

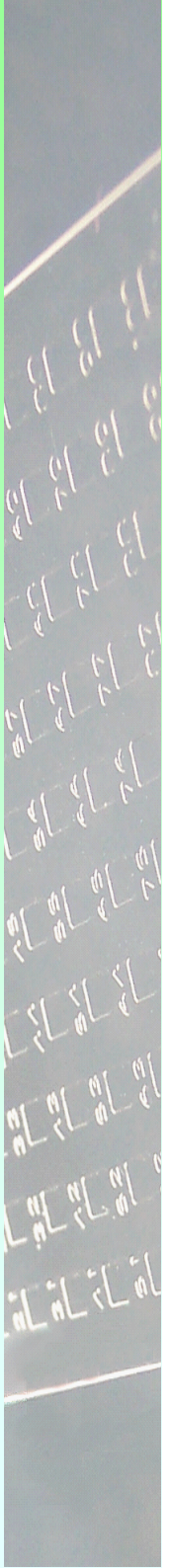
# Vývoj a aplikace miniaturizovaných integrovaných separačních zařízení v MS-proteomice a elektrochemii

Alexander Muck, PhD  
MS Group-ProtLab, MPI-ICE



# Obsah

- > nedávná historie, definice pojmů, názvosloví
- > některé příklady a fyzikální charakteristiky a typy lab-on-chip zařízení
- > mikrofabrikace a postupy přípravy v laboratorním měřítku
- > některé elektrochemické aplikace
- > aplikace pro hmotnostní spektrometrii
- > nové směry vývoje
- > Shrnutí



# Definice pojmů

pojem **Micro-total analytical systems ( $\mu$ TAS)** byl definován Jedem Harrisonem a Andreasem Manzem pod vedením Michaela Widmera (původně ETH) začátkem devadesátých let v laboratořích Ciba Geigy ve Švýcarsku. Podařilo se jim vzbudit velký ohlas prvními pracemi v *Sensors & Actuators B, Analytical Chemistry a Science*



# Definice pojmů

pojem **Micro-total analytical systems ( $\mu$ TAS)** byl definován Jedem Harrisonem a Andreasem Manzem pod vedením Michaela Widmera (původně ETH) začátkem devadesátých let v laboratořích Ciba Geigy ve Švýcarsku. Podařilo se jim vzbudit velký ohlas prvními pracemi v *Sensors & Actuators B, Analytical Chemistry a Science*



# Definice pojmů

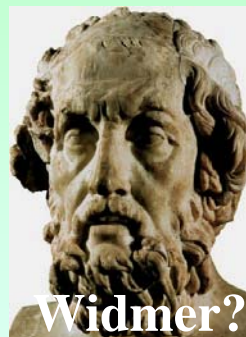
pojem **Micro-total analytical systems ( $\mu$ TAS)** byl definován Jedem Harrisonem a Andreasem Manzem pod vedením Michaela Widmera (původně ETH) začátkem devadesátých let v laboratořích Ciba Geigy ve Švýcarsku. Podařilo se jim vzbudit velký ohlas prvními pracemi v *Sensors & Actuators B, Analytical Chemistry a Science*





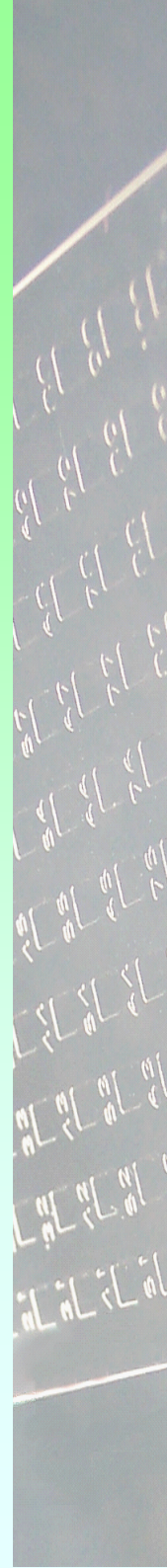
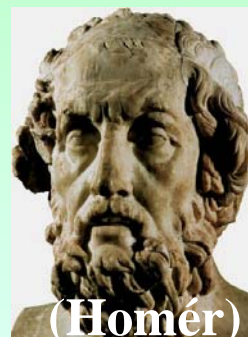
# Definice pojmů

pojem **Micro-total analytical systems ( $\mu$ TAS)** byl definován Jedem Harrisonem a Andreasem Manzem pod vedením Michaela Widmera (původně ETH) začátkem devadesátých let v laboratořích Ciba Geigy ve Švýcarsku. Podařilo se jim vzbudit velký ohlas prvními pracemi v *Sensors & Actuators B, Analytical Chemistry a Science*



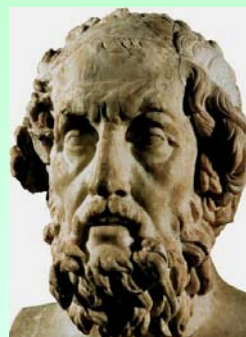
# Definice pojmů

pojem **Micro-total analytical systems ( $\mu$ TAS)** byl definován Jedem Harrisonem a Andreasem Manzem pod vedením Michaela Widmera (původně ETH) začátkem devadesátých let v laboratořích Ciba Geigy ve Švýcarsku. Podařilo se jim vzbudit velký ohlas prvními pracemi v *Sensors&Actuators B, Anal. Chem. a Science*



# Definice pojmů

pojem **Micro-total analytical systems ( $\mu$ TAS)** byl definován Jedem Harrisonem a Andreasem Manzem pod vedením Michaela Widmera (původně ETH) začátkem devadesátých let v laboratořích Ciba Geigy ve Švýcarsku. Podařilo se jim vzbudit velký ohlas prvními pracemi v *Sensors&Actuators B, Anal. Chem. a Science*



Autoři poukázali na předchozí automatizované analýzy např. FIA, ale na rozdíl od minulých postupů se snažili **integrovat všechny analytické operace** na jedné miniaturizované platformě



# Úvod a nedávná historie

## Cíle????

Připravit **integrované chemické 'zařízení'** (*lepší český termín neexistuje, mnoho odborných výrazů zatím nebylo do našeho jazyka obstojně přeloženo..*) schopné manipulace reagentů, derivatizačních a enzymových reakcí a separace a detekce produktů

Tato úsilí byla přímým pokračováním konceptu **MEMS** (micro electro-mechanical systems), který byl rozvíjen od konce šedesátých let v **elektrotechnickém průmyslu**: šlo o integraci elektrických obvodů, miniaturizaci a dále o přípravu elektrických a mechanických senzorů jež byla umožněna rozvojem **polovodičové chemie a fyziky křemíku**

# Úvod a nedávná historie

1926

*Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1926–1932

## Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip

D. Jed Harrison,<sup>\*,†,‡</sup> Andreas Manz,<sup>\*,§</sup> Zhonghui Fan,<sup>‡</sup> Hans Lüdi,<sup>§</sup> and H. Michael Widmer<sup>§</sup>

*Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2G2, and Forschung Analytik, Ciba Geigy, CH 4002 Basel, Switzerland*

..pro analýzu proteinů použili **elektrokinetické dávkování** vzorku a **elektroforetickou** separační techniku..

..**detektor** (konfokální fluorescenční mikroskop) zůstal mimo platformu (*další pěkné slovo, ještě jich dnes bude víc..*). Pokud uvážíme velikost jejich zařízení **14,8 × 3,9 × 1 cm** byl navíc mnohonásobně větší..

# Původ označení chip?

vzhledem k tomu, že se microTAS zařízení připravují na skleněných či křemíkových substrátech (polotovarových deskách pro elektrotechnický průmysl, angl. wafers), které jsou většinou kulaté a lámou se na menší kousky (**chips**), ujalo se toto zjednodušující označení pro většinu zařízení.



