén is alkalmazható az eljárás, amelyek az UV-tartományban nem rendelkeznek elnyeléssel, ekkor az ún. indirekt UV-detektálással határozhatók meg a komponensek. Ennek érdekében az adott részecske mozgékonyásával közel megegyező, az UV-tartományban elnyelő anyagot kell a pufferekhez adni. Mogensen

16,5 mM koncentrációjú paracetamol (acetaminofen) CZE elválasztását végezte el Si csipen, a detektálásnál UV-Vis módszert használt, 254 nm hullámhosszon [86].

Egy másik, mikrocsipekhez is gyakran használt módszer az elektrokémiai (EC) detektálás, melynek több változata ismeretes (amperometriás, voltammetriás, konduktometriás és potenciometriás). A mikrocsipeken történő EC detektálás előnye többek között az, hogy a holtterfogat minimalizálható, a munkaelektrodok a mikromegmunkálási technikákkal egyszerűen elkészíthetők, illetve az elektród a LOD érték romlása nélkül (nincs optikai úthosszfüggés) miniaturizálható. Az első amperometriás EC detektáláshoz üvegből készült mikrocsipet használtak DNS fragmensek azonosítására, melybe munka- és ellenelektrodot integráltak, referenciaelektrodként pedig Ag/AgCl huzalt szolgált [87]. Fanguy és Henry húgysav (15-110 μM koncentrációtartományban) MCE elválasztását valósította meg PDMS-üveg mikrocsipen, amperometriás detektálással, platina (Pt) elektród alkalmazásával [88]. A vezetőképesség mérésen alapuló módszer szintén egy elterjedt detektálási lehetőség univerzális jellegének köszönhetően [89]. Létezik érintkezéssel (kontakt) formája, ekkor a detektor elektródjai közvetlen kapcsolatban vannak a minta- és pufferoldatokkal, bár ez gyakran az elektródok elszennyeződéséhez, valamint azok felületén történő fokozott buborékképződéshez vezethet [47, 90]. Érintkezésmentes változatában egy vékony szigetelő réteg választja el az érzékelő elektródokat a mintaoldattól, így a szennyeződés elkerülhető. Számos irodalmi példa létezik kapacitív módon kapcsolt érintkezésmentes vezetőképességi detektorok alkalmazásáról (C^4D) [91-93]. A legelterjedtebben használt, kereskedelmi forgalomban kapható rendszerek a kvarckapillárisokra ráfűzhető C^4D szenzorfejek [94-95], újabban pedig megjelentek a mikrocsipekhez használható C^4D platformok is [96]. A C^4D mikrofluidikai rendszerekhez való alkalmazhatóságát Coltro és mtsai. foglalták össze [97], emellett két évente jelennek meg áttekintő cikkek további C^4D alkalmazásokról [98]. Számos esetben a C^4D elektródokat beleépítik a mikrocsipekbe gyakran időigényes és költséges eljárásokkal, így a rendszer korábban említett egyszer használatos jellege elvész [99-100]. Egy hordozható, eldobható analitikai rendszer akkor használható optimálisan, ha a mikrocsip könnyen eltávolítható a detektorról vagy helyezhető vissza oda. Éppen ezért a nem integrált elektródokat tartalmazó detektorok előnyösen használhatók erre a célra [101]. A C^4D rendszerek gyártói elsősorban üveg mikrocsipek alkalmazását ajánlják a detektorokhoz. Annak ellenére, hogy napjainkban a PDMS műanyagból készült mikrocsipeket használják leggyakrabban, csak néhány esetben alkalmazták C^4D -vel. Guijt és mtsai. egy újrahasznosítható, reverzibilisen kötött PDMS-hibrid eszközt fejlesztettek ki, amelyben a nyomtatott áramkör technikával készült elektródokat egy száraz fotoreziszt szigetelő rétegbe ágyazták bele [102]. Mások a csatornamintázatot tartalmazó PDMS réteget üveghez ragasztották és egy PDMS/üveg hibrid mikrocsipet hoztak létre [103], továbbá

készítettek integrált rézelektrodokkal szerelt PDMS/PET hibrid mikrocsipet [104]. Extrém vékony ($0,6\ \mu\text{m}$) szigetelő réteget is alkalmaztak PDMS mikrocsip és üveglapba integrált platina elektrodok között [105]. Ding és Rogers háromszög alakú alumínium elektródot kapcsolt PDMS mikrocsiphez halogénessavak detektálásához [106]. Nemrégiben ionos folyadékokat használtak fémentes elektródként C^4D -hez PMMA/PDMS hibrid mikrocsipekkel való összekapcsoláshoz [107]. Olyan munka is ismert, amelyben egy extra csatornát alakítottak ki a mikrocsipben, hogy alacsony olvadáspontú fém (gallium) belejuttatva hozzák létre az integrált C^4D elektródokat [108].

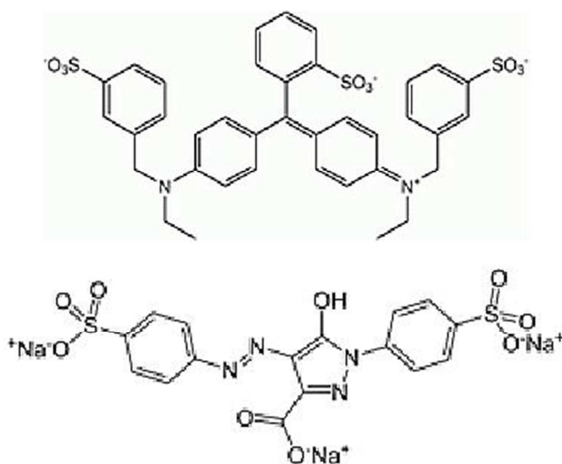
Korábban mikrocsipek tömegspektrométerrel való összekapcsolásának lehetőségeiről is beszámoltak [109-110], melyek megvalósításához speciálisan kialakított interfészeket alkalmaztak, de ezen a területen még további fejlesztésekre van szükség.

3. Alkalmazott kísérleti körülmények

3.1. Vegyszerek, minták

A kísérletekhez analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk. A CZE elválasztásokhoz elektrolitként (BGE) különböző koncentrációjú foszfát puffert alkalmaztunk. A 6,8-as pH-jú puffereket dinátrium-hidrogénfoszfát, nátrium-dihidrogénfoszfát (Reanal) 1:1 molarányú összemérésével készítettük. Az ITP elemzésekhez használt elektrolit oldatokat a Sigma Aldrichtól vásárolt vegyszerekből (MES, L-hisztidin (His), L-hisztidin-monohidroklorid (His·HCl)) készítettük. A puffereket felhasználásig hűtőben tároltuk (+4°C-on) és legfeljebb egy hónapig alkalmaztuk. A mérések megkezdése előtt a lebegő szennyeződések eltávolításához a pufferoldatokat minden esetben 0,45 µm-es fecskendőszűrőn szűrtük át.

A mikroszipekben végrehajtott CZE és ITP elemzések bemutatásához tesztvegyületeként színes ételfestékeket alkalmaztunk, hogy a folyamatokat mikroszkópban könnyen követni lehessen (a zöld ételfesték (Unifine Kft., Magyarország, ill. McCormick&Co., Inc, MD) sárga (E102, tartrazin) és kék (E133, Brilliant Blue FCF) komponensből áll (3. ábra).



3. ábra

A kék (E133, Brilliant Blue FCF) (felül) és a sárga (E102, tartrazin) ételfestékek szerkezeti képletei (alul).

Az antibiotikumok CZE elválasztásához a következő kefalosporinokat használtuk fel: cefaclor (Ceclor 500 mg filmtabletta, Lilly, Olaszország), cefadroxil (Duracef 50 mg/ml por belsőleges szuszpenzióhoz, Bristol-Myers, Olaszország), ceftriaxon (Rochefin 250 mg por oldatos injekcióhoz, Roche, Svájc), cefuroxim (Zinacef

750 mg por injekcióhoz, Glaxo, Egyesült Királyság) és ceftazidim (Fortum 500 mg por injekcióhoz, Glaxo, Egyesült Királyság), cefixim (Suprax 200 mg filmtabletta, Richter Gedeon, Magyarország). A cefaclor és cefixim esetén a tablettákat porcelán dörzsmozsárban összetörtük, homogenizáltuk. A többi por formában lévő kefalosporint közvetlen bemérés után desztillált vízben oldottuk fel, majd szűrtük az oldatot. A kefalosporinok vizes oldatban lassan bomlanak, ezért maximum 3 napig használtuk fel az oldatokat.

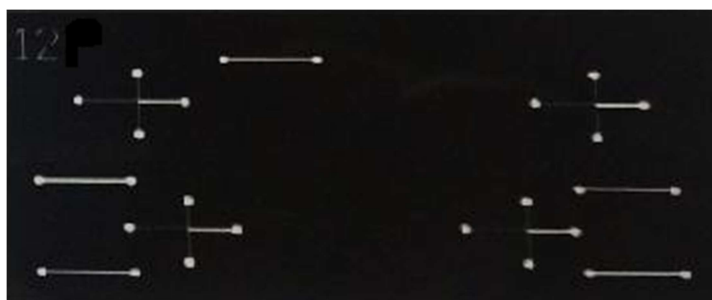
A PDMS mikrocship- $C^{4}D$ mérésekhez használt törzsoldatokat az anionok megfelelő kálium és nátrium sóiból (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) készítettük. Közvetlenül felhasználás előtt desztillált vízzel (Millipore Synergy UV, 18,2 M Ω) hígítottuk az oldatokat a szükséges koncentrációra.

A kapilláris és mikrocship felületének módosításához nagy molekulatömegű polimereket alkalmaztunk: PVP ($M_w=1300000$), PEO ($M_w=900000$) és HPMC a Sigma Aldrichtól beszerezve.

CITP elemzéshez előkészített reálminták: 0,5 g pórásból származó bőrdarabot 5 ml desztillált vízben 10 percig extraháltunk és 20% TE-vel hígítottuk. A vörösbort, meggylevet és almalevet membránszűrőn átszűrtük, buborékmentesítettük és desztillált vízzel 10-szeresére hígítottuk. A vizsgált minták mindegyike tartalmazott 20% TE-t. Egyéb minta-előkészítést nem alkalmaztunk.

3.2. PDMS mikrocshipek készítése

A kísérleteinkhez használt PDMS mikrocshipet lágy litográfiás módszerrel [64] készítettük. A fotolitográfiás maszkhoz (4. ábra) elsőként megrajzoltuk AutoCAD szoftverrel (v.2013, Autodesk, San Rafael, CA, USA) a szükséges mikrocship csatornamintázatát. Az AutoCAD ábrát egy nagyfelbontású (3600 dpi) nyomtató segítségével egy átlátszó fóliára nyomtattuk (háttér fekete, csatorna átlátszó lesz).

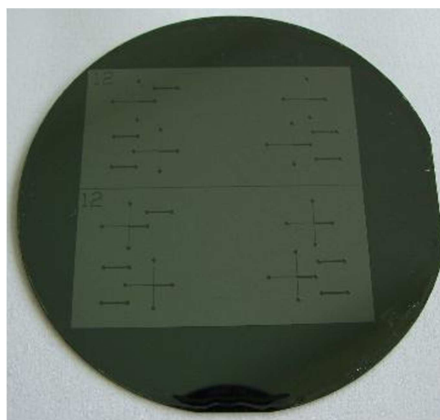


4. ábra

Fotolitográfiás maszk

Egy vékony szilíciumlapot (Silicon Quest, Santa Clara, CA) metanol segítségével gondosan megtisztítottunk. A Si lapkára felcseppentettünk kb. 0,5 g negatív típusú

fényérzékeny polimer gyantát (SU-8 2025, Microchem, Newton, MA, USA). Az egyenletes eloszlás és a megfelelő vastagság (35 μm) eléréséhez egy házi készítésű spincoateret használtunk, melynek segítségével a Si lapkát nagy sebességgel (ebben az esetben 3200 fordulat/perccel, 30 mp-ig) lehet forgatni. A vékony filmet tartalmazó lapot 15 percre 95°C-os kemencébe helyeztük (előmelegítési szakasz). Miután a film megkeményedett, a Si lapkára ráraktuk az elkészített fotolitográfias maszkot és UV fénnel ($\lambda = 365 \text{ nm}$, Spectroline FC-100/F lámpa, Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA) besugároztuk (merőlegesen, 50 cm távolságról, 60 s-ig). Ezután visszaraktuk további 5 percre a 95°C-os kemencébe (utómelegítési szakasz). A lapkát SU-8 előhívószerbe (mr-Dev 600, Micro Resist Technology, Berlin, Németország) merítettük és az előhívószer feleslegének eltávolításához spincoater segítségével néhány másodpercig kb. 1000 fordulat/perccel forgattuk (elszívósó fülke alatt!). Mivel negatív típusú fényérzékeny anyagot használtunk, így az előhívás után az UV fénnel besugárzott részek megmaradtak (kb. 35 μm vastagságban) a Si lapon, ahol pedig a maszk miatt nem érte UV fény a réteget, az előhívószer lemosta a gyantát. A kész öntőformát (5. ábra) metanollal öblítettük és pár óráig 200°C-os kemencében állni hagytuk. Az öntőforma többször is használható mikrocipek készítésére, a mintázatot csak erősebb mechanikai behatással, például pengével lehet eltávolítani a Si lapkáról.

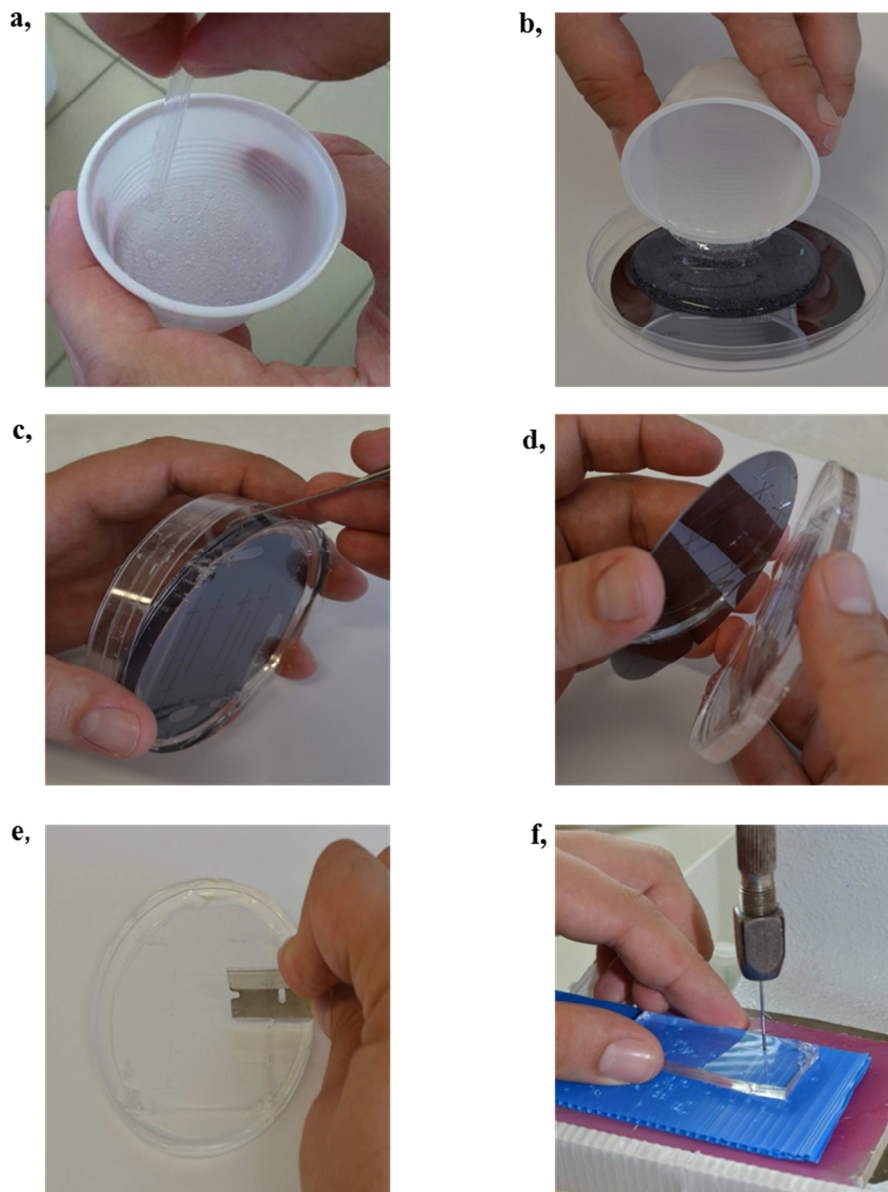


5. ábra

A PDMS mikrocip készítéséhez használt öntőforma.

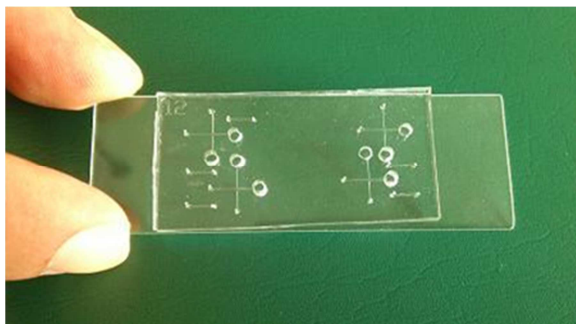
A mikrocipeket a PDMS polimer öntőformára öntésével (molding módszer) készítettük. Az öntőforma felületét még egyszer metanollal mostuk és szárítottuk, majd beleraktuk egy műanyag Petri-csésze aljába. Összemértünk 25 g PDMS-t és 2,5 g térhálósító adalékot (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA). Fontos, hogy a PDMS monomer és a térhálósító aránya 10:1 legyen, mert így lesz megfelelő keménységű a mikrocip. Természetesen, ha vastagabb vagy vékonyabb mikrocipet

akarunk készíteni, akkor az arányokat megtartva növelhetjük/csökkenthetjük a komponensek mennyiségét (nagyon vastag mikrocsipek készítése problémába ütközhet, mivel a Si öntőforma törékenysége miatt nehéz lehúzni a műanyagot az öntőformáról). Ezután homogenizáltuk a keveréket a térhálósító egyenletes eloszlása érdekében (6.a ábra). Az összekeverés hatására képződő buborékok vákuummal eltávolíthatók, azonban tapasztalataink szerint ez a lépés nem feltétlenül szükséges, mivel a buborékok a kemencében történő polimerizációkor eltűnnek a műanyagból. Ezt követően az öntőformára öntöttük a keveréket (6.b ábra), majd 60 percre 64,5°C-os kemencébe helyeztük. Az egy óra letelte után kivettük a Petri-csészét, hagytuk kihűlni, majd egy fémszerszám segítségével óvatosan körbevágtuk a perem mentén (6.c ábra). Ezután a műanyagot lehúztuk a Si öntőformáról (6.d ábra), amely mintázatának másolata rákerült a műanyag aljára. A mikrocsip készítésének kritikus mozzanata az előző két lépés volt az öntőforma törékenysége miatt. Az öntőformát végül áttöröltük metanolos vattával, amelyre így újra önthető mikrocsip. A műanyagot ezután egy penge segítségével méretre vágtuk (6.e ábra). Egy öntőformán ugyanaz a mintázat kétszer szerepel, ezért a szélek eltávolítása után kettévágtuk a formáról lehúzott műanyagot. A portok kialakításához cserélhető hegygel rendelkező kézi lyukasztót alkalmaztunk (6.f ábra). A lezárási lépésnél (sealing) két felületet teljes terjedelmében, tökéletesen kell összeilleszteni és ragasztani. Ha a lezárási nem tökéletes, akkor a nemkívánatos hézagok miatt kialakuló folyadékáramlások használhatatlanná tehetik a rendszert. A ragasztás előtt metanollal tisztítottuk a két összeragasztandó felületet, majd két percre levegő plazmába (nagyfrekvenciás kisnyomású térbe) helyeztük (Harrick PDC-32G, Harrick Plasma, Ithaca, NY, USA) az aktiválandó lapokat. Végül a vákuum megszüntetése után az aktivált felületeket egymásra helyeztük, melyek irreverzibilisen összeragadtak. Így elkészült a 7. ábrán látható mikrocsip.



6. ábra

Mikrocsipek készítésének lépései. PDMS monomer és térhálósító összekeverése (a), a PDMS keverék öntőformára öntése (b), megkeményedett polimer körbevágása (c) és lehúzása az öntőformáról (d), majd méretre igazítása (e) és a portok kialakítása (f).

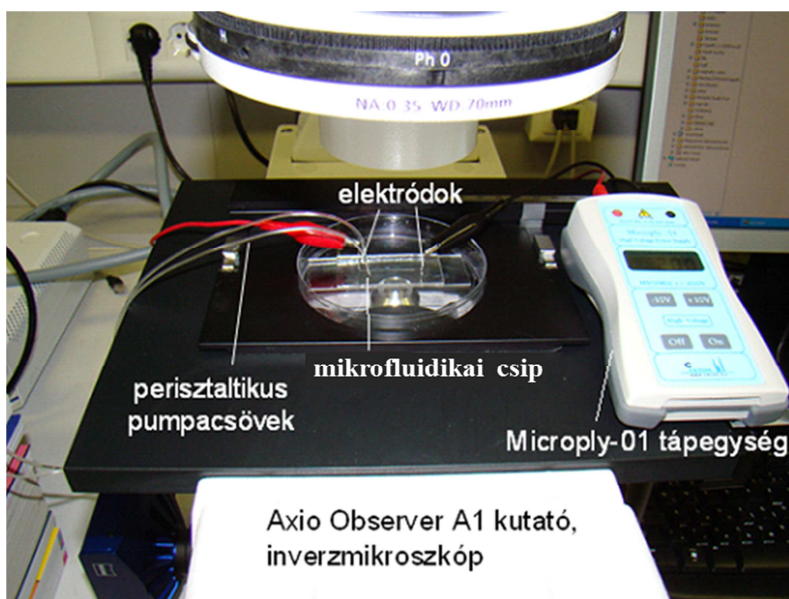


7. ábra

PDMS-ből készült mikrofluidikai csip üveglaphoz ragasztva.

3.3. Mikrocsipek alkalmazása során használt eszközök

A minták injektálásához, valamint a pufferelektrolit áramoltatásához perisztaltikus pumpát (IPC, Ismatec) vagy fecskendőpumpát (Bee Hive MD-1020, Bioanalytical System Inc., 2,5 ml-es fecskendővel szerelve) használtunk. A beinjektált minta mikrocsipben való áramlását és az elektroforetikus elválasztásokat kutató inverz mikroszkóppal követtük (Axio Observer A1, Zeiss), illetve nagyfelbontású digitális kamerával (AxioCam ICC3, Zeiss) rögzítettük. A kiértékeléshez kép/video rögzítő- és feldolgozószoftvert (AxioVision 4.6.3, Zeiss) alkalmaztunk (8. ábra).



8. ábra

A mikrocsipben történő elektroforetikus elválasztások végzéséhez és megfigyeléséhez használt rendszer.

Az injektálást követő elektroforetikus elválasztásokhoz egyenáramú, nagyfeszültségű tápegységeket (Microply-01, 0-2 kV, max. 0,25 mA és Microply-31, 0-2,5 kV, max. 0,6 mA, Cetox Kft., illetve Spellman CZE 1000R, 0-30 kV, max. 0,3 mA, Ithaca, New York, USA) használtunk.

A μ CE rendszernél a komponensek detektálását száloptikás, miniatürizált UV spektrofotométerrel (Avaspec-2048-2, Avantes, Hollandia) valósítottuk meg. A mért értékeket Avasoft szoftver (Avantes, Eerbeek, Hollandia) rögzítette.

A CE és CITEP elemzéseket HP 3DCE és 7100 CE (Agilent, Waldbronn, Németország) készülékeken végeztük, 50 μ m belső átmérőjű poliimid réteggel bevont kvarckapillárisokban (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA). Az elektroferogramokat a CE készülék szoftverével (ChemStation 7.01) értékeltük ki.

A folyadékáram-megosztásos injektálás során végbemenő áramlási viszonyokat a COMSOL Multiphysics (COMSOL, Inc., Palo Alto, CA, USA) szoftverrel szimuláltuk.

Az érintkezésmentes vezetőképességi detektáláshoz a mikrocipekhez fejlesztett platformot (ET121 modell) és a hozzá kapcsolódó jelerősítő és adatgyűjtő egységet (PowerChrom 280, eDAQ, Ausztrália) használtuk. A kapillárisban végrehajtott detektálást pedig C^4D szenzorfejjel (TraceDec, Innovative Sensor Technologies, Strasshof, Austria) végeztük. A C^4D adatok kiértékeléséhez és feldolgozásához a Chart (v.5.5.13, eDAQ) szoftvert alkalmaztuk.

4. Az elért eredmények és értékelésük

4.1. Folyadékáram-megosztásos mintabevitel kidolgozása mikrocsipekhez

4.1.1. A folyadékáram-megosztásos injektálás elve

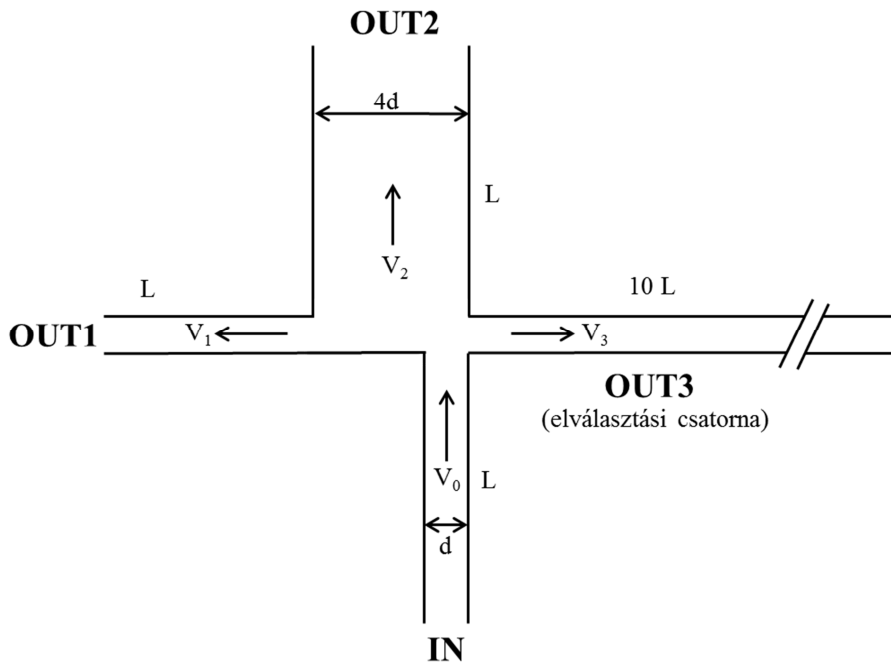
Mikrocsipek esetén egy optimális injektálási eljárással szemben támasztott legfontosabb követelmény, hogy a mintabeviteli lépés ne legyen hibával terhelt. A feszültség alkalmazása kerülendő, mivel az változást okozhat a mintaösszetételben. Munkánk során célul tűztük ki egy olyan új injektálási módszer kidolgozását, amely megfelel ezeknek az elvárásoknak. Az általunk kidolgozott, nyomással történő, folyadékáram megosztásán alapuló mintabevitel elve hasonlít a gázkromatográfiából (GC) jól ismert megosztott (split) injektáláshoz. 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 másik része egy nyíláson keresztül kifúvódik. A megosztási arány általában 1:10 és 1:1000 közötti [111]. A split injektálás elvét a folyadékkromatográfiában gyakorlatilag nem használják.

A folyadékáram-megosztásos injektálás elve a Hagen-Poiseuille törvényen (1. egyenlet) alapul, mely számszerűen leírja az áramlási viszonyokat a mikrofluidikai csipben (vízszintes csatorna, stacionárius, réteges áramlás).

$$V = \frac{\Delta P d^4 \pi}{128 \eta L} \quad (1)$$

Az egyenletben a V a kapilláris keresztmetszetén t idő alatt átáramlott folyadék térfogatát, η a viszkozitást, ΔP a csatorna mentén l távolságban kialakuló nyomáskülönbséget, d a kapilláris/csatorna sugarát jelenti. A törvényből következik, hogy a csatorna átmérőjétől rendkívül nagymértékben (d a negyedik hatványon szerepel) függ az injektált minta térfogatának (áramlási sebességének) eloszlása a különböző szélességű csatornák között. Továbbá fordított arányosság áll fenn a szeparációs csatornába jutott minta térfogata és a csatorna/kapilláris hossza között, tehát az egyforma átmérőjű csatornák közül a hosszabb csatornába jut be kevesebb minta.

A folyadékáram-megosztásos mintabevitelhez egy olyan csatornarendszert terveztünk, amelyben az injektálási rész egy négyszer szélesebb csatornát (OUT2), illetve egy keskenyebb, de tízszer hosszabb csatornát tartalmazott (OUT3) az injektálási csatornán (IN) és egy plusz kivezetésen kívül (OUT1) (9. ábra).



9. ábra

Mikrofluidikai csip kereszteződésének mintázata és az áramlási viszonyok szemléltetése
(V: folyadéktérfogat, d: csatornaszélesség, L: csatornahossz).

A rendszerben érvényes viszonyok leírása a 2. egyenlet alapján történhet:

$$\frac{V_3}{V_0} = \frac{\frac{d_3^4}{L_3}}{\frac{d_3^4}{L_3} + \frac{d_2^4}{L_2} + \frac{d_1^4}{L_1}} \quad (2)$$

Az általunk tervezett mikrocipben a szélesebb csatorna átmérője négyszer nagyobb a keskenyebbekéhez képest, a szeparációs csatorna hossza pedig tízszerese a többi csatornáénak, azaz

$$d_1 = 4d \quad \text{és} \quad d_0 = d_2 = d_3 = d, \quad \text{illetve} \quad (3)$$

$$L_3 = 10L \quad \text{és} \quad L_0 = L_1 = L_2 = L \quad (4)$$

Mindezekből következik, hogy

$$V_3 = \frac{V_0}{4^4 \cdot 10}, \quad \text{azaz} \quad V_3 = \frac{V_0}{2560} \quad (5)$$

Ez azt jelenti, hogy ha a csatornába beinjektált minta térfogata (V_0) 1 μl , akkor a szeparációs csatornába jutott minta mennyisége (V_3) csupán 0,39 nl. Ez a térfogat a 10 cm hosszúságú csatorna térfogatának 0,22%-a (220 μm hosszúságú mintadugó, a csatorna mélysége 35 μm), ami megfelelően kicsi térfogatot biztosít az elektroforetikus elválasztásokhoz.

