



Gáspár Attila

■ Debreceni Egyetem, Szeretlen és Analitikai Kémiai Tanszék

# Kromatográfiás töltetek alkalmazása mikrofluidikai csipekben



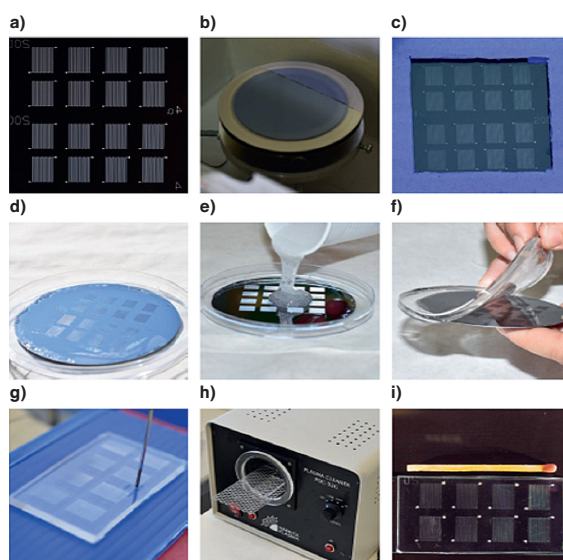
## Bevezetés

Az utóbbi 20 évben kifejlesztett mikrofluidikai rendszerek, a „lab-on-a-chip” technológia termékei egyre inkább átalakítják a laboratóriumi kísérletezést és az analitikai vizsgálatokat. Az analitikai mérőrendszerek miniatürizálása ugyanis nem csupán a jelenlegi technológia méreteinek csökkentését jelenti, de egyúttal egészen újfajta analitikai rendszerek megszületését is lehetővé teszi. Amellett, hogy a mikrocsipek többnyire olcsók és sok esetben egyszerű használatosak, a mikrocsipekben végzett vizsgálatok sokkal gyorsabbak, pikoliternyi mintaoldatot, illetve nanoliternyi reagensoldatot igényelnek. Ezek a kutatások intenzíven folynak a biotechnológiai, klinikai és analitikai területeken.

Mivel a kromatográfiás elválasztások az analitikai kémia egyik leggyakrabban alkalmazott módszerei, a mikrofluidikai kutatásokban is fontos terület a kromatográfiás állófázisok kialakítása a mikrocsipek csatornáiban. A mikrocsipek kromatográfiás állófázisaként monolitokat [1], kereskedelmi forgalomban levő, 1–5  $\mu\text{m}$  méretű kromatográfiás részecskéket [2], újabban pedig nanorészecskéket [3] is használnak. E nagy felület/térfogat aránnyal jellemezhető mikrotöltetek jól alkalmazhatók akár nagy hatékonyságú kromatográfiás elválasztásokhoz, on-line minta-előkészítési eljárásokhoz vagy enzimreaktorok hordozóanyagaiként. Jelen közleményben a hagyományos kromatográfiás részecskékből mikrocsipekben kialakított töltetéről lesz szó. A kutatási terület tömör áttekintése mellett az elmúlt években elért, a témához kapcsolódó saját eredményeinkről is beszámolok.

## Mikrofluidikai csipek készítése

A mikrofluidikai csipeket eleinte az elektronikai ipar által is használt kemény anyagokból (szilícium, kvarc, üveg) készítették a mikroelektronikai fejlesztésekben alkalmazott módszerek (pl. maratási eljárások, finom rétegek kialakítása) segítségével. A későbbiekben egyre inkább az olcsóbb és könnyebben megmunkálható műanyagok [plexi, poliimid, polidimetilsziloxán (PDMS)] alkalmazása felé fordult a kutatók figyelme. Különösen népszerűvé vált a PDMS-ből készült mikrofluidikai csipek elkészítésére alkalmas ún. lágy litográfias módszer, mellyel kevesebb mint 24 óra alatt elkészíthetők a mikrocsipek egy átlagos felszereltségű laborban [4]. A módszer lényege, hogy egy szilíciumlap hordozón először egy vékony fényérzékeny réteget (fotoreziszt) alakítanak