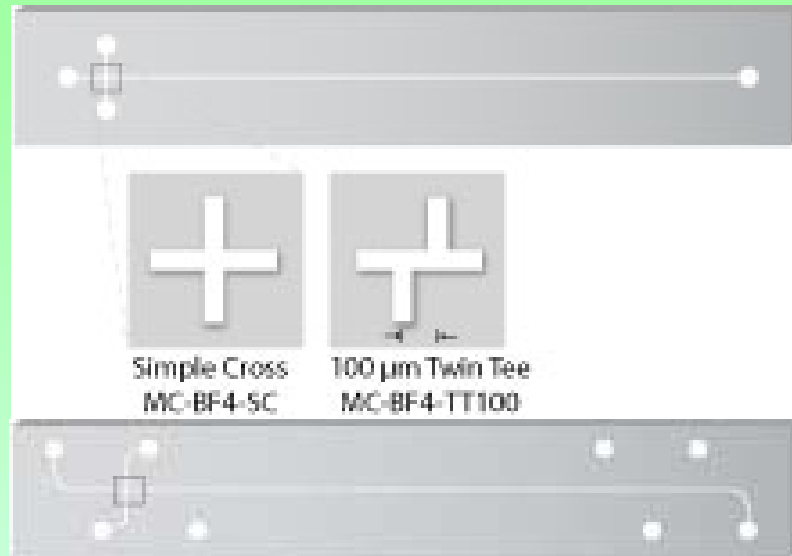
[www.si-mat.com](http://www.si-mat.com)



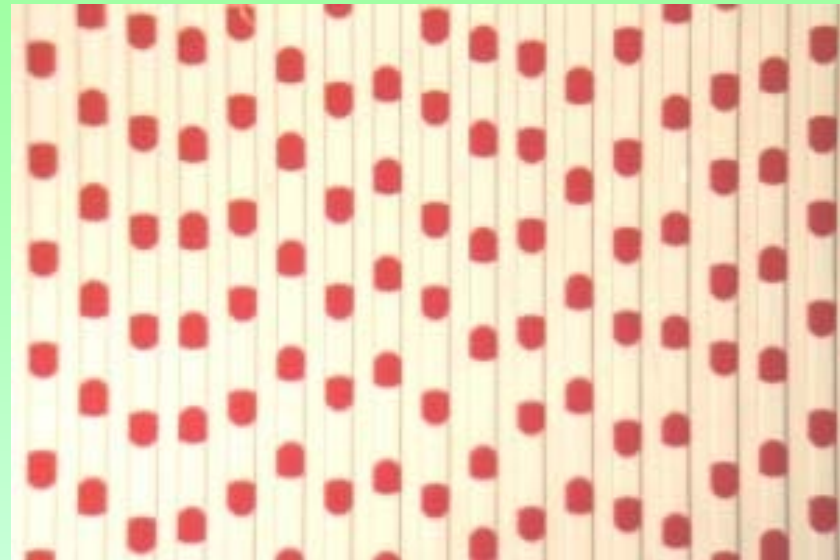
[www.schott.com](http://www.schott.com)



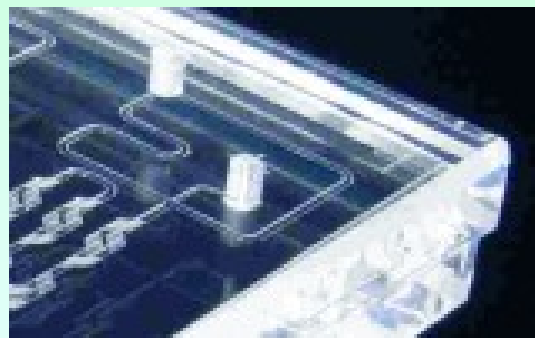
.... pryč od názvosloví, podívejme se na několik obrázků a na některé fenomény chemických mikročipů



[www.micralyne.com](http://www.micralyne.com)



[www.dolomite-centre.com](http://www.dolomite-centre.com)

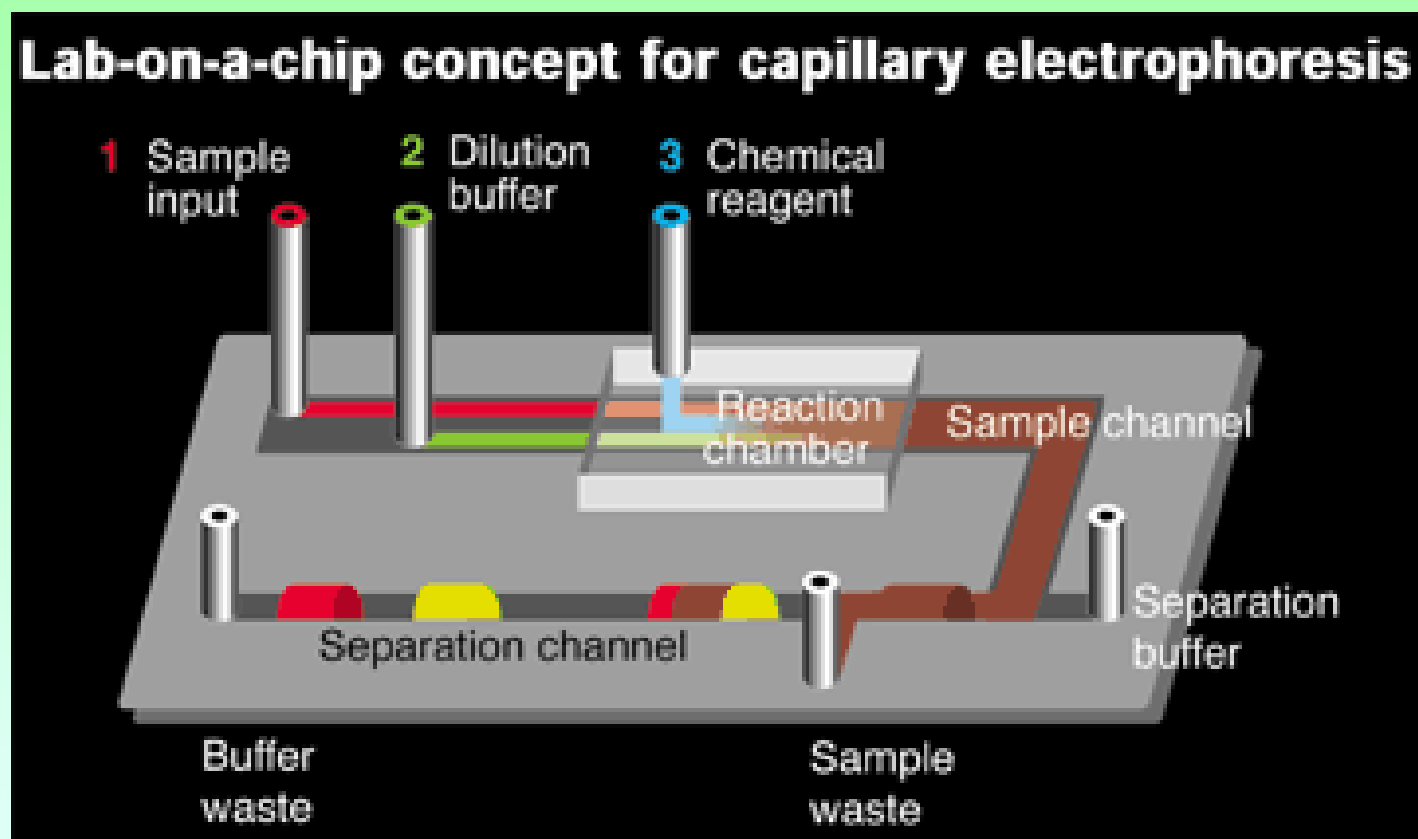


[www.dolomite-centre.com](http://www.dolomite-centre.com)





# Charakteristiky lab-on-chip





# Charakteristiky lab-on-chip

## Komponenty

Zásobníky

Kanály

Dávkovače

Pumpy

Ventily

Mixery

Filtry

Elektrody

Sensory (P, T, m)



# Charakteristiky lab-on-chip

## Komponenty

Zásobníky  
Kanály  
Dávkovače  
Pumpy  
Ventily  
Mixery  
Filtry  
Elektrody  
Sensory (P, T, m)



## Funkce

Dávkování  
Transport  
Míchání  
Separace  
Syntéza  
Analýza  
Doprava species  
Buněčné kultury  
Amplifikace