4.1.2. A folyadékáram-megosztásos injektálás alkalmazása folyadékminták mikrocsipbe történő bejuttatásához

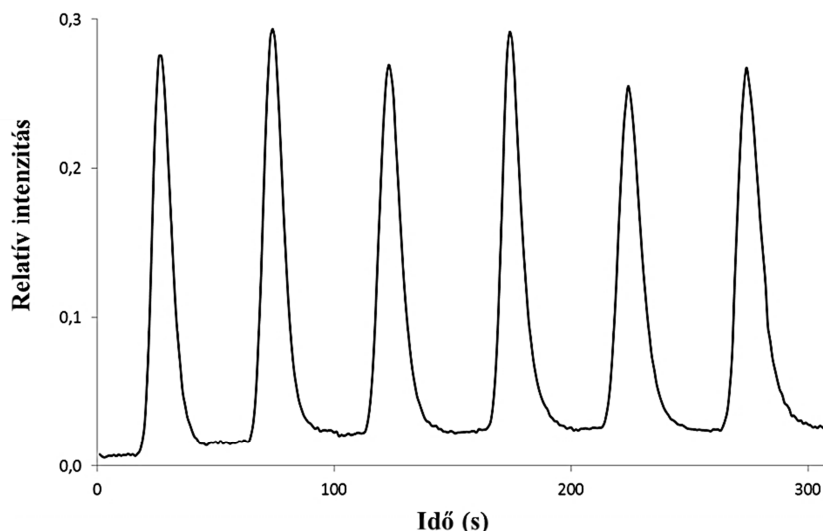
A folyadékáram-megosztásos injektálás bemutatására kék ételfestéket használtunk, mikroszkóppal rögzítve az áramlási viszonyokat és az elválasztási csatorna kezdetén kialakuló kicsi mintatérfogatot. A 10. ábrán követhető, hogy az IN port felől érkező kezdeti mintatérfogat hogyan oszlik meg a különböző átmérőjű és hosszúságú csatornák (OUT1-2 és SEP) között.



10. ábra

A kidolgozott folyadékáram-megosztásos mintabevitel folyamatának szemléltetése kék ételfesték alkalmazásával ($V_0=1 \mu\text{l}$, $V_{\text{inj.}} \sim 0,4 \text{ nl}$).

A folyadékáram-megosztásos mintabevitel reprodukálhatóságát kék ételfesték egymás utáni injektálásával ($N=6$) vizsgáltuk, a kialakult kicsi mintatérfogatok csúcsmagasságaira és csúcsterületeire 4,8, illetve 3,7 RSD% relatív szórás értékeket állapítottunk meg, melyek hasonlóak a mikrofluidikai csipekhez használt más mintabeviteli módszerekkel elért értékekhez (11. ábra).



11. ábra

Folyadékáram-megosztásos mintabevitel reprodukálhatóságának vizsgálata kék ételfesték egymást követő injektálásával (N=6). A kék festék színintenzitását a mikroszkóp kamerájával követtük a csatorna kereszteződése és a SEP/OUT3 port között. Körülmények ugyanazok, mint a 10. ábrán.

A kidolgozott injektálási módszer jelentőségét az adja, hogy jelenleg alig ismert olyan mintabeviteli módszer, mellyel ilyen kis térfogatú minta beinjektálását lehetne elvégezni mikrofluidikai csipekbe pusztán nyomás alkalmazásával, egyszerű eszközök felhasználásával. A csatornák átmérőinek és hosszainak változtatásával az adott analitikai probléma megoldásához szükséges mikrocsip készíthető el. A csatornák dimenzió arányainak változtatásával az előzőekhez képest kisebb vagy nagyobb mintamennyiség injektálása is megoldható. Egy nagyobb mintatérfogat injektálásával a zónaelektroforetikus elválasztás helyett izotachoforézisre van lehetőség, amely a minták dúsításának egyik hatékony alternatívája (lásd részletesebben a 4.3.3. fejezetben). Kis mintamennyiségnél gyors, rövid csatornahosszon történő elektroforetikus elválasztást lehet elérni. Fontos kiemelni, hogy az injektált mintamennyiség térfogata nem függ a pumpa sebességétől, azt kizárólag a csatornák átmérőinek aránya és hossza, illetve az eredeti minta térfogata (V_0) befolyásolja.

4.1.3. COMSOL szimulációk alkalmazása mikrofluidikai csatornarendszerekben a folyadékáram-megosztásos injektálás modellezéséhez

A mikrofluidikai csatornáknak jellemző áramlástanai viszonyokról a COMSOL Multiphysics® 5.0 (COMSOL, Inc., Palo Alto, CA, USA) végeelem alapú (Finite Element Method, FEM) mérnöki szoftverrel készítettünk szimulációkat a PPKE Mikrofluidikai Kutatócsoportjával együttműködve. A program működése a Navier-Stokes egyenlet (6. egyenlet) numerikus megoldásán alapul lamináris áramlási körülmények (közismert, hogy mikrofluidikai csatornarendszerekben erős lamináris áramlási profil tapasztalható, mivel a Reynolds szám sok esetben kisebb mint 1) és nem összenyomható folyadékok feltételezése mellett.

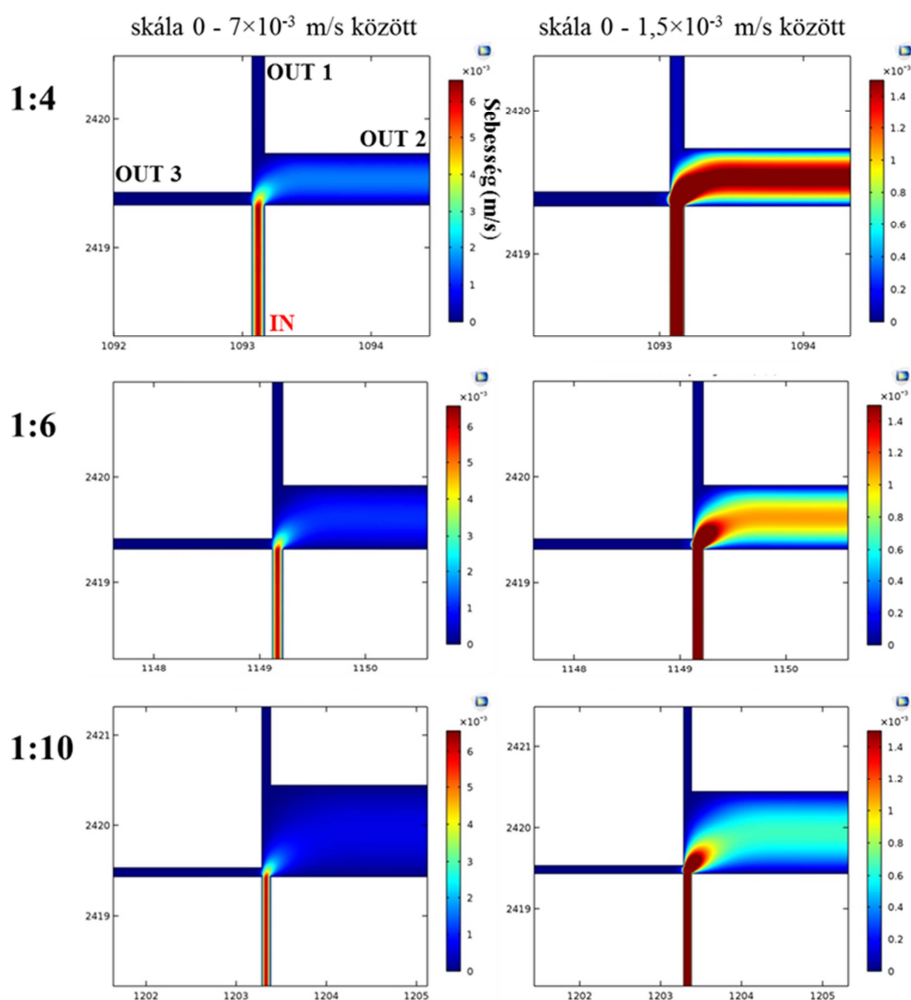
$$\frac{\partial \underline{v}}{\partial t} + (\underline{v} \cdot \nabla) \underline{v} = -\frac{1}{\rho} \nabla p + \nu \nabla^2 \underline{v} \quad (6)$$

ahol $\underline{v}$ sebesség (ms^{-1}), t idő (s), p nyomás (Pa), ρ sűrűség (kgm^{-3}), ν kinematikus viszkozitás (m^2s^{-1}). A folyadékokra a szobahőmérsékletű vízre jellemző paramétereket alkalmaztuk (sűrűség: 1000 kgm^{-3} , kinematikai viszkozitás: $10^{-6} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$).

A szimulálni kívánt rendszerek AutoCAD csatornamintázata (dxf kiterjesztésű fájl) közvetlenül exportálható a COMSOL programba. A mikrocsip bemeneti portjánál (IN) $1 \mu\text{l}/\text{min}$ áramlási sebességet, míg az összes többi (OUT 1-3) portnál nulla nyomásértékeket állítottuk be, mely a folyadék szabad kiáramlásának felel meg. A csatornamintázatokra 42000-256000 db alkotóelemet tartalmazó hálórendszert rajzoltunk, amelyben az elemek legkisebb mérete $6\text{-}16 \mu\text{m}$, átlagos méretük pedig $18\text{-}30 \mu\text{m}$ volt. A szabadsági fokok száma 60000 és 440000 között változott.

Különböző csatornaszélesség-arányú (1:4, 1:6 és 1:10 split-flow arány) mintázatokban szimuláltuk az áramlási viszonyokat azonos kezdeti szimulációs paraméterek mellett. A kapott sebességeloszlás-diagramokat különböző skálákat használva ábrázoltuk ($0\text{-}7 \times 10^{-3} \text{ ms}^{-1}$, valamint $0\text{-}1,5 \times 10^{-3} \text{ ms}^{-1}$) (12. ábra). A várakozásnak megfelelően a szélesebb csatornák ($400, 600$ és $1000 \mu\text{m}$ -es) felé tapasztalható nagyobb lineáris áramlási sebességek, amelyek megfeleltethetők nagyobb térfogati sebességeknek. 1:4 aránynál a beinjektált kezdeti térfogat ($V_0=1 \mu\text{l}$) 98,5%-a, 1:6 aránynál 99,5%-a, 1:10 aránynál pedig 99,9%-a áramlik a széles csatornák felé (OUT 2). Így az $1 \mu\text{l}$ térfogatnak csupán a töredéke oszlik meg az OUT 1 és OUT 3 (szeparációs csatorna) között. Mivel a szeparációs csatorna hosszabb, mint az OUT 1 kivezető ága, utóbbiba kerül be nagyobb térfogat a fordított arányossági tényező miatt ($V \sim L^{-1}$). A szimulációk alapján az elválasztó csatornába a szélességarányoktól függően $0,37\text{-}1,02 \text{ nl}$ (1:10→1:4) térfogatok jutnak

be, amelyek megfelelően kis mintatérfogatot biztosíthatnak többkomponensű minta esetén is a CZE elválasztásokhoz.

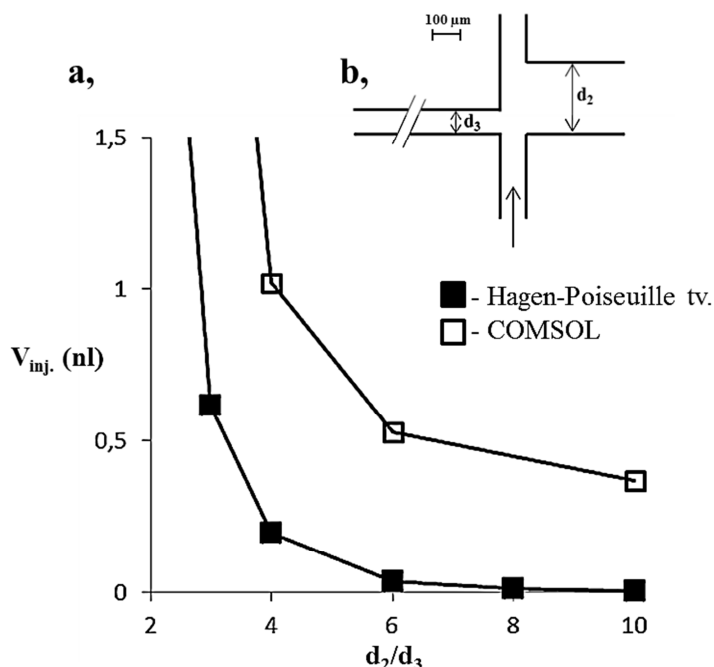


12. ábra

COMSOL szimulációk sebességeloszlás-diagramjai folyadékáram-megosztásos injektálásnál eltérő csatornaátmérő-arányok esetén kétféle sebességskálán ábrázolva.

Összehasonlítottuk a Hagen-Poiseuille törvény (1. egyenlet) alapján számolt és a szimulációkból kapott injektált térfogatokat (13.a ábra) különböző csatornaátmérő-arányok esetén ($d_3=100\text{ }\mu\text{m}$, $d_2=400$, 600 és $1000\text{ }\mu\text{m}$, 13.b ábra). Megállapítható, hogy a görbék lefutása hasonló, de némi különbség (kb. ötszörös) tapasztalható az injektált térfogatokban azonos V_0 értékek esetén is. Ez a különbség abból adódhat, hogy a szimuláció és a számítás némileg eltérő fizikai törvényeken alapul. A Hagen-Poiseuille törvény a Navier-Stokes egyenlet leegyszerűsített formája, mindkettő

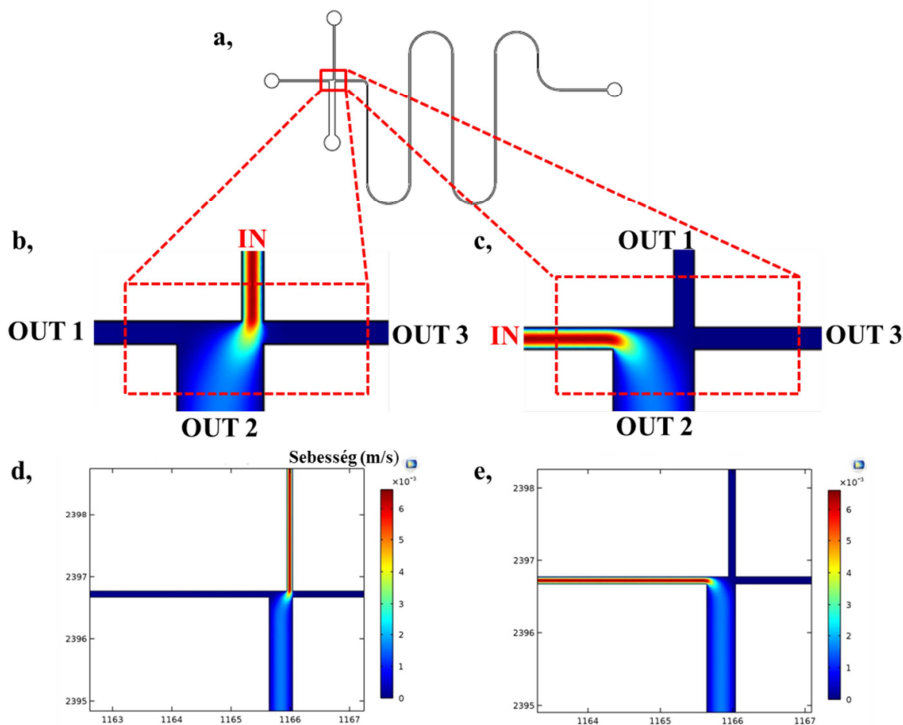
figyelembe veszi az áramlási sebességet és a csatorna végei közötti nyomáskülönbséget (nyomásesés). A COMSOL szoftver azonban emellett a csatornafalnál jelentkező sűrűdással, a teljes csatornamintázat geometriájával és a fal nedvesítésével is számol, ezért a Hagen-Poiseuille törvény egyszerűsége miatt inkább közelítő becslésekhez használható. Mivel már 1:4 csatornaarányú mintázat esetén is megfelelően kis térfogatú (1,02 nl) minta injektálására nyílt lehetőség, ezért a további szimulációkhoz, valamint a mikrocsipek készítéséhez is ezt az alakzatot használtuk.



13. ábra

A Hagen-Poiseuille törvény alapján és a COMSOL szimulációval kapott szeparációs csatornába injektált mintatérfogatok összehasonlítása eltérő csatornaátmérő-arányoknál (a). A szimulációhoz/számításhoz felhasznált csatornakereszteződés sematikus ábrázolása (b).

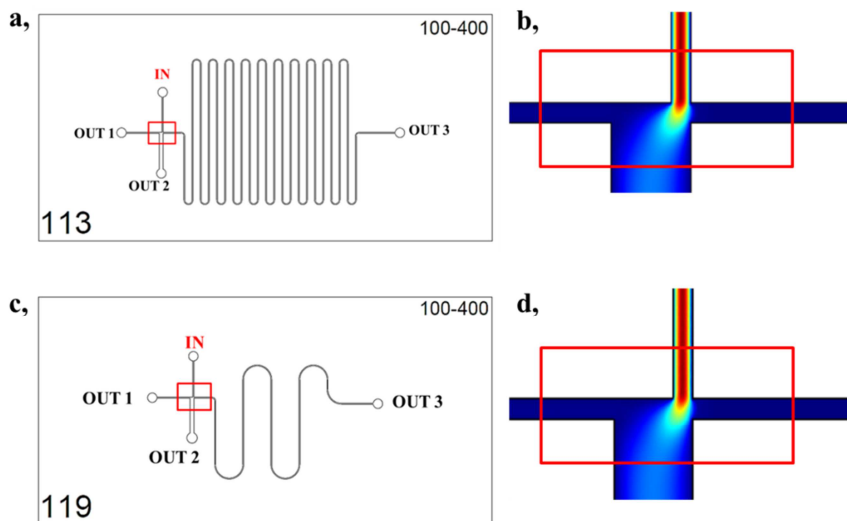
Megvizsgáltuk azt is, hogy a minta bejuttatásának pozíciója a kereszteződésben hogyan befolyásolja a kialakult minta térfogatát. Ehhez ugyanolyan csatornamintázatú mikrocsipet használtunk (14.a ábra) és kizárólag az injektálási portok helyét (IN) cseréltük fel. A kinagyított (14.b-c ábra) és a normál méretű (14.d-e ábra) sebességeloszlás-diagramokon látható, hogy az áramlási profilok nem térnek el egymástól jelentősen, a szeparációs csatornába injektált térfogatok közötti különbségek viszonylag kicsik (1,23 nl, illetve 0,94 nl). A különbség abból adódhat, hogy a kereszteződés kialakítása miatt kissé eltér az IN és OUT 1 csatornák geometriája.



14. ábra

A mintainjektálás pozíciójának hatása a bejuttatott oldat térfogatára. A szimulációhoz használt csatornamintázat (a), valamint a kinagyított (b, c) és normálméretű (d, e) sebességeloszlási-diagramok.

Ahogy korábban utaltunk rá, a csatornahossz és a beinjektált térfogat között fordított arányosság áll fent. Azonos csatornaarányú és elrendezésű, de különböző hosszúságú (35 cm, illetve 5 cm) szeparációs csatornák esetén is végeztünk modellezést (15.a, c ábra). Látható, hogy mindkét csatornahosszúság esetén lehetőség nyílik kis mintamennyiség injektálására, a kapott sebességeloszlás-profilok pedig nagyon hasonlóak egymáshoz (15.b, c ábra). A hosszabb elválasztási csatornánál 0,22 nl, a rövidebb esetén pedig 1,23 nl térfogatú minta jutott be, ami ~5,5-szeres arányt jelent. A Hagen-Poiseuille törvény alapján becsült arányhoz (~7) képest ez csekély mértékű eltérés. Ezek a térfogatbeli különbségek nem lényegesek egy CZE elválasztásnál, a kulcsfontosságú az, hogy az egymást követő injektálásoknál kapott mintatérfogatok azonos térfogatúak legyenek. Hosszabb elválasztási csatorna alkalmazására akkor lehet szükség, ha többkomponensű mintát elemzünk, vagy ha nagyobb mintadugót akarunk injektálni nagyobb V_0 alkalmazásával, pl. izotachoretikus dúsításhoz.



15. ábra

A szeparációs csatorna hosszának hatása a kialakult mintadugó térfogatára 35 cm (a,) és 5 cm (c,) hosszak esetén a releváns sebességeloszlási-diagramok feltüntetésével (b, d.).

A Hagen-Poiseuille törvényen alapuló meghatározás elsősorban olyan egyszerű csatornamintázatok (hengerszerű forma) esetén használható, amelyekben nincs alakzat- vagy átmérőváltozás a csatorna teljes hosszát tekintve, illetve nem tartalmaznak kanyarulatokat sem. Bonyolultabb mintázatok esetén a COMSOL szimuláció adhat pontosabb eredményt, mivel alkalmazásával figyelembe vehető a teljes csatornamintázat (összgeometria) áramlási folyamatokra gyakorolt hatása (pl. a nagyobb hosszúságú elválasztási csatorna áramlási ellenállásának hatása a csatorna kereszteződésére).

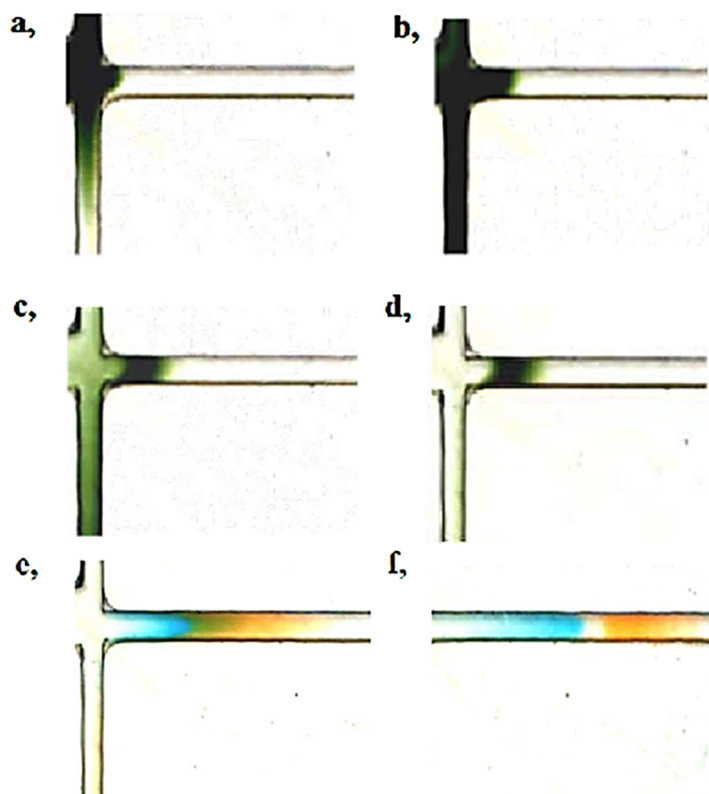
Meg kell említenünk, hogy míg a szimulációk esetében ideális körülményeket feltételezünk, reális rendszereknél a csatornában előfordulhat szennyeződés vagy a portokban maradhat a kialakítás (lyukasztás) során lehasadt PDMS darabka. Ezek a tényezők jelentősen befolyásolhatják az áramló folyadékok viselkedését, eltérést okozva a kísérletes, valamint a szimulációkkal kapott eredmények között.

4.2. A folyadékáram-megosztásos injektálást követő elektroforetikus elválasztások mikrocsipben

4.2.1. Zónaelektroforetikus elválasztások tanulmányozása a PDMS mikrocsip felületmódosítását követően

A zónaelektroforetikus elválasztások PDMS mikrocsipben való megvalósítása során fő célunk a hidrodinamikus folyadékáram-megosztásos injektálást (melynek elvét részletesen a 4.1.1. fejezetben ismertettük) követően a szeparációs csatornába juttatott, néhány tized nl térfogatú minta komponenseinek minél gyorsabb és rövidebb csatornahossz alatt történő teljes elválasztása volt.

A vizsgálataink során zöld ételfesték keveréket választottunk komponenseire (sárga és kék). A színes vegyület alkalmazását az indokolta, hogy így mikroszkóppal egyszerűen nyomon lehetett követni a csatornában végbemenő áramlási viszonyokat, a kis mintatérfogat kialakulását az injektálás során, illetve magát az elválasztást is (16. ábra). Mivel az ételfestékben található sárga és kék komponensek negatív töltésűek, mindkettő az anód (+) felé mozog feszültség hatására. Ezért az elválasztási csatorna végén lévő port mellé helyezett platina elektródra pozitív, az injektálási résznél lévő elektródra negatív feszültséget (föld) kapcsoltunk. A két festékanyag közül a sárga komponensnek volt nagyobb az elektroforetikus mozgékonyága (a nagyobb töltés/méret aránya miatt), így az elektroforézis során a kék komponens előtt haladt az anód felé (16.e-f ábra). Az elváló komponensek láthatóan azonos irányba és az EOF-fel ellentétesen mozogtak, de a komponensek eredő (látszólagos) mozgékonyága az EOF változásával nagymértékben megváltozhat.

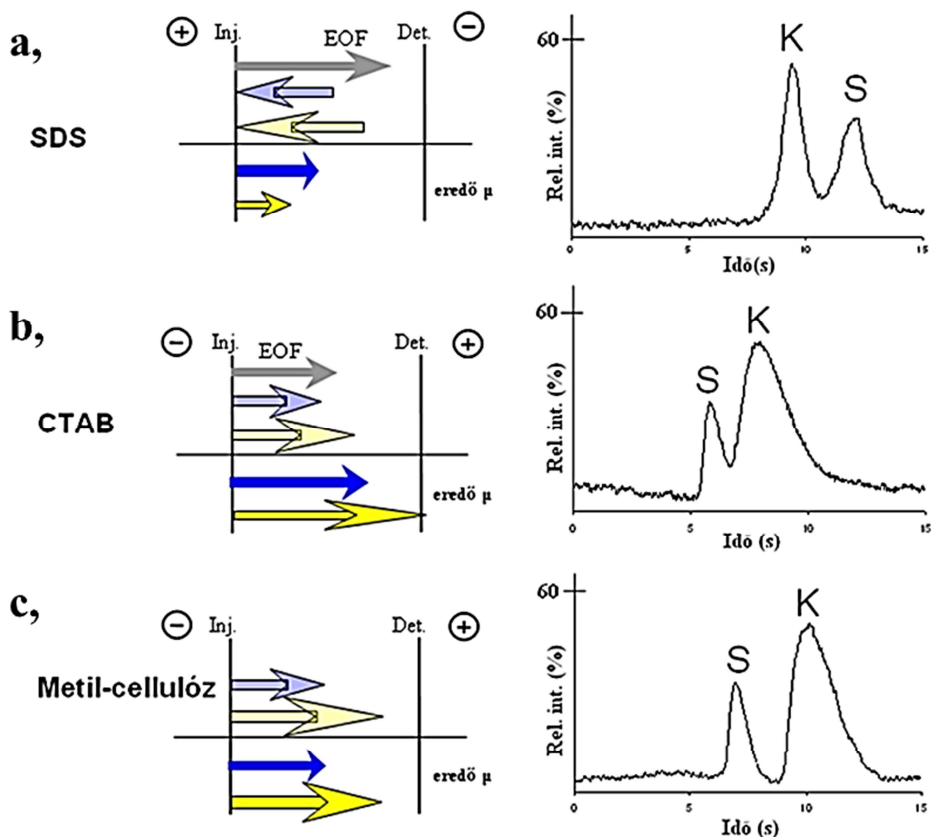


16. ábra

Mikroszkópos fényképek a folyadékáram-megosztásos injektálásról (a-d) és az injektálást követő zónaelektroforetikus elválasztásról (e-f). Körülmények: BGE: 25 mM foszfát (pH 6,8), $U=1000$ V, csatornaátmérő: $100\ \mu\text{m}$, minta: kék és sárga festék.

Ismert, hogy a PDMS jó adszorpciós készsége miatt képes megkötni a mintában, illetve a futtatópufferben lévő komponenseket. Emiatt a felületi töltésviszonyok állandóan módosulhatnak az elemzések során, ami az EOF változását eredményezheti. Jól reprodukálható elektroforetikus elválasztásokhoz a PDMS csatorna falának egységes és állandó töltésű felülettel kell rendelkeznie. Ennek kialakítása érdekében különböző felületmódosító anyagokat alkalmaztunk. Megvizsgáltuk, hogy milyen hatással vannak az elválasztásokra az anionos (SDS) és kationos (cetil-trimetil-ammónium-bromid, CTAB) felületaktív anyagok, illetve a semleges polimer (metil-cellulóz, MC) alkalmazása. Az elválasztások előtt a különböző felületmódosító anyagok $1\ \text{mM}$ koncentrációjú oldatával 1 percre öblítettük a mikrocip csatornáját, majd három óra elteltével az átöblítést megismételtük. A megkötődött felületmódosítókat szerves oldószerrel (metanol) sikerült eltávolítani, a BGE-vel történő mosás csak kis mértékben hatott az adszorbeálódott módosítókra.