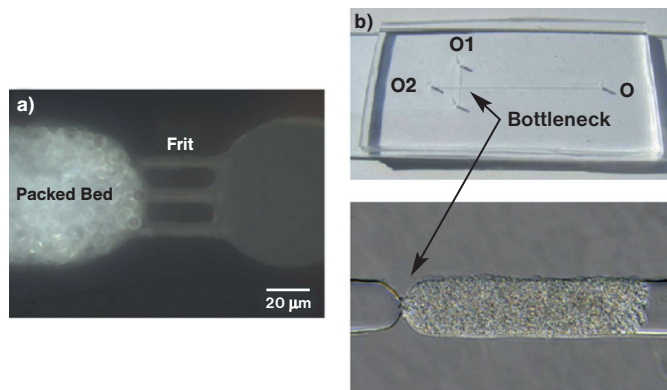


1. ábra. Mikrofluidikai csip készítésének lépései lágy litográfias módszerrel [4]: a) a fotolitográfias maszk, b) egyenletes vastagságú fényérzékeny réteg kialakítása Si-lapka forgatásával (3200 rpm), c) a Si-lapka fotolitográfias maszkon keresztül történő besugárzása UV-fénnyel, d) a kész öntőforma az előhívó szerrel láthatóvá tett csatornamintázattal, e) PDMS és térhálósító adalék keverékének öntőformára öntése, f) a megkeményedett polimer lehúszása, g) portok kialakítása lyukasztóval, h) felületek reaktívá tétele levegőplazmás aktiválással és i) a kész mikrofluidikai csip (a szerpentin alakú csatornák átmérője 50  $\mu\text{m}$ ) [5]

ki, majd erre helyezik rá a csatornák mintázatát tartalmazó litográfias maszkot (a csatornamintázat átlátszó a fekete alapon), amit UV-fénnyel besugároznak, majd a mintázatot „előhívják”. Ezzel az eljárással a maszk mintázata átvihető az öntőformára, az öntőforma pedig egy többlépéses eljárást használva alkalmas a PDMS-csipek készítésére (1. ábra).

## Kromatográfiás töltetek kialakítása mikrocsipekben

A mikrocsipekben a kromatográfiás részecskéket általában valamilyen frit vagy fizikai akadály (gát, pillér, szűkület) segítségével tartják vissza, hogy ily módon kromatográfiás töltetet kapja-



2. ábra. Kromatográfiai töltetek kialakítása a kromatográfiai részecskék frit [2] (a) vagy szűkület [7] (b) segítségével történő visszatartásával

nak. Az egyik leghatékonyabb eljárást az Agilent cég kutatói dolgozták ki, akik a mikrocip kemény poliimid anyagában alakították ki a csatornákat lézeralációval, kifejlesztve a HPLC-csip rendszert (2.a ábra) [2]. Ez a mikrocip alkalmas volt nagy nyomású hatékony elválasztásokra és tömegspektrométerhez való illesztéshez).

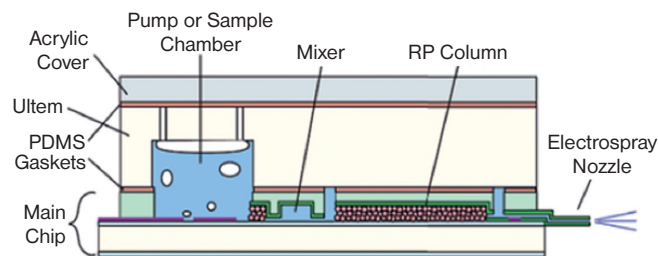
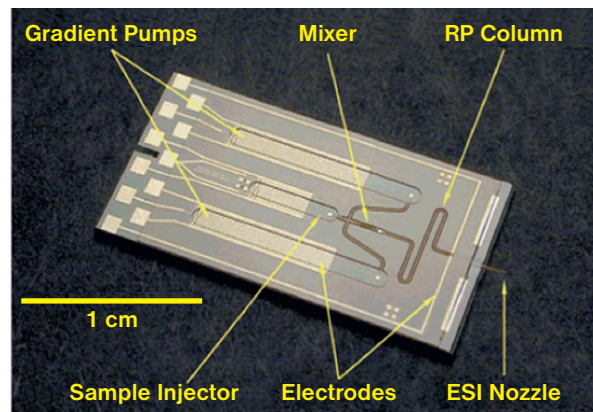
Kutatócsoportunk olyan egyszerű eljárásról számolt be (2.b ábra), ahol a kromatográfiai részecskék rugalmas PDMS-ből készült csipbe történő integrálása frit kialakítása nélkül is lehetséges [6, 7]. Az ún. zárókő-hatás miatt a szűkület felé áramoltatott részecskék közül az előlő részecskék megszorulnak a csatornában, és ezek tartják vissza a mögöttük jövő részecskéket.