# Charakteristiky lab-on-chip

## Komponenty

Zásobníky  
Kanály  
Dávkovače  
Pumpy  
Ventily  
Mixery  
Filtry  
Elektrody  
Sensory (P, T, m)



## Funkce

Dávkování  
Transport  
Míchání  
Separace  
Syntéza  
Analýza  
Doprava species  
Buněčné kultury  
Amplifikace



## Výhody

Krátké časy analýz  
Malé objemy vzorku  
Menší spotřeba proudu  
Automatizace  
Rychlý návrh konceptu  
Efektivní náklady  
Vysoký throughput  
Malé odpady  
Field deployability



# Použití lab-on-chip

Rychlá DNA amplifikace a použití restričních enzymů pro štěpení

Dialýza biologických roztoků

Dělení malých molekul pomocí CE, MEKC, OTEC, RP-HPLC

Dělení biopolymerů, například proteinů

Digesce proteinů v mikroreaktorech

Analýza organických polutantů

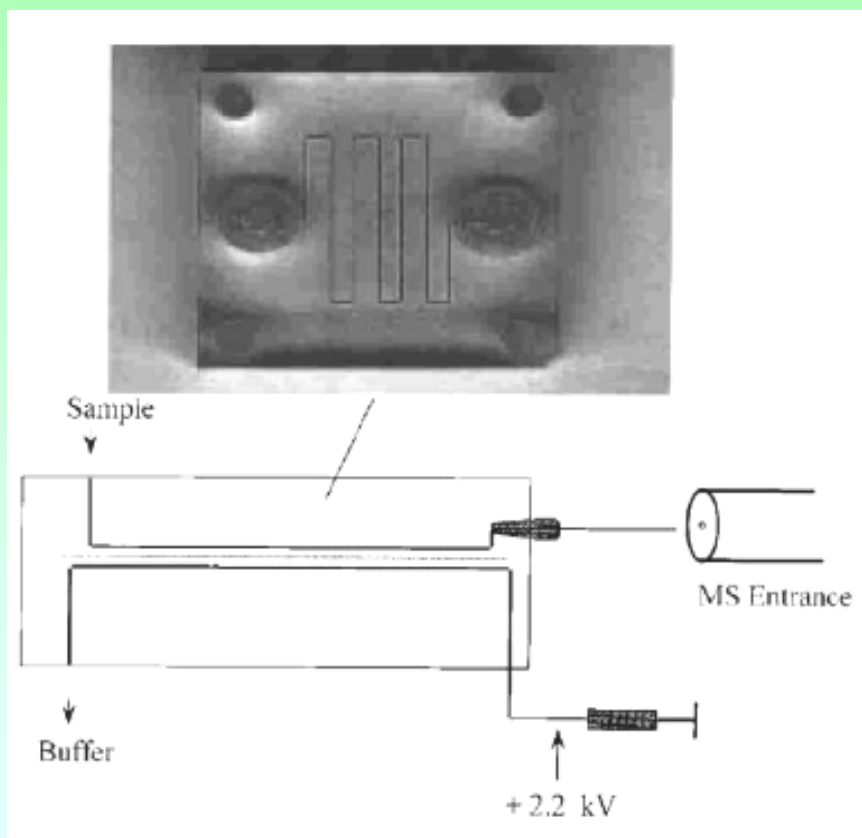
Separace buněk na základě velikosti

Organické reakce a jejich monitorování



# Použití lab-on-chip

## Mikrodialýza



polopropustná membrána:

1) odstranit soli z roztoku peptidů a zabránit tak znečištění detektoru

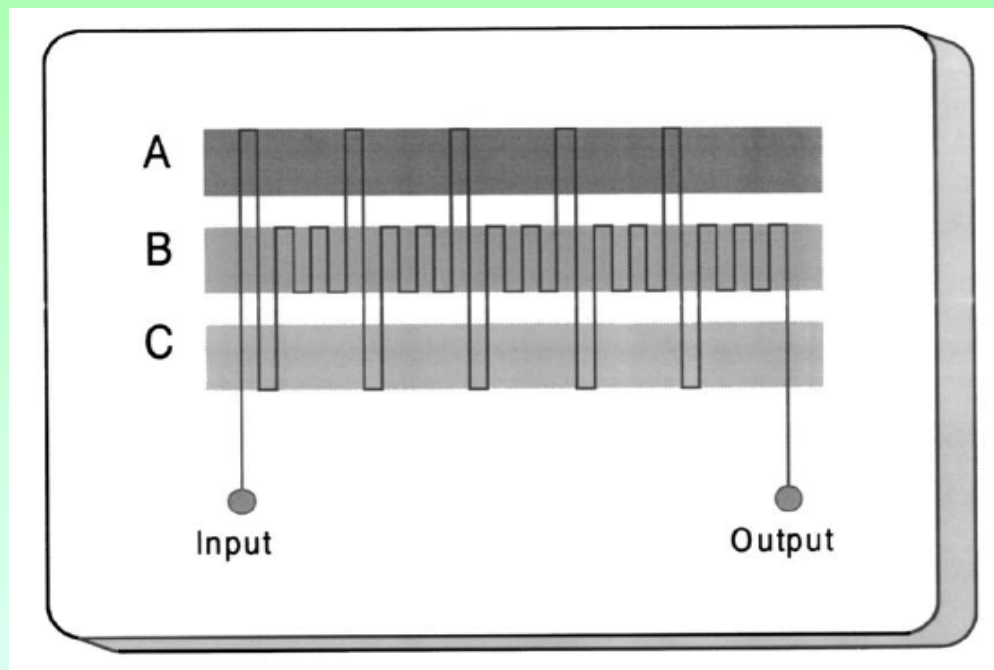
2) analyzované látky jsou difundovány do roztoku pufru pro analýzu (např. z krve) (odstranění albuminů etc.)

Komerční membrány dostupné pro velikosti od ca 100-300 g/mol, většinou estery celulózy



# Použití lab-on-chip

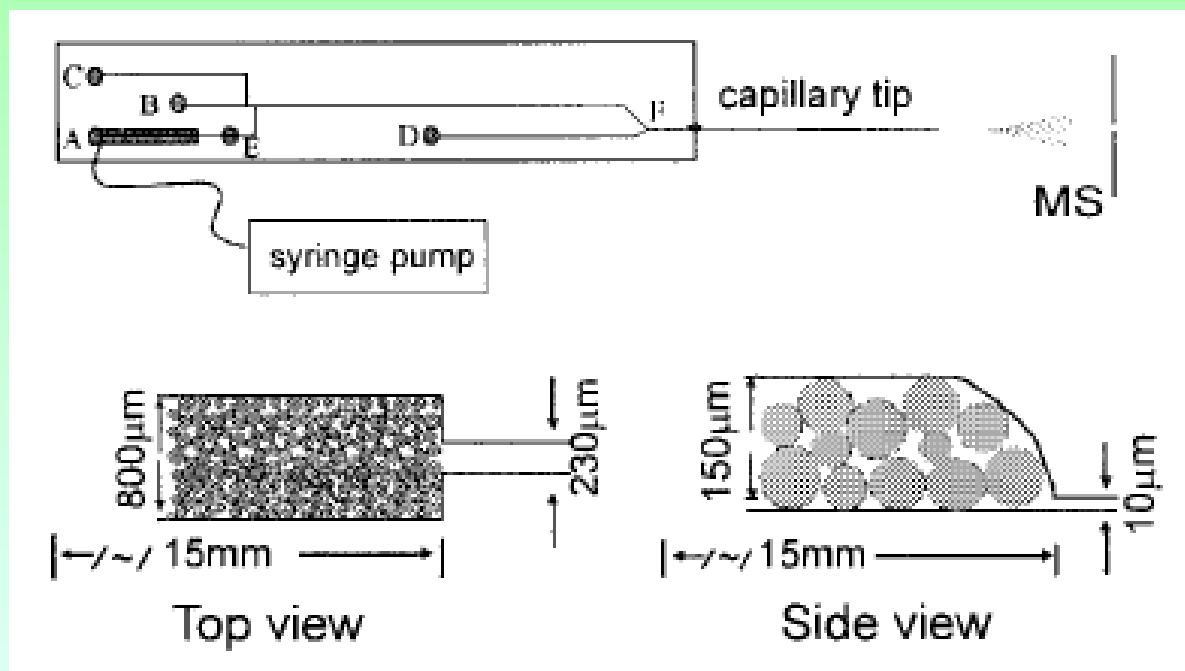
## On-chip-PCR



tři Cu zóny na spodní straně čipu zajišťují teploty potřebné pro polymerázovou reakci (místo opakovaného ohřívání a chlazení jedné epinky). Vzorek pro amplifikaci je pumpován konstantní rychlostí meandrovitým designem skleněného čipu. Ohřátí a ochlazení probíhá během ca 100 ms, celková doba reakce 1.5 až 18.7 min

# Použití lab-on-chip

## enzymatická hydrolýza proteinů



rychlá digesce, separace a identifikace melitinu, cytochromu c and hovězího albuminu (BSA) na čipu s kanálkem pro CE, injektorem a zónou pro hydrolýzu (širší kanálek obsahuje  $\mu\text{m}$  částice s ukotveným trypsinem) Dělení peptidů probíhá v užším kanálku ústícím do spektrometru. Průtok ca  $0.5 \mu\text{L}/\text{min.}$ , anodický EOF.

