

# Elektroforetikus elválasztások kapillárisban és mikrocipben

GÁSPÁR Attila\* és ANDRÁSI Melinda

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Debreceni Egyetem, 4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

## 1. Bevezetés

A DE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén folyó elektroforetikus elválasztásokkal kapcsolatos kutatások 1999-ben indultak. Kezdetben a kutatások elsősorban szervetlen komponensek meghatározására, az elektrokinetikus injektálás alkalmazhatóságának tanulmányozására, majd különböző környezeti- és gyógyszeranalitikai alkalmazásokra irányultak. 2006-tól - igazodva az analitikai kémia egyik jelenlegi fő irányvonalához - a tudományos munkánkban egyre meghatározóbbá váltak a mikrocipben végzett analitikai kutatások, elsősorban az elektroforetikus elválasztások.

Kutatócsoportunk nagyban támaszkodik hazai és külföldi együttműködésekre és hallgatóink közreműködésére. Jelen közleményben az elmúlt öt évben elért eredményeinkről számolunk be.

## 2. Kapilláris elektroforézis

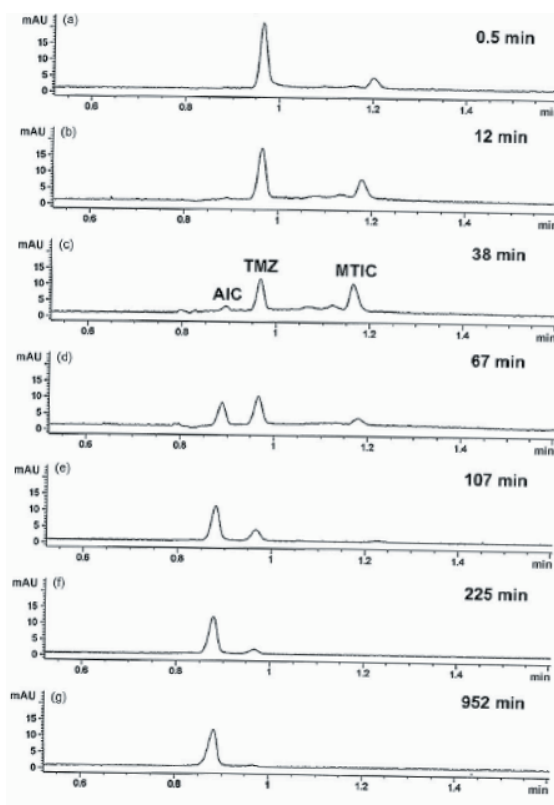
A kapilláris elektroforézis (CE) egy olyan nagyteljesítő-képességű analitikai módszer, mely jól egyesíti a nagy elválasztási hatékonyság, a gyors elemzés, kis mennyiségű minta- és vegyszerfelhasználás, illetve poláros és nem-poláros anyagok elemzésének lehetőségét. A CE sokoldalúsága miatt alkalmas az egyes gyógyszer-vegyületek legkülönbözőbb farmakokinetikai, fizikai-kémiai jellemzőinek meghatározására, gyógyászati hatékonyságának vizsgálatára.<sup>1</sup> A viszonylag új CE jelenleg a nagyteljesítményű kromatográfias módszerek legfontosabb alternatívája, melynek alapkutatása még jelenleg is folyik.

### 2.1. Gyógyszervegyületek vizsgálata

14 különböző kefalosporin és egyes bomkástermékek meghatározását modelloldatokban és gyógyászati termékekben kapilláris zónaelektroforézis (CZE) módszerrel végeztük.<sup>2</sup> A kefalosporinok pK meghatározásainál a CZE használatának előnyei (pl. több komponens pK-jának egyidejű meghatározása, bomlékony vagy szennyezett minták elemezhetősége, kis térfogatú, viszonylag kis koncentrációjú minták, automatizált elemzések) jól kihasználhatók.<sup>3</sup> A CE-vel történő pK meghatározás különösen hasznosnak bizonyulhat a gyógyszeriparban, mert nem szükséges a vizsgálandó komponens extrakciója és tisztítása.