Az SDS anionos detergens negatív töltéseket visz a PDMS felületére, ezáltal megnöveli a katód irányú EOF mértékét, erős, konstans, reprodukálható áramlást hozva létre. Ilyen körülmények mellett a komponensek vándorlásának irányai módosultak a detergenssel nem kezelt mikrocshipben leírtakhoz képest (17. ábra). Az erős EOF olyan nagymértékben befolyásolta az anionos komponensek saját mozgékonyosságát, hogy összességében az EOF mozgékonyága határozta meg a vándorlás irányát. Annak érdekében, hogy a komponenseket detektálni tudjuk az elválasztási csatorna egy adott pontján, az előzőekhez képest fordított polaritást alkalmaztunk (a szeparációs csatorna végére kapcsoltuk a negatív feszültséget). Mivel a kék komponens eredő mozgékonyága (a saját mozgékonyág és az EOF mozgékonyágának előjeles összege) nagyobb volt, mint a sárga komponensé, az elválasztás során a kék komponens vándorolt gyorsabban (17.a ábra). A kationos detergenssel történő felületkezeléskor a negatív töltésű csatorna falán a CTAB adszorpciója miatt pozitív felületi töltések jelentek meg. Ez azt eredményezte, hogy az EOF értéke nemcsak csökkent, hanem az áramlás iránya is megfordult (anód irányú EOF). Mivel sárga és kék komponensek a töltésüknek megfelelően az anód irányába vándorolnak, a két hatás összegződik. Azt tapasztaltuk, hogy az elektroforéziskor a nagyobb mozgékonyágú sárga komponens haladt elől (a pozitív elektródot az elválasztási csatorna végére helyeztük) (17.b ábra). Ebben az esetben az EOF hatása a komponensek vándorlására nem volt előnyös, mert teljes elválasztásuk nagyobb úthosszon történt meg (összehasonlítva a MC-vel történő felületmódosítással). Megvizsgáltuk a semleges módosító (MC) elektroforézisre gyakorolt hatását is. A MC polimer részecskék a PDMS falára adszorbeálódva elfedik a negatív felületi töltést, és így megszűnik az EOF a rendszerben. Az elektroforézis szempontjából így kizárólag a komponensek eltérő elektroforetikus mozgékonyágai lesznek a meghatározók. Ebben az esetben is az elválasztási csatorna végére kapcsoltuk a pozitív feszültséget. A két komponens teljes elválasztása nagyon rövid úthossz alatt (<1 cm) megtörtént. Az elválasztások során kapott elektroferogramokról látható, hogy az MC-vel történő felületmódosítás után végzett elektroforézis során alapvonalon elváló csúcsokat kaptunk (17.c ábra). Tehát a vizsgált rendszerben az ételfesték elválasztására az volt a legkedvezőbb körülmény, amikor az EOF nem, csupán az elektroforetikus mozgékonyágok különbségei befolyásolták az elválasztást.



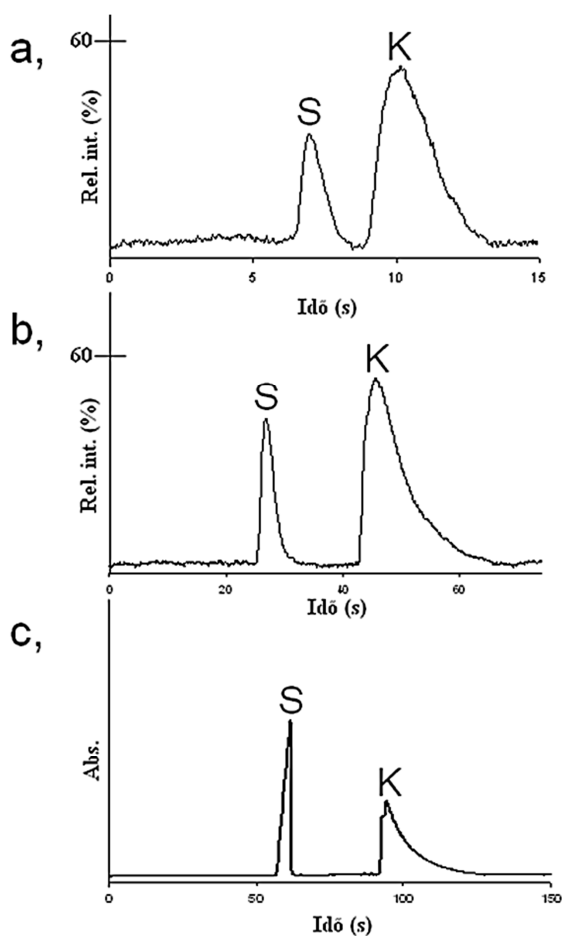
17. ábra

Az EOF és a vizsgált komponensek (sárga és kék ételfesték) mozgékonyságainak (μ) illusztrálása és a kapott elektroferogramok. A mikrocsip csatornáit SDS-sel (a,); CTAB-vel (b,) és metil-cellulózzal (c,) kezeltük az elektroforézis előtt. Körülmények: BGE: 100 mM foszfát (pH 6,8), $U=1000$ V.

Az elválasztások összehasonlíthatósága érdekében mindhárom esetben a mikrocsip csatornájának azonos pontjában (a csatorna keresztveződésétől 10 mm távolságra) detektáltunk. Ezt a mikroszkóp szoftverébe épített modullal végeztük el, mely a mikrocsip csatornájának egy adott pontján a színintenzitás-változásokat érzékelte (17. ábra). A szoftver működése az RGB (Red-Green-Blue) színrendszer alkalmazásán alapult (a fehér színben mindhárom színösszetevő 255-ös hozzájárulással szerepel, fekete színnél az RGB faktorok 0 értéket vesznek fel). Amíg egyik komponens sem érte el a detektálás helyét az alapvonal változatlan maradt. A sárga komponens kisebb színintenzitása miatt alacsonyabb csúcsot eredményezett a kék komponenshez képest (hasonlóan az UV/Vis detektálás esetén, amelynél egy adott komponensnek különböző hullámhosszakon való elnyelése/detektorjele eltérő).

A 16.e-f ábrán látható, hogy az elektroforézis során elég jelentős a nagy koncentrációjú, elváló komponensek diszperziója a bejuttatott minta térfogatához képest. A diszperziót nagyobb koncentrációjú puffer alkalmazásával eredményesen csökkenteni lehet (a felületmódosító anyagokkal történő vizsgálatoknál éppen ezért használtunk 100 mM koncentrációjú puffert). A nagy koncentráció viszont problémát jelenthet, mivel nagyobb feszültség alkalmazása esetén az áramerősség jelentősen megnövekedne, ami a jelentős Joule-hő képződés miatt megint csak a zónák nagymértékű diszperziójához vezetne. Alacsonyabb koncentrációjú puffer használata előnyös lehet a nagyobb alkalmazható feszültség miatt, ami gyorsabb elválasztást eredményez, de az előzőeknek megfelelően nagyobb diszperzióval kell számolnunk.

A mikrocshipben történő elektroforéziskor a csatorna kereszteződésétől 10 mm távolságra detektáltunk, ez a legkisebb távolság, ahol a komponensek teljesen elváltak egymástól (18.a ábra) kevesebb mint 15 s alatt. A felbontás növelhető, ha a kereszteződéstől távolabb detektálunk (18.b ábra), de így az elemzési idő a detektálási távolsággal arányosan megnövekszik. A hagyományos CE készülékben a lehetséges legkisebb effektív elválasztási hossz 85 mm (ún. "short end" injektálásnál, Agilent készülék) a készülék geometriai elrendezéséből adódóan. A CE készüléken a nagyobb effektív hossz alkalmazása miatt nagy felbontás érhető el, de ehhez legalább 130 s analízisidőre van szükség (18.c ábra). A 18. ábra elektroferogramjain látható, hogy a várakozásnak megfelelően mind a mikrocshipen, mind a CE-vel végzett elemzéseknel ugyanolyan az elválasztási profil, hiszen az alkalmazott pufferrendszer, illetve az elválasztás mechanizmusa (CZE) megegyezett. Különbség csak az EOF hozzájárulásának mértékében, vagy az esetleges eltérő fali adszorpciók hatások tekintetében volt várható.



18. ábra

A kapott elektroferogramok 10 mm (a,) és 45 mm (b,) elválasztási hosszánál a mikrocsipen és CE-nél kvarckapillárison (c,) detektálva.

Az előző kísérletekből látható, hogy PDMS mikrocsipen végzett elválasztások esetén az EOF változása problémákat okozhat, annak szabályozása és állandó értéken tartása kulcsfontosságú a reprodukálható elemzésekhez. Munkánk további részében ezért az elválasztó csatorna felületének módosítására – az alkalmazási körtől függően – kiemelt figyelmet fordítottunk.

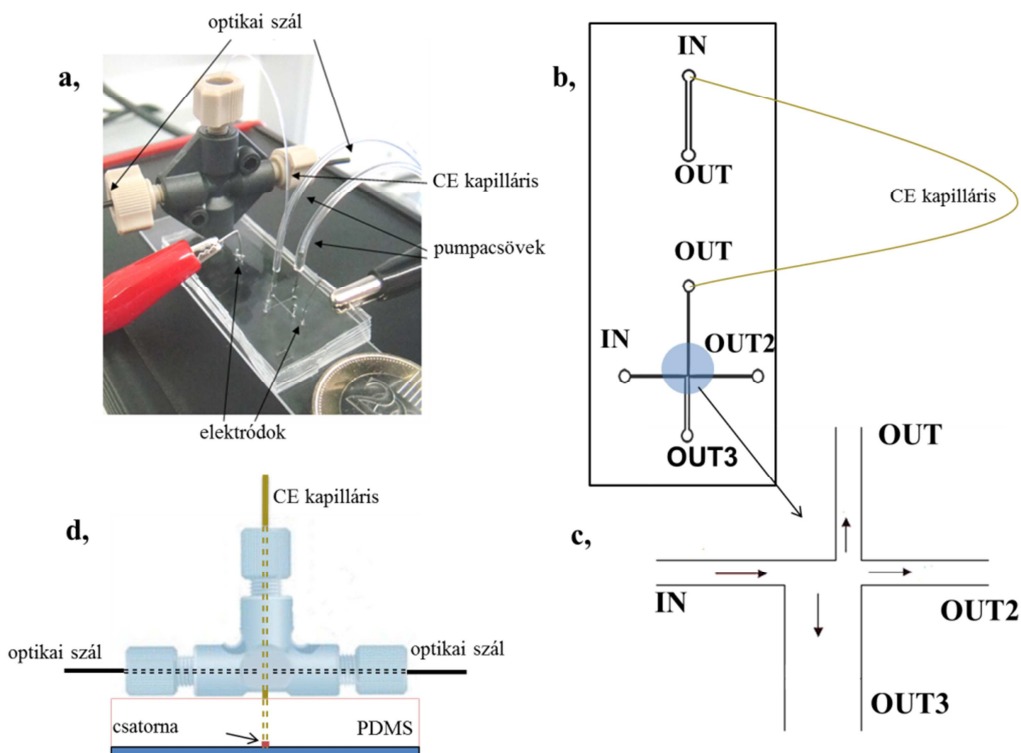
4.2.2. Miniaturizált CE rendszer kifejlesztése

4.2.2.1. Mikrocsip–kvarckapilláris kombinációjú elválasztó rendszer kifejlesztése száloptikás spektrofotometriás detektálás alkalmazásával

Munkánk során egy olyan új, miniaturizált kapilláris elektroforézis rendszer összeállítását tűztük ki célul, amelyben megtalálhatók a hagyományos CE készülék főbb alkotórészei. A korábban már részletesen bemutatott (4.1.1. fejezet) folyadékáram-megosztásos injektálást alkalmaztuk a mintabeviteli lépéshez. A hagyományos CE készülékben pontosan szabályozott körülmények között, teljesen automatikusan, reprodukálható módon történik a néhányszor tíz nl-nyi minta injektálása. Mikrocsipek esetén egyszerű pumpa alkalmazásával nincs lehetőség ilyen kis térfogatok bevitelére, a folyadékáram-megosztásos injektálással viszont lehetőség nyílik ezek kezelésére. A PDMS mikrocsipben elvégzett elektroforetikus elválasztásokhoz (4.2.1. fejezet) a minta áramoltatására kezdetben perisztaltikus pumpát használtunk. Ezzel a manuális eljárással (a mintát adott ideig és sebességgel szívtuk fel a pumpacsőbe, majd a mikrocsip bemeneti portjához csatlakoztatva az áramlás irányának megfordítása után a csatornába pumpáltuk a kb. 1 μ l mintát, amelynek csak töredéke jutott az elválasztó csatornába) nem lehetett precíz injektálásokat elvégezni. Részből azért, mert a minta felszívásakor jelentős diszperzió lépett fel a csőben, valamint a pumpa pulzálása is pontatlanságot okozhatott. Az injektálási lépés problémájának megoldására egy, a folyadékkromatográfiában használt mikroinjektor (Rheodyne 7520) alkalmazhatóságát vizsgáltuk meg. Az injektor rotorja tartalmaz egy adott térfogatú kamrát (pl. 0,2-1 μ l), amelyet egy tompa hegyű Hamilton fecskendő segítségével kell feltölteni a mintával (a minta feleslege a kimenő nyíláson át távozik). A kar injektálási állásba fordításával a rotorban lévő minta az áramló pufferbe került, melynek áramoltatásához fecskendőpumpát használtunk. Működése során nem jelentkező pulzáló áramlás, amely nyomásesést okozott volna a rendszerben. A mikroinjektor alkalmazásával lehetőség nyílik áramlásos injektálásra (flow injection), vagyis a rotor újbóli feltöltésével újabb mintarészlet injektálására, sorozatinjektálásra. Ez előny a hagyományos kapilláris elektroforézis rendszerrel szemben, ahol nincs lehetőség sorozatos mintabevitelre az elektroforézis alatt. A mikroinjektorból egy PEEK csövön keresztül távozott a puffer (injektálási pozícióban a minta is), amely a PDMS mikrocsip bemeneti portjához közvetlenül csatlakoztatható. Vizsgálatainkhoz a 19.b ábrán látható csatornamintázatú mikrocsipet használtuk. A négyágú (kereszt) résszel (három 50 és egy 200 μ m átmérőjű csatorna) lehetőség nyílt a folyadékáram-megosztásos injektálásra. A PEEK csövet a bemeneti (IN) porthoz csatlakoztattuk (a port átmérője kb. 300 μ m, a PEEK cső külső átmérője pedig 360 μ m volt). Mivel a PDMS meglehetősen

rugalmas anyag, ennek köszönhetően a PEEK cső függőleges pozícióban teljesen szivárgásmentesen csatlakoztatható. Szivárgás legfeljebb nagyobb nyomás esetén alakulhat ki, azonban az injektálás során kis áramlási sebesség (kisebb mint 1 bar nyomás) alkalmazása is elegendő volt. Hasonlóan jól záró csatlakozást sikerült kialakítani a PDMS mikrocip és a kvarckapilláris között is. A kapillárist az injektálási rész OUT csatorna portjához csatlakoztattuk. A fennmaradó 50 μm -es (OUT2) és a 200 μm széles csatornák (OUT3) végeire kb. 2 mm átmérőjű lyukakat (tartályokat) készítettünk. A bejuttatott minta nagy része a széles csatorna felé áramlott az injektálás során, amely így elvezető csatornaként funkcionált. Fontos, hogy az elektródoknál viszonylag nagy puffertartály (puffercsepp) legyen jelen, mert az elektroforézis során a puffer változó pH-ja jelentősen befolyásolhatja az EOF értékét. Ezért lényeges a pufferoldat adott időközönkénti cseréje (hasonlóan, mint a hagyományos CE esetében). A puffer változó pH-ján (a foszfát nagy pufferkapacitása ellenére) kívül gondot okozhat, hogy az elektródnál (anód (+)) keletkező buborékokat az EOF a szeparációs csatorna felé szállíthatja. Ez instabillá teheti a rendszert, mivel a buborékok szélsőséges esetben az áramvezetés megszűnését is eredményezhetik. Ennek kiküszöbölésére (a puffer gázmentesítése és cseréje mellett) egy buborékleválasztó alkalmazása jelenthet megoldást, melynek megvalósítása érdekében két egyszerű eljárást is kipróbáltunk. Az első esetben egy kis pórusméretű (0,45 μm) membránszűrő-lappal tekertük körbe az elektródot. A vékony lap megakadályozta a buborékok csatornába áramlását, viszont az áramvezetést nem befolyásolta. Másik esetben egy töltetes pipettahegyet nedvesítettünk a pufferrel, ebbe raktuk bele az elektródot, majd az egészet a nagy átmérőjű tartályba helyeztük, a buborékok ekkor sem jutottak át a csatornába.

A kvarckapilláris injektálási oldallal ellentétes végénél alakítottuk ki a detektálási részt. Ugyanazt az elvet követtük, mint CE készülék esetén, vagyis közvetlenül a kvarckapillárison keresztül detektáltuk (on-capillary detection) a komponenseket. Olyan miniaturizált UV száloptikás detektort használtunk, amelynek két optikai szálát (fényszugár a forrás felől és az áthaladt fény a jelfeldolgozó felé) a négyágú PEEK csatlakozóval pozícionáltuk egy vonalba (19.d ábra). A kvarckapillárist a fényútra merőlegesen fűztük bele a csatlakozóba, majd szivárgásmentesen ugyanazon PDMS mikrocipen lévő rövid egyenes csatorna IN portjába helyeztük, a csatorna másik portjához (OUT) pedig a tápegység negatív pólusát csatlakoztattuk.



19. ábra

Miniaturizált kapilláris elektroforézis rendszer elrendezése száloptikás spektrofotometriás detektálással (a.). A csatornamintázat sematikus ábrázolása (b.), a folyadékáram-megosztósos injektálást lehetővé tevő kereszteződéssel (c.). A minta bejuttatása az IN porton keresztül történt, a kialakult kis térfogatú minta pedig a kvarckapilláris felé (OUT port) áramlott. Detektálási egységként miniaturizált száloptikás spektrofotometriás módszert alkalmaztunk (d.). A CE kapillárist, a pumpacsőveket és az elektródokat közvetlenül a PDMS mikrocsipbe csatlakoztattuk (a.).

Az elválasztó egységként használt kvarckapilláris hossza 20 cm volt (ez 18 cm effektív elválasztási hosszúnak felel meg), mivel a CE előkísérletek alapján ez a távolság elegendőnek bizonyult a kefalosporinok elválasztására (a többi optimalizált paraméter alkalmazása mellett). A kapilláris belső és külső átmérője megegyezett a CE-nél használt kapilláriséval, de az utóbbit nem fedte kívülről poliimid réteg, így nem volt szükség detektorablak kialakítására. (A kapilláris speciális UV áteresztő bevonatot tartalmazott, amelyet a gyártó cég kifejezetten UV detektáláshoz fejlesztett ki.) A 20 cm hosszúságú kapilláris választása azért is előnyös volt, mert ennél rövidebb vagy hosszabb kvarckapilláris alkalmazása esetén feszülés lépett fel a csatlakoztatás során, és így a kapilláris nem illeszkedett tökéletesen a mikrocsip portjába (ez pedig szivárgáshoz vezetett).

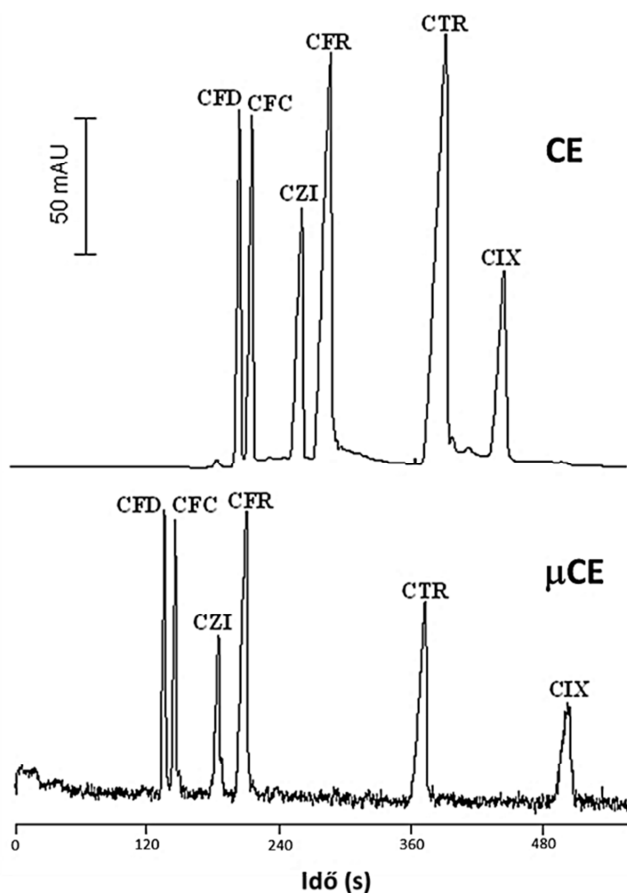
Az általunk tervezett és elkészített PDMS mikrocshipen ugyanaz az injektálási rész (mintázat) négyszer szerepelt (19.b ábra), így a csatorna elhasználódása/eltömődése esetén a rendszer egyszerűen átszerelhető volt a mikrocshipen található másik csatornamintázat csatlakozási portjaira. Néhány kísérletet olyan mikrocshipekkel végeztünk el, amelyeket nem ragasztottunk össze üveggel, az így nyert tapasztalataink alapján megállapítható, hogy a rendszer teljes lezárása nagyobb nyomás alkalmazása esetén elengedhetetlen. A PDMS és az üveglap metanolos öblítése és szárítása után reverzibilis módon egymáshoz tapadt. Ez a viszonylag erős tapadás sok esetben elegendő volt a folyadékok szivárgásmentes áramoltatásához kis nyomások alkalmazásakor. Így szennyeződéskor a mikrocship szétválasztható, felülete mosható, majd újra felhasználható elektroforetikus elválasztásra. Természetesen az irreverzibilis (oxigén plazmával való kezelés után) összeragasztás megbízhatóbb működést tett lehetővé, mert ragasztás nélkül bármilyen kicsi szivárgás a PDMS réteg felválását eredményezte. Az összeállított rendszer tesztelését ezért ragasztott mikrocshipekkel végeztük.

4.2.2.2. Kefalosporinok CZE elválasztása μ CE rendszerben

Az összeállított PDMS mikrocship-kvarckapilláris (miniaturizált CE, μ CE) rendszerbe a hagyományos CE technikára kidolgozott analitikai módszerek elméletileg teljes egészükben átvihetők, hiszen az elválasztóegység, a kvarckapilláris és az elektroлитrendszer is megegyezik. Az összeállított rendszert hat kefalosporin antibiotikum keverékének elektroforetikus elválasztásával teszteltük.

Az elválasztások előtt a rendszert 10 percig mostuk pufferrel (BGE: 50 mM foszfát, pH 6,8) (fecskendőpumpa sebessége: 5 μ l/perc). Mivel a kefalosporinok oldata szintelen volt, így nem lehetett szabad szemmel követni az injektálás folyamatát. Ezért néhány előkísérletet végeztünk zöld ételfesték felhasználásával, melynek során 1,5 μ l/perc áramlási sebesség mellett a mikroinjektor átváltása után a kis mintatérfogat $\sim$ 3 másodperc alatt alakult ki. A kefalosporinok injektálásakor a mikroinjektor átváltása után 3 másodpercet vártunk, majd ezt követően kapcsoltunk feszültséget a rendszerre. A 20. ábrán a 6 kefalosporin mikrocship elektroforézissel kapott elektroferogramja látható, a hasonló körülmények között elvégzett CE elemzéssel összehasonlítva. A μ CE méréssel a kefalosporinokat 8,5 perc alatt, alapvonalon sikerült egymástól elválasztani. A két mérés esetén a csúcsok alakja hasonló volt, a csúcsmagasságokban jelentkező kis eltérés a kefalosporinok vizes oldatban való bomlásával magyarázható. μ CE esetén megfigyelhető, hogy a legnagyobb migrációs idővel rendelkező komponens (cefixim) hosszabb idő alatt éri el a detektort, mint a CE mérésnél. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy az elektroforézis során változik az elektródoknál a puffer összetétele mely az EOF

csökkenéséhez vezet. Ez utóbbi pedig azt eredményezi, hogy a legnagyobb saját mozgékonyssággal (legnagyobb negatív töltéssel) rendelkező komponens később detektálható. Ez a hatás a hagyományos CE rendszernél kevésbé érvényesül, mert a puffert tartalmazó edény nagyobb térfogatú (1,5 ml), míg μ CE esetén ez csak kb. 200 μ l.



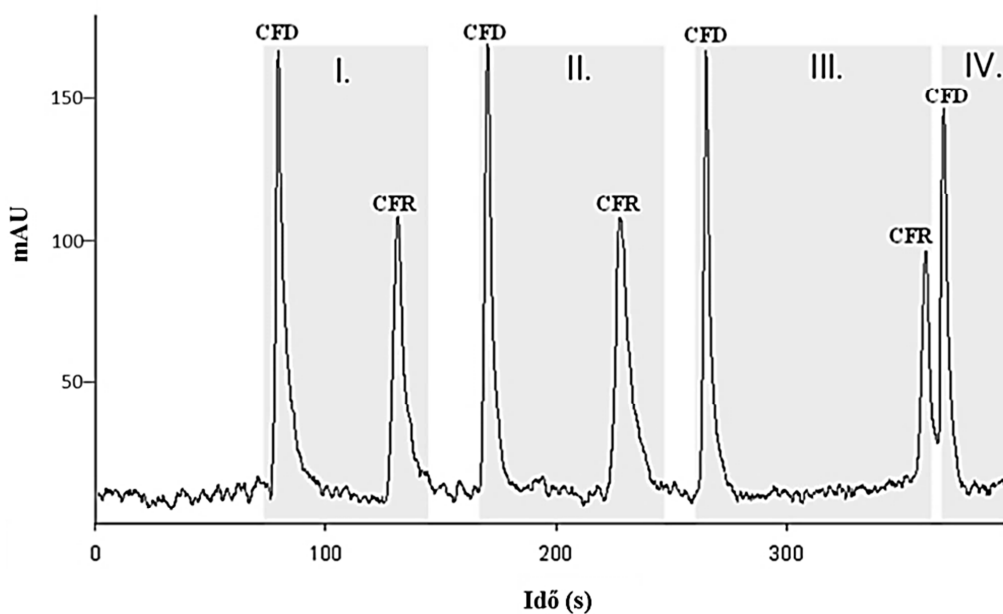
20. ábra

Hatkomponensű kefalosporin antibiotikum keverékének CE és μ CE elválasztása.

Körülmények: BGE: 50 mM foszfát (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, hidrodinamikus injektálás: 50 mbar x 2s, **μ CE**: L_{eff} =18 cm, folyadékáram-megosztásos injektálás ($V_{\text{inj.}}$ =2 μ l $\rightarrow$ $\sim$ 400 pl).

Korábban utaltunk rá, hogy a μ CE rendszerrel lehetőség nyílt minták sorozatelemzésére is, amelyre hagyományos CE készülékkel nincs mód. Munkánk során kétkomponensű kefalosporin (cefadroxil és cefuroxim) mintát elemeztünk (21. ábra). A folyamatos elektroforézis mellett a mintákat 90 másodperces időközönként

injektáltuk a rendszerbe. A ~3 másodpercig tartó injektálás (a kétállású mintainjektor feltöltés-injektálás pozíciói közötti váltáshoz szükséges időtartam) alatt lekapcsolhatjuk az elektroforetizáló feszültséget, hogy csak a hidrodinamikai hatások érvényesüljenek az injektálás során (e rövid időtartamú nyomás jelenléte a szeparációs kapillárisban elhanyagolható hatású az elválasztásra). Azonban az elektroforézishez használt feszültség fenntartása mellett is injektálhatunk, ugyanis a mintának a bemeneti portból (IN) a csatornák kereszteződésébe történő áramoltatása döntően a nyomás hatására történik, a feszültség hatása pedig – a mikroszkópos megfigyelések alapján – elhanyagolhatónak bizonyult. Az elektroferogramon látható, hogy az elemzés idejének előrehaladásával egyre növekszik a két komponens csúcsa közötti távolság, annak ellenére, hogy mindig azonos időközönként (90 s) injektáltunk. A 4. injektálást követően a CFD csúcsa már részlegesen összeolvadt az előző elemzés utolsó komponensének csúcsával. Ez a jelenség az EOF folyamatos és gyors változásával magyarázható, mivel a folyamatosan csökkenő EOF egyre lassabban szállítja a komponenseket a detektor felé. Az EOF gyors változásának egyik lehetséges oka, hogy a PDMS mikrocsipben kialakított elektrolittartályok térfogatai túl kicsik (100 μ l) voltak, így a viszonylag rövid idejű elektroforéziskor az elektrolittartályban fellépő elektrolízis is képes megváltoztatni az elektrolit pH-ját. A megváltozott összetételű puffer a szeparációs kapillárisba bejutva eltérő mértékű EOF-et és elektrolit pH-t eredményez, ami miatt a komponensek migrációs sebességei megváltoznak. Ezen vizsgálatok hívták fel a figyelmet arra, hogy a mikrocsip, illetve a miniatürizált rendszerekben a teljes kapilláris/csatornarendszer térfogatát kb. 1000-szeresen meghaladó térfogatú elektrolittartályokra (a rendszerben kb. 500 μ l) van szükség.



21. ábra

Kétkomponensű kefalosprin keverék sorozatinjektálása μ CE rendszerben.

Körülmények: BGE: 50 mM foszfát (pH 6,8), $L_{\text{eff}}=18$ cm, +20 kV, folyadékáram-megosztásos injektálás 90 másodpercenként ($0,5 \mu\text{l} \rightarrow \sim 100$ pl), $\lambda=270$ nm, $N=4$, minta: 2 mg/ml cefadroxil (CFD), cefuroxim (CFR)).

4.2.2.3. A μ CE és a kereskedelmi CE készülék analitikai teljesítőképességének összehasonlítása

A kereskedelmi CE, valamint a μ CE módszerrel kapott elválasztásokat jellemző paramétereket (felbontás (R), elméleti tányérszám (N)) meghatározva egymáshoz hasonló értékeket kaptunk (1. táblázat).