# Fenomény lab-on-chip

**Difuze**  $d^2 = 2Dt$       $d$ , vzdálenost, kterou částice urazí v čase  $t$   
 $D$ , difuzní koeficient částice (např.  $D_{\text{hemogl}} = 7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ )  
 $1 \text{ cm} \sim 8,3 \text{ dní}$   
 $10 \mu\text{m} \sim 0,7 \text{ s}$

**SAV** (poměr povrchové plochy k objemu) neboli **tvar**

v miniaturním měřítku důležitý vzrůst adsorpčních jevů  
(pozitivní či negativní)  
petriho miska  $3.5 \text{ cm}$  napůl plná vody ( $2.5 \text{ mL}$ )  $\sim 4,2 \text{ cm}^{-1}$   
mikrokanál  $50 \times 50 \mu\text{m} \times 3 \text{ cm}$  ( $75 \text{ nL}$ )  $\sim 800.6 \text{ cm}^{-1}$

miniaturizace má za následek **rychlou difuzi** makromolekul, **laminární tok**  
(k míchání dochází jen difuzí, zóny vzorku mohou být pohybovány po síti  
bez přílišného rozmytí) a **rychlý odvod tepla** u elektroforetických  
separací a org. reakcí

# Fenomény lab-on-chip

**Povrchové napětí** způsobuje u miniaturizovaných rozměrů nárůst kapilárních sil a tlaku a tím pohyb roztoku podél mikrokanálu.

napětí je výsledkem soudržnosti molekul roztoku s mezifází vzduch/roztok a je charakterizováno povrchovou silou ( $\gamma$ ) na zakřivenou plochu o ramenech  $R_1$  a  $R_2$

$\Delta P = \gamma (1/R_1 + 1/R_2)$  .. lze v několika několika krocích zjednodušit pro kapku..

proto je vzdálenost po kterou se bude roztok pohybovat přímo úměrná této síle a nepřímo průměru kapiláry/mikrokanálu

..nepřímo to znamená, že pavouci s osmi nohama se udrží na vodě, ale člověk by potřeboval nohy dlouhé 2.4 km a široké 800 m.. tento údaj z literatury není repřepočítán..

# Mikrofabrikační postupy

Návrh chemického čipu (testování konceptů, grafika)

Litografické postupy (měkká litografie, LIGA)

Leptání (chemické postupy, DRIE)

Něco o křemíku (trocha krystalografie)

Replikace (atmosferické odlití, tepelné otisky)

Lepení (bonding, laminace teplem, chemické postupy)

Balení čipů (packaging, příprava na použití čipu)





# Mikrofabrikační postupy

## Návrh chemického čipu (testování konceptů, grafika)

příprava čipu začíná úvahou o funkci zařízení, obsahu komponent a jejich uspořádání -> a z toho vyplývajících makroskopických rozměrech. Začátkem je návrh v grafickém programu (AI, Corel)

ty jsou podmíněny navíc velikostí substrátu (materiálu pro přípravu) a jeho cenou (dostupnou velikostí) většinou 2 nebo 4'' ~ 5-10 cm, ovšem je možné použít i substráty mnohem větší 12''

je vhodné uspořádat jednotlivá zařízení tak, aby se jich na substrát vešlo co nejvíce



# Mikrofabrikační postupy

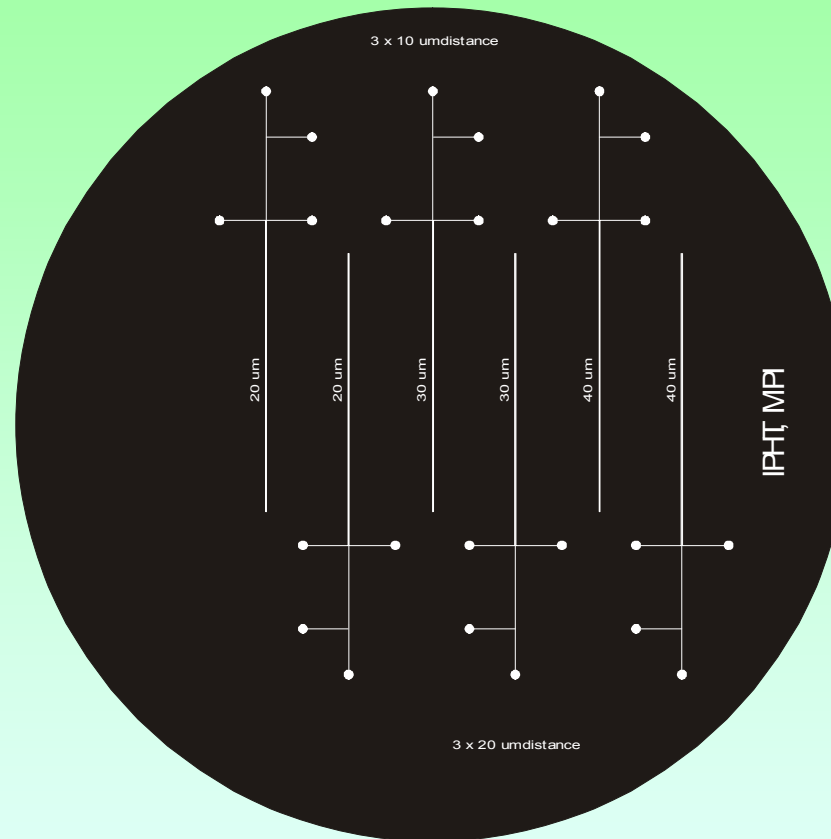
## Litografie

v dalších krocích je použito litografického postupu a leptání pro přenos vzoru (**pattern transfer**) na substrát.

V **měkké litografii** je použita PMMA folie obsahující černé (neprůsvitné) a průsvitné zóny (maska). Substrát čipu je ovrstven světlocitlivou vrstvou kopolymerní látky 'fotoresistem'. Používá se rotačního ovrstvení (spincoating) s využitím gradientů otáček, nebo sprayového ovrstvení (spraycoating), jež se v poslední době bouřlivě rozvíjí (Suss Microtech, Mnichov, etc.), maska se uspořádá na substrátu a osvítí UV světlem. Dojde k zesíťování polymeru a zbylý oligomer se vymyje ve vývojce. Vzniklé struktury se dále tepelně zpracují.