## Analitikai alkalmazási területek

### Kromatográfiai elválasztások

A mikrofluidikai csipekben folyadékkromatográfiai (LC) vagy elektrokromatográfiai (CEC) elválasztások egyaránt végrehajthatók. Az előbbi módszer esetén a mobilfázist és a mintát nyomással, az utóbbi esetén elektromos térerő (elektroosztatikus áramlás) segítségével hajtják át az állófázison. A CEC alkalmazása azért vált népszerűvé, mert a mikrofluidikai eszközökben való megvalósítása viszonylag egyszerű és az elektrokinetikus áramlás profilja lapos. Az egyik elsőként kifejlesztett LC-mikrocipben 1,5 µm méretű C18 részecskékből kialakított tölteten két komponens CEC-elválasztása 20 s-on belül 2 µm tányérmagassági érték elérése mellett elvégezhető volt [8]. A technikai fejlesztéseknek köszönhetően a HPLC mikrociprendszerek (pl. az Agilent terméke [2]) hasonló vagy akár jobb elválasztási hatékonyságot, szimmetrikusabb és keskenyebb csúcsokat kínálnak, mint a létező nano-HPLC rendszerek.

A kromatográfiai elválasztások mikrocipben történő alkalmazására elegáns példát mutattak be Lee és mtsai [9]. Mikrofluidikai rendszerük 3 elektrolízisen alapuló pumpát integrált, melyből egy a mintaoldat szállítását, kettő pedig az oldószergradiens kialakítását és a mobilfázis mozgását végezte (3. ábra). Az alkalmazott Pt-elektrodok egyrészt a pumpák, másrészt az elektropray működtetéséhez szükségesek. A fordított fázisú töltetet a kromatográfiai részecskék frittel való visszatartásával alakították ki. A mikrocip MS-hez on-line kapcsolható, így a fehérjék tripszines bontásával kapott peptidegy közvetlenül elemezhető. A szerzők hasonló elválasztási felbontásról, de sokkal rövidebb analízisidőről számoltak be a kereskedelmi nano-LC-MS rendszerekhez képest.



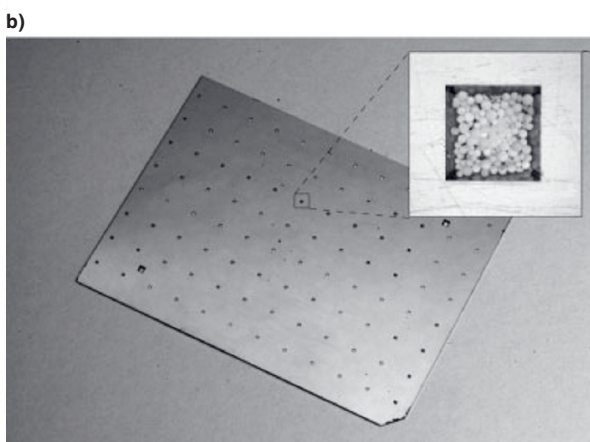
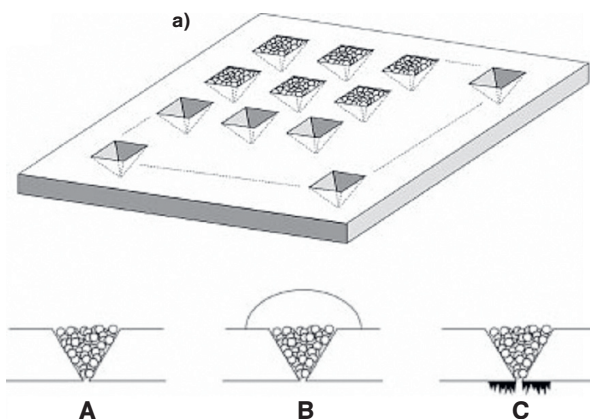
3. ábra. LC-mikrocip fotója és felépítésének vázlatos rajza [9]. A pumpák azon az elven működnek, hogy a mobilfázis zárt tartályában elektrolízist végezve a fejlődő gázok (akár 17 bar nyomással) kinyomják a folyadékot a kromatográfiai töltet, majd az elektropray-kapilláris felé