1. táblázat

CE és μ CE rendszer analitikai paramétereinek összehasonlítása kefalosporinok elválasztása esetén.

	komp.	felbontás	elm. tányérsz.
CE	CFD	1,48	9948
	CFC		19833
	CZI	1,69	8624
	CFR		4924
	CTR	2,50	8174
	CIX		17854
μ-CE	CFD	1,68	11520
	CFC		13193
	CZI	2,05	10725
	CFR		4686
	CTR	7,08	17714
	CIX		13462

Az elválasztási hatékonyságot jellemző elméleti tányérszám értékek jó egyezést mutattak a két rendszert tekintve (ami meglehetősen jó eredmény a házilagos összeállítású μ CE rendszerre nézve). A módszerek jobb összehasonlíthatósága érdekében közel azonos kapilláris hosszakkal végeztük az elemzéseket, ugyanakkor a hagyományos CE-nél általánosan használt, 2-3-szor hosszabb kapillárisokkal jobb hatékonyság lett volna elérhető. Az elválasztó kapillárisba beinjektált mintatérfogatok egyik módszernél sem ismertek pontosan (a hagyományos CE-nél is csak nyomás x idő (mbar x sec) szorzatokat adnak meg), de a csúcsok alakja és mérete alapján valószínűleg a μ CE rendszerbe kisebb mintatérfogat injektálódott, ami ugyancsak eredményezheti a jobb tányérszám adatokat az utóbbi esetben. A felbontás értékei szintén megfelelnek egy nagyhatékonyságú mérőrendszerrel szemben támasztott követelményeknek (a gyakorlatban 1,5 értékű felbontás elegendő lehet a mennyiségi elemzés elvégzéséhez).

2. táblázat
Különböző paraméterek összehasonlítása CE és μ CE esetén.

	CE (Agilent)	μ CE (saját összeállítás)
Mintafelhasználás	1-5 nl	1-5 nl
Mintaszükséglet	30-100 ml	2 ml
Elválasztási hatékonyság (elméleti tányérszám)	10000-50000*	4000-20000**
Analízisidő	5-25 perc	2-10 perc
Kimutatási határ (UV)	0,5-2 mg/l*	110-276 mg/l**
A készülék mérete/hordozhatóság	60 x 60 x 70 cm 20 kg	~ 10 x 20 x 20 cm 1 kg
Készülék ára	12 MFt	0,4 MFt + UV fotométer
Üzemeltetési költség	Kicsi (~ <2 eFt/munkaóra)	Nagyon kicsi (~ <0,5 eFt/munkaóra)
Robusztusság, a mérések reprodukálhatósága	Kiváló (a készülék a piacvezető Agilent többéves fejlesztése)	Gyenge (a készülék tudományos kutatásunk eredménye, további fejlesztés alatt áll)
Moduláris jelleg	Korlátozott	Kifejezetten moduláris
Flexibilitás (kapcsolható más analitikai/detektáló rendszerekhez?)	Nagyon korlátozott	Kifejezetten flexibilis
Multikapilláris elemzés lehetősége	Nincs rá lehetőség	Kis átalakítással van rá lehetőség

* kefalosporinok CE elemzése alapján [112]

**kefalosporinok μ CE elemzése alapján

A kétféle módszert összehasonlítva összességében megállapítható, hogy az egyszerű és olcsó eszközökből, illetve az általunk tervezett/elkészített mikrocipből álló, és a kidolgozott folyadékáram-megosztásos injektálási módszer alkalmazásával összeállított μ CE rendszer alkalmas komplex mintakeverékek komponenseinek gyors és hatékony elválasztására. Az elérhető elválasztási hatékonyság hasonló nagyságrendű a jelenleg kereskedelmi forgalomban lévő legkorszerűbb készülékekkel elérhető hatékonysággal. A későbbiekben a rendszer robusztusságának, a mérések precizitásának és az UV detektálás kimutatási határának javítását célzó fejlesztésekre lenne szükség. UV detektálás esetén a

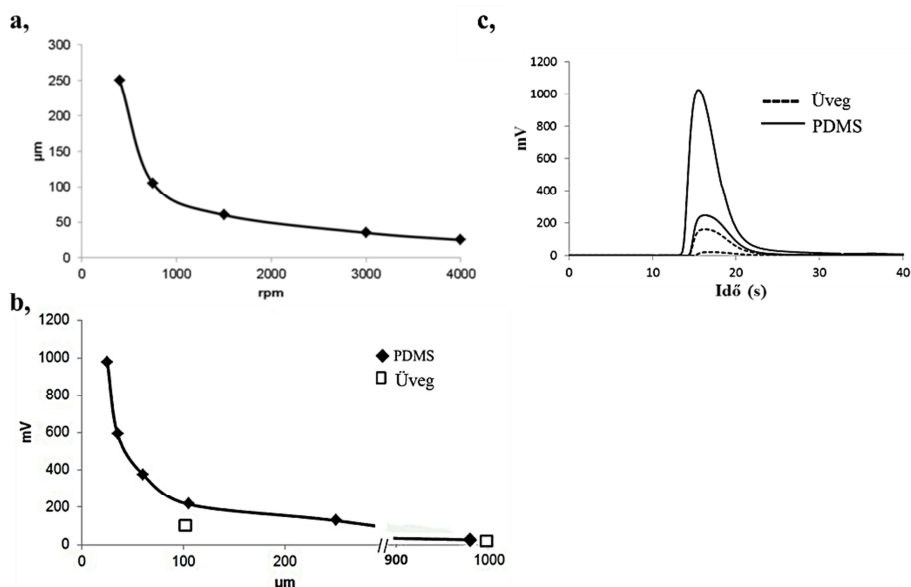
fényforrás felől érkező fény a száloptikából kilépve széttart, a kapilláris falán bekövetkező szóródás miatt pedig jelentős zajt okoz a mérés során. A CE készülék detektáló egységében ezt a problémát úgy küszöbölik ki, hogy a kapilláris előtt keskeny rést (alignment interface) használnak, ezáltal a fénysugarat pontosan a kapilláris belsejébe fókuszálják. A μ CE rendszerénél az elérhető kimutatási határ (LOD) 110-276 mg/l között alakult, mely kb. két nagyságrenddel marad el a CE mérések LOD értékeihez képest.

4.2.3. Érintkezésmentes vezetőképességi detektálás alkalmazása mikrofluidikai csipekhez

4.2.3.1. Mikrocsipek tervezése és készítése C^4D detektáláshoz

Az érintkezésmentes detektáláshoz egy olyan vékony aljú PDMS mikrocsipre volt szükség, melyben a mikrocsip alja szigetelő réteggként funkcionált a detektor érzékelő elektródjai és a mikrofluidikai csatorna között. Részletesen megvizsgáltuk, hogy a különböző vastagságú aljak (20-1000 μm) hogyan befolyásolják a detektálás érzékenységét. A vékony PDMS aljak készítéséhez $\sim 0,5$ g PDMS és térhálósító 10:1 arányú keverékét öntöttük egy szilícium lapra és különböző sebességekkel 50 s-ig forgattuk. A kapott PDMS réteg vastagságának a forgatás sebességétől való függését a 22.a ábrán mutatjuk be. A parabolikus görbe lefutása hasonló a mások által kapott eredményekhez [113]. Ha a PDMS-t szerves oldószerekkel (például hexánnal vagy diklórmétánnal) hígítjuk, még vékonyabb réteget lehet előállítani, azonban ezt már nem lehetséges ráhelyezni a detektor elektródjaira vagy eltávolítani onnan a membrán sérülése nélkül [105].

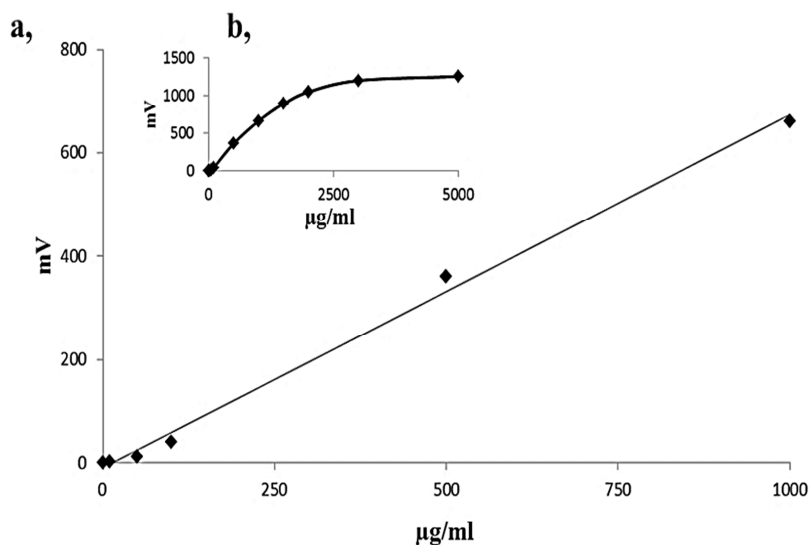
A vékony PDMS-t tartalmazó szilícium lapot és a csatornamintázatot magában foglaló PDMS réteget levegő plazmával történő felületaktiválás után egymáshoz ragasztottuk, ezt követően a PDMS mikrocsipkönnyen lehúzható volt a Si lapról. Az ily módon elkészített, különböző aljvastagságú mikrocsipeken KCl-oldatot áramoltattunk keresztül, majd megvizsgáltuk, hogy a kapott válaszjel hogyan függ az alj vastagságától (22.b-c ábra). Tapasztalataink szerint 100 μm -nél kisebb aljvastagság esetén jelentős mértékű jelnövekedés észlelhető az 1 mm vastagságú üvegaljú mikrocsipnél kapott jelhez képest (ezutóbbi vastagságot gyakran használják mikrofluidikai munkákhoz). Vagyis ~ 100 μm vastagságú PDMS alkalmazása esetén már megfelelő érzékenységű detektálás érhető el, az üveg aljhoz képest pedig kb. kétszer nagyobb jelet detektáltunk, ami a két anyag eltérő dielektromos állandójával magyarázható (a dielektromos állandók értékei üvegnél 5-19, PDMS-nél 2,3-2,8 között változnak). Kisebb vastagságoknál nagyobb válaszjeleket lehetett elérni, de a vékonyabb PDMS réteg már nehezebben kezelhető (könnyebben átszakad). Az üvegalj további hátránya, hogy merevségének köszönhetően nem simul rá megfelelően a C^4D elektródjaira. Mindezek alapján a továbbiakban az elektroforetikus elválasztásokhoz 100 μm aljvastagságú PDMS mikrocsipeket használtunk.



22. ábra

A PDMS mikrocip aljvastagságának függése az azonos ideig (50 s) tartó különböző forgatási sebességektől (a.). A detektor válaszjele és a PDMS vagy üveg réteg vastagságai közötti összefüggés (b.). A jel nagyság összehasonlítása 0,03 és 0,1 mm PDMS, valamint 0,1 mm és 1 mm üveg aljvastagságnál (c.). A kísérletekhez 0,5 μl térfogatú 1500 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú KCl-oldatot juttattunk a 100 μm széles csatornába egy mikroinjektorral, és fecskendő pumpával (5 $\mu\text{l/perc}$ sebességgel) áramoltattuk a detektoron keresztül (elektroforetikus elválasztás ebben az esetben nem volt). Az alkalmazott C^4D frekvencia 2 MHz volt.

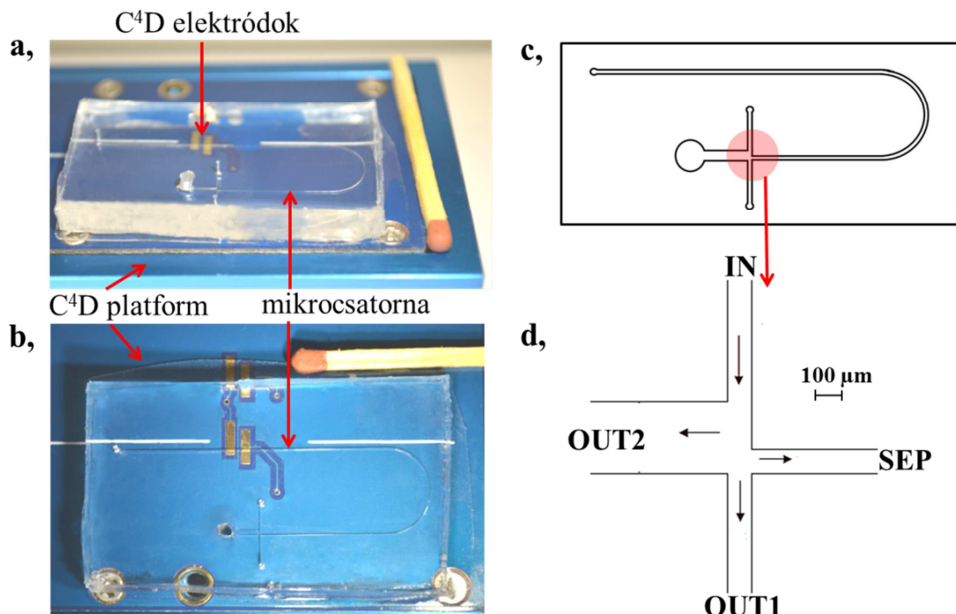
1-1000 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációtartományban meghatároztuk a C^4D lineáris tartományát (23.a ábra), nagyobb koncentrációk (>1500 $\mu\text{g/ml}$) esetén azonban nem lineáris összefüggést tapasztaltunk, amely ~3000 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú KCl-oldatnál érte el a telítést (23.b ábra).



23. ábra

A $C^{4}D$ detektor válaszjelének koncentrációfüggése KCl-oldat esetén 1-1000 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2=0,9957$) (a,) és 1-5000 $\mu\text{g/ml}$ (b,) koncentrációtartományban. A körülmények megegyeztek a 22. ábrán leírtakkal, a PDMS mikrocsip aljvastagsága 30 μm volt.

Az összeállított PDMS mikrocsip- $C^{4}D$ rendszer a 24. ábrán látható. A rendszer egyik előnye az eldobható jelleg, mivel a mikrocsip esetleges eltömődése esetén könnyen eltávolítható a platformról, egy új mikrocsip pedig rugalmasságának köszönhetően egyszerűen az érzékelő elektródokra simítható (24.a ábra). Emellett a mikrocsip csatornája tetszőlegesen pozícionálható az elektródokra (24.b ábra), így az elválasztási hossz szabad változtatására is lehetőség nyílik. A minta injektálásához a már korábban bemutatott folyadékáram-megosztós módszert alkalmaztuk a PDMS mikrocsipen kialakított csatornamintázat segítségével (24.c-d ábra).



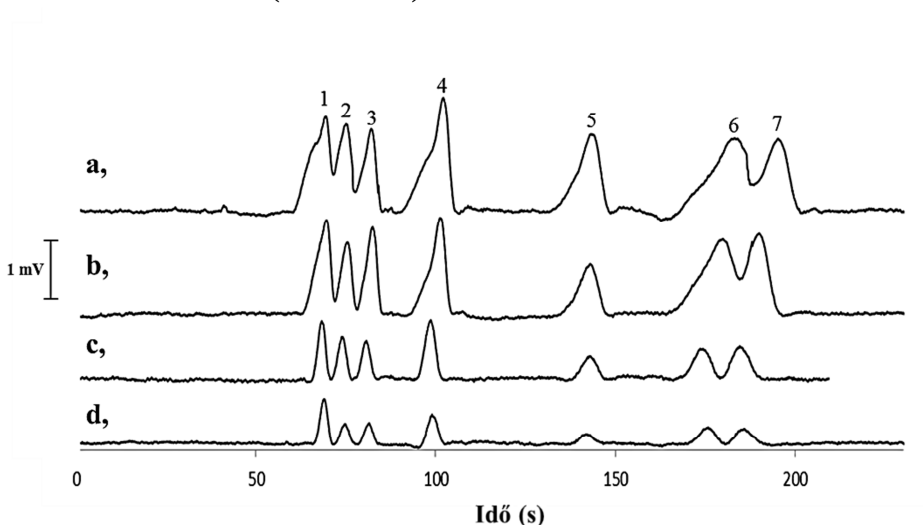
24. ábra

Vékony aljú (~100 μm vastagságú) PDMS mikrocsip a C⁴D platformra helyezve (oldalnézetből (a), és felülnézetből (b)). A mikrocsip csatornája a síkbeli elrendezésű érzékelő elektródok felett halad el. A csatornamintázat a folyadékáram-megosztásos injektáláshoz alkalmazható részt tartalmaz, amellyel nanoliternél kevesebb mintamennyiséget lehet az elválasztó csatornába (SEP) bejuttatni (c.). Az injektálási rész egy 100 μm széles elválasztó csatornát (SEP) és egy 400 μm széles elfolyó csatornát tartalmaz (OUT2) (d.). A minta injektálása az IN port felől történt egy fecskendő segítségével. Az elektroforézis során a feszültséget az OUT1 (- pólus) és SEP (+ pólus) csatornák végénél alkalmaztuk.

4.2.3.2. C⁴D alkalmazása CZE elválasztásokhoz

Az összeállított PDMS mikrocsip-C⁴D rendszert hétkomponensű, szervesetlen és szerves anionokat egyaránt tartalmazó keverék zónaelektroforetikus elválasztásával teszteltük. Először meghatároztuk, mekkora mennyiségű kezdeti mintatérfogatot kell beinjektálni a bemeneti porton keresztül ahhoz, hogy a folyadékáram-megosztásos injektálás során megfelelően kicsi mintatérfogat kerüljön be az elválasztó csatornába. Különböző kezdeti térfogatokat injektáltunk ($V_{in} = 0,25-2 \mu l$) egy Hamilton fecskendő segítségével, amely mintamennyiség a három kivezetés felé (OUT1, OUT2 és SEP) széteszlott, az elválasztó csatorna kezdetén pedig kialakult a kicsi (0,1-0,8 nl) mintatérfogat. Az injektálást követően a csatornák végeihez 1 kV feszültséget kapcsoltunk és végrehajtottuk az elektroforetikus elválasztást (25. ábra). 1 és 2 μl kezdeti térfogat injektálásával kapott ~0,4 és 0,8 nl mintatérfogat esetén

nem sikerült elérni az összes komponens alapvonalon elválasztását (25.a-b ábra). 0,25 és 0,5 μl kezdeti térfogatnál már kellően kicsi mintamennyiség került be az elválasztó csatornába, így kisebb intenzitású, de egymástól alapvonalon elváló csúcsokat detektáltunk (25.c-d ábra).

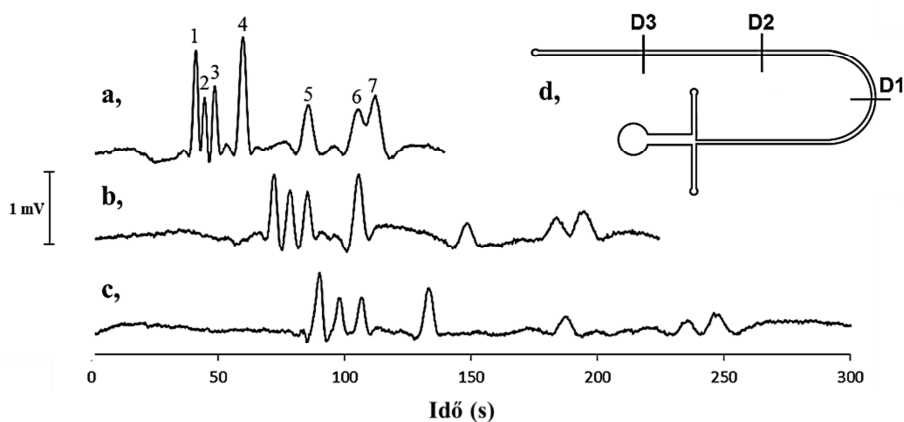


25. ábra

Hétkomponensű szervetlen és szerves anion keverék elektroferogramjai különböző kezdeti térfogatok ($V_{\text{in}}=2 \mu\text{l}$ (a.); $1 \mu\text{l}$ (b.); $0,5 \mu\text{l}$ (c.) és $0,25 \mu\text{l}$ (d.))alkalmazása esetén.

Körülmények: BGE: 50 mM MES/His (pH 6,0), $U=1000 \text{ V}$. Anionok csúcsainak hozzárendelése: klorid (1), nitrát (2), tiocianát (3), fluorid (4), acetát (5), foszfát (6), benzoát (7). A vizsgált komponensek koncentrációja $50 \mu\text{g/ml}$ (1-5 anionokra) és $100 \mu\text{g/ml}$ (6-7 anionokra) volt.

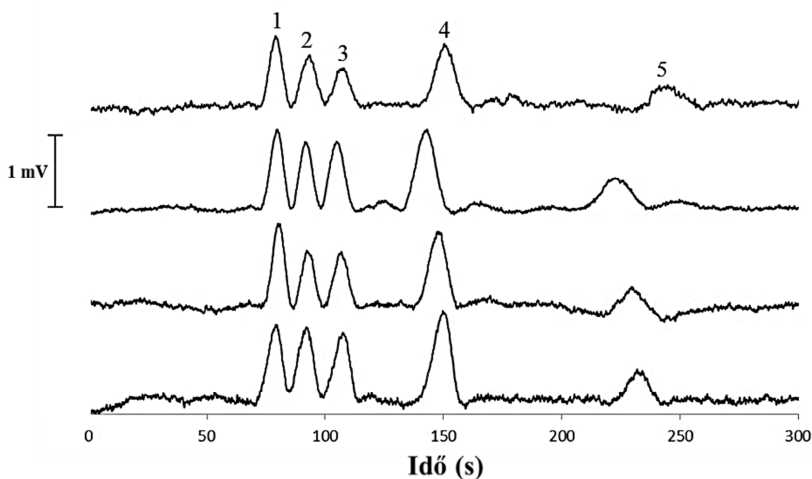
További kísérleteinkben a jobb érzékenység eléréséhez $0,5 \mu\text{l}$ kezdeti térfogatokat injektáltunk. Az összeállított rendszer egyik előnye, hogy a mikrocip pozícionálásával az elválasztás úthossza tetszőlegesen és egyszerűen változtatható. A különböző effektív hosszak ($L_{\text{eff}}= 5 \text{ cm}$; $6,5 \text{ cm}$ és 8 cm) (26.d ábra) alkalmazásával kapott elektroferogramok a 26.a-c ábrán láthatók. 5 cm úthossznál a vizsgált anionok (elsősorban a nagyobb migrációs időknél jelentkező szélesebb csúcsot eredményező komponensek) nem voltak elválaszthatók egymástól (26.a ábra). Megállapítható, hogy $6,5 \text{ cm}$ elválasztási hosszon a tesztvegyületként használt anionok keveréke alapvonalon elválasztható volt egymástól, rövid elemzési idő (kevesebb mint 3,5 perc), valamint $4000\text{-}6000$ ($63000\text{-}93000/\text{m}$) elméleti tányérszám érték elérése mellett (26.b ábra). A hosszabb (8 cm) elválasztási távolság viszont nem biztosított jobb elválasztást (26.c ábra).



26. ábra

Hétkomponensű mintaoldat elektroforetikus elválasztásával kapott elektroferogramok különböző elválasztási-úthosszak ($L_{\text{eff}} = 5$ cm (a,); 6,5 cm (b,) és 8 cm (c,)) esetén. A detektálási pontok a csatornamintázat sematikus ábráján láthatók (d.). Körülmények: a 25. ábrán leírtakkal megegyezők, $V_{\text{in}} = 0,5 \mu\text{l}$ volt.

A rendszer reprodukálhatóságát a minták egymás utáni injektálásával és elválasztásával teszteltük ($N=4$). A migrációs időkre és csúcsterületekre kapott RSD értékek 0,63-3,53%, illetve 1,73-14,58% között alakultak (27. ábra).

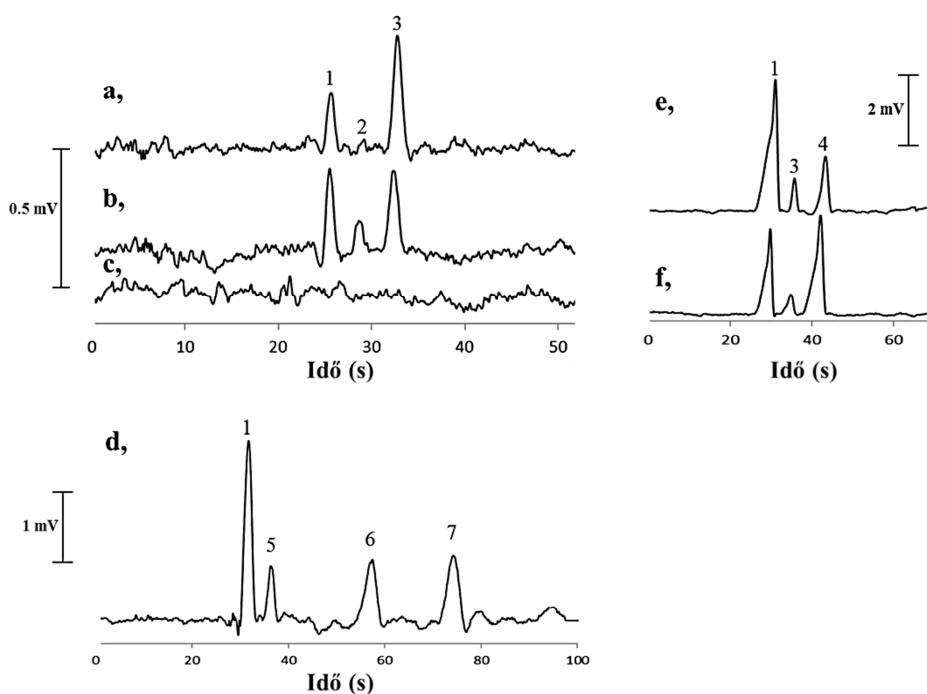


27. ábra

PDMS mikrocshipen történő elválasztások reprodukálhatóságának vizsgálata ($N=4$) manuális folyadék-áram megosztásos injektálás után, C^4D módszerrel detektálva. Körülmények ugyanolyanok, mint a 25. ábrán, $U=1000$ V. Csúcsok azonosítása: klorid (1), nitrát (2), tiocianát (3), fluorid (4), foszfát (5).

4.2.3.3. Valódi minták elemzése

A mikrocsip- C^4D rendszert különféle valódi minták elemzésével is teszteltük. Ásványvízben és csapvízben klorid-, szulfát- és nitrát-ionokat azonosítottunk (28.a-b ábra). A 10-szeres hígítású nyálmintát etanol (96%) segítségével fehérjementesítettük a mikrocsipbe történő injektálás előtt. Ebben a mintában klorid-, tiocianát-, acetát- és foszfát-ionokat határoztunk meg (28.d ábra). Gyermeknek és felnőtteknek készült fogkrémet is elemeztünk hígítás (10-szeres) és centrifugálás után (28.e-f ábra). A valódi mintákban meghatározott ionok koncentrációit a 3. táblázatban foglaltuk össze.



28. ábra

Ásványvíz (a.); csapvíz (b.); desztillált víz (c.); nyál (d.); gyermekeknek (e.) és felnőtteknek való fogkrém (f.) PDMS mikrocsip- C^4D elemzésével kapott elektroferogramok.

Körülmények: $V_{in}=0,5 \mu l$; $U=2 \text{ kV}$; $L_{eff}=6,5 \text{ cm}$; BGE ua., mint a 25. ábrán. Csúcsok hozzárendelése: klorid (1), nitrát (2), szulfát (3), fluorid (4), tiocianát (5), acetát (6), foszfát (7).

3. táblázat

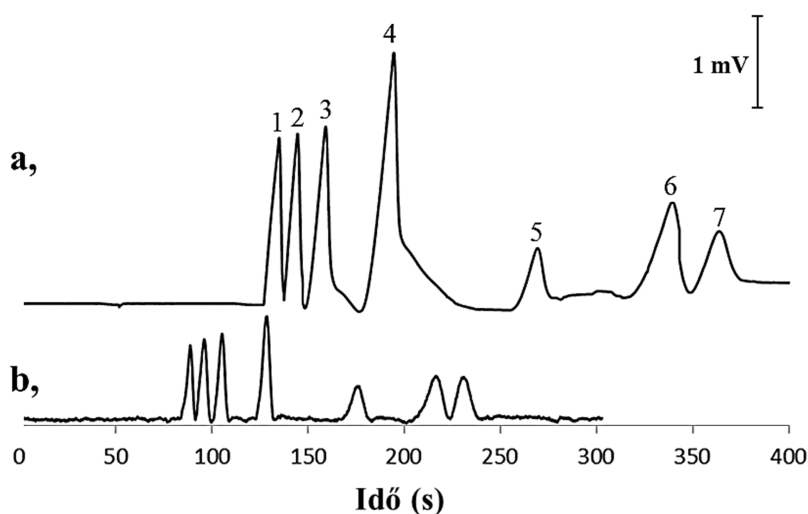
PDMS mikrocsip- C^4D rendszerrel meghatározott szervetlen és szerves anionok koncentrációk különböző valódi mintákban. (Körülmények ugyanazok mint a 25. ábrán.)

Minta	Koncentráció (µg/ml)						
	klorid	nitrát	szulfát	fluorid	tiocianát	acetát	foszfát
Ásványvíz	0,79 ± 0,01	0,35±0,05	2,09±0,17	–	–	–	–
Csapvíz	1,36 ± 0,02	1,09±0,15	1,34±0,11	–	–	–	–
Felnőtt fogkrém	188,4±3,5	–	52,6±4,3	446,7±48,2	–	–	–
Gyermek fogkrém	384,1±7,0	–	54,2±4,4	208,2±20,0	–	–	–
Nyál	181,0±3,5	–	–	–	142,4±20,0	239,7±19,8	412,5±41,3

Az elválasztások során kapott felbontásokat a detektor érzékelő elektródjai közötti távolság csökkentésével lehetne javítani. Az alkalmazott C^4D esetén ez a távolság ~500 µm (általában 500 µm és 2 mm között változik). Egy kb. 100 µm hosszúságú mintazóna esetén (amely jellemző mikrocsip elektroforézisre, 6-10 cm elválasztási úthossz esetén) a detektor elektródjai közötti távolságnak 20-100 µm között kellene lennie. 500 µm-nél kisebb távolság alkalmazása azonban nehézkes, mivel az elektródok között „közvetlen” kapcsolat alakulhatna ki. Ezen a téren további fejlesztésre lenne szükség a műszergyártó cégek részéről. (Erről a problémakörrel részletesen a 4.3 fejezetben lesz szó.)