A gyógyszervegyületek stabilitása a gyógykészítményben, oldatban, biológiai mátrixokban, különböző pH-kon és hőmérsékleteken eltérő, ennek vizsgálata CE módszerrel viszonylag egyszerű és gyors. Például a temozolomid (TMZ, daganatellenes gyógyszer) először gyors kémiai reakcióval monometil-triazenoimidazol-karboxamiddá

(MTIC), majd ebből 5-amino-imidazol-4-karboxamiddá (AIC) alakul át. A kidolgozott micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfias (MEKC) módszerrel a TMZ és bomlástermékei 1,4 percen belül meghatározhatók voltak, így a viszonylag gyors bomlás követhető volt modelloldatokban és klinikai mintákban (1. ábra).<sup>4</sup>



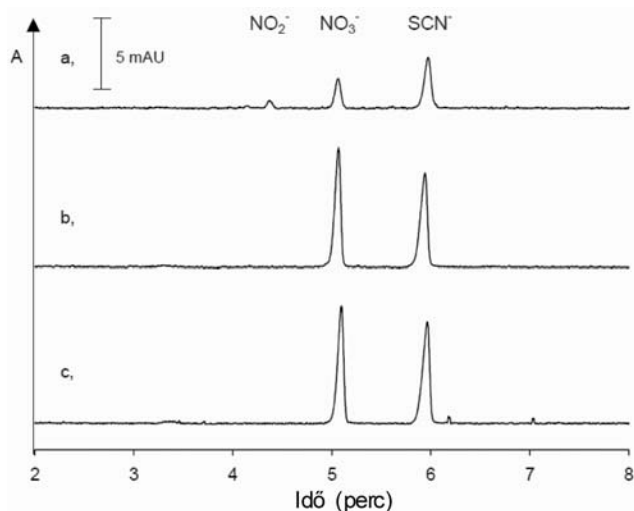
1. Ábra. TMZ vízben való oldását követően (0,5-952 perc) kapott MEKC elektroferogramok (Körülmények: 25 mM foszfát, 45 mM SDS, pH: 6,8,  $U=25$  kV,  $l_{\text{eff}}=8,5$  cm, 100 mbars,  $\lambda=214$  nm,  $c_{0,\text{TMZ}}=180$   $\mu\text{g/mL}$ ).<sup>4</sup>

### 2.2. Klinikai és környezeti minták elemzése

A klinikai minták elemzésekor a cél az, hogy megadjuk az egyes vegyületek koncentrációját a biológiai mintákban (pl. szérum, vizelet, liquor, nyál, könny) és gyógykészítményekben, és ezáltal a vegyületek hatékonyságát, metabolizmusát tanulmányozhassuk annak érdekében, hogy megfelelő módon és mennyiségben történjen a gyógyszerek adagolása. A CE módszer előnye más elválasztástechnikai módszerekkel szemben az, hogy itt lehetőség van a nagy fehérje- és szervesanyag-tartalmú klinikai minták közvetlen (mintaelőkészítés nélküli) kapillárisba juttatására és elemzésére.<sup>5</sup> A nagy viszkozitású, inhomogén minták (sputum, tumorok) minta-előkészítéséhez liofilizálást alkalmaztunk.<sup>6</sup>

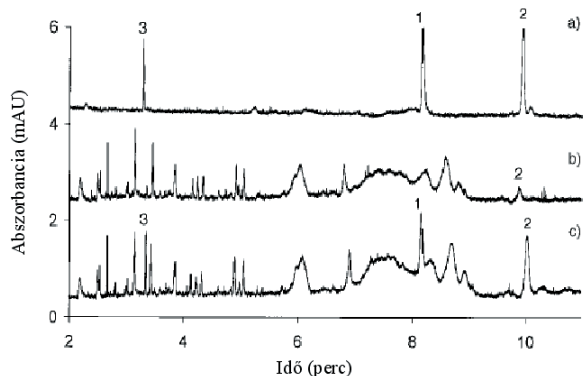
\*G.A. Tel.: 52-512900 ; fax: 52-518660; e-mail: gaspar@science.unideb.hu; web: inorg.unideb.hu/gaspara

A nyálban található nitrit- és nitrátionok mennyiségének ismerete nagy fontosságú az orvosdiagnosztikában. A kidolgozott CZE módszerrel különböző betegektől, dohányos és nem dohányos személyektől, a szájüreg különböző helyeiről, illetve nyálmirigyekből (pl. a Wharton-vezetékéből, illetve a Stenon-vezetékéből) vett mintákat elemeztünk.<sup>7</sup> A módszer nemcsak gyors és olcsó, hanem a mintaelőkészítés is minimális, hiszen a nyálminta közvetlenül a kapillárisba injektálható. Dohányos és nem dohányos személyektől vett nyálminták elemzésekor azt kaptuk, hogy a tiocianát koncentrációja átlagosan 5,4-szer volt nagyobb a dohányosokénál (dohányosoknál átlagosan 63,1 µg/mL, nem dohányosoknál átlagosan 11,7 µg/mL).