### Mintaelőkészítés

A mikrocipbe integrált kromatográfiai tölteteken nem csupán nagy hatékonyságú elválasztások, de olyan minta-előkészítési eljárások is elvégezhetők, melyek nagy felületű szilárd állófázist/hordozót igényelnek. Ezek a mikrotöltetek – hasonlóan a szilárd fázisú extrakció (SPE) tölteteihez – alkalmasak lehetnek egy sokkomponensű minta valamely vizsgálandó komponensének dúsítására vagy más (zavaró) komponensek (pl. sók, fehérjék) eltávolítására. A mikrofluidikai eszközök alkalmazásának előnye, hogy könnyen kialakíthatók olyan rendszerek (array), amelyekben párhuzamos műveletek egyidejűleg végezhetők.

Ekström és mtsai [10] olyan, fehérjeminták előkezelésére szolgáló platformot fejlesztettek ki, mely egyúttal a MALDI-MS mintatartó lemeze is volt. A platform 96 perforált mintatartó edénykéi 40 nL-nyi fordított fázisú töltetet tartalmaztak (4. ábra). A töltet anyaga változatosan funkcionálizálható a megfelelő szelektivitás elérése érdekében. Az edényké alján a 15 µm-es nyílások visszatartották a töltetrészecskéket a rajtuk adszorbeálódott peptidekkel, míg a mozgófázis szabadon eltávozhatott. A feldúsult peptideket ezt követően acetonitril/MALDI mátrixeleggyel közvetlenül eluálták a nyílás körüli 500 µm-nyi részbe. A peptidek gyors kikristályosodását követően a platformot megfordítva a mintatartó megfelelő pozícióiban a minta MALDI-MS-sel elemezhető. A módszer minimalizálja a minta kezeléseinek és áthelyezéseinek számát, így növelve az elemzés érzékenységét.

Kutatócsoportunkban a kromatográfiai tölteteket (mint egyfajta SPE-mikrooszlopokat) tartalmazó mikrofluidikai csipeket láng-atomabszorpció (FAAS) [11] és lézer indukált plazma (LIBS) [12] spektrométerekkel on-line összekapcsoltuk. A megfelelő reprodukálhatóságú és érzékenységgű FAAS-méréshez szükséges minimális mintatér fogat (30 µl) biztosításához a mikrocipben 20



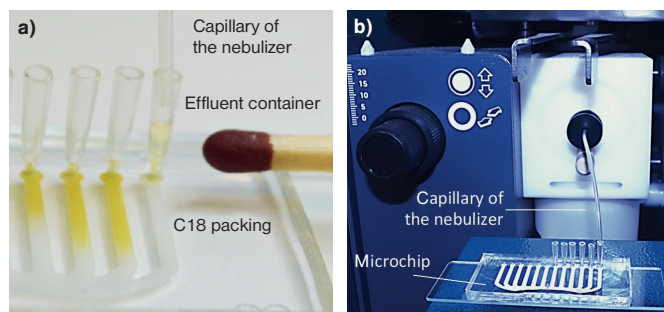
4. ábra. a) A MALDI-MS mintatartóján elhelyezhető, szelektív dúsítást elősegítő platform felépítésének rajza. A keresztmetszeti rajzok illusztrálják a fordított fázisú kromatográfiás részecskékkel töltött mintatartó edényekét (A); az eluens/mátrix keverék hozzáadását a mintatartó edényke tetejére (B); és az eluált minta kristályosodását (C) a mintatartó edényke kifolyó nyílása körül (a mintának e formája alkalmas a MALDI-elemzésre).

b) A platformról készített fotó, kinagyítva egyetlen mintatartó edénykét, az abba integrált kromatográfiás részecskékkel [10]

mm hosszú, 1 mm széles és 0,1 mm vastag, 5  $\mu\text{m}$ -es C18 kromatográfiás tölteteket alakítottuk ki. A Cr(VI) elválasztását/dúsítását ionpár-kromatográfiás módszerrel végeztük el, azaz a minták Cr(VI)-tartalmát ionpárképzés után a fordított fázisú tölteten megkötöttük, majd a koncentrációzott komponenst metanollal eluáltuk a töltet végén elhelyezett mintatartó edényekbe. Innen az oldatot a spektrométer porlasztójának kapillárisa felszívta, és a minta Cr(VI)-tartalma így közvetlenül a spektrométer lángjába jutott (5. ábra) [11].