4.2.3.4. Kapilláris C^4D szenzor és mikrofluidikai C^4D platform alkalmazása a detektorok analitikai teljesítőképességének vizsgálatához

A mikrocsipekhez használt C^4D és a kvarckapillárishoz alkalmazható C^4D szenzorfej teljesítőképességének összehasonlításához a 4.2.3.1. fejezetben bemutatott PDMS mikrocsip- C^4D rendszert módosítottuk. Egy 8 cm hosszúságú kvarckapillárist (ID 50 µm) illesztettünk az elválasztó csatorna kivezető portjába, a kapilláris másik végét pedig egy elektrolittal töltött edénybe merítettük. A kétféle detektor egymás utáni kapcsolásával lehetőség nyílt arra, hogy működésüket ugyanazon elektroforetikus elválasztás alatt hasonlíthassuk össze. C^4D szenzorfejjel hozzávetőlegesen 2,5-szer nagyobb jelet, valamint kevésbé zajos alapvonalat kaptunk a C^4D platformmal detektált jelekhez viszonyítva (29. ábra).



29. ábra

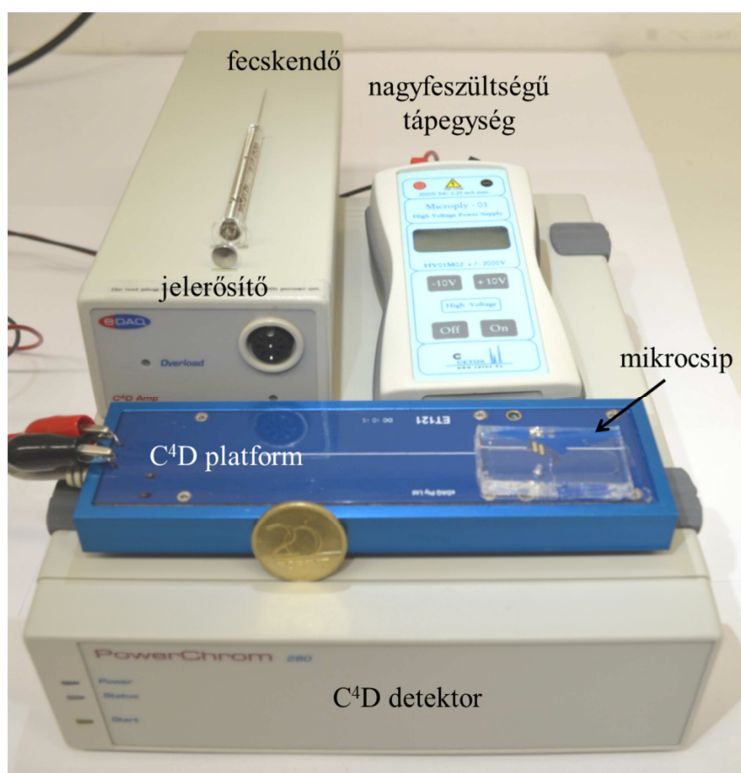
A hagyományos C^4D szenzorfejjel (a,) és a C^4D platformmal (b,) végrehajtott, kettős detektálással kapott elektroferogramok. Körülmények: $U=2500$ V; $V_{in}=0,5$ μ l; $L_{eff1}=6,5$ cm (a C^4D platform elektródjainak pozíciója) és $L_{eff2}=12$ cm (a C^4D szenzorfej pozíciója).

Csúcsok hozzárendelése és további körülmények ugyanazok, mint a 25. ábrán.

A vizsgált anionokra számolt kimutatási határ (LOD) értékek a C^4D szenzorfejre 0,056-1,04 μ mol/l (0,002-0,037 μ g/ml), a C^4D platformra pedig 3,6-14,7 μ mol/l (0,13-2,26 μ g/ml) között alakultak, amelyek más mikrofluidikai rendszerekkel elért értékekkel megegyező nagyságrendűek (2,5-24 μ M) [114-116]. A LOD értékeket az alapvonal szórásából (s) és a kalibrációs egyenes meredekségéből (S) számítottuk (3s/S). Ez az eltérés elsősorban a szigetelő réteggént használt anyagok minőségétől (kvarc, illetve PDMS), vastagságától és a különböző gyártmányú detektorok konstrukciójától/teljesítményétől függ. A vastagabb szigetelő réteg ellenére a C^4D szenzorfej esetén kaptunk jobb LOD értékeket, amely azzal magyarázható, hogy a kétféle detektornál használt elektródok geometriája eltér, illetve a szenzorfej beépített erősítőt tartalmaz és korlátozott erősítésű gerjesztő feszültséggel működik [117]. A két elektroferogramon a migrációs idők arányos eltolódása a különböző effektív hosszaknak köszönhető.

Az összeállított alacsony költségű PDMS mikrocsip- C^4D rendszer alternatívája lehet a jelenleg használt, kereskedelmi forgalomban elérhető, drága mikrocsipeknek. A teljes berendezés elfér egy laboratóriumi tálcán vagy egy közepes méretű aktatászkában az összes tartozékával együtt (Hamilton fecskendő a folyadékaramegosztásos injektáláshoz, nagyfeszültségű tápegység az elektroforézishez, jelerősítő a válaszjel növeléséhez és szűréséhez, valamint C^4D detektor a

jelfeldolgozáshoz), össztömege pedig nem haladja meg a 3 kg-ot, így könnyen hordozható (30. ábra).



30. ábra

Hordozható, miniatürizált PDMS mikrocsip-C⁴D rendszer kiegészítő egységekkel.

4.3. Mintadúsítás izotachoforézissel kereskedelmi CE készülékben és mikrofluidikai csipben

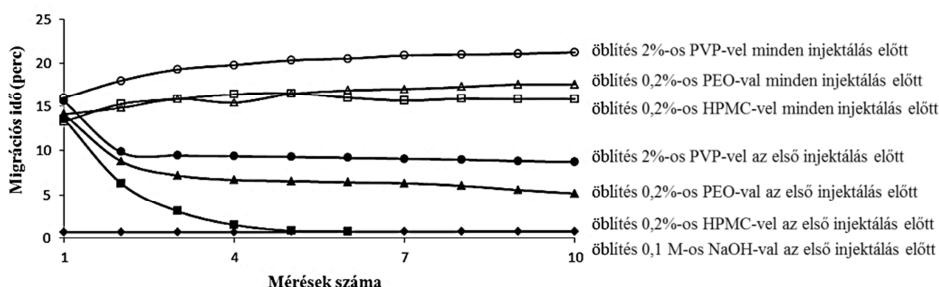
4.3.1. Az elektroosmotikus áramlás visszaszorítása dinamikus felületmódosítással

Kezdetekben az EOF csökkentéséhez és a vizsgálandó komponensek kapilláris falához történő adszorpciójának megakadályozásához nem térhálósított poliakrilamid monomolekuláris réteget használtak [118]. Később sokféle dinamikus vagy statikus (állandó) réteget alakítottak ki a kapilláris falán [119]. A statikus réteg bár robosztus, létrehozásához gyakran bonyolult lépésekre van szükség [120], ezért a dinamikus bevonatok használata is elterjedt. A dinamikus réteg kialakulása H-kötéssel vagy hidrofób és dipól-dipól/elektrosztatikus kölcsönhatásokkal valósul meg az alkalmazott polimer anyagi minőségétől függően [118, 121, 122]. Korábban már részletesen vizsgálták a HPMC [123], PEO [124], HEC, PVA [125], PEG [126] és PVP [127-129] dinamikus réteggént való alkalmazhatóságát. Hidrofil polimerek puffer oldathoz való hozzáadása előnyös lehet, mivel a közeg viszkozitása nem nő meg és így a mérési idő sem hosszabbodik meg.

Vizsgálataink során dinamikus rétegeket alakítottunk ki a kapilláris falán az EOF csökkentésére, melynek változását a semleges marker módszerrel (benzil-alkohol) [130] követtük. Az injektálás előtt három különböző polimer (HPMC, PEO, PVP) vizes oldatával módosítottuk a kapilláris falát, de a BGE nem tartalmazott adalékot. Először csak az első injektálás előtt öblítettük a kapillárist a módosítókkal (10 percig), majd 10-10 egymást követő elektroforetikus futtatást hajtottunk végre a polimerek további alkalmazása nélkül. A benzil-alkohol migrációs idejének változása a kapilláris felületi töltéseinek módosulására utal (31. ábra). Megfigyelhető, hogy az egyszeri polimeres mosás jelentősen csökkentette az EOF-t (~7-8-szor kisebb volt, mint a NaOH-oldatos öblítés után). Az így kialakított réteg viszont nem volt stabil, mivel a második futtatás után az EOF jelentős növekedését tapasztaltuk. Feltételezhetően először egy olyan réteg alakult ki a kapilláris felületén, amely az elektrolittal történő öblítés hatására részben lemosódott és egy viszonylag stabilis monoréteg maradt vissza. Ekkor azonban a töltések elfedése nem volt teljes, így kismértékű EOF volt jellemző. Az ötödik futtatás után a HPMC csaknem teljes mennyisége lemosódott a falról, PEO és PVP esetén pedig a második mérés után egy viszonylag stabilis felület alakult ki lecsökkent EOF jelenléte mellett.

Ha a kapilláris falát minden injektálás előtt mostuk a polimerekkel (10 percig) jóval hatékonyabban sikerült a felületi töltéseket elfedni, amely csekély, de viszonylag állandó EOF-hez vezetett (3-5 mérés után csak minimális változás volt megfigyelhető a marker migrációs idejében). A vizsgált polimerek közül a PVP

bizonyult a leghatékonyabb EOF szupresszornak, amely a polimerek oldhatóságbeli különbözőségének is tulajdonítható. A HPMC és PEO alig oldódik vízben, maximum 0,1-0,2%-os oldat készíthető belőlük erőteljes keveréssel. A PEO-t pedig csak teljesen protonált (például sósavas öblítést követően) állapotban lévő kapilláris falra lehet adszorbeáltatni [131]. Ezzel szemben a hidrofíl tulajdonságú PVP-ből nagyobb koncentrációjú (1-2 %) oldatok is készíthetők. A PVP alkalmazásának hátránya viszont, hogy az UV fényt elnyeli. Így a további CITP mérésekhez PVP-vel bevont kapillárisokat használtunk, úgy, hogy minden injektálás előtt öblítettük a kapilláris falát a polimerrel, de a puffer oldatok (BGE, LE) nem tartalmaztak PVP-t.



31. ábra

Az EOF csökkentés hatékonyságának vizsgálata a kvarckapilláris felületének HPMC-vel, PEO-vel és PVP-vel történő dinamikus felületmódosítását követően. A diagramon az EOF marker migrációs idejét a CZE elemzések számának függvényében ábrázoltuk. Kapilláris előkezelése: 1 bar nyomással, 10 percig a megfelelő adalékkal, illetve a BGE-vel 5 percig.

CZE elemzés körülményei: BGE 25 mM foszfát (pH 6,8), L_{tot} = 33 cm x 50 μ m, L_{eff} = 24,5 cm, U = +20 kV, injektálás: 50 mbar x 2 s a kapilláris anódos végénél, λ = 200 nm, semleges marker: benzil-alkohol.

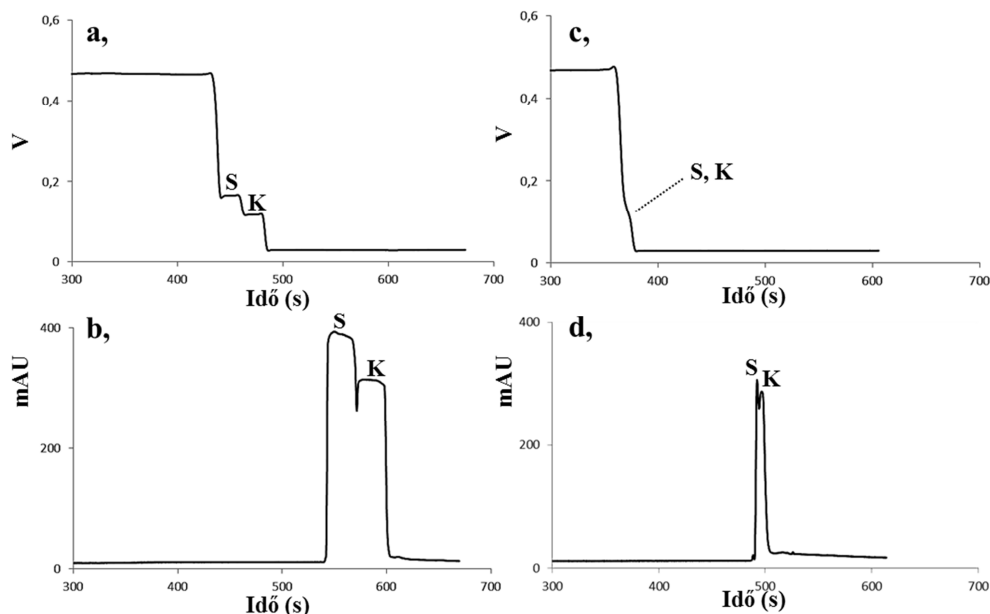
4.3.2. $C^{4}D$ és UV detektálás alkalmazása kapilláris ITP-hez

A vezetőképességi detektálás alkalmazása előnyös töltéssel rendelkező komponensek detektálására, elsősorban CZE méréseknél. A $C^{4}D$ elterjedtebb használata a direkt módszerrel szemben annak köszönhető, hogy a $C^{4}D$ szenzorfej könnyen alkalmazható a kvarckapillárisokhoz, nincs szükség a poliimid réteg eltávolítására és szabadon lehet változtatni az effektív hosszt is. Könnyen összekapcsolható a kereskedelmi CE készülékkel, és lehetőség nyílt kettős detektálásra is az UV módszer párhuzamos alkalmazásával [132-133]. A nyilvánvaló előnyök ellenére az érintkezésmentes vezetőképességi detektálást csak néhány esetben alkalmazták CITP-hez nagy frekvenciás sugárirányú [134, 135] vagy a később kifejlesztett axiális elrendezésben [24, 136].

Munkánk során a kereskedelmi forgalomban elérhető $C^{4}D$ szenzorfej alkalmazhatóságát teszteltük hagyományos CE készülékben végrehajtott CITP

elemzésekhez, ezt a kombinációt korábban alig használták [137-139]. Az alkalmazhatóság sarkalatos pontja a detektor két érzékelő elektródja közötti távolság (jellemzően 1-2 mm) hatása az elválasztásra, mivel ez nagyban befolyásolja az elérhető felbontást [132, 140]. Ha a detektálási rés 1 mm széles, a CITP során létrejövő zónák hosszának 1 mm-nél nagyobbak kell lenniük annak érdekében, hogy az izotachferogramon két elkülönülő lépcsőt detektálhassunk. A nem túlságosan rövid zónák eléréséhez nagy mennyiségű mintát kell bejuttatni a kapillárisba vagy pedig kisebb koncentrációjú vezető elektrolitot (LE) kell alkalmazni. Hasonló megfontolásokat kell figyelembe venni CZE elválasztásnál, ahol a két egymástól elválasztott csúcs közötti távolságnak kell a detektálási résnél nagyobbak lennie (4.2.3.2. fejezet). Az elválasztási felbontás javításához a detektálási rés méretének csökkentésére van szükség, de 500 μm -nél kisebb rés esetében közvetlen kapcsolat alakulhat ki az elektródok között növelve a szórt kapacitást [141]. UV detektálásnál a kapilláris és a fényforrás között alkalmazott interfész résmagassága (620 μm Agilent gyártmányánál) feleltethető meg a C^4D -nél lévő detektálási résnek.

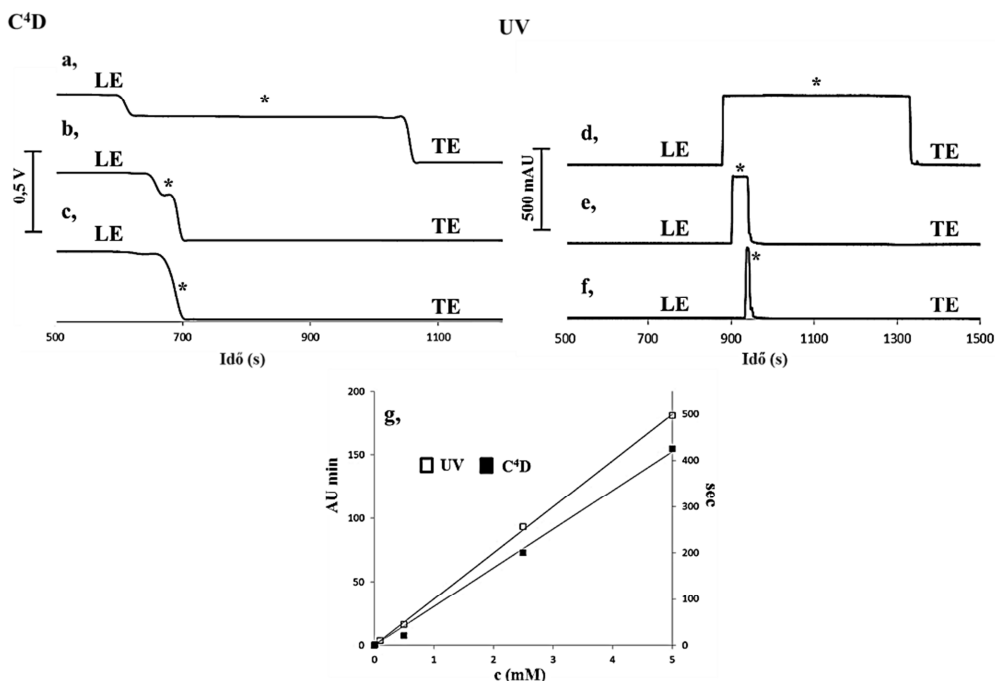
A 32. ábrán egy kétkomponensű festékkverék beinjektált mennyiségének a detektálhatóságra gyakorolt hatását mutatjuk be. Nagyobb koncentrációjú minta esetén (500 mg/l) két különálló lépcső látható az izotachferogramon (32.a ábra). A kapott jel jellemző a hagyományos ITP elemzésekre, és könnyen kiértékelhető minőségi (relatív lépcsőmagasság alapján) és mennyiségi (lépcső hossza alapján) szempontból. UV detektálásnál (32.b ábra) a zónák szélessége hasonló a C^4D -vel mért szélességekhez, amely azt mutatja, hogy a kialakult ITP zónák stabilak voltak, mivel nem fordult elő jelentős diszperzió a két detektor közötti távolságon (a migrációs idők közötti különbségek az eltérő effektív hosszaknak tulajdoníthatóak, mely 20 cm volt C^4D -re és 24,5 cm UV detektálásra). Az UV detektálással kapott izotachferogramon a csúcsterületek integrálással meghatározhatók. Minél nagyobbak a zónák abszorbananciáinak különbségei, annál pontosabban lehet integrálni a csúcsokat. 10-szeres hígítású minta elemzésekor (50 mg/l) a koncentrált zónák szélessége kisebb volt mint a detektálási rés, ezért a zónák detektálása nem volt lehetséges (32.c ábra). Ugyanígy az UV detektálást követően sem értékelhető (integrálható) jól a két minta zónája az összeolvadás miatt (32.d ábra).



32. ábra

Kétkomponensű festékeverék (S= sárga (tartrazin) és K= kék (Brilliant Blue FCF)) C⁴D elemzése C⁴D (a, c) és UV (b, d) detektálással. A komponensek koncentrációja 500 mg/l (a, b), illetve 50 mg/l (c, d) volt. Körülmények: LE: 100 mM Cl⁻/His (pH 6.0) és TE: 100 mM MES/His (pH 6.0), U= -10 kV, injektálás: 50 mbar x 150 s minta + 50 mbar x 20 s TE a kapilláris katódos végénél. Detektálási paraméterek: **C⁴D**: frekvencia: 3x HIGH, feszültség: -6 dB, erősítés: 50%, levágás: 040, L_{eff}= 20 cm, **UV**: λ=400 nm, L_{eff}= 24,5 cm. Kapilláris előkezelése: mosás 2%-os PVP-oldattal (1 bar x 10 perc) és LE-vel (1 bar x 5 perc) minden injektálás előtt. A minták 20% TE-t tartalmaztak.

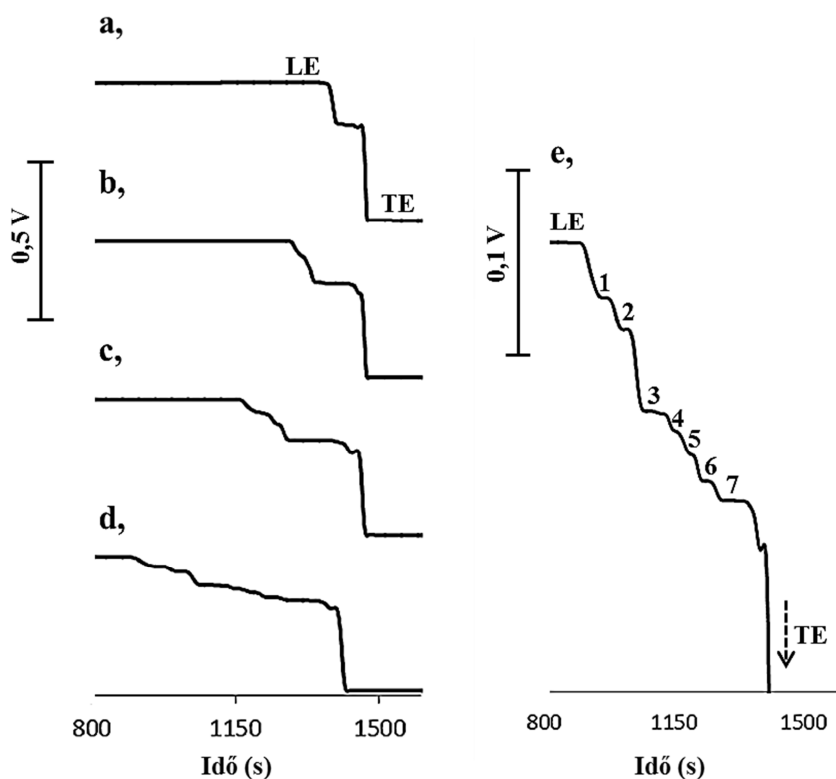
Az ITP lépcsők jobb látszólagos felbontása (ami az ITP elválasztás körülményeivel (elválasztási felbontás) és a detektor cella felépítésével (térbeli felbontás) határozható meg) akkor érhető el, ha a mintazónák szélességét megnöveljük (maximalizáljuk) nagyobb injektált térfogat alkalmazásával, amihez hosszú kapillárisra van szükség. Ennek vizsgálatához a 120 cm hosszú kapilláris 75%-át töltöttük meg kromát-oldattal. Nagyobb koncentrációknál (0,5-5 mM) normál ITP zónák C⁴D detektálására nyílik lehetőség (33.a-b ábra), de hígabb minta esetében (0,1 mM) a kromát zóna nem detektálható (33.c ábra), mivel az injektált minta mennyisége nem elegendő a normál ITP zóna kialakításához. A kromofór csoportot tartalmazó meghatározandó komponens UV detektálásakor a kapott jel könnyen meghatározható plató vagy csúcsmódban (33.d-f ábra), ezért az UV detektálás előnyösen alkalmazható kis mennyiségben jelenlévő, kromofór csoportot tartalmazó komponensek meghatározására, ha egyetlen UV elnyelő anyagként van jelen a mintában és a szomszédos zónák sem nyelik el az UV fényt.



33. ábra

Különböző koncentrációjú kromát-ion (5 mM (a, d); 0,5 mM (b, e) és 0,1 mM (c, f)) CITP elemzése C^4D (a, b, c) és UV (d, e, f) detektálással. Körülmények: L_{tot} = 120 cm x 50 μ m, L_{eff} = 111,5 cm (UV), L_{eff} = 107 cm (C^4D), U = -30 kV, injektálás: 1 bar x 120 s + 50 mbar x 20 s TE, λ = 360 nm. Kromát-ion kalibrációs egyenese (g.). Kapilláris kondicionálása ugyanaz, mint a 32. ábrán. Kromát-ion lépcsőjét/csúcsát *-gal jelöltük.

A különböző injektált mintamennyiségek eltérő hosszúságú komponens zónákat eredményeznek, amely kifejezetten fontos a CITP elválasztás felbontásának javításához egy adott detektálási résnél. Különböző szerves anionokat (nitrát, nitrit, tiocianát, szulfát, kromát, bromát, fluorid) tartalmazó elegyeket vizsgáltunk CITP-vel (34. ábra). Ha a kapilláris 19%-át (1 bar x 30 s) töltöttük meg mintával az izotachferogramon mindössze egyetlen kevert zóna lépcsője jelent meg (34.a ábra). A kapilláris 38 vagy 56%-át (1 bar x 60 s vagy 90 s) megtöltve újabb lépcsők jelennek meg az izotachferogramon, de szabályos ITP zónák nem figyelhetők meg minden meghatározandó komponens esetén (34.b-c ábra). A kapilláris 75%-át (1 bar x 120 s) megtöltve mintával az összes vizsgált anionra különálló zóna lépcsőket kaptunk (34.d ábra, kinagyítva a 34.e ábrán látható). Mivel ezek a szerves anionok kis mértékben nyelik el a fényt, az UV detektálás nem alkalmas vizsgálatukhoz.

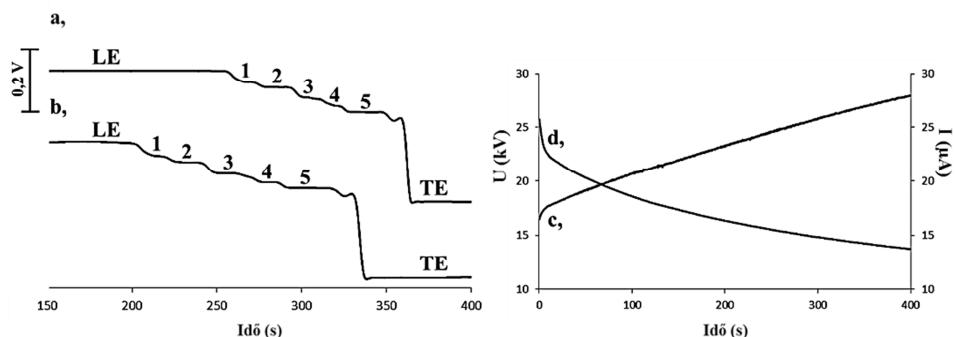


34. ábra

Hétkomponensű szervesetlen anionok keverékének CIP elemzése különböző mintatérfogatok esetén (injektálási paraméterek: 1 bar x 30 s (a,); 60 s (b,); 90 s (c,) és 120 s (d,)). A d, izotachoferogram kinagyított skálán ábrázolva (e,). Zónalépcsők hozzárendelése: nitrit (1), nitrát (2), tiocianát (3), szulfát (4), kromát (5), bromát (6), fluorid (7). A koncentráció minden komponensre 1 mM volt. Egyéb körülmény ua., mint 33. ábrán.

Az elvégzett kísérletek alapján megállapítható, hogy a kereskedelmi CE készülékben végrehajtott CIP elemzések alkalmasak voltak a mintaösszetevőinek dúsítására abban az esetben, ha a kapilláris nagy része töltve volt a mintával. Bár a CIP elemzéseket gyakran állandó áramerősség mellett végzik, vizsgálataink során nem találtunk számottevő különbséget a kapott eredményekben állandó feszültség értékek alkalmazása mellett sem (35.a-b ábra). Megfigyelésünk szerint állandó áramerősség használatkor a feszültség fokozatosan növekedett a mérés előrehaladtával (35.c ábra), állandó feszültség esetén pedig a mért áram értéke csökkent (35.d ábra). Ez azzal magyarázható, hogy az elemzés során egyre nagyobb mennyiségű (kis vezetőképességű) TE jut be, kiszorítva ezzel a (nagyobb vezetőképességű) LE-t a kapillárisból. Korlátozó tényező, hogy a kereskedelmi CE készülékben maximálisan 30 kV feszültséget lehet elérni, így elsősorban állandó

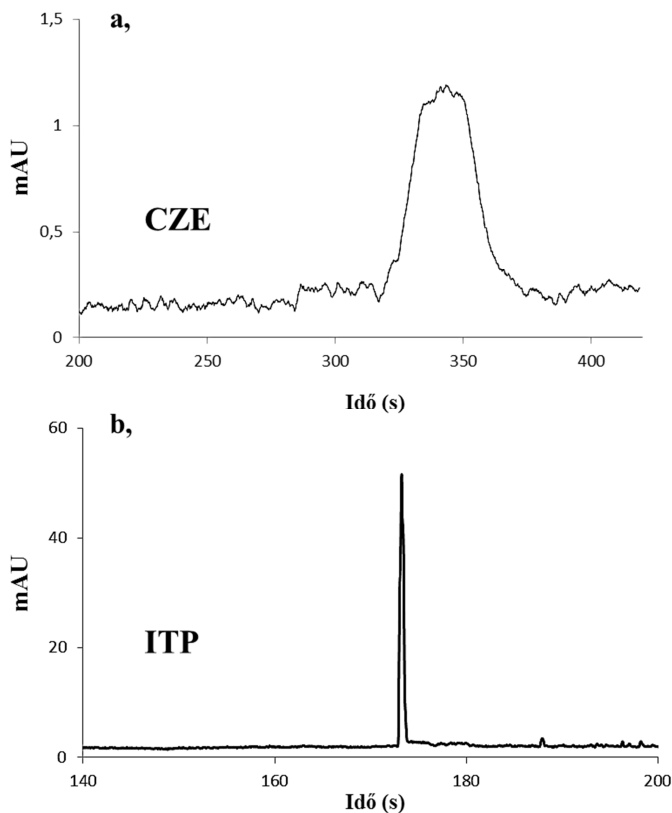
áramerősség mellett úgy kell megválasztani az I értéket, hogy a mérés végéig a növekvő feszültség ne érje el a felső küszöböt (30 kV). Különböző összetételű/koncentrációjú pufferrendszer használatakor pedig az alkalmazott feszültség vagy áram értékének optimalizálása válhat szükségessé az említett korlátok figyelembe vételével.