2. **Ábra.** A szájüregből (a), a fültömrigyből (b), és a submandibuláris nyálmirigyből (c) vett nyálminták CZE elektroferogramjai. (Körülmények: 50 mM foszfát puffer, pH: 6,8, -25 kV,  $l_{\text{eff}}$ : 40 cm,  $\lambda=214$  nm).<sup>7</sup>

CZE és MEKC módszert alkalmaztunk felszínivizek vízvirágzásából származó cianobaktérium extraktumok toxintartalmának meghatározására. A kimutatási határok spektrofotometriás detektálást alkalmazva a mikrocisztin, a cilindrospermopszin és az anatoxin esetében 1-4 µg/mL között alakultak.<sup>8</sup>

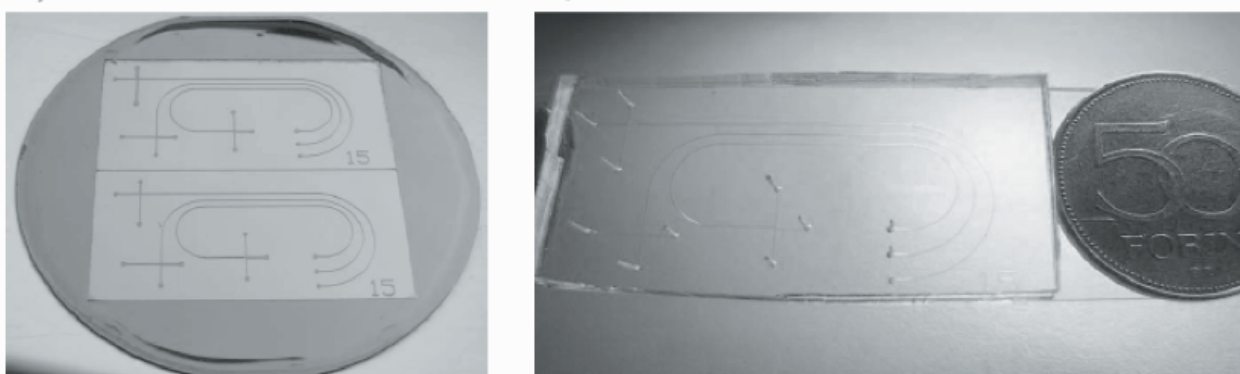


3. **Ábra.** Az anatoxin-a (1), a mikrocisztin-LR (2) és a cilindrospermopszin (3) standardok keveréke (a), egy tavi vízvirágzás minta (b) és 10 µg/mL toxin standardokkal adalékolt vízvirágzás minta (c) MEKC elektroferogramjai (Körülmények: 25 mM borát, 100 mM SDS, pH: 9,3,  $\lambda = 230$  nm).<sup>8</sup>

### 3. Mikrocsip elektroforézis

Az utóbbi években a „lab-on-a-chip” technológia forradalmasítani látszik a laboratóriumi kísérleteket és analitikai vizsgálatokat. Az analitikai mérőrendszerek miniatürizálása nem csupán a jelenlegi technológia összenyomását jelenti, de egyúttal egészen újfajta analitikai rendszerek megszületését is lehetővé teszi. A mikrocsipekben végzett vizsgálatok sokkal gyorsabbak, pikoliternyi mintaoldatot, illetve szubmikroliternyi reagens oldatot igényelnek. Ezek a kutatások - elsősorban biotechnológiai, klinikai és analitikai kémiai területeken - intenzíven folynak a fejlett országok egyetemlein és a különböző fejlesztő cégekben.<sup>1</sup>

A mikrofluidikai kutatásainkhoz az alapvető infrastruktúrát tanszékünkön nemrégiben alakítottuk ki. A saját tervezésű mikrocsipjeinket magunk készítjük polidimetilsziloxán (PDMS) műanyagból egy ún. lágy litográfias eljárás<sup>9</sup> segítségével (4. ábra). Az elektroforetikus elválasztásokhoz újfajta, hidrodinamikus elvű injektálási módszert dolgoztunk ki. Munkánk során olyan mikrofluidikai



4. **Ábra.** Mikrocsipek előállításához készített öntőforma (Si lap, melyből 30 µm magasságban emelkedik ki a csatornamintázat) és az elektroforetikus elválasztásokhoz alkalmas, egy üveglaphoz irreverzibilisen kötött PDMS csip.