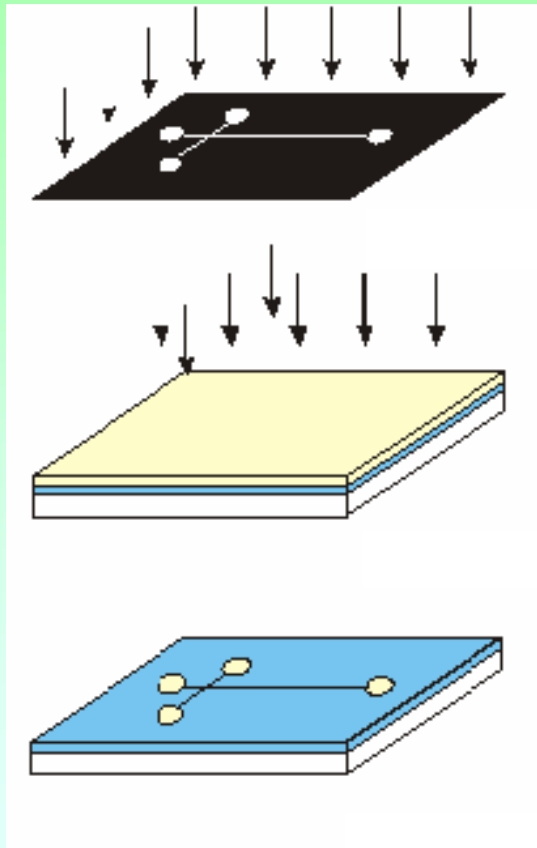
# Mikrofabrikační postupy



v této litografii je většinou vytvořen negativ navrhovaného systému v měřítku 1:1, typické šířky stop jsou 50-70  $\mu\text{m}$  a průměry rezervoárů 1.6 či 2 mm. Návrh je poté uspořádán na ploše a vytištěn s rozlišením min 4000 DPI na film či folii



# Mikrofabrikační postupy



Sestavení litografického sendviče  
-expozice fotorezistu UV světlem

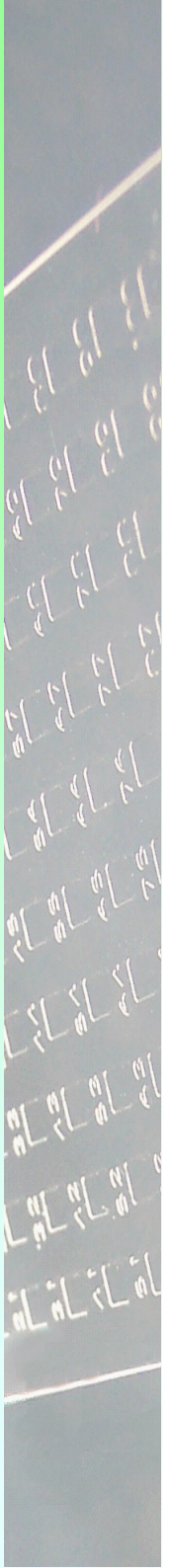
substrát ovrstvený negativním fotorezistem  
(v některých případech obsahuje další vrstvy,  
např  $\text{SiO}_2$ )

vyvinutý a tepelně stabilizovaný substrát  
s polymerním 'templátem' struktury

# Mikrofabrikační postupy

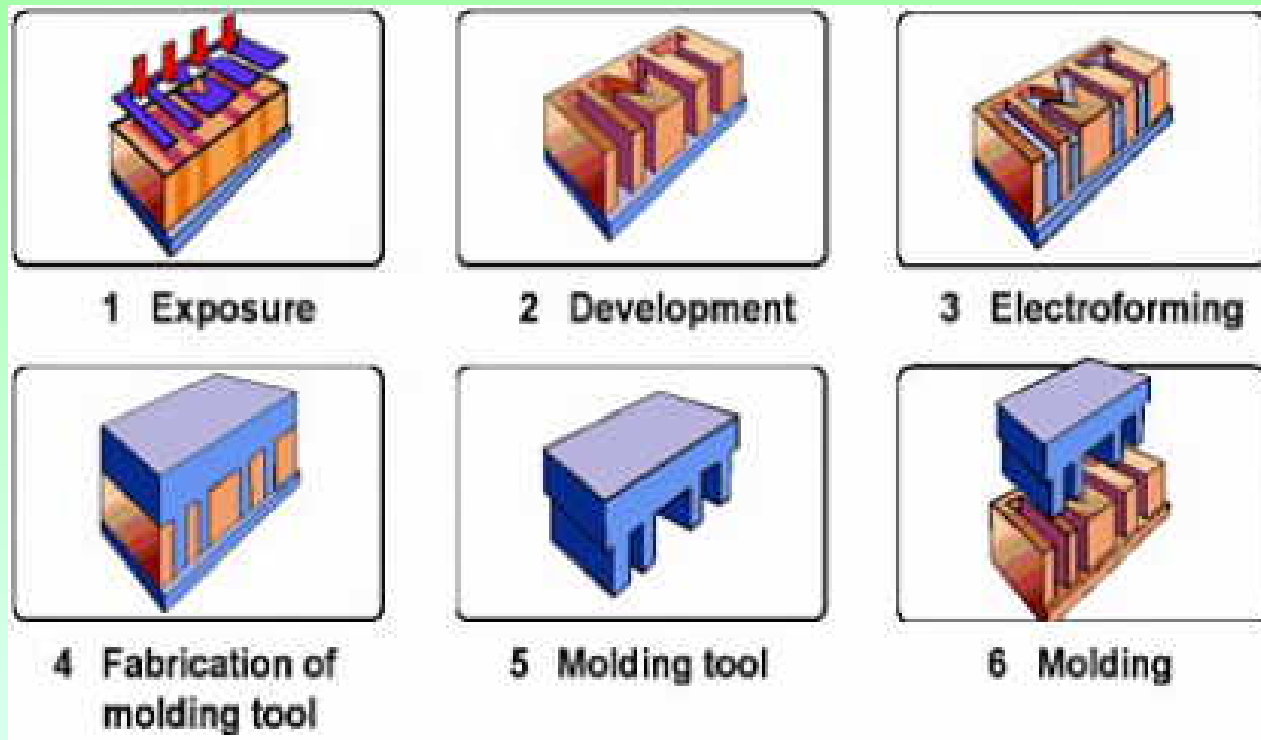
v **tvrdé litografii** (hard contact) je tenká kovová maska připravena na skleněné desce (cena > 4000 €) jež je upevněna na substrátu pomocí vakua. Vzor se přenese na substrát po zaostření speciálním mikroskopem (mask aligner). Zbylý postup je podobný

**LIGA** (Röntgen **LI**thographie-**G**alvanik-**A**bformung) jednou z nej-důležitějších technik v mikrofabrikaci obecně, vyvinuta v 80 letech v Helmholtzově ústavu nukleární chemie v Karlsruhe. Umožňuje sériovou výrobu mikrokomponent pro složitější integrované systémy



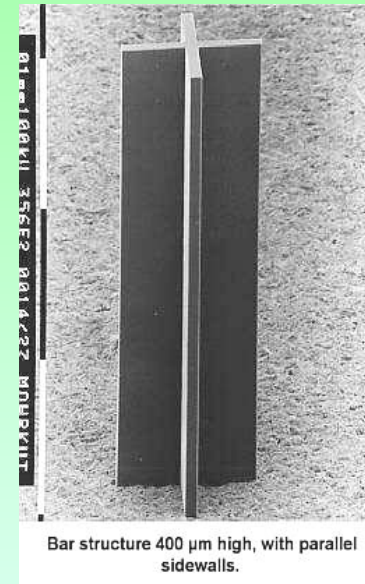


# Mikrofabrikační postupy



po ovrstvení resistem jsou substráty osvětleny synchrotronovým zářením, jež je vysoce kolimované. Ozářené plochy se vypláchnou vývojkou a do uvolněných mezer je elektrolyticky redukován kov - takto se vytvoří master pro pozdější odlití polymerního čipu/komponenty/

# Mikrofabrikační postupy

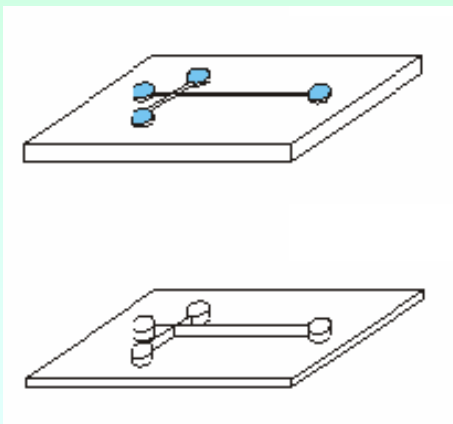


tyto komponenty mají vysoký **poměr výšky ku šířce** (HAR, height aspect ratio) jeden z parametrů 'kvality' čipu. Tato metoda umožňuje vytvořit prvky z kovu nebo plastu s výškou až 1mm a rozlišením 0.2  $\mu\text{m}$ , například soustavy optických mikročoček, difuzní filtry molekul, rotační magn. pumpy v mikročipech