35. ábra

Ötkomponensű anionok keverékének (nitrit (1), nitrát (2), tiocianát (3), szulfát (4), fluorid (5)) CIP elemzése állandó áramerősség (20 μ A) (a), és állandó feszültség (20 kV) (b), alkalmazása mellett. A feszültség (c), és áramerősség (d), értékeinek változása a CIP elemzés alatt. A meghatározandó komponensek koncentrációja 10 mM volt. A detektálás C^4D -vel történt, egyéb körülmények a 32. ábrán.

Az előzőekben bemutatott CIP rendszer analitikai teljesítőképességének értékeléséhez először a sárga ételfesték CZE és CIP vizsgálataival elért eredményeit hasonlítottuk össze. Ehhez 10 μ M koncentrációjú festéket injektáltunk 50 mbar nyomással 100 s-ig (ez ~50-szer nagyobb injektált térfogat, mint ami CZE-nél szokásos). CZE esetén kis intenzitású (~ 1 mAU) és szabályos alakú csúcsot detektáltunk minimális dúsítás mellett (36.a ábra). ITP módszerrel nagyon éles (~1 s csúcsszélesség) csúcsot kaptunk, majdnem 50-szer nagyobb csúcsintenzitás mellett (a csúcsterületek hasonlóak voltak a CZE és CIP mérésnél) (36.b ábra). A dúsítási faktort ~50-nek állapítottuk meg, de akár 100-1000-szeres dúsítási faktor értékek is elérhetők hígabb minta vagy nagyobb injektált térfogatok alkalmazása esetén.

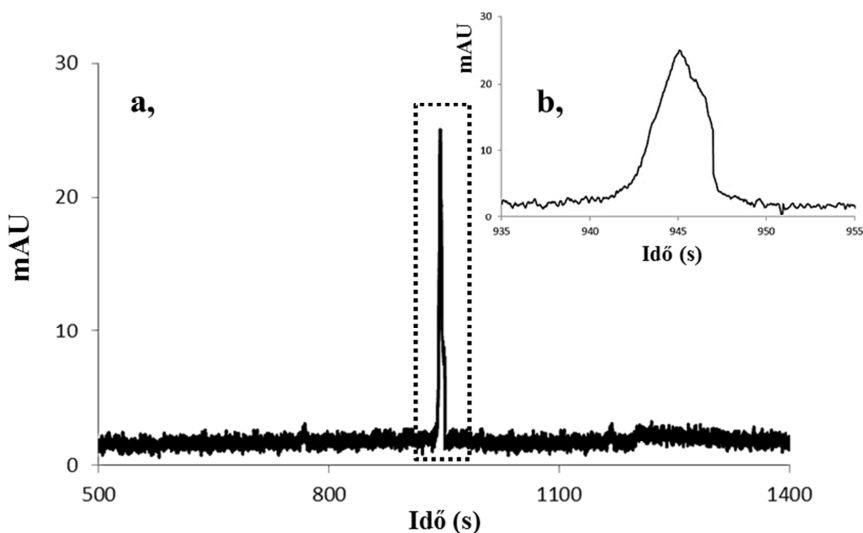


36. ábra

10 μM koncentrációjú sárga ételfesték CZE (a,) és CITP (b,) elemzéssel kapott UV jelei. Körülmények: $U = -15 \text{ kV}$, injektálás: 50 mbar x 100 s. **CITP**: paraméterek ugyanazok, mint 32. ábrán. **CZE**: körülmények ugyanolyanok, mint 31. ábrán.

A kromát-ionra kapott kalibrációs diagram lineáris összefüggést mutat (az R^2 értékek 0,9997-nek (UV) és 0,9951-nek (C^4D) adódtak) a 0,1 μM -5 mM (UV) és 0,4 mM-5 mM koncentrációtartományban (C^4D) (33.g ábra). A kalibrációs egyenes készítéséhez a csúcs alatti területeket (UV) és a zónalépcsők szélességeit (C^4D) használtuk fel. A 37. ábrán 0,2 μM koncentrációjú kromát-ion CITP csúcsa látható UV detektálással. Ez alapján a kimutatási határként 0,2 mM (C^4D) és 0,02 μM (UV) értékeket állapítottunk meg. (A LOD kiszámításához az alapvonal szórását (s) és a kalibrációs egyenes meredekségét (S) alkalmaztuk: $3s/S$.) Megállapítottuk, hogy C^4D módszer nem alkalmazható a meghatározandó komponensek detektálására csúcs módban CITP-nél. A LOD értékekből is látható, hogy a CITP körülmények a komponensek nagymértékű dúsításához vezettek. Mivel a nagyon keskeny zónák nem detektálhatók a viszonylag széles detektálási rés miatt, jobb LOD értéket kisebb dúsítás esetén kaphatunk (ami szélesebb mintazónákat eredményez). Ezt a vezető

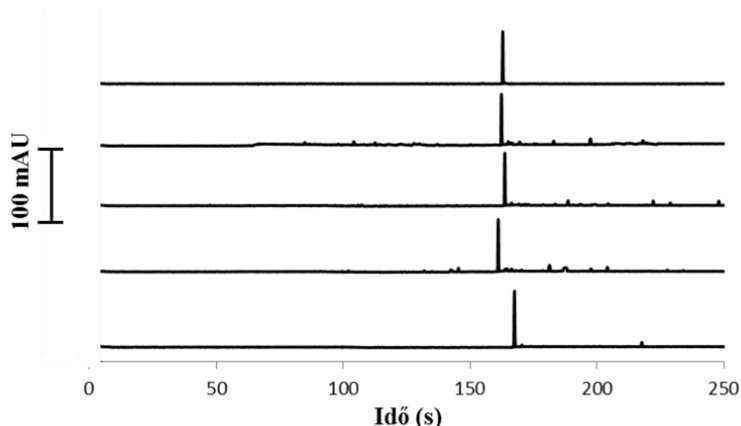
elektrolit koncentrációjának csökkentésével (100 mM-ról 10 mM-ra) lehet elérni, hiszen ez elméletileg majdnem 10-szer jobb értéket (0,03 mM) eredményez a kisebb dúsítás ellenére is. A kiváló LOD értékek a kromát-ionra UV detektálással érhetők el, abban az esetben, ha a két szomszédos zóna nem nyeli el az UV fényt.



37. ábra

0,2 μ M koncentrációjú kromát-ion CITP elemzése UV detektálással (a.). A kromát-ion csúcsa kisebb időskálán ábrázolva (b.). Egyéb körülmények a 33. ábrán.

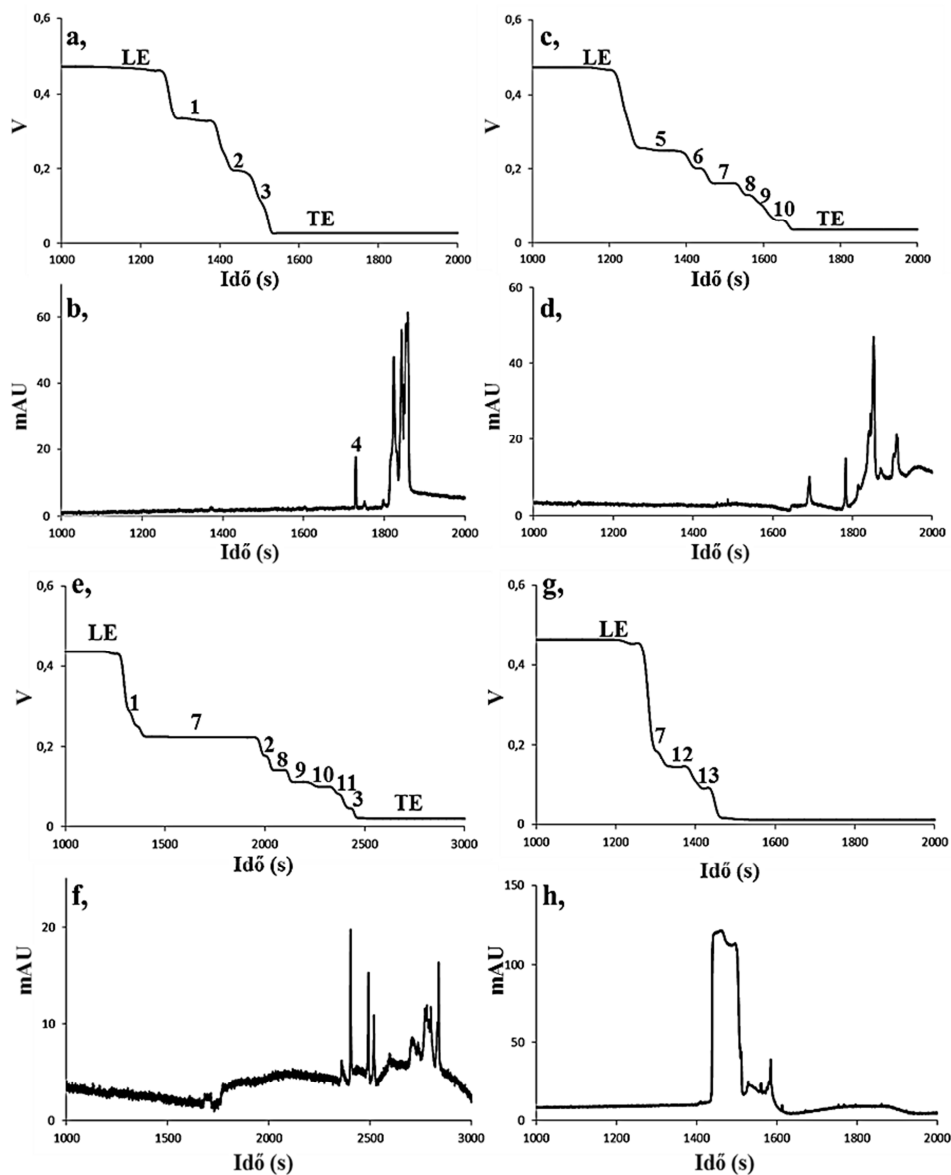
A CITP elemzések reprodukálhatóságát a sárga ételfesték egymás utáni injektálásával (N=5) és ITP elemzésével teszteltük (38. ábra). A migrációs időkre (1,49%) és a csúcsterületekre (1,98%) kapott RSD értékek hasonlóak a CE mérésekre jellemző értékekhez.



38. ábra

Sárga ételfesték (10 μM) CITP elemzése egymást követő injektálások után ($N=5$).
Körülmények: $U = -15$ kV, injektálás: 50 mbar x 100 s. További paraméterek ugyanazok, mint a 32. ábrán.

Munkánk során különféle valódi mintákat elemeztünk a CITP rendszerben C^4D és UV detektálással (39. ábra). A cserzett bőr vizes extraktumából csak a nagyobb mennyiségben jelenlévő összetevőket (szulfát-, acetát-ion, színező anyag) lehetett C^4D -vel vizsgálni, de UV detektálással a kis mennyiségben jelen lévő mérgező kromát-iont is sikerült detektálni 1,3 μM -os mennyiségben (a kromátot gyakran használják bőrcserzéshez). Vörösborban és meggylében számos szerves savat azonosítottunk milimólos koncentrációtartományban C^4D -vel. Szénsavas almalében szintetikus tartósítószerket (benzoát, szorbát) határoztunk meg mindkét detektálási módszerrel.



39. ábra

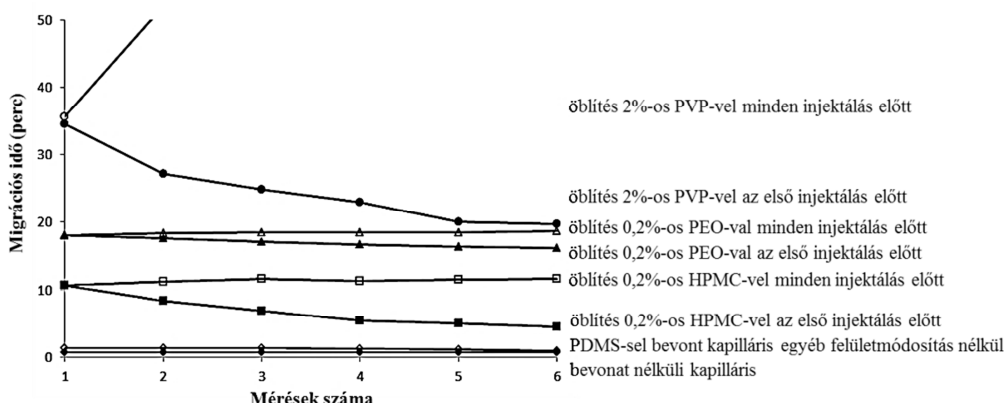
Különböző valódi minták CIPIT elemzése C^4D (a, c, e, g) és UV (b, d, f, h) detektálással ($\lambda=360$ nm). Minták: bőr extraktum (a, b), vörösbor (c, d), meggylé (e, f) és almale (g, h). Körülmények ugyanazok, mint a 33. ábrán. Zónalépcsők hozzárendelése: szulfát (1), acetát (2), azonosítatlan színező anyag (3), kromát (4), tartarát (5), malát (6), citrát (7), laktát (8), aszpartát (9), glükonát (10), aszkorbát (11), benzoát (12), szorbát (13).

4.3.3. ITP alkalmazása mikrocshipben

A kereskedelmi CE készülékben végrehajtott CIP elemzések (4.3.2. fejezet) tapasztalatainak felhasználásával megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy miként lehet PDMS mikrocshipben ITP elválasztást/dúsítást végrehajtani. Korábban utaltunk rá, hogy a PDMS csatornában jelentősen változhatnak a felületi töltések, ez pedig a mérések reprodukálhatóságának csökkenéséhez vezethet. Ezért a legtöbb esetben zónaelekforetikus elválasztásoknál is szükség lehet a felület módosítására (4.2.1. fejezet). ITP-nél annak érdekében, hogy kizárólag a zónaszűkítő hatás érvényesüljön, kulcsfontosságú, hogy ne legyen egyéb áramlás a rendszerben. Így az ITP elemzésnél a felületmódosítás fő célja nem az állandó töltésű felület biztosítása, hanem az EOF (lehetőleg) teljes mértékű kizárása.

A 4.3.1. fejezetben leírt, az EOF lecsökkentését dinamikus felületmódosítással megvalósító méréseinket további kísérletekkel egészítettük ki. Ahhoz, hogy a PDMS felületi töltésének és így az EOF-nek a változását is pontosan vizsgálni tudjuk, kísérleteinket kereskedelmi CE készülékben hajtottuk végre (a korábbi mérésekkel megegyező körülmények között). Ehhez olyan kvarckapillást használtunk, amelyet előzőleg PDMS réteggel vontunk be. A bevonathoz a PDMS monomerből és térhálósítóból (10:1 arány) 1%-os oldatot készítettünk hexánban. Ezzel öblítettük a kapillárist 10 percig, N_2 -t vezettünk át rajta (5 perc), és végül polimerizáció elősegítéséhez 65°C-on tartottuk 1 órán keresztül. Az EOF változását a különböző felületmódosítók alkalmazásakor itt is a semleges marker (benzil-alkohol) módszerrel követtük (nagyobb migrációs idő kisebb EOF-re utal) (40. ábra). A PDMS-sel bevont kapillárisban a bevonat nélkülihez hasonlítva kb. fele akkora, de még így is jelentős EOF volt tapasztalható. Ennek valószínűleg az az oka, hogy bár a PDMS hidrofób, a polimerizáció után maradhatnak vissza töltéssel rendelkező csoportok a csatorna felületén (például komponensek a térhálósító adalékból). Ha a kapilláris falát csak az első injektálás előtt öblítettük a felületmódosító anyagokkal (HPMC, PEO, PVP) jelentős mértékben csökkent az EOF (leginkább a PVP-nél, legkevésbé a HPMC-nél). Vagyis a PDMS jó adszorpciós készségének köszönhetően a nagy molekulatömegű módosítók jobban megkötődnek a felületén, mint ahogy azt a bevonat nélküli kvarckapillárisnál tapasztaltuk. A kötődés erősségét jelzi az is, hogy egymást követő méréseknél – ha nem alkalmaztunk újabb felületkezelést – kis mértékben mosódott le a HPMC és a PEO. PVP-nél ez a lemosódás nagyobb mértékű volt, hiszen hidrofil oldattal (vízes puffer) öblítettük a kapilláris falát, bár összességében még így is kisebb EOF-t tapasztaltunk, mint HPMC vagy PEO esetén. Ha minden injektálás előtt kondicionáltunk a módosítókkal (HPMC, PEO) a migrációs idők csekély változását tapasztaltuk, amely stabil felület kialakulására utalt. PVP-vel való mosás után a második injektálástól kezdve már nem tudtuk detektálni a markert 1 óra elteltével sem, vagyis az EOF

extrém mértékben csökkent a rendszerben (gyakorlatilag nullához közelített). Ezért a továbbiakban a mikrocsip ITP elemzésekhez PVP-vel történő felületmódosítást alkalmaztunk az injektálások előtt. Emellett az LE-ben is használtunk 0,5% PVP-t, mivel a mikroszkópos detektálási módszernél nem okozott gondot a PVP nagymértékű UV elnyelése.



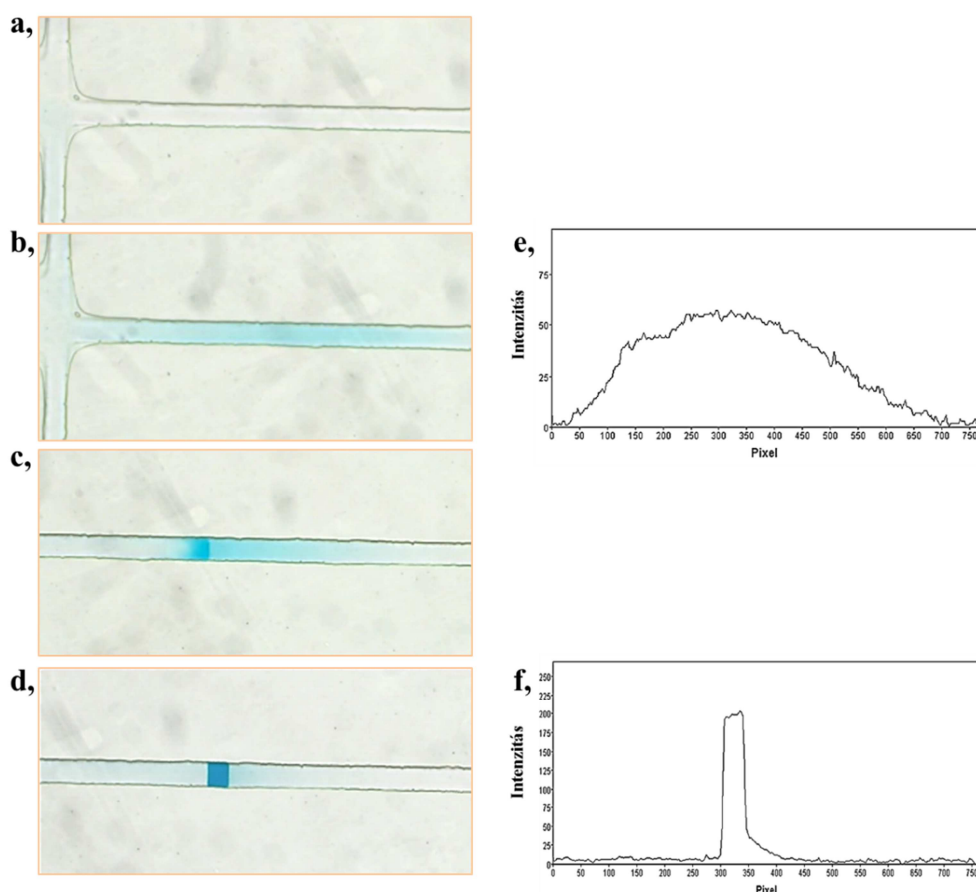
40. ábra

Az EOF csökkentés hatékonyságának vizsgálata a PDMS réteggel bevont kvarckapilláris felületének HPMC-vel, PEO-vel és PVP-vel történő dinamikus felületmódosítását követően.

A diagramon az EOF marker migrációs idejét a CZE elemzések számának függvényében ábrázoltuk. Kapilláris előkezelése: 1 bar nyomással, 10 percig a megfelelő adalékkal, illetve a BGE-vel 5 percig. PVP-vel való öblítésnél (minden injektálás előtt) a marker a mérés ideje alatt (60 perc) nem volt detektálható. A CZE elemzés körülményei ugyanazok, mint a 31. ábrán.

Az ITP elemzéshez szükséges nagyobb mintatérfogot (néhány nl) kialakításához is a folyadékáram-megosztásos injektálást (4.1.1. fejezet) alkalmaztunk. Ehhez kisebb csatornaátmérő-arányú (1:2 vagy 1:1) mintázattal készült mikrocsipet vagy nagyobb kezdeti térfogatot (V_0) alkalmaztunk. Munkánk során sikeresen hajtottuk végre egy, illetve többkomponensű ételfestékek ITP dúsítását PDMS mikrocsipben. A mintazónák kialakulását valós időben követtük és rögzítettük egy mikroszkópra szerelt kamera segítségével. Először a 2%-os PVP-oldattal, majd a LE-vel öblítettük (41.a ábra) a mikrocsip csatornáját. Az injektáláshoz a perisztaltikus pumpa csövébe (ami a TE-t tartalmazta) felszívtuk a szükséges mennyiségű mintát (V_0), majd bejuttattuk a kémiai festéket a csatornába (41.b ábra). Mivel anionos ITP-t hajtottunk végre (vagyis negatív töltésű komponenseket vizsgáltunk), ezért a (+) pólust az elválasztási csatorna végéhez helyeztük. Feszültség hatására az ITP zónaszűkítő lépése pillanatszerűen végbement (41.c ábra), és egy keskeny, éles határfelületű, az eredetihez képest nagyobb koncentrációjú (ez a színintenzitás-változásból szabad szemmel is látható) mintazóna alakult ki (41.d ábra), mely ezt követően változatlan

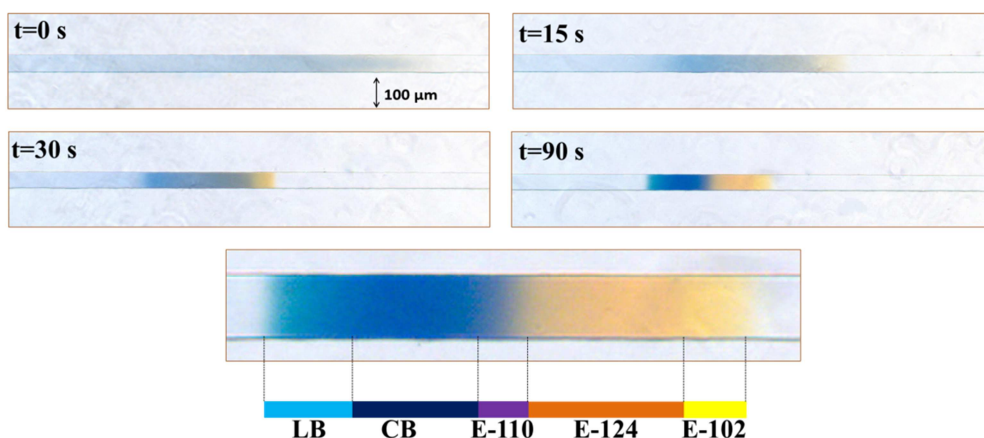
formában – diszperzió nélkül – haladt tovább a csatornában. A kezdeti (injektálás utáni) (41.e ábra) és végállapot (steady state) (41.f ábra) denzitometriás kiértékelésénél (CP ATLAS 2.0) is látható, hogy jelentős zónaszűkítő hatás következett be. Az injektált zóna kezdeti szélességéhez képest ~20-szor keskenyebb koncentrált zóna alakult ki. A dúsult zóna esetén ~3,5-szeres színintenzitás-növekedést tapasztaltunk, de figyelembe kell venni, hogy a színintenzitás és a koncentráció változása között nem feltétlenül lineáris az összefüggés a vizsgált koncentráció-tartományban.



41. ábra

Kék festék ITP dúsítása PDMS mikrocipben. A mintabevitel előtt a csatornát LE-vel töltöttük fel (a.), majd folyadékáram-megosztásos módszerrel injektáltuk a mintát (b.). Feszültség hatására ITP történt (c.), éles határfelületű, koncentrált mintazóna alakult ki a steady-state állapotban (d.). Az ITP előtti (e.) és utáni (f.) állapot mikroszkópos fényképének denzitometriás kiértékelésével kapott jelei. Körülmények: LE: 100 mM Cl⁻/His (pH 6,0), TE: 100 mM MES/His (pH 6,0), L_{tot} = 10 cm, U = 500 V, injektálás: folyadékáram-megosztásos (V_o = 3 μ l), csatornaszélesség: 100 μ m, minta: Brilliant Blue FCF (1 mM).

Többkomponensű festékkeveréket is vizsgáltunk ITP-vel (42. ábra). Az injektálás után a feszültség alkalmazását követően megfigyelhető, hogy először a LE és a TE frontján dúsultak a komponensek (15 s), majd ezt követően a mintazóna közepén is kialakultak a zónahatárok (30 s, 90 s). A színes dúsított zónák még jobban elkülöníthetők (detektálhatók) lennének egymástól, ha megfelelő mozgékonyságú, szintelen komponenseket, ún. diszkrét spacereket használnánk a mintaoldatban [142].



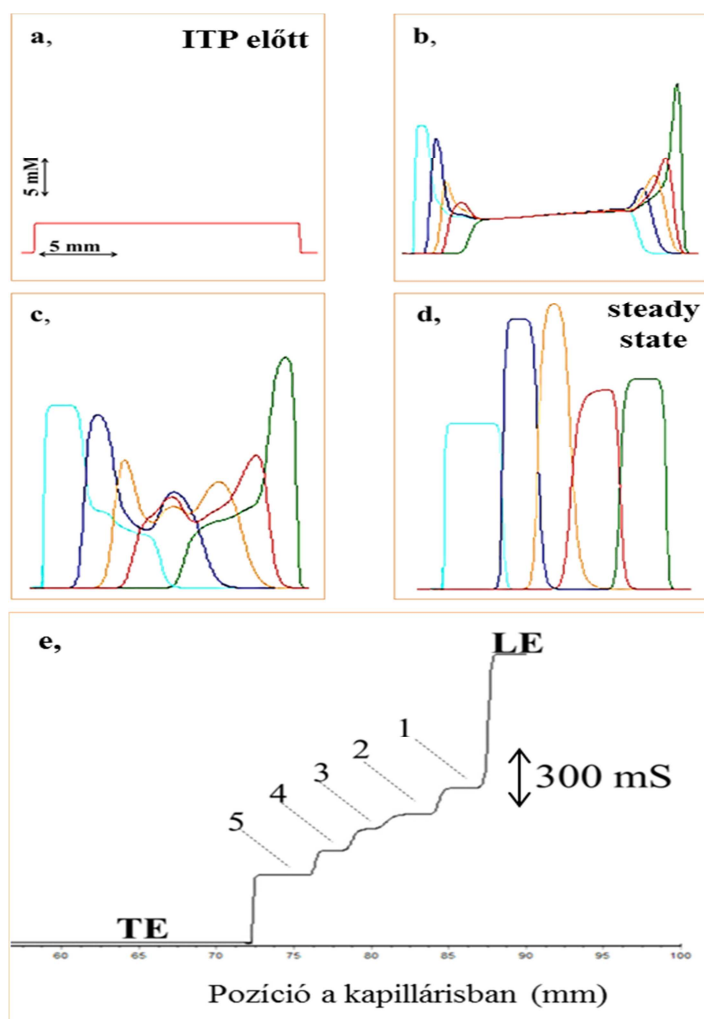
42. ábra

Ötkomponensű szulfonált azofestékek keverékének anionos ITP dúsítása és elválasztása

PDMS mikroszipben. A feszültség hatására kialakuló mintazónák követése inverz mikroszkóppal, különböző időpontokban (0, 15, 30 és 90 s) rögzítve. Körülmények: LE: 100 mM Cl⁻/His (pH= 6,0), TE: 100 mM MES/His (pH= 6,0), U= 500 V, minta: E-102 tartrazin, E-110 Sunset Yellow, E-124 New Coccine, Coomassie Brilliant Blue (CB) és Light Green SF Yellowish (LG), c= 0,5 mmol/l minden komponensre. Az alsó képen az ITP mintazónák kinagyított képe látható.