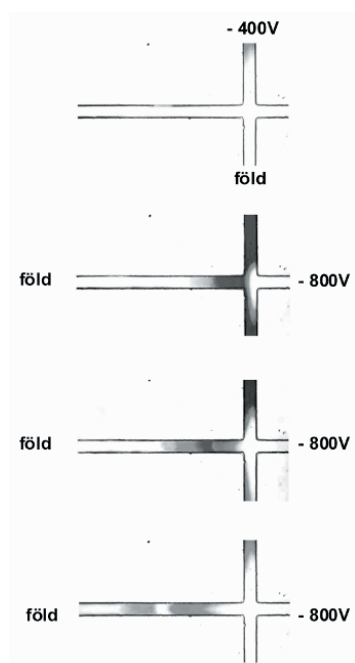
csipek kifejlesztéséről számoltunk be, melybe fordított fázisú kromatográfias (C18-szilika) töltetet,<sup>10,11</sup> illetve porított szilika aerogél monolitot<sup>12</sup> egyszerű módon integráltunk. A kromatográfias tölteteken a nanoliternyi

térfogatú mintaoldatot és a mobilfázist nyomással (1-3 bar) vagy feszültséggel (0,5-2 kV) áramoltatjuk keresztül, így ugyanazon csipen folyadékkromatográfias (LC) vagy elektrokromatográfias (CEC) elválasztásokat is

végrehajthatunk. A komponenseknek az átlátszó csipen való detektálását vagy a CCD kamerával ellátott mikroszkóp segítségével (festékek, fluoreszcens anyagok esetében) vagy száloptikás spektrofotometriával végeztük.

### 3.1. Elektroforetikus elválasztások

A mikrofluidikai kutatásaink egyik célja az volt, hogy injektálási módszert dolgozzunk ki a néhány száz pikoliternyi térfogatú folyadékminták csipbe való injektálásához, hogy ily módon érthessünk el hatékony zónaelektroforetikus elválasztást. Ellentétben az irodalomban található nagyszámú, elektrokinetikus elven történő injektálási módszerrel (5. ábra), munkánk során olyan új, nyomással történő injektálási eljárás kidolgozását tűztük ki célul, melynél nem jelentkeznek az elektrokinetikus injektálásokra jellemző, mennyiségi meghatározások pontosságát csökkentő hibák (*sampling bias*, *injection bias*).<sup>13</sup>

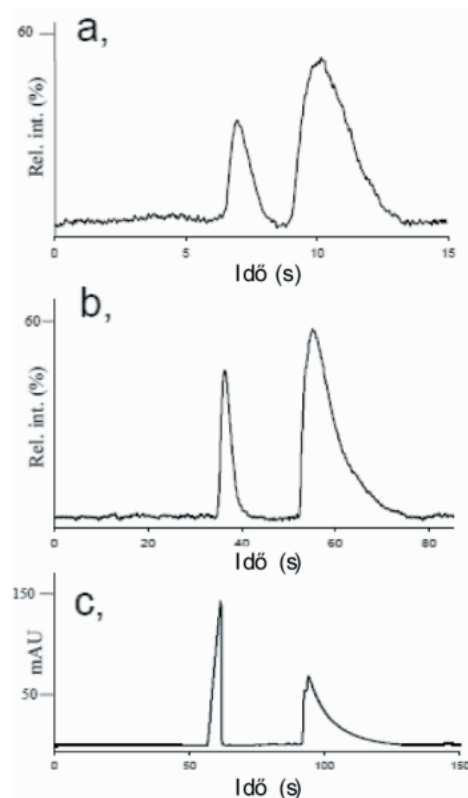


5. Ábra. Két komponensű festékeverék elektrokinetikus injektálásának és CZE elválasztásának lépései.

Az általunk tervezett és elkészített csipekben néhányszor száz pikoliternyi minta szeparációs csatornába történő bejuttatására sikeresen alkalmaztuk a hidrodinamikus megosztott (split) injektálást. Tanulmányoztuk a csipekben történő zónaelektroforetikus elválasztásokat a hidrodinamikus megosztott injektálást követően. Az eljárással gyors meghatározásra nyílik lehetőség, az elektroforézis kevesebb, mint 15 másodpercet vesz igénybe (6. ábra).