# Mikrofabrikační postupy

## Leptání

v dalším kroku je třeba vytvořit 3D struktury již na substrátu samotném. K tomu se využije rozdílných vlastností (stability) obnaženého substrátu a substrátu s vyvinutým resistem. Používá se **chemického leptání** bázemi a kyselinami, nebo **suchého leptání** vaporizací substrátu (Dry Etching) např. paprskem iontů (výboj Ar 1keV) nebo reaktivní plasmou ( $\text{SF}_6$  v Ar)



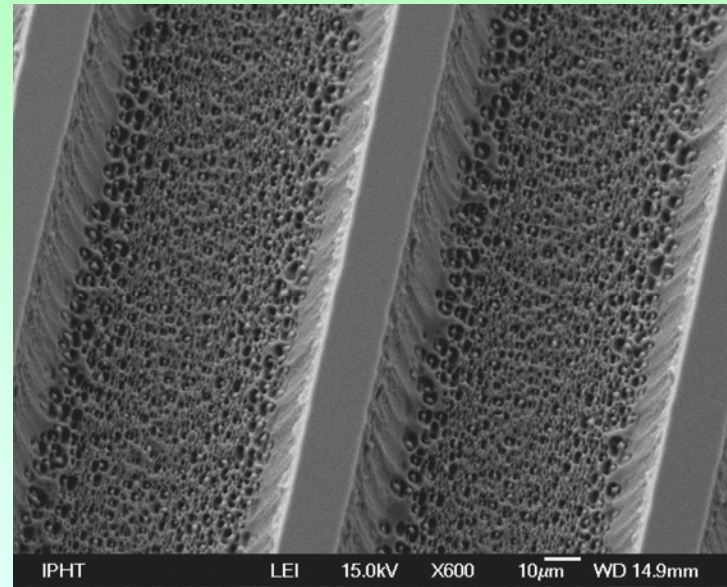
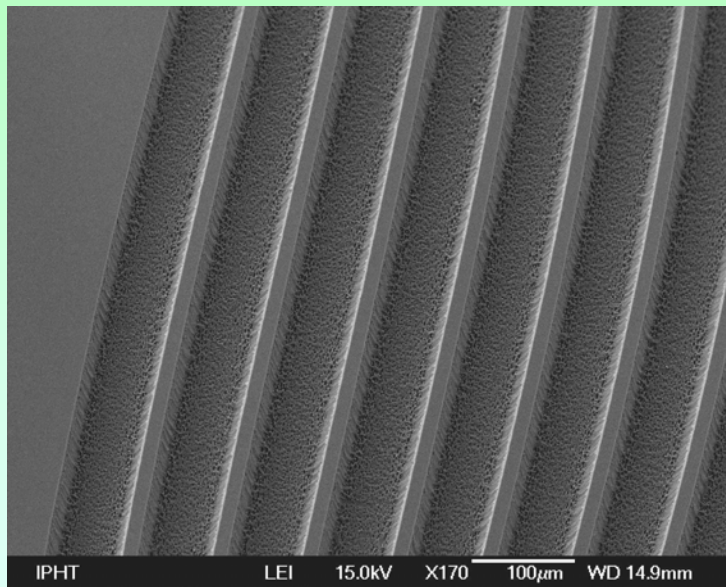
substrát se vzorem krytým oxidem a negativním resistem vystaven působení reaktivních sil

vzniklá 3D struktura po odstranění všech krycích vrstev



# Mikrofabrikační postupy

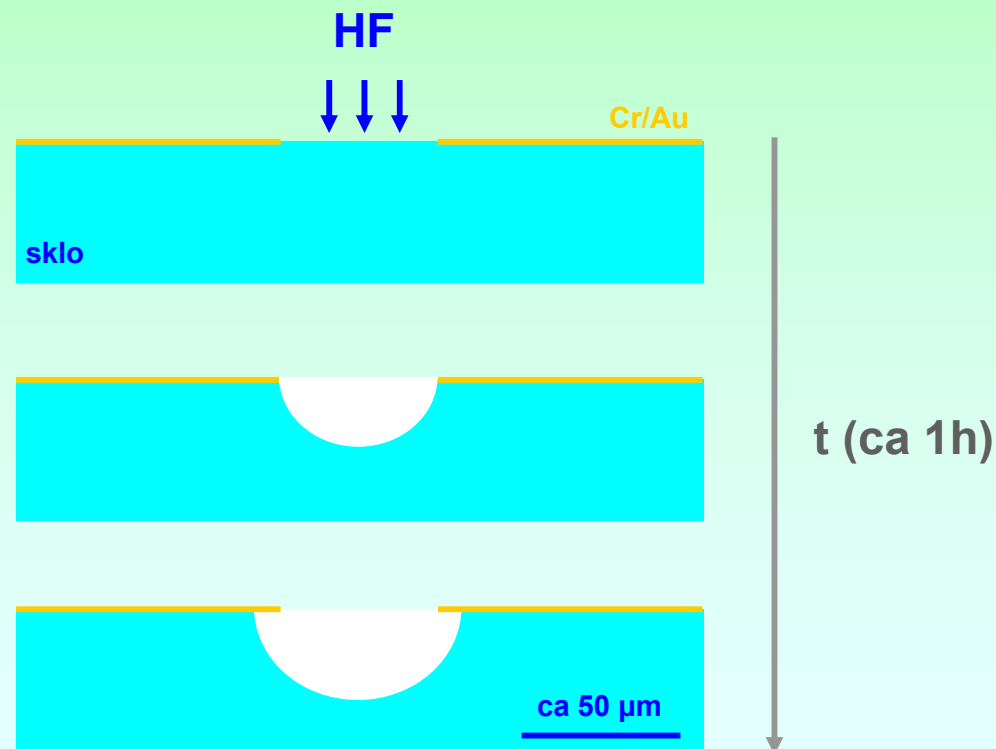
suché, neboli **fyzikální metody** leptání mají za následek **isotropní** odstranění materiálu a rozšiřování stop



HAR plasmové leptání - testovací pyrex deska, vyšší rozlišení

# Mikrofabrikační postupy

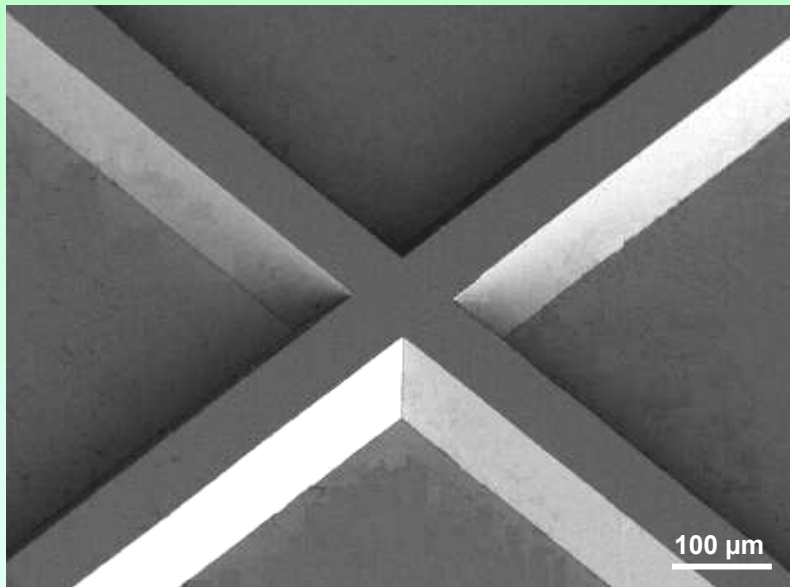
podobné účinky má **chemické leptání** skla kyselinou fluorovodíkovou - k rozšiřování stop dochází isotropně. V případě použití kovové masky pro definování šířky mikrokanálu dochází k 'podleptání' (underetch)