### Enzimreaktorok

Az utóbbi időben egyre fontosabb tendenciát mutat az enzimek immobilizálása mikrofluidikai eszközökben analitikai kémiai célból. Az immobilizált mikrofluidikai enzimreaktorban lejátszódó reakciók gyakorlatilag megegyeznek az oldatban való emésztés során lejátszódó reakciókkal. A mikrofluidikai csipek használatának azonban számos előnye van. Egyrészt lehetővé teszi a kis ( $\mu\text{L}$ -nél kisebb) mintatér fogatkozását, ami kifejezetten előnyös biológiai mintáknál. Másrészt a mikrofluidikai reaktorokban sokkal rövidebb reakcióidő szükséges az oldatban történő emésztéshez képest, hiszen a felületen való immobilizálással

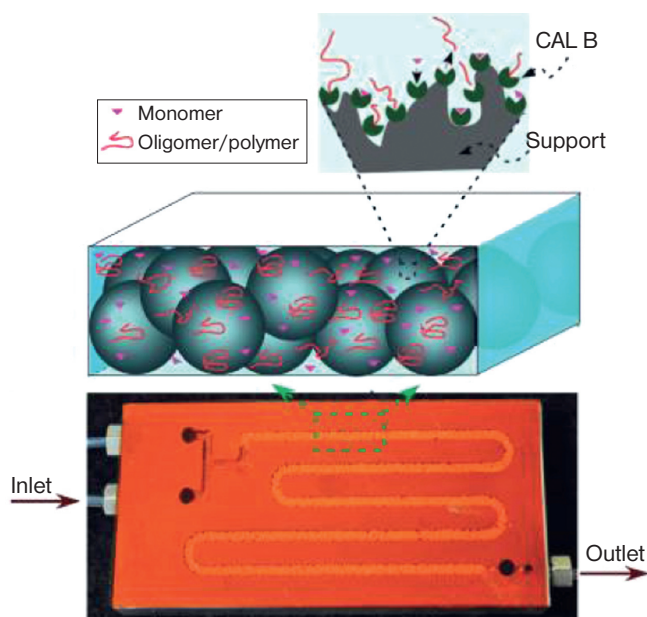


5. ábra. Az effluensek összegyűjtésére készített tárolóedények mikrosziphez csatlakoztatása (a), illetve a mikroszip és az FAAS-készülék összekapcsolása (b) [11]

nagy felületi enzimm koncentráció érhető el. Természetesen a mikrofluidikai reaktoroknál is célravezető minél nagyobb fajlagos felületű, porózus anyagot (kromatográfiás részecskék, polimergek, gélek) használni az enzim szilárd fázisú hordozójaként. Enzimek immobilizálására sok példa található a szakirodalomban, de leggyakrabban kovalens kötéssel történik az enzim rögzítése. Kovalens kötésű immobilizáláskor a reaktor élettartama növelhető, mivel a kovalensen rögzített enzim gyakorlatilag nem mobilizálódhat a felületről. A kötés az enzim egy aminosav-oldallánc és a felület egy reaktív csoportja között alakul ki.

Kundu és mtsai [13] gyűrűnyitós polimerizáció ( $\epsilon$ -kapolakton  $\rightarrow$  polikaprolakton) enzim katalizálására alkalmas mikrofluidikai reaktort fejlesztett ki (6. ábra). A *Candida antarctica* Lipase B (CAL B) enzimet a kereskedelmi forgalomban levő Novozym 435<sup>®</sup> részecskékhez rögzítették. E heterogén reakciót folyamatos módban, szerves oldószeres közegben és magas hőmérsékleten játszották le. Azt állapították meg, hogy a mikrofluidikai reaktorral a polimerizációs reakció gyorsabban ment végbe,