A festékkeverék vizsgálatával párhuzamosan az ITP számítógépes szimulációját is elvégeztük a szabad hozzáférésű Simul 5 Complex programmal [143] (43. ábra). A szimulációhoz szükséges paramétereket (effektív mozgékonyságok) CE készülékbeli CZE mérésekkel határoztuk meg. Megfigyelhető, hogy a szimuláció esetén a zónák dúsulása a kísérletes munka során tapasztaltakhoz hasonló sorrendben történt (43.b-c ábra). A steady state állapot elérése után a kialakult mintazónák változatlanul haladtak a detektor felé. A szoftverrel előállított, az öt komponensre kapott izotachofrogram a 43.e ábrán látható. A Simul 5 Complex program használatának előnye, hogy valós idejű szimulációt tesz lehetővé, így a zónák kialakulása is nyomon követhető, nemcsak a végső állapot. Alkalmazásával pedig lehetőség nyílt az ITP körülmények optimalizálására vagy akár különféle összetételű pufferrendszerek vizsgálatára. Korlátozó tényező, hogy a program

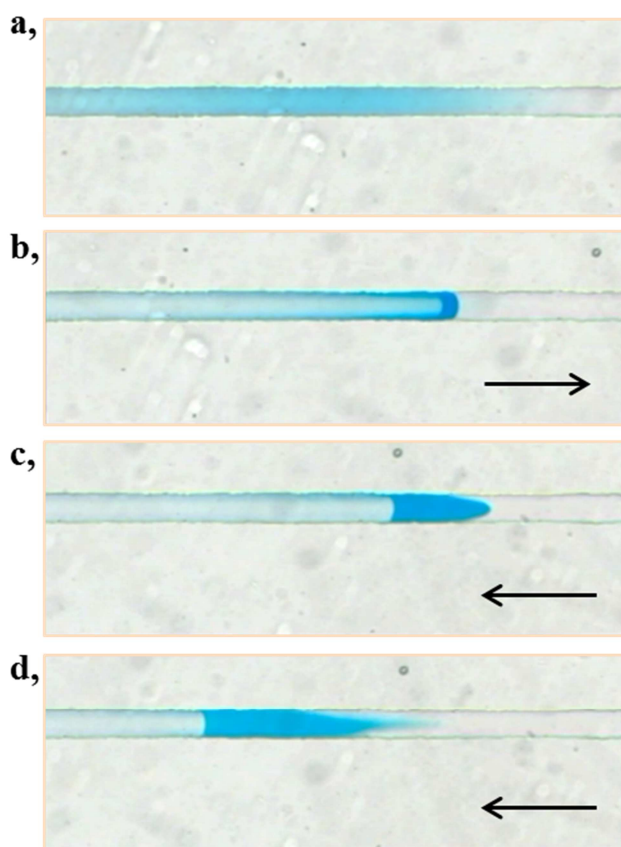
adatbázisában elsősorban kisebb molekulájú anyagok szerepelnek, így sok esetben szükség van a futtatáshoz szükséges paraméterek (mozgékonyosság, pK érték) előzetes becslésére, meghatározására.



43. ábra

Azofestékek ITP elválasztásának szimulációs vizsgálata Simul 5 Complex szoftverrel. Szimuláció kezdeti paraméterei (a.): mikrocsatorna teljes hossza: 100 mm, effektív hossz: 70 mm, ID: 100 μm , injektált mintazóna hossza: 15 mm, áramerősség az ITP során: 10 μA . Az éles, egymás melletti minta zónák kialakulásának lépései (b-c), illetve a végső (steady-state) állapot (d). Az öt szulfonált azofesték izotachoferogramja (e), (mindegyik komponens koncentrációja 5 mmol/l volt). Mintalépcsők hozzárendelése: E-102 (1), E-124 (2), E-110 (3), Coomassie Blue (4), Light Green (5), vezetőelektrolit (LE), záró elektrolit (TE). ITP körülmények ugyanazok, mint a 42. ábrán.

A kék ételfesték ITP dúsítását úgy is végrehajtottuk, hogy az injektálás előtt nem alkalmaztunk PVP-vel történő felületmódosítást, valamint a LE sem tartalmazott módosító adalékot. Az injektálás után (44.a ábra) a rendszerre feszültséget kapcsolva a kék komponens jelentős mértékű fal adszorpciója, illetve a dúsuló zóna erős torzulása volt megfigyelhető (44.b ábra). Egy rövid idő múlva az anód (+) felé áramló mintazóna lelassult és ellenkező (az EOF mozgásának megfelelő) irányba kezdett vándorolni egyre fokozódó diszperzió mellett (44.c-d ábra), amely az ITP zóna teljes szétesését eredményezte.



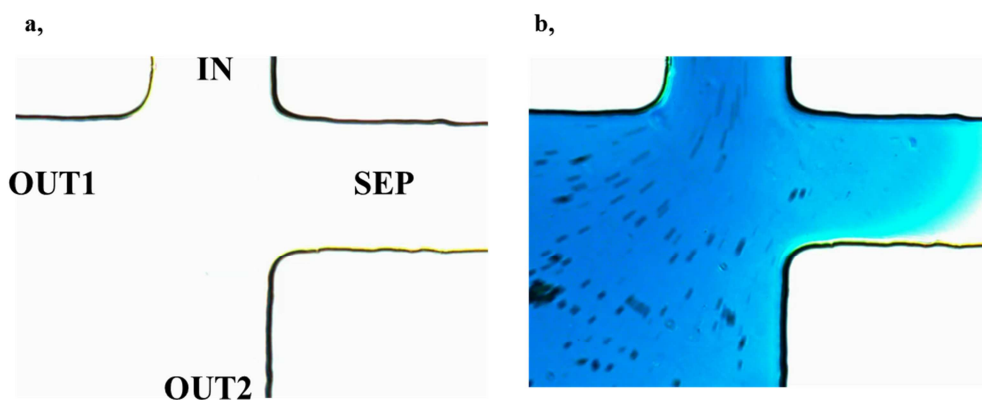
44. ábra

Kék festék ITP vizsgálata a PDMS csatorna felületének előzetes módosítása nélkül. A folyadékáram-megosztásos injektálás után (a,) feszültség hatására megkezdődött az ITP dúsítás (b,), majd a mintazóna mozgásának iránya (fekete nyíllal jelölve) megváltozott (c,) és jelentős diszperzió volt megfigyelhető (d.). Körülmények ugyanolyanok, mint 42. ábrán.

Kísérleteink látványosan demonstrálták, hogy az EOF jelenléte drasztikus mértékben befolyásolja az ITP végrehajthatóságát és a dúsító effektust, éppen ezért

felületmódosító alkalmazása az EOF kizárására és a komponensek fali adszorpciójának csökkentésére minden esetben szükséges.

Az ITP elemzéseket nemcsak folyadékmintákkal végeztük, hanem kiterjesztettük alakos elemek (*Microcystis aeruginosa* baktériumsejtek, 5-10 μm) vizsgálatára is. Megfigyeltük, hogy a folyadékáram-megosztásos injektálás során a sejtek mozgása térbeli kiterjedésük miatt lényegesen eltért a 4.1.1. fejezetben leírt folyadékáramlási-profiltól. A korábbiakban használt 1:4 csatornaátmérő-arányú mikrocsipbe a sejtek és a kék festék keverékét injektáltuk be (45.a-b ábra). Míg a kék festék a folyadékáram-megosztásos injektálás elvének megfelelően bekerült az elválasztási csatornába, addig a sejtek nem jutottak be, hanem a csatornában lévő legnagyobb áramlási sebességnél, egy jellegzetes görbült ív mentén (12. ábra COMSOL szimulációk áramlási profilja) a széles kivezető csatorna (OUT1) felé áramlottak. A sejtek mikrofluidikai rendszerekben történő áramlásának bővebb értelmezéséhez további (COMSOL) szimulációs vizsgálatokra lenne szükség.

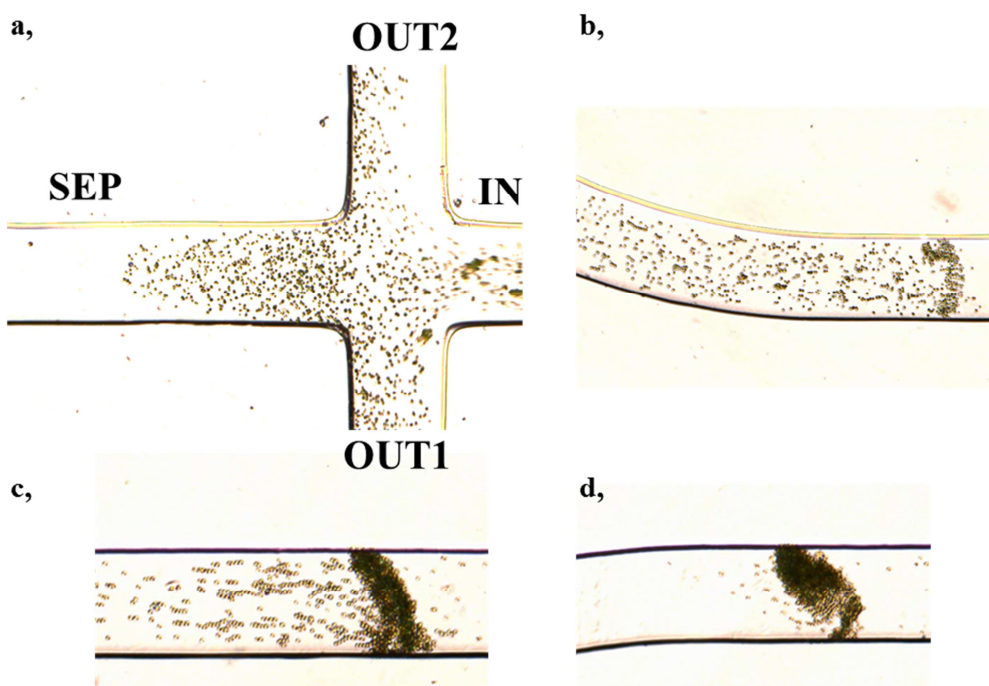


45. ábra

Baktériumsejtek folyadékáram-megosztásos injektálása során jellemző áramlási viszonyok vizsgálata. A mintabevitelhez alkalmazott 1:4 szélességarányú csatornamintázat (a.) fényképe. Az injektálás az IN port felől történt, melynek során a kék festék bejutott az elválasztási csatornába (SEP), míg a baktériumsejtek nem (b.). Körülmények: áramlási sebesség: 5 $\mu\text{l}/\text{perc}$, minta: kék festék és baktériumsejtek keveréke. Egyéb paraméterek ugyanolyanok, mint a 42. ábrán.

A továbbiakban a sejtek injektálásához 1:1 csatornaátmérő-arányú mintázatot használtunk (46.a ábra), amellyel a nagyobb átmérőarányoknál jelentkező jelentős áramlási sebességi különbségeket csökkenteni lehetett. Így a sejtek ITP elemzéséhez egy széles mintazónát injektáltunk, majd pozitív feszültséget kapcsoltunk az elválasztási csatorna végére. Az ITP dúsulás a TE frontján kezdődött meg (46.b ábra), fokozatosan „összegyűjtve” a beinjektált sejteket (46.c ábra). A kialakult

koncentrált zóna szélessége ~200-szor kisebb volt mint az injektált minta szélessége (46.d ábra).



46. ábra

A *Microcystis aeruginosa* baktériumsejtek ITP vizsgálatához használt 1:1 csatornaátmérő-arányú PDMS mikrocship (a.). Feszültség hatására történő ITP zónaszűkítő effektus lépései baktériumsejteknél (b-d). Körülmények ugyanazok, mint a 42. ábránál.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az ITP körülmények alkalmazásával a PDMS mikrocshipben az azonos fajtájú és korú sejtek a bejuttatott mennyiségtől függően keskenyebb vagy szélesebb koncentrált zónába tömöríthetők, illetve elhanyagolható zónaszélesedés mellett akár nagyobb csatornahosszon is szállíthatók. Megítélésünk szerint többkomponensű (különböző fajtájú, korú) baktériumokat, sejteket tartalmazó minta esetén az ITP alkalmazásával lehetőség nyílhat különféle méretű/típusú sejtek/baktériumok dúsítására és szétválasztására.

5. Összefoglalás

Az analitikai mikrofluidika töretlen fejlődésének köszönhetően újabb és újabb lab-on-a-chip eszközök jelennek meg. A mikrofluidikai rendszerek azért lehetnek versenyképesek más hagyományos (nagyűszeres) analitikai módszerekkel szemben, mert a lab-on-a-chipek üzemeltetése, előállítási költsége, minta igénye rendkívül kedvező. Kicsi méretüknek köszönhetően hordozhatóak és alkalmazásukkal lehetőség nyílik gyors, egymást követő vagy pedig sok, egymással párhuzamosan végrehajtható elemzésre.

Bár elsősorban alapkutatás jellegű vizsgálatokat végeztünk, munkánk során törekedtünk viszonylag egyszerű elven alapuló módszerek megvalósítására. Kidolgoztunk egy olyan mintabeviteli módszert, a folyadékáram-megosztásos injektálást, amely jól alkalmazható nagyon kicsi térfogatú minták reprodukálható injektálására. A módszer a Hagen-Poiseuille törvényen alapul, mely szerint a csatornák kereszteződésén keresztül az elválasztási csatornába jutott minta térfogatát nagymértékben befolyásolja a csatornaátmérők aránya, valamint fordított arányban függ az elválasztási csatorna hosszától, de független az áramlás sebességétől. Ha egy pumpa segítségével kb. 1 μl -nyi (V_0) mintát juttatunk be a mikrocsipbe, ennek a mennyiségben csak töredéke (kevesebb mint 2500-ad része) áramlik az elválasztási csatorna felé, amely kellően kicsi térfogatot ($\sim 0,4$ nl) biztosít mikrocsipben történő zónaelektroforetikus elválasztásokhoz. Ezért olyan mikrofluidikai csipeket terveztünk, ahol a mintázat kereszteződésében az elválasztási csatorna és az egyik szélesebb kivezető csatorna átmérőjének aránya 1:4 volt. A kidolgozott injektálás reprodukálhatóságát kék ételfesték egymás utáni injektálásával ($N=6$) vizsgáltuk, a kialakult kicsi mintatérfogatok csúcsmagasságaira és csúcsterületeire 4,8%, illetve 3,7% RSD relatív szórás értékeket állapítottunk meg. Ezek az értékek hasonlóak a mikrofluidikai csipekhez használt más mintabeviteli módszerekkel elért eredményekhez. A folyadékáram-megosztásos injektálással lehetőség nyílt a mikrocsipek esetén szinte kizárólagosan alkalmazott elektrokinetikus injektálásnál jelentkező hibák kizárására, mivel a mintabevitel során a töltéssel rendelkező komponensek bejutását nem befolyásolta az alkalmazott feszültség (és így a minta összetétele sem változott meg az injektálás során). A kidolgozott injektálási módszerhez nem szükséges semmiféle speciális eszköz, így könnyen átültethető más mikrofluidikai rendszerekbe is.

A folyadékáram-megosztásos injektáláshoz tervezett mikrocsipek kereszteződésében végbemenő áramlási viszonyok jellemzéséhez COMSOL szimulációs szoftvert alkalmaztunk. A különböző csatornaszélesség-arányú (1:4, 1:6 és 1:10 megosztási arány) mintázatokban kapott sebességeloszlás-diagramokból megállapítottuk, hogy 1:4 aránynál a beinjektált kezdeti térfogat ($V_0=1$ μl) 0,102%-a, 1:6 aránynál 0,053%-a és 1:10 aránynál pedig 0,037%-a áramlott az elválasztási

csatorna felé. Így a szeperációs csatornába a szélességarányoktól függően 0,37-1,02 nl (1:10→1:4) térfogatok jutottak be. Rámutattunk arra is, hogy a Hagen-Poiseuille törvény alapján számolt és a szimulációkból kapott injektált térfogatok különböző csatornaátmérő-arányok esetén nagyságrendileg hasonló eredményekhez vezettek, de az injektált térfogatokban hozzávetőlegesen ötszörös különbség volt tapasztalható azonos V_0 értékek esetén is.

A folyadékáram-megosztásos injektálást követően kialakult kicsi mintatérfogatot PDMS mikrocsipben történő elektroforetikus elválasztások végrehajtásához használtuk fel. Mivel az eredetileg hidrofób tulajdonságú PDMS-ből készült csatornarendszerekben jelentős mértékű katódirányú elektroosmotikus áramlás lép fel, ezért felületmódosító alkalmazását javasoltuk. A reprodukálható CZE elválasztásokhoz különféle felületmódosító anyagokkal (anionos, kationos és semleges) kezeltük az injektálás előtt a csatorna falát a stabil, egységes felület kialakítása érdekében. Miután a csatorna falát 5 percig semleges felületmódosítóval (0,1%-os metil-cellulóz) öblítettük, a két negatív töltésű komponens alapvonal elválasztása kevesebb mint 15 s alatt, 1 cm úthosszon megvalósítható volt.

Olyan mikrocsip alapú miniatürizált kapilláris elektroforézis rendszert (μ CE) fejlesztettünk ki, amelynél a mintabevitel egy PDMS csipbe történt a folyadékáram-megosztásos injektálással, a komponensek elektroforetikus elválasztását pedig egy, a mikrocsip portjaiba csatlakozó kvarckapillárisban hajtottuk végre. Az összeállított rendszerben a PDMS mikrocsipnek kettős funkciója volt, mivel nemcsak az injektáláshoz szükséges mintázatot tartalmazta, hanem a csatornarendszer két kivezető portjába illesztett 20 cm hosszúságú kvarckapillárist is megfelelően rögzítette. A kapilláris a PDMS rugalmasságának köszönhetően szorosan, ezáltal szivárgásmentesen integrálható volt a portokba, elhanyagolható holtterefogat mellett. A detektáláshoz miniatürizált száloptikás UV spektrofotométert használtunk, vagyis – hasonlóan a kereskedelmi CE készülékekhez – közvetlenül a kapillárison keresztül detektáltunk. A hat (kémiaailag viszonylag hasonló szerkezetű) kefalosporin alapvonal elválasztása kevesebb mint 8,5 percet vett igénybe 18 cm-es elválasztási távolságon. A μ CE rendszerben elért elválasztási hatékonyság ($N=5000-15000$) hasonló nagyságrendben volt a hagyományos CE készülékben mért értékekkel. A μ CE elválasztások reprodukálhatóságát két kefalosporin egymás utáni, többszöri elválasztásával teszteltük, a csúcsmagasságokra és a csúcsterületekre számított RSD értékek 1,89-1,96%, illetve 3,34-3,58% között alakultak. A lekicsinyített elválasztórendszernek és akkumulátorról használható nagyfeszültségű táp- és detektoregységnek köszönhetően a μ CE rendszer hordozhatóvá vált.

A C^4D platformhoz olyan PDMS mikrocsipeket terveztünk és készítettünk, amelynél egy vékony PDMS-t használtunk szigetelő réteggként a mikrocsip csatornája és a detektor érzékelő elektródjai között. Megvizsgáltuk, hogy a különböző vastagságú PDMS-ből, illetve üvegből készült aljak hogyan befolyásolják

a kapott válaszjeleket. Megállapítottuk, hogy $\sim 100\ \mu\text{m}$ vastagságú PDMS esetén megfelelő érzékenységgű detektálás érhető el. A rendszer egyik előnye az eldobható jelleg, mivel a mikrocsip esetleges eltörmődése esetén könnyen eltávolítható a platformról, egy új mikrocsip pedig rugalmasságának köszönhetően egyszerűen az érzékelő elektródokra simítható. Emellett a mikrocsip csatornája tetszőlegesen pozícionálható az elektródokra, így az elválasztási hossz szabad változtatására is lehetőség nyílik. A PDMS mikrocsip- C^4D rendszert hétkomponensű, szerves és szervetlen anionokat tartalmazó modelloldat elválasztásával teszteltük. Megállapítottuk, hogy ebben a csatornarendszerben $0,5\ \mu\text{l}$ minta injektálásakor (V_0) megfelelően kicsi mintatérfogat jut be az elválasztási csatornába a folyadékarám-megosztásos injektálást követően és így lehetőség nyílt a hét komponens alapvonal elválasztására $6,5\ \text{cm}$ szeparációs távolságon kevesebb mint $3,5$ perc alatt, 4000 - 6000 (63000 - $93000/\text{m}$) elméleti tányérszám elérése mellett. A vizsgált anionokra számolt kimutatási határ (LOD) értékek a C^4D szenzorfejekre $0,056$ - $1,04\ \mu\text{mol/l}$ ($0,002$ - $0,037\ \mu\text{g/ml}$), a C^4D platformra pedig $3,6$ - $14,7\ \mu\text{mol/l}$ ($0,13$ - $2,26\ \mu\text{g/ml}$) között alakultak, amelyek hasonló nagyságrendben vannak más mikrofluidikai rendszerekkel elért értékekkel. A PDMS mikrocsip- C^4D rendszert sikeresen alkalmaztuk anionok valódi mintákban (csap- és ásványvíz, fogkrém, nyál) történő meghatározásához is. Továbbá összehasonlítottuk a kereskedelmi forgalomban kapható kapilláris C^4D és mikrofluidikai C^4D platform analitikai teljesítőképességét. C^4D szenzorfejjel hozzávetőlegesen $2,5$ -szer nagyobb jelet, valamint kevésbé zajos alapvonalat kaptunk a C^4D platformmal detektált jelekhez viszonyítva.

Kapilláris izotachoforetikus (CITP) mintadúsítást és elválasztást hajtottunk végre kereskedelmi CE készülékben. Részletesen vizsgáltuk a kvarckapillárisban feszültség hatására kialakuló elektroosmotikus áramlás (EOF) csökkentésének lehetőségét, úgy hogy, az injektálás előtt a kapilláris falát nagy molekulatömegű polimerek oldatával öblítettük. Az EOF módosulását egy töltés nélküli anyag (benzil-alkohol) migrációs idejének változásával követtük. Már 10 perc 2% -os PVP-oldattal való öblítés elégnék bizonyult az EOF minimálisra csökkentéséhez, ez idő alatt a kapilláris falán egy stabil, dinamikus réteg alakult ki. Ezért a további kapillárisban végrehajtott CITP elemzéseknel a PVP-oldattal történő mosást használtuk, de a mérés során a puffer nem tartalmazta a polimert. Részletesen tanulmányoztuk a C^4D szenzorfej és az UV detektálás alkalmazhatóságát kereskedelmi CE készülékben végrehajtott CITP elemzésekhez. Megállapítottuk, hogy a C^4D szenzorfej csak korlátozott mértékben használható az izotachoforetikus dúsítás során kapott keskeny mintazónák megfelelő detektálásához, melynek fő oka a detektor érzékelő elektródjai közötti viszonylag nagy távolság (1 - $2\ \text{mm}$). A felbontás javítása, szélesebb mintazónák elérése érdekében $120\ \text{cm}$ hosszú kapillárist alkalmaztunk, amelynek 75% -át mintával (kromát-ion) töltöttük fel az CITP elemzés előtt. A különböző koncentrációjú minták elemzésével kapott

kalibrációs diagramok az UV detektálásnál 0,1 μM -5 mM, a C^4D -nél a 0,4-5 mM koncentrációtartományban mutattak lineáris függést. A kromát-ionra meghatározott LOD értékek 0,02 μM -nak (UV) és 0,2 mM-nak (C^4D) adódtak. CITP mérések reprodukálhatóságának vizsgálatakor (N=5) a migrációs időkre 1,49%, a csúcsterületekre 1,98% RSD értékeket kaptunk. Megállapítottuk, hogy a CITP spektrofotometriás detektálással UV aktív komponens esetén (ha a két szomszédos zóna komponensei nem nyelik el az UV fényt) előnyösen használható nagyon kis (<1 μM) mennyiségben jelen lévő anyagok meghatározására. A CITP módszerrel sikeresen elemeztünk különféle valódi mintákat is (pl. kromát-iont cserzett bőr vizes extraktumából, szerves savakat, tartósítószeret bor és gyümölcsle mintákból).

A folyadékarám-megosztásos injektálást sikeresen használtuk a mikrocip ITP-hez szükséges nagyobb mintatérfogot (néhány nl) kialakításához kisebb csatornaátmérő-arány vagy nagyobb kezdeti térfogat (V_0) alkalmazásával. Elsőként hajtottunk végre egy, illetve többkomponensű festékek keverékének ITP dúsítását PDMS mikrocipben. Az éles határvonalú, keskeny mintazónák kialakulását valós időben követtük és rögzítettük egy kamera segítségével. Az ITP zónák kialakulását Simul 5 Complex programmal is vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a kísérletes eredmények összhangban vannak a kapott szimulációkkal. Az ITP elemzéseket nemcsak folyadékmintákkal végeztük, hanem kiterjesztettük alakos elemek (baktériumsejtek) vizsgálatára is. Megfigyeltük, hogy a folyadékarám-megosztásos injektálás során a sejtek mozgása térbeli kiterjedésük miatt lényegesen eltért a korábban bemutatott folyadékaramlási-profilról. Ezért a sejtek injektálásához 1:1 csatornaátmérő-arányú mintázatot használtunk. Az ITP körülmények alkalmazásával a sejtek (a bejuttatott mennyiségtől függően keskenyebb vagy szélesebb) koncentrált zónába tömöríthetők és elhanyagolható zónaszélesedés mellett akár nagyobb csatornahosszon is szállíthatók voltak.

A jövőben a mikrofluidikai csipek analitikai kémiai felhasználásának további bővülése jósolható, amelyhez elsősorban érzékenyebb detektálási módszerekre lesz szükség. Ez a már meglévő detektorok továbbfejlesztésével, valamint új típusú miniatürizált detektorok létrehozásával, illetve hatékony mintadúsítási technikák (izotachoforézis) alkalmazásával érhető el.

6. Summary

Owing to continuous development of analytical microfluidics, newer and newer lab-on-a-chip devices have been appeared. The microfluidic systems can be competitive with other conventional (instrumental) analytical methods due to low cost of its operation, production and the small sample request. Lab-on-a-chip devices are portable owing to small sizes and since their use is rapid, consecutive or (many) parallel analyses can be performed.

Although we primarily carried out basic research studies, we tried to implement methods based on a relatively simple principle. Sample introduction method has been developed, called split-flow, for injecting small volume of sample in reproducible way, based on the Hagen-Poiseuille law. According to Hagen-Poiseuille law the volume of a homogeneous fluid passing through a capillary tube into the separation channel is directly proportional to the fourth power of internal diameter of channel and inversely proportional to length of channel, but independent from the flow rate. If 1 μL volume of sample was pumped into the chip, only a fraction of initial volume (less than 1/2500 part) was flown toward the separation channel that provided small sample volume (~ 0.4 nL) for zone electrophoretic separation in microchip. Microchip with channel pattern was designed in which crossing of channels consist of a separation channel and a wider channel with ratio of their diameter 1:4. Reproducibility of the developed injection method was tested by consecutive injection of blue dye ($N=6$) and the achieved precisions were 4.8 RSD% and 3.7 RSD% for the peak heights and peak areas, respectively. These values were similar to those obtained with other injection technique used for microchips. In this injection method only pressure was applied, therefore the known quantitation errors (biases) of electrokinetic injection did not occur, because the voltage does not influence the moving of charged analytes (and thus the composition of the sample was not changed). The developed injection method does not require any special equipment. Thus, consequently it can be easily transposed to other microfluidic systems.

To investigate flow conditions occurring at the crossing channels in the proposed microchip designed for split-flow injection, COMSOL simulation software was used. From the velocity distribution diagram obtained at different channel width ratios (1:4, 1:6 and 1:10 split ratios) we found that 0.102% (at the ratio of 1:4), 0.053% (at the ratio of 1:6) or 0.037% (at the ratio of 1:10) of initial volume of the injected sample ($V_0 = 1$ μl) was introduced into the separation channel, respectively. Thus, depending on the ratios of channel widths volumes of sample in the range of 0.37 to 1.02 nl (1:10 $\rightarrow$ 1:4 split ratios) were injected. Injected volumes of samples at different ratios of channel widths calculated from the Hagen-Poiseuille law and obtained from the simulation were compared resulting values in similar magnitude,

but despite the same initial volumes of sample, five-fold differences were observed in the injected volumes.

After the split-flow injection, the formed small sample plug was used for zone electrophoretic separation in PDMS microchip. In the originally hydrophobic PDMS channel system, significant EOF flowing toward the cathode was present, the use of surface modification was proposed. For the reproducible CZE separations, different surface modifying agents (anionic, cationic and neutral) was used before the injection in order to create stable, homogeneous channel wall. After the channel wall was rinsed with neutral (methyl cellulose of 0.1%) modifier for 5 min, baseline separation of the two negatively charged components was achieved less than 15 s, at 1 cm effective length.

A microchip-based miniaturized capillary electrophoresis system (μ CE) has been developed, wherein the sample introduction was executed in a PDMS chip using split-flow injection method and the separation of compounds was performed in a fused silica capillary attached to the ports of the PDMS chip. In the assembled system, PDMS microchip had dual function, it did not only include channel pattern for the injection, but also held the 20 cm length of CE separation capillary. The flexible PDMS used as material for microchip preparation allowed the formation of leakage-free connection with a relatively low dead volume. The optical fibres of the photometer were used for detection, like in the commercial CE apparatus, directly detected through the capillary. The baseline separation of six cephalosporins, having relatively similar chemical structure, was completed in less than 8.5 minutes, at 18 cm separation length. In the μ CE system the achieved separation efficiency (number of theoretical plates ranged from 5 000 to 15 000) was in similar magnitude to be measured by traditional CE apparatus. The reproducibility of the μ CE system was tested by consecutive injection and repeated separation of mixture of two cephalosporins. Peak heights and peak areas were ranged from 1.89 to 1.96% and 3.34 to 3.58%, respectively. Owing to its reduced size, battery operated high-voltage power supply and detector device, μ CE system can be considered portable.

To accomplish the contactless conductivity (C^4D) platform detection, a very thin layer has to be used for making the bottom of the PDMS microchip acting as an insulating layer between the sensing electrodes and the liquid inside the microfluidic channel. We examined how different thickness of PDMS and glass layers affect the response signals. ~ 100 μ m thick PDMS layer was found to be optimal for sensitive detection. One advantage of the proposed system is disposability, because the PDMS chip can be removed from the platform in case of clogging and due to its flexibility a new microchip can be smoothed simply onto the sensing electrodes. The other advantage of the use of C^4D with external electrodes was the possibility to freely variate the separation length in the microchip. PDMS microchip- C^4D was tested by separation a seven-component containing mixture as a model solution, including

inorganic or organic anions. Using 0.5 μL sample as initial volume, small sample plug was got into the separation channel. The length of 6.5 cm was long enough for baseline separation of the seven components less than 3.5 min obtaining the numbers of theoretical plates in the range of 4 000-6 000 (63 000/m - 93 000/m). The LODs of the studied inorganic anions were in the range of 0.056-1.04 μM and 3.66-14.7 μM for the C^4D headstage and for the C^4D platform, respectively. These LODs were in similar magnitude compared to values obtained in other microfluidic system. The proposed microchip- C^4D system was successfully applied to analyze different types of real samples (tap and mineral water, toothpaste, saliva). Arranging the two types of C^4D detectors in line, a dual detection could be performed to directly compare the performances of the two C^4D detection systems using the same electrophoretic run. Using the C^4D headstage 2.5 times higher signal heights and a smoother baseline was recorded in comparison with the C^4D platform.