### 3.2. Kromatográfias töltetek kialakítása csipben

A mikrofluidikai analitikai kutatások egyik iránya a kromatográfias elválasztási technikák miniaturizálása, a különféle kromatográfias töltetek csipben való kialakítása és alkalmazása. Nemrégiben olyan eljárásról számoltunk be, ahol a hagyományos kromatográfias állófázis (pl. C18) PDMS-ből készült csipbe történő integrálása frit kialakítása nélkül lehetséges.<sup>10</sup>



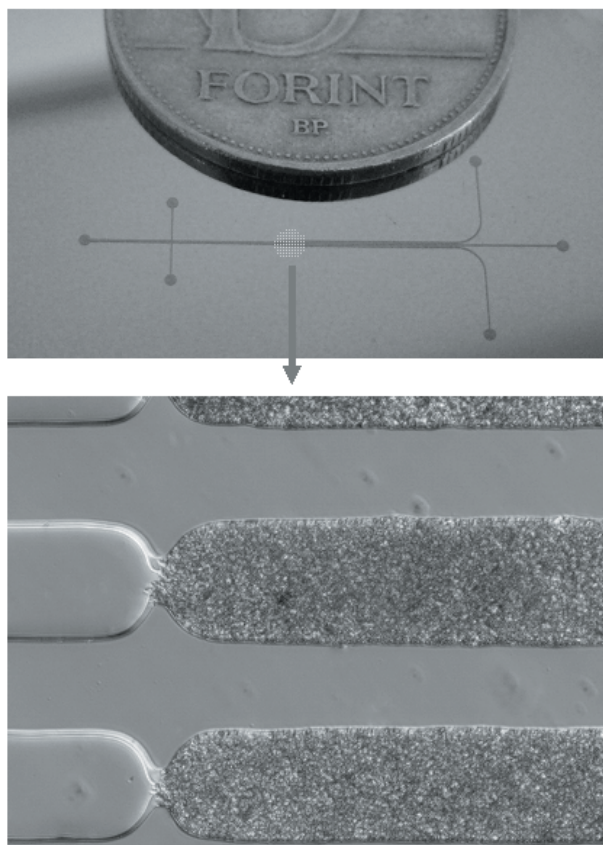
6. Ábra. PDMS mikroszipben 10 mm (a), és 45 mm (b), illetve kapilláris elektroforézis készülékben („short-end” mód, 85 mm effektív hossz) (c.) azonos elválasztási körülmények mellett (25 mM foszfát, pH: 6,8; E=200 V/cm) kapott elektroferogramok.

A kialakított tölteten elektrochromatográfias elválasztásra is lehetőség van.<sup>11</sup> A töltés során a csip felületén történő nyomás hatására a csatornában szűkület alakul ki, emiatt megakadnak a részecskék a csatornában. Az elkészült töltet esetén különböző stabilizáló hatásokat figyelhetünk meg (pl. az ún. zárókő-hatást, ahol a szűkület felé áramoltatott részecskék közül az elülső részecskék megszorulnak a csatornában és ezek tartják vissza a mögöttük jövő részecskéket). A későbbiekben az öntőforma speciális kialakításával értünk el megfelelő, állandó szűkületet, az így elkészített csipbe porított aerogélt töltöttünk.<sup>12</sup> A csip csatornájában kialakult szűkület esetén nem csak a csatorna szélessége, de a mélysége is csökkent. Ez a szűkület egyáltalán nem engedte át a részecskéket, de a folyadék könnyedén át tudott rajta jutni. Ezen szűkületek segítségével egy csipben akár több aerogéltöltet is kialakítható volt (7. ábra).

### Köszönetnyilvánítás

Köszönjük, hogy a bemutatott munkáinkban együttműködött velünk Kilar Ferenc (PTE), Klekner Álmos, Vasas Gábor, Lázár István, Bágyi Kinga, Buglyó Péter és Zékány László (DE), Frank A. Gomez (CSU Los Angeles). Az elvégzett kísérleti munkában elengedhetetlen segítséget nyújtottak hallgatóink (Páger Csilla, Juhász Péter, Nagy Andrea, Koczka Péter, Törzsök Brigitta, Kovács Otília). Köszönjük az OTKA (K75286), a TÁMOP (4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007), illetve a Cetox Kft. támogatását.





7. **Ábra.** Három, egymással kapcsolatban lévő, párhuzamos csatornából álló mintázatot tartalmazó öntőforma fényképe (felső kép), és az öntőforma segítségével készített PDMS mikrocsip csatornáiban kialakított különböző kromatográfias töltetek egy részletének mikroszkópos felvétele (a csatornák szélessége 100  $\mu\text{m}$ ) (alsó kép). Az 1 nL-nyi térfogatú mintadugó kialakítása a baloldali keresztvezetőben történik, mely a töltetek felé áramoltatva 3 kisebb mintadugóra oszlik, ezek jutnak a töltetekre. Az elvált komponensek detektálása magán a tölteten vagy a töltet után a csatornában lehetséges.