# Mikrofabrikační postupy

další **chemické metody** umožňují **anisotropní** leptání (směrově definovatelné odstranění materiálu a rozšiřování stop) pokud je použit krystalický materiál např. křemík s vrstvou  $\text{SiO}_2$  nebo jiných oxidů či karbidů



**tři fáze:**

- 1) odstranění vrstvy oxidu na obnažené části desky HF (vzor chráněn resistem)
- 2) postupné odstranění substrátu bází, např. 40% KOH, 1% IPA při 60°C (20  $\mu\text{m}/\text{h}$ )
- 3) odstranění oxidu ze vzoru

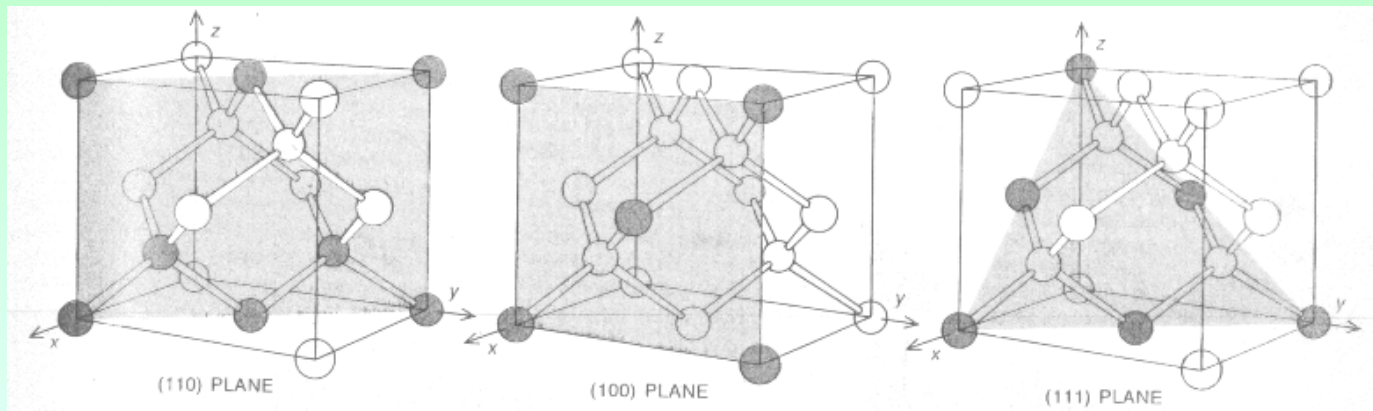
KOH leptání křemíku - detail injekčního kříže u CE mikročipu (nároky na kvalitu - rozlišení masky)

# Mikrofabrikační postupy

## Křemík

specifické vlastnosti křemíku umožnily jeho rozšíření v přípravě MEMS. Je obráběn chemickými a fyzikálními prostředky mnohem snáze, než mechanicky, navíc je to oxidovatelný (T, H<sub>2</sub>O) polovodič

## Trocha krystalografie

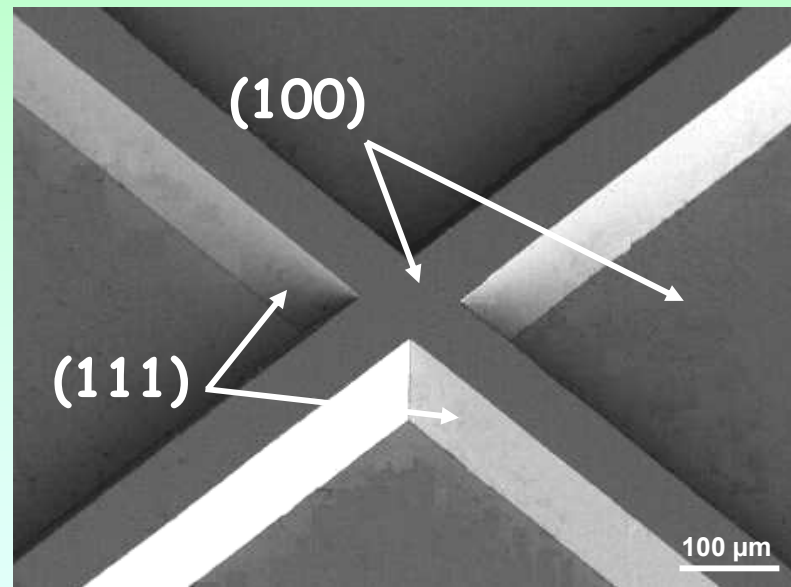


má prostorově centrovanou **kubickou strukturu** symetrie, jeho molekulové orbitály jsou sp<sup>3</sup> hybridizované (podobný diamantu)

**Millerovy indexy** popisují orientaci ploch krystalu na substrátu, jsou to kolmice na tyto plochy [např (100) je plocha obsahující pět atomů mřížky]

# Mikrofabrikační postupy

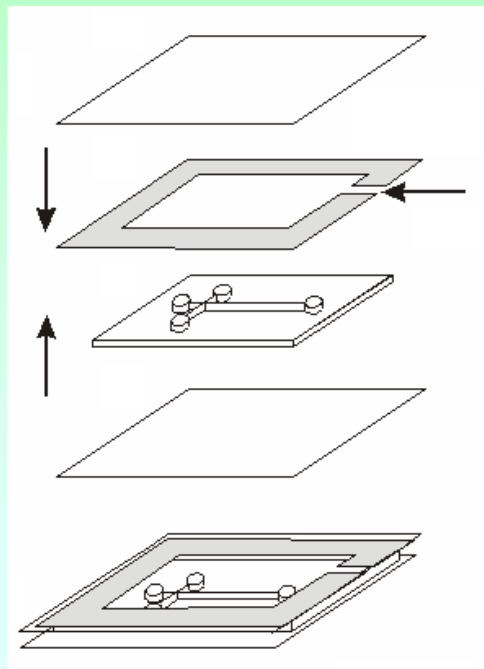
proto se tyto indexy používají pro označení typu křemíkových substrátů a podle těchto ploch se volí **způsob leptání**. Směr (100) je v chemické mikrofabrikaci neoblíbenější, ačkoliv např. v senzorice jsou často používány (110) pro leptání trysek a filtrů



# Mikrofabrikační postupy

## Replikace

v případě skleněných nebo křemíkových zařízení se vyleptané substráty rozřežou na jednotlivé čipy



## polymerní čipy:

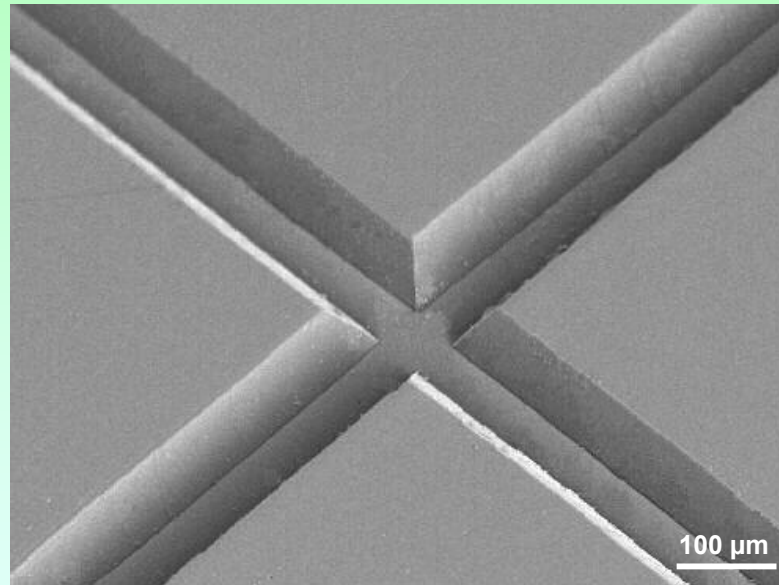
výhodná cena a možnost připravit mnoho čipů z jedné vzorové desky (masteru).. používá se buď zvýšené teploty ( $T_g$ ) pro vytvoření otisku (hot embossing)

alternativou je *in situ* odlití, neboli polymerace ve formách (molding) obsahujících master, jež je možná za zvýšeného, nebo atmosferického tlaku



# Mikrofabrikační postupy

výhodou odlití oproti otiskům za tepla, je **přesnost** replikace, někdy též označovaná rozlišení ( $< 1 \mu\text{m}$ ) a nepřítomnost tepelné relaxace (změny tvaru v rozích etc.)