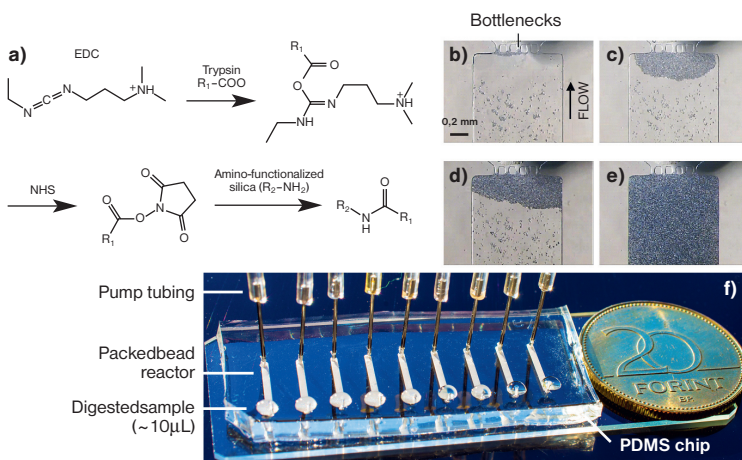
6. ábra. Folyamatos működésű, enzim által katalizált polimerizációs mikroreaktor fényképe és felépítésének vázlatos rajza. A CAL B enzimet szilárd gyöngyökre [makropózusos poli(metilmetakrilát)] immobilizálták, és a mikrosatornába töltötték. A reaktánsok mikroreaktorbeli tartózkodási idejét az áramlási sebesség változtatásával lehetett szabályozni [13]





ráadásul nagyobb molekulatömegű polimereket kaptak, mint a hagyományos reaktorokban.

A mikroreaktorokban az egyik leggyakrabban alkalmazott enzim a tripszin, amely proteolitikus enzimként a fehérjéket peptidre bontja. A kapott enzimelegyet elválasztástechnikai módszerrel (HPLC vagy kapilláris elektroforézis) és tömegspektrometriával elemezve, adatbázisok felhasználásával a mintában található fehérjék azonosíthatók. A mikrofluidikai immobilizált enzimreaktorok (IMER) off-line vagy on-line is kapcsolhatók a tömegspektrometriás rendszerekhez, sőt olyan rendszereket is kifejlesztettek már, ahol a mikrocsipen nem csupán a fehérjetartalmú minta emésztése, de az emésztett minta SPE-sómentesítése és LC-elválasztása is megtörténik. A kromatográfiai részecskékből kialakított tölteteken kovalensen immobilizált tripszines reaktor



**7. ábra.** a) A tripszin kovalens kötással (EDC/NHS reagensek segítségével) történő immobilizálása amino-funkcionált szilikarészecskék felületére. b–e) Optikai mikroszkópos felvételek a mikroreaktortöltet kialakításáról a részecskék szűkületek segítségével történő visszatartásával. A szilikarészecskék szuszpenziójának áramoltatása a szűkületek felé történik. f) A 9 minta egyidejű emésztésére szolgáló mikrofluidikai enzimreaktor fényképe [14]

előnye, hogy aktivitását akár több hónapig is megőrizheti megfelelő körülmények között tárolva, és ez idő alatt a reaktor többször felhasználható fehérjék emésztésére. Míg a hagyományos, oldatban történő emésztéshez sokszor 16 óra is szükséges, addig a mikrocsip IMER-egységekben, például az általunk kifejlesztett IMER-ben (7. ábra), 10 s-nál rövidebb időtartam is már elegendő [14].

## Várható trendek, kilátások

A kromatográfiai töltetet tartalmazó mikrocsipek fejlesztései várhatóan i) új típusú mikrofluidikai eszközök tervezésére és előállítására, ii) különböző mechanizmusú elválasztások (LC, CEC, CE) kombinálására, új állófázisok integrálása, illetve iii) a kifejlesztett mikrofluidikai eszközök orvosi diagnosztikai, gyógyszer- és környezetanalitikai alkalmazásaira fognak irányulni. Fontos lenne olyan mikrocsipek előállítása, amelyeknek párhuzamos csatornáiban nagyszámú kromatográfiai tölteten lehetne nagy nyomással hatékony elválasztást végezni, hogy ezáltal nagy elemzési sebességű analitikai eszközökhöz juthassunk, amely akár több hagyományos analitikai labor elemzési sebességével érhetne fel.