### Hivatkozások

- Landers, J. P. *Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*; CRC Press: Boca Raton, **2008**.
- Gáspár, A.; András, M.; Kardos, S. *J.Chromatogr.B.*, **2002**, *775*, 239-246.
- András, M.; Buglyó, P.; Zékány, L.; Gáspár, A. *J. Pharmac. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 1040-1047.
- András, M.; Bustos, R.; Gáspár, A.; Gomez, F.A.; Klekner, Á. *J.Chromatogr. B*, **2010**, *878*, 1801-1808.
- Petersen, J.R.; Mohammad, A.A. *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*, Humana Press Totowa, **2001**.
- András, M.; Gáspár, A.; Klekner, Á. *J.Chromatogr. B*, **2007**, *846*, 355-358.
- Gáspár, A.; Juhász, P.; Bágyi, K. *J.Chromatogr. A*, **2005**, *1065*, 327-331.
- Vasas, G.; Gáspár, A.; Páger, C.; Surányi, G.; Máthé, C.; Hamvas, M.M.; Borbély, G. *Electrophoresis*, **2004**, *25*, 108-115.
- Duffy, D.C.; McDonald, J.C.; Schueller, O.J.A.; Whitesides, G.M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4974-4984.
- Gáspár, A.; Piyasena, M.E.; Gomez, F.A. *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 7906-7909.
- Gáspár, A.; Hernandez, L. Stevens, S.; Gomez, F.A. *Electrophoresis*, **2008**, *29*, 1638-1642.
- Gáspár, A.; Nagy, A.; Lázár I. *J.Chromatogr.A.*, **2011**, *1218*, 1011-1015.
- Alarie, J.P.; Jacobson, S.C.; Ramsey, J.M., *Electrophoresis* **2001**, *22*, 312-317.

### Electrophoretic separations in capillary and microchip

The capillary electrophoresis is a high performance analytical method, which combines the high separation efficiency, the rapid analysis, the small consumption of samples/reagents with the possibility to analyze polar and non-polar compounds. Due to the versatility of the method it can be useful for the determination of the different (physiological, pharmacokinetic and physicochemical) parameters of pharmaceuticals and the study of their effectiveness. In the Department of Inorganic and Analytical Chemistry at University of Debrecen the research of electrophoretic separations started in 1999. At the beginning the research topics were focused on the separation of inorganic components (nitrite,<sup>7</sup> nitrate,<sup>7</sup> thiocyanate,<sup>7</sup> different arsenic and mercury compounds), the study of the applicability of electrokinetic injection, then the analysis of environmental and pharmaceutical components (cyanobacterial toxins,<sup>8</sup> cephalosporins,<sup>2</sup> benzodiazepines, temozolomide).<sup>4</sup>

The capillary electrophoresis was applied to determine the dissociation constant of several antibiotics.<sup>3</sup> Since CZE is a separation method, it is not necessary for the samples to be of high purity and known concentration because only the mobilities are measured. The applicability of CZE for the analysis of cephalosporin antibiotics has been studied in bronchial secretion as highly viscous, thick and non-homogeneous samples<sup>6</sup> and in other clinical samples such as serum, wound drainage, cerebrospinal fluid, urine or serum. The obtained results offer possibility for evaluating actual effectiveness of antibiotics that can promote optimization of individual drug therapy.

From 2006, following one of the main trend in analytical chemistry, the separation systems have been designed, constructed and studied in a microchip more and more often. For the electrophoretic separations the subnanoliter volume of samples were transported to the separation channel by a new hydrodynamic sample injection: split-injection mode. This injection method based on a simple patterning of the crossing of channels that does not require sophisticated instrumentation. The sample volume injected into the separation channel is dependent on the ratio of the widths of the crossing channels. This injection technique is tested for zone electrophoresis in native and surface modified poly(dimethylsiloxane) (PDMS) chips.

Chromatographic packings created from conventional C18 modified silica particles<sup>10,11</sup> and grounded silica aerogel<sup>12</sup> have been integrated into the microscopic channels without the use of frits. The packing of the chromatographic particles into the microfluidic channels is made possible by the hydrophobic nature and excellent elasticity of PDMS. Keystone-, clamping-, and anchor-effects provide the stability and the compactness of the packing and the attenuated wall-effects were observed.<sup>10,12</sup>