Capillary isotachophoretic (CITP) sample preconcentration and separation were performed in the conventional CE instrument. We have studied the possibility of reducing electroosmotic flow (EOF) induced by applying voltage in the fused silica capillary. Thus, before the injection the capillary wall was rinsed with solution of polymers having high molecular weight. The alteration of EOF was studied by following the changes of migration time of neutral marker (benzyl alcohol). Rinsing with PVP of 2% for 10 min was enough to minimize the EOF, a stable, dynamic layer was formed on the capillary wall. For the further CITP experiments the use of PVP-coated silica capillary was concluded to be optimal and therefore flushing the capillary with PVP solution before each sample injection was applied, but the buffer solutions did not contain PVP. Detailed studies were conducted about the applicability of the C^4D headstage and UV detection for CITP analysis carried out in commercial CE instrument. It was found that the use of C^4D headstage for detecting narrow sample zones obtained during isotachopheresis was very limited due to the relatively large distance between electrodes of the detector (1-2 mm). To improve the resolution and reach wider zones 75% of the 120 cm length of capillary was filled with the sample (chromate ion) prior to the CITP analysis. Calibration diagram for chromate was shown good linearity in the concentration range of 0.1 μM -5 mM for UV and 0.4 mM-5 mM for C^4D . The LODs values for chromate were 0.02 μM and 0.2 mM obtained with UV and C^4D detection, respectively. Repeatability of CITP analysis was tested, the obtained RSD values were 1.49% for migration times and 1.98% for peak areas (N=5). We found that CITP with spectrophotometric detection in case of UV active component (if adjacent (neighbouring) zones were non UV-absorbing components) can be advantageously applied for determining trace chromophore analytes (<1 μM). With CITP, various real samples were successfully analyzed (e.g. chromate in aqueous extract of tanned leather, organic acids in wine samples and preservatives in juice).

Split-flow injection was successfully used to inject larger sample volume (a few nL) required for microchip ITP by using smaller ratio of channel diameter or higher initial volume (V_0). ITP analyses of one and multi-component mixtures of dyes were performed in PDMS microchip. The sharp, narrow zones of the sample were monitored and recorded using a camera in real time. The formation of ITP zones was examined and the experimental results were consistent with the simulations obtained by Simul 5 complex software. Not only ITP analyzes of liquid samples were carried out, but also extended investigations were conducted with shaped components (bacterial cells). During the split-flow injection moving of cells was significantly different from the previously described flow profile of liquids. Therefore, channel pattern with 1:1 ratio of diameter was used for injection of the cells. Using ITP conditions, cells were concentrated into the compressed zone (narrower or wider depending on the injected volume) and this zone can be transported without band dispersion even at greater channel distance.

In the future, further expansion of the use of microfluidic chips can be predicted in analytical chemistry, for which more sensitive detection methods will be needed. This can be achieved by improving the existing detectors as well as introducing new types of miniaturized detectors and applying effective sample preconcentration techniques (e.g. isotachopheresis).

7. Hivatkozások

- [1] Kohlrausch, F., *Ann. Phys. Chem.* 1897, 62, 209-239.
- [2] Smithies, O., *Biochem J.* 1955, 61, 629-641.
- [3] Hjertén, S., *Chromatogr. Rev.* 1967, 9, 122-219.
- [4] Virtanen, R., *Acta Polytechnica Scan.* 1974, 123, 1-67.
- [5] Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, Th. P. E. M., *J. Chromatogr.* 1979, 169, 11-20.
- [6] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *J. Chromatogr.* 1981, 218, 209-216.
- [7] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., *Anal. Chem.* 1984, 56, 111-113.
- [8] Knox, J. H., Grant, I. H., *Chromatographia* 1991, 32, 317-328.
- [9] Manz, A., Harrison, D. J., Verpoorte, E. M. J., Fettingner, J. C., Paulus, A., Lüdi, H., Widmer, H. M., *J. Chromatogr.* 1992, 593, 253-258.
- [10] Honda, S., Suzuki, K., Kakehi, K., *Anal. Biochem.* 1989, 177, 62-66.
- [11] Honda, S., Iwase, S., Makino, A., Fujiwara, S., *Anal. Biochem.* 1989, 176, 72-77.
- [12] Liu, J., Cobb, K. A., Novotny, M., *J. Chromatogr.* 1988, 468, 55-65.
- [13] Nishi, H., Tsumagari, N., Kakimoto, T., Terabe, S., *J. Chromatogr.* 1989, 465, 331-343.
- [14] Nishi, H., Tsumagari, N., Kakimoto, T., Terabe, S., *J. Chromatogr.* 1989, 477, 259-270.
- [15] Carretero, A. S., Cruces-Blanco, C., Ramirez, S. C., Pancorbo, A. C., Gutierrez A. F., *J. Agric. Food. Chem.* 2004, 52, 5791-5795.
- [16] Rodrigues, M. R. A., Caramao, E. B., Arce, L., Rios, A., Valcarcel, M., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4215-4220.
- [17] Fu, H., Huang, X., Jin, W., Zou, H., *Current Opinion in Biotechnology* 2003, 14, 96-100.
- [18] Hiraoka, A., *J. Chromatogr. A* 2000, 895, 339-344.
- [19] Hjertén, S., Zhu, M. D., *J. Chromatogr. A* 1985, 346, 265-270.
- [20] Everaerts, F. M., Beckers, J. L., Verheggen, Th. P. E. M., *Isotachopheresis*, Elsevier, Amsterdam 1976.
- [21] Huang, Z., Ito, K., Hirokawa, T., *J. Chromatogr. A* 2004, 1055, 229-234.
- [22] Boček, P., Deml, M., Gebauer, P., Dolník, V., *Analytical Isotachopheresis*, Wiley-VCH, Weinheim 1988.
- [23] Beckers, J. L., *Electrophoresis* 1995, 16, 1987-1998.
- [24] Caslavská, J., Thormann, W., *Electrophoresis* 2006, 27, 4618-4630.
- [25] Bahga, S. S., Santiago, J. G., *Electrophoresis* 2012, 33, 1048-1059.
- [26] Timerbaev, A. R., Hirokawa, T., *Electrophoresis* 2006, 27, 323-340.

- [27] Rogács, A., Marshall, L. A., Santiago, J. G., *J. Chromatogr. A* 2014, 1335, 105–120.
- [28] Madajová, V., Šimuničová, E., Kaniansky, D., Marák, J., Zelenská, V., *Electrophoresis* 2005, 26, 2664–2673.
- [29] Terry, S. C., Jerman, J. H., Angell, J. B., *IEEE Trans. Electron Devices* 1979, 26, 1880–1886.
- [30] Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M., *Sens. Actuators B* 1990, 1, 244–248.
- [31] Harrison, D. J., Manz, A., Fan, Z., Lüdi, H., Widmer, H. M., *Anal. Chem.* 1992, 64, 1926–1932.
- [32] Harrison, D. J., Fluri, K., Seiler, K., Fan, Z., Effenhauser, C. S., Manz, A., *Science* 1993, 261, 895–897.
- [33] Jacobson, S. C., Culbertson, C. T., Daler, J. E., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 1998, 70, 3476–3480.
- [34] Huang, B., Wu, H. K., Kim, S., Zare, R. N., *Lab Chip*, 2005, 5, 1005–1007.
- [35] Liu, B. F., Ozaki, M., Hisamoto, H., Luo, Q. M., Utsumi, Y., Hattori, T., Terabe, S., *Anal. Chem.* 2005, 77, 573–578.
- [36] Makamba, H., Hsieh, Y. Y., Sung, W. C., Chen, S. H., *Anal. Chem.* 2005, 77, 3971–3978.
- [37] Roman, G. T., McDaniel, K., Culbertson, C. T., *Analyst* 2006, 131, 194–201.
- [38] Bergstrom, S. K., Edenwall, N., Laven, M., Velikyan, I., Langstrom, B., Markides, K. E., *Anal. Chem.* 2005, 77, 938–942.
- [39] Wu, D. P., Luo, Y., Zhou, X. M., Dai, Z. P., Lin, B. C., *Electrophoresis* 2005, 26, 211–218.
- [40] Wu, D. P., Qin, J. H., Lin, B. C., *Lab Chip* 2007, 7, 1490–1496.
- [41] Ölvecká, E., Masár, M., Kaniansky, D., Jöhnck, M., Stanislawski, B., *Electrophoresis* 2001, 22, 3347–3353.
- [42] Grass, B., Neyer, A., Jöhnck, M., Siepe, D., Eisenbeiss, F., Weber, G., Hergenroder, R., *Sens. Actuators B* 2001, 72, 249–258.
- [43] Baldock, S. J., Fielden, P. R., Goddard, N. J. Prest, J. E., Treves Brown, B. J., *J. Chromatogr., A* 2003, 990, 11–22.
- [44] Walker, P. A., Morris, M. D., Burns, M. A., Johnson, B. N., *Anal. Chem.* 1998, 70, 3766–3769.
- [45] Prest, J. E., Baldock, S. J., Bektas, N., Fielden, P. R., Brown, B. J. T., *J. Chromatogr. A* 1999, 836, 59–65.
- [46] Kaniansky, D., Masár, M., Bielčíková, J., Iványi, F., Eisenbeiss, F., Stanislawski, B., Grass, B., Neyer, A., Jöhnck, M., *Anal. Chem.* 2000, 72, 3596–3604.
- [47] Bodor, R., Madajová, V., Kaniansky, D., Masár, M., Jöhnck, M., Stanislawski, B., *J. Chromatogr. A* 2001, 916, 155–165.

- [48] Grass, B., Hergenroder, R., Neyer, A., Siepe, D., *J. Separ. Sci.* 2002, 25, 135–140.
- [49] Bodor, R., Žuborová, M., Ölvecká, E., Madajová, V., Masár, M., Kaniansky, D., Stanislawski, B., *J. Sep. Sci.* 2001, 24, 802–809.
- [50] Smejkal, P., Breadmore, M. C., Guijt, R. M., Foret, F., Bek, F., Macka, M., *Electrophoresis* 2012, 33, 3166–3172.
- [51] Masár, M., Danková, M., Ölvecká, E., Stachurová, A., Kaniansky, D., Stanislawski, B., *J. Chromatogr. A* 2004, 1026, 31–39.
- [52] Masár, M., Danková, M., Ölvecká, E., Stachurová, A., Kaniansky, D., Stanislawski, B., *J. Chromatogr. A* 2005, 1084, 101–107.
- [53] Khurana, T. K., Santiago, J. G., *Anal. Chem.* 2008, 80, 279–286.
- [54] Persat, A., Marshall, L. A., Santiago, J. G., *Anal. Chem.* 2009, 81, 9507–9511.
- [55] Bier, M., Palusinski, O. A., Mosher, R. A., Saville, D. A., *Science* 1983, 219, 1281–1287.
- [56] Bercovici, M., Lele, S. K., Santiago, J. G., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 1008–1018.
- [57] Hruška, V., Jaroš, M., Gaš, B., *Electrophoresis* 2006, 27, 984–991.
- [58] Brody, J. P., Osborn, T. D., Forster, F. K., Yager, P., *Sens. Actuators A* 1996, 54, 704–708.
- [59] Ocvirik, G., Munroe, M., Tang, T., Oleschuk, R., Westra, K., Harrison, D. J., *Electrophoresis* 2000, 21, 107–115.
- [60] Hua, S. Z., Sachs, F., Yang, D. X., Chopra, H. D., *Anal. Chem.* 2002, 74, 6392–6396.
- [61] Parce, J. W., Owicki, J. C., Kercso, K. M., Sigal, G. B., Wada, H. G., Muir, V. C., Bousse, L. J., Ross, K. L., Sikic, B. I., McConnell, H. M., *Science* 1989, 246, 243–247.
- [62] Brivio, M., Fokkens, R. H., Verboom, W., Reinhoudt, D. N., Tas, N. R., Goedbloed, M., van den Berg, A., *Anal. Chem.* 2002, 74, 3972–3976.
- [63] Emrich, C. A., Tian, H., Medintz, I. L., Mathies, R. A., *Anal. Chem.* 2002, 74, 5076–5083.
- [64] Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. A., Whitesides, G. M., *Anal. Chem.* 1998, 70, 4974–4984.
- [65] Becker, H., Dietz, W., Dannberg, P., Micro Total Analysis Systems '98. Proceedings mTAS '98 Workshop. Banff, Canada, 13–16 Oct. 1998, pp. 253–256.
- [66] McCormick, R. M., Nelson, R. J., Alonso-Amigo, M. G., Benvegna, D. J., Hooper, H. H., *Anal. Chem.* 1997, 69, 2626–2630.
- [67] Lao, A. I. K., Trau, D., Hsing, I., *Anal. Chem.* 2002, 74, 5364–5369.
- [68] Effenhauser, C. S., Bruin, G. J. M., Paulus, A., Ehrat, M., *Anal. Chem.* 1997b, 69, 3451–3457.

- [69] Bianchi, F., Wagner, F., Hoffmann, P., Girault, H. H., *Anal. Chem.* 2001, 73, 829–836.
- [70] Liu, Y., Rauch, C. B., Stevens, R. L., Lenigk, R., Yang, J., Rhine, D. B., Grodzinski, P., *Anal. Chem.* 2002, 74, 3063–3070.
- [71] Wallenborg, S. R., Bailey, C. G., *Anal. Chem.* 2000, 72, 1872–1878.
- [72] Seiler, K., Harrison, D. J., Manz, A., *Anal. Chem.* 1993, 65, 1481–1488.
- [73] Fan, Z. H., Harrison, D. J., *Anal. Chem.* 1994, 66, 177–184.
- [74] Jacobson, S. C., Hergenröder, R., Koutny, L. B., Warmack, R. J., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 1994, 66, 1107–1113.
- [75] Effenhauser, C. S., Manz, A., Widmer, H. M., *Anal. Chem.* 1993, 65, 2637–2642.
- [76] Backofen, U. B., Matysik, F., Lunte, C. E., *Anal. Chem.* 2002, 74, 4054–4059.
- [77] Solignac, D., Gijs, M. A. M., *Anal. Chem.* 2003, 75, 1652–1657.
- [78] Wu, Z., Jensen, H., Gamby, J., Bai, X., Girault, H. H., *Lab Chip* 2004, 4, 512–515.
- [79] Karlinsey, M., Monahan, J., Marchiarullo, D. J., Ferrance, J. P., Landers, J. P. *Anal. Chem.* 2005, 77, 3637–3643.
- [80] Lapos, J. A., Manica, D. P., Ewing, A. G., *Anal. Chem.* 2002, 74, 3348–3353.
- [81] Fu, J. L., Fang, Q., Zhang, T., Jin, X. H., Fang, Z. L., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3827–3834.
- [82] Chabiny, M. L., Chiu, D. T., McDonald, J. C., Stroock, A. D., Christian, J. F., Karger, A. M., Whitesides, G. M., *Anal. Chem.* 2001, 73, 4491–4498.
- [83] Weiller, B. H., Ceriotti, L., Shibata, T., Rein, D., Roberts, M. A., Lichtenberg, J., German, J. B., de Rooij, N. F., Verpoorte, E., *Anal. Chem.* 2002, 74, 1702–1711.
- [84] Foret, F., Krivánková, L., Bocek, P., *Capillary Zone Electrophoresis*, VCH-Weinheim, 1993.
- [85] Mogensen, K. B., Kutter, J. P., *Electrophoresis* 2009, 30, S92–S100.
- [86] Mogensen, K. B., Petersen, N., Hübner, J., Kutter, J., *Micro Total Analysis Systems 2001. Proceedings μ TAS 2001 Symposium*, 5th ed. Monterey, CA, 2001, Olt. 21–25., 280–282.
- [87] Woolley, A. T., Lao, K., Glazer, A. N., Mathies, R. A., *Anal. Chem.* 1998, 70, 684–688.
- [88] Fanguy, J. C., Henry, C. S., *Electrophoresis* 2002, 23, 767–773.
- [89] Guijt, R. M., Evenhuis, C. J., Macka, M., Haddad, P. R., *Electrophoresis* 2004, 25, 4032–4057.
- [90] Shadpour, H., Hupert, M. L., Patterson, D., Liu, C., Galloway, M., Stryjewski, W., Goettert, J., Soper, S. A., *Anal. Chem.* 2007, 79, 870–878.
- [91] Drevinskas, T., Maruska, A., Briedis, V., *Electrophoresis* 2015, 36, 292–297.

- [92] Drevinskas, T., Kaljurand, M., Maruska, A., *Electrophoresis* 2014, 35, 2401-2407.
- [93] Francisco, K. J. M., do Lago, C. M., *Electrophoresis* 2009, 30, 3458–3464.
- [94] Neaga, I. O., Iacob, B. C., Bodoki, E., *J. Liq. Chrom. Rel. Techn.* 2014, 37, 2072-2090.
- [95] Hutchinson, J. P., Johns, C., Breadmore, M. C., Hilder, E. F., Guijt, R. M., Lennard, C., Dicinoski, G., Haddad, P. R., *Electrophoresis* 2008, 29, 4593–4602.
- [96] C⁴D Platforms for Microchip Electrophoresis, M-ET225, 121-1210, eDAQ Pty Ltd., 2010
- [97] Coltro, W. K. T., Lima, R. S., Segato, T. P., Carrilho, E., Jesus, D. P., Logo, C. L., Silva, J. A. F., *Anal. Methods* 2012, 4, 25-33.
- [98] Kubáň, P., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2015, 36, 195-211.
- [99] Lichtenberg, J., de Rooij, N. F., Verpoorte, E., *Electrophoresis* 2002, 23, 3769–3780.
- [100] Pumera, M., Wang, J., Opekar, F., Jelínek, I., Feldman, J., Löwe, H., Hardt, S., *Anal. Chem.* 2002, 74, 1968–1971.
- [101] Mahabadi, K. A., Rodriguez, I., Lim, C. Y., Maurya, D. K., Hauser, P. C., de Rooij, N. F., *Electrophoresis* 2010, 31, 1063–1070.
- [102] Guijt, R. M., Armstrong, J. P., Candish, E., Lefleur, V., Percey, W. J., Shabala, S., Hauser, P. C., Breadmore, M. C., *Sens. Actuators B.*, 2011, 159, 307-313.
- [103] Vázquez, M., Frankenfeld, C., Coltro, W. K. T., Carrilho, E., Diamond, D., Lunte, S. M., *Analyst* 2010, 135, 96–103.
- [104] Coltro, W. K. T., da Silva, J. A. F., Carrilho, E., *Anal. Methods* 2011, 3, 168-172.
- [105] Liu, J., Xu, F., Wang, S., Chen, Z., Pan, J., Ma, X., Jia, X., Xu, Z., Liu, C., Wang, L., *Electrochem. Comm.* 2012, 25, 147-150.
- [106] Ding, Y., Rogers, K., *Electrophoresis* 2010, 31, 2602–2607.
- [107] Duarte Junior, G. F., da Silva, J. A. F., Francisco, K. J. M., do Lago, C. L., Carrilho, E., Coltro, W. K. T., *Electrophoresis* 2015, 36, 1935-1940.
- [108] Thredgold, L. D., Khodanov, D. A., Ellis, A. V., Lenehan, C. E., *Analyst* 2013, 138, 4275-4279.
- [109] Tantra R., Manz A., *Anal. Chem.* 2000, 72, 2875-2878.
- [110] Sillon N., Baptist R., *Sens. Actuators B* 2002, 83, 129-137.
- [111] Poole, C. F.: The essence of chromatography, 2003, *Elsevier*
- [112] Gáspár, A., Andrási, M., Kardos, Sz., *J. Chromatogr. B* 2002, 775, 239-246.
- [113] Segato, T. P., Coltro, W. K. T., Almeida, A. L. J., Piazzetta, M. H. O., Gobbi, A. L., Mazo, L. H., Carrilho, E., *Electrophoresis* 2010, 31, 2526–2533.

- [114] Gaudry, A. J., Nai, Y. H., Guijt, R. M., Breadmore, M. C., *Anal. Chem.* 2014, 86, 3380–3388.
- [115] Ansari, K., Ying, J. Y. S., Hauser, P. C., de Rooij, N. F., Rodriguez, I., *Electrophoresis* 2013, 34, 1390–1399.
- [116] Tanyanyiwa, J., Abad-Villar, E. M., Fernández-Abedul, M. T., Costa-García, A., Hoffman, W., Guber, A. E., Herrmann, D., Gerlach, A., Gottschlich, N., Hauser, P. C., *Analyst* 2003, 128, 1019–1022.
- [117] Kubáň, P., Evenhuis, C. J., Macka, M., Haddad, P. R., Hauser, P. C., *Electroanalysis* 2006, 18, 1289–1296.
- [118] Hjertén, S., *J. Chromatogr.* 1985, 347, 191–198.
- [119] Doherty, E. A. S., Meagher, R. J., Albarghouthi, M. N., Barron, A. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 34–54.
- [120] Gao, L., Liu, S., *Anal. Chem.* 2004, 76, 7179–7186.
- [121] Chiari, M., Cretich, M., Damin, F., Ceriotti, L., Consonni, R., *Electrophoresis* 2000, 21, 909–916.
- [122] Horvath, J., Dolník, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 644–655.
- [123] Gebauer, P., Thormann, W., *J. Chromatogr.* 1991, 558, 423–429.
- [124] Fung, E. N., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* 1995, 67, 1913–1919.
- [125] Kleemiss, M. H., Gilges, M., Schomburg, G., *Electrophoresis* 1993, 14, 515–522.
- [126] Chen, S. H., Tzeng, R. T., *Electrophoresis* 1999, 20, 547–554.
- [127] Gao, Q., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* 1998, 70, 1382–1388.
- [128] Kaneta, T., Ueda, T., Hata, K., Imasaka, T., *J. Chromatogr. A.* 2006, 1106, 52–55.
- [129] Madajová, V., Turcelová, E., Kaniánsky, D., *J. Chromatogr.* 1992, 589, 329–332.
- [130] Landers, J. P. (Ed) *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, CRC, Press, 2008.
- [131] Iki, N., Yeung, E. S., *J. Chromatogr. A.* 1996, 731, 273–282.
- [132] Zemann, A. J., Schnell, E., Volgger, D., Bonn, G. K., *Anal. Chem.* 1998, 70, 563–567.
- [133] Kubáň, P., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2009, 30, 176–188.
- [134] Thormann, W., *J. Chromatogr.* 1990, 516, 211–217.
- [135] Vacík, J., Zuska, J., Muselasová, I., *J. Chromatogr.* 1985, 320, 233–240.
- [136] Caslavská, J., Koenka, I. J., Hauser, P. C., Thormann, W., *Electrophoresis* 2016, 37, 699–710.
- [137] Pyell, U., Bücking, W., Huhn, C., Herrmann, B., Merkoulov, A., Mannhardt, J., Jungclas, H., Nann, T., *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 395, 1681–1691.
- [138] Ibrahim, A., Koval, D., Kašička, V., Faye, C., Cottet, H., *Macromolecules* 2013, 46, 533–540.

- [139] Kler, P. A., Posch, T. N., Pattky, M., Tiggelaar, R. M., Huhn, C., *J. Chromatogr. A* 2013, *1297*, 204–212.
- [140] Kubáň, P., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2004, *25*, 3387–3397.
- [141] Brito-Neto, J. G. A., da Silva, J. A. F., Blanes, L., do Lago, C. L., *Electroanalysis* 2005, *17*, 1198–1206.
- [142] Marák, J., Nagyová, I., Kaniánsky, D., *J. Chromatogr. A* 2003, *1018*, 233–249.
- [143] Svobodová, J., Beneš, M., Hruška, V., Ušelová, K., Gaš, B., *Electrophoresis* 2012, *33*, 948–957.

8. Tudományos közlemények

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

1. Attila Gáspár, Péter I. Koczka, Hector Carmona, Frank A. Gomez
Split injection: a simple introduction of subnanoliter sample volumes for chip electrophoresis
Microchemical Journal, **2011**, 99, 180-185.
IF: 3,048
2. Péter I. Koczka, Attila Gáspár
Application of a capillary-assembled microfluidic system for separation of cephalosporins
Electrophoresis, **2014**, 35, 2534-2537.
IF: 3,028
3. Péter I. Koczka, Ede Bodoki, Attila Gáspár
Application of capacitively coupled contactless conductivity as an external detector for zone electrophoresis in poly(dimethylsiloxane) chips
Electrophoresis, **2016**, 37, 398-405.
IF (2014): 3,028
4. Péter I. Koczka, Róbert Bodor, Marián Masár, Attila Gáspár
Application of isotachopheresis in commercial capillary electrophoresis instrument using C⁴D and UV detection
Electrophoresis, közlésre elfogadva, **2016**
DOI: 10.1002/elps.201600194
IF (2014): 3,028

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó előadások:

1. Koczka Péter István
Folyadékáram megosztásán alapuló injektálás kidolgozása mikrofluidikai csipeken történő elektroforetikus elválasztásokhoz
Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar 2010. évi Őszi Tudományos Diákköri Konferencia, 2010. november 25., Debrecen

2. Koczka Péter István
Folyadékáram megosztásán alapuló injektálás kidolgozása mikrofluidikai csipeken történő elektroforetikus elválasztásokhoz
XXX. Jubileumi Országos Tudományos Diákköri Konferencia Kémiai és Vegyipari Szekció, 2011. április 27-29., Pécs
3. Koczka Péter István
Miniatürizált kapilláris elektroforézis rendszer kifejlesztése és tanulmányozása
DE Természettudományi és Technológiai Kar, DETEP konferencia, 2012. május 10., Debrecen
4. Péter I. Koczka, Andrea Nagy, Attila Gáspár
Developing microfluidic chips for electrophoretic and chromatographic separations
46. Komplexkémiai Kollokvium, 2012. május 21-23., Mátrafüred
5. Koczka Péter István
Miniatürizált kapilláris elektroforézis rendszer alkalmazása kefalosporin antibiotikumok elemzéséhez
XXXV. Kémiai Előadói Napok (KEN), 2012. október 29-31., Szeged
6. Péter I. Koczka, Ede Bodoki, Attila Gáspár
Developing PDMS microchips for electrophoretic separation using contactless conductivity detection
15th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2015. július 13-18., Târgu Mureș (Marosvásárhely), Románia

Az értekezés témájából készült poszterek:

1. Péter I. Koczka, Maria Ortega, Melinda András, Frank Gomez, Attila Gáspár
The use of split-injection for microchip electrophoresis
10th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2010. július 7-14., Zágráb, Horvátország

2. Péter I. Koczka, Hector Carmona, Frank A. Gomez, Attila Gáspár
The applications of split injection for zone electrophoretic separation in microfluidic chips
11th Symposium and CEEPUS Summer School, 2011. szeptember 18-28., Graz, Ausztria
3. Péter I. Koczka, Attila Gáspár
Developing a miniaturized capillary electrophoretic system for analysis of cephalosporins
12th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2012. július 4-14., Kolozsvár, Románia
4. Péter I. Koczka, Attila Gáspár
Application of split-flow injection in microchips
13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2013. június 27-július 7., Debrecen
5. Péter I. Koczka, Attila Gáspár
Application of split-flow injection in PDMS microfluidic chips
9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2013. szeptember 4-6., Siófok
6. Péter I. Koczka, Martina Riesová, Eva Tesařová, Attila Gáspár
Study of applicability of Simul 5 software for optimizing ITP in PDMS microchips
14th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2014. június 27-július 7., Pozsony (Szomolány), Szlovákia
7. Péter I. Koczka, Ede Bodoki, Attila Gáspár
Developing PDMS microchips for electrophoretic separation using contactless conductivity detection
ISC 2014, 30th International Symposium on Chromatography, 2014. szeptember 14-18., Salzburg, Ausztria
8. Péter I. Koczka, Ede Bodoki, Attila Gáspár
Study of applicability of PDMS chip to C⁴D with in-plane electrodes and its application for CZE separations
10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2015. szeptember 2-4., Siófok

9. Péter I. Koczka, Róbert Bodor, Marián Masár, Attila Gáspár
Application of isotachophoresis in commercial capillary electrophoresis
instrument using C⁴D and UV detection
16th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2016.
július 6-15., Varsó, Lengyelország

9. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Gáspár Attila egyetemi docensnek a munkámhoz nyújtott segítségét, útmutatását, hasznos tanácsait.

Köszönöm Dr. Andrási Melindának, Dr. Nagy Andreának és Kecskeméti Ádámnak, hogy nemcsak munkatársként, de barátként is fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm Prof. Dr. Fábián István tanszékvezető egyetemi tanárnak, a Koordinációs és analitikai kémia doktori program (K/2) vezetőjének, hogy lehetővé tette kutatómunkámat a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Köszönetet mondok Dr. Marián Masár egyetemi docensnek és Dr. Bodor Róbert egyetemi adjunktusnak (Comenius Egyetem, Pozsony) az izotachoforetikus mérésekhez nyújtott szakmai segítségükért.

Hálával tartozom Dr. Bodoki Edének (Iuliu Hațieganu Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Kolozsvár) a vezetőképeségi detektáláshoz nyújtott tanácsaiért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Iván Kristóf egyetemi docensnek (Pázmány Péter Katolikus Egyetem, Információs Technológiai és Bionikai Kar) a számítógépes szimulációs vizsgálatok kivitelezéséért.

Köszönet illeti a CEEPUS (CIII-RO-0010-09-1516) programot külföldi tanulmányútjaim támogatásáért.

Külön hálával tartozom feleségemnek, családomnak és barátaimnak türelmükért, biztatásukért.