A sokcsatornás rendszerek egyetlen mikrocsipen történő megvalósítása lehetőséget adhat 2D elválasztások (pl. CEC–LC) végrehajtására is. A kifejlesztett csipeket alkalmazva kihasználhatók a technológiából adódó olyan jellemző előnyök, mint a csupán minimális minta- (100–500 pL) és reagensmennyiség (1–10 uL) szükségessége, gyors analízis (1–2 perc) és egyszerű multiplex (2 vagy több elválasztóegység ugyanazon a csipen) lehetősége.

Olyan várakozások is ismeretesek a jövőbeni fejlesztésekkel kapcsolatban, amelyek szerint a mikrocsipekben parányi minták sokaságával lehetünk képesek párhuzamosan kémiai reakciókat lejátszatni (pl. enzimreaktorokban) és komponenseket analizálni, így módon csökkentve drasztikusan a költségeket és fokozva az elemzési sebességet a diagnosztikában és a gyógyszerkutatásban. Ráadásul a mikrofluidikai csipekben elvileg akár ezernyi lehetséges gyógyszervegyület (bio)kémiai sajátosságai is meghatározhatók egyidejűleg, gyorsan és csupán néhány nL-nyi mintarészletet felhasználva.

**Köszönetnyilvánítás.** Köszönöm, hogy a bemutatott témák kutatásában együttműködött velem Nagy Andrea, Kecskeméti Ádám, Nagy Cynthia, Dr. Lázár István (DE), Prof. Galbács Gábor (SZTE), Prof. Frank A. Gomez (CSU Los Angeles). Köszönöm az OTKA (K11932) és a GINOP (2.3.2-15-2016-00008 és 2.3.3-15-2016-00004) támogatását.

## IRODALOM

- [1] Ericson, C.; Holm, J.; Ericson, T.; Hjertén, S.: *Anal. Chem.* (2000) 72, 81–87.
- [2] Ehlert, S.; Trojer, L.; van de Goor, T.; Tallarek, U.: *J. Mass. Spectrom.* (2010) 45, 313–320.
- [3] Lavrik, N. V.; Taylor L. T.; Sepaniak, M. J.: *Anal. Chim. Acta* (2011) 694, 6–20.
- [4] Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M.: *Anal. Chem.* (1998) 70, 4974–4984.
- [5] Nagy, C. N.: Könnyminták fehérjetartalmának tripszines emésztése mikrofluidikai enzimreaktoron; BSc szakdolgozat, DE-TTK, Debrecen, 2017.
- [6] Gáspár, A.; Piyasena, M. E.; Gomez, F. A.: *Anal. Chem.* (2007) 79, 7906–7909.
- [7] Gáspár, A.; Nagy, A.; Lázár I.: *J. Chromatogr. A.* (2011) 1218, 1011–1015.
- [8] Oleschuk, R. D.; Shultz-Lockyear, L.L.; Ning, Y.; Harrison, D. J.: *Anal. Chem.* (2000) 72, 585–590.
- [9] Xie, J.; Miao, Y.; Shih, J.; Tai, Y.C.; Lee, T. D.: *Anal. Chem.* (2005) 77, 6947–6953.
- [10] Ekström, S.; Wallman, L.; Malm, J.; Becker, C.; Lilja, H.; Laurell, T.; Marko-Varga, G.: *Electrophoresis* (2004) 25, 3769–3777.
- [11] Nagy, A.; Baranyai, E.; Gaspar, A.: *Microchem. J.* (2014) 114, 216–222.
- [12] Metzinger, A.; Nagy, A.; Gáspár, A.; Márton, Z.; Széles, É.; Buzás, A.; Galbács, G.: *Spectrochim. Acta B* (2016) 126, 23–30.
- [13] Kundu, S.; Bhangale, A. S.; Wallace, W. E.; Flynn, K. M.; Guttman, C. M.; Gross, R. A.; Beers, K. L.: *J. Am. Chem. Soc.* (2011) 133, 6006–6011.
- [14] Kecskeméti, A.; Gaspar, A.: *Talanta* (2017) 166, 275–283.