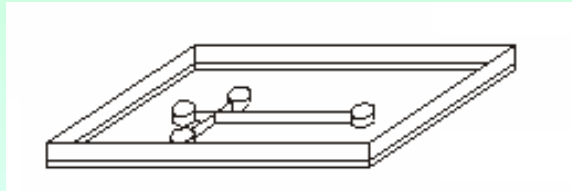
PMMA odlitek mikrostruktury pro CE-ED čip



# Mikrofabrikační postupy

## Lepení (bonding)

předposlední fází mikrofabrikace je překrytí otevřených kanálků na čipu krycí deskou (v případě skleněných čipů 0.5 mm nestrukturovaný čip skleněného substrátu, v případě plastových zařízení je to laminační folie ze stejného materiálu, jako je čip)



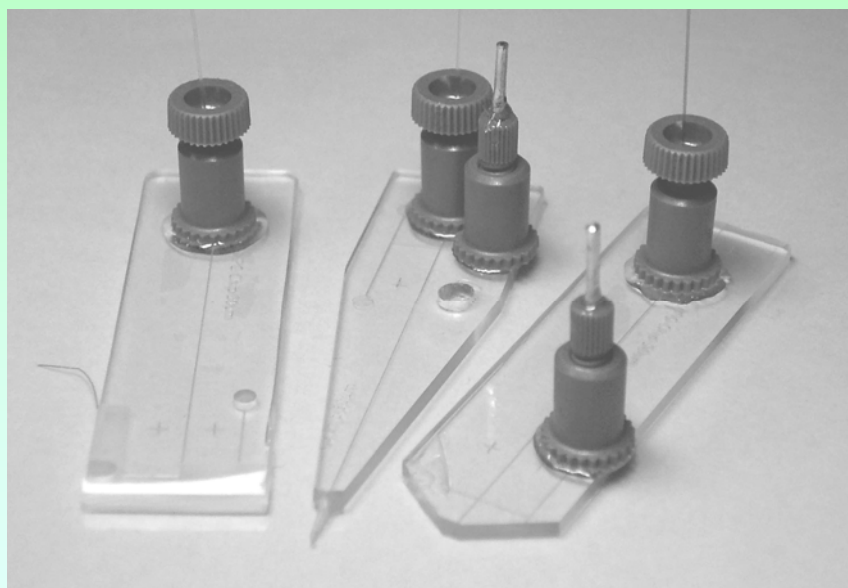
použije se opět teploty skelného přechodu ( $T_g$ ) materiálu (108 °C pro PMMA). Za této teploty se přitiskne v klemě čip mikrokanálky dolů na folii a zchladí na RT

některé chemické postupy (roztoky  $\text{SiO}_2$  v NaOH a ohřátí) se používají pro čipy skleněné, pro Si/ $\text{SiO}_2$  MEMS se nejčastěji používá **anodické lepení** (migrace iontů materiálu při zvýšené teplotě a napětí 400 V).

# Mikrofabrikační postupy

## Finalizace polymerních čipů

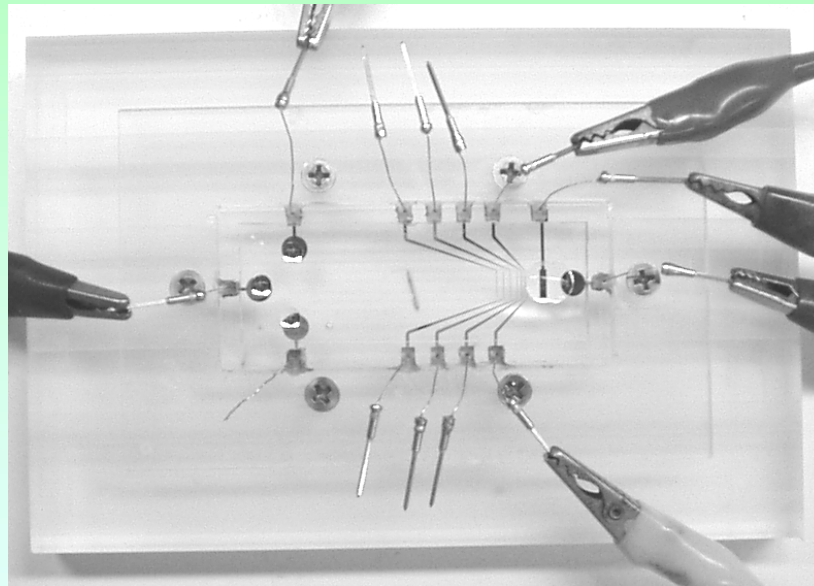
po laminaci mikrokanálků je nutno integrovat přívodní kapiláry, CE elektrody, nebo senzorové nízkonapěťové elektrody



výhodné je využití nanoportů (Upchurch) na fluidních čipech např. ESI emittech pro přívod kapilár a HV elektrod (on-line junction)

# Mikrofabrikační postupy

existuje mnoho dalších užitečných postupů, například elektrolytické, chemické či fyzikální **pokovení substrátů** (Ni, Au, Cu), **Lift-off** techniky, kdy je část kovové vrstvy sejmuta (použití pro elektrické obvody na čipu, '**packaging**' neboli upevnění mikročipů v makroskopickém okolí a příprava hybridních zařízení..



Hybridní PDMS/Pyrex čip s integrovanými Pt elektrodami v PMMA kazetě pro amperometrické měření neurotransmitterů (high/low-tech systém)

# Integrace analytických operací

na začátku již zmíněny cíle a prostředky analytických mikrosystémů:

**integrace operací a prvků**

**miniaturizace celé sestavy**

jednou z hlavních operací je dávkování vzorku, dále pohyb roztoku po čipu (pumpování) jeho separace/sběr frakcí a detekce. Za tímto účelem je použito několika principů

**tlaku**

**elektroforetického pohybu/EOF**

**elektrochemických a spektrálních metod**





# Integrace analytických operací

na začátku již zmíněny cíle a prostředky analytických mikrosystémů:

**integrace operací a prvků**

**miniaturizace celé sestavy**

jedním z hlavních úkolů je dávkování vzorku, dále pohyb roztoku po čipu (pumpování) jeho separace/sběr frakcí a detekce. Za tímto účelem je použito několika principů

**tlaku**

**elektroforetického pohybu/EOF**

**elektrochemických a spektrálních metod**



# Integrace analytických operací

na začátku již zmíněny cíle a prostředky analytických mikrosystémů:

integrace operací a prvků

miniaturizace celé sestavy

jedním z hlavních úkolů je **dávkování vzorku**, dále **pohyb roztoku** po čipu (pumpování) jeho **separace/sběr frakcí** a **detekce**. Za tímto účelem je použito několika principů

tlaku

elektroforetického pohybu/EOF

elektrochemických a spektrálních metod

# Integrace analytických operací

na začátku již zmíněny cíle a prostředky analytických mikrosystémů:

**integrace operací a prvků**

**miniaturizace celé sestavy**

jedním z hlavních úkolů je dávkování vzorku, dále pohyb roztoku po čipu (pumpování) jeho separace/sběr frakcí a detekce. Za tímto účelem je použito několika principů

**tlaku**

**elektroforetického pohybu/EOF**

**elektrochemických a spektrálních metod**

# Integrace analytických operací

na začátku již zmíněny cíle a prostředky analytických mikrosystémů:

**integrace operací a prvků**

**miniaturizace celé sestavy**

jedním z hlavních úkolů je dávkování vzorku, dále pohyb roztoku po čipu (pumpování) jeho separace/sběr frakcí a detekce. Za tímto účelem je použito několika principů

**tlaku**

**elektroforetického pohybu/EOF**

**elektrochemických a spektrálních metod**

# Integrace analytických operací

na začátku již zmíněny cíle a prostředky analytických mikrosystémů:

**integrace operací a prvků**

**miniaturizace celé sestavy**

jedním z hlavních úkolů je dávkování vzorku, dále pohyb roztoku po čipu (pumpování) jeho separace/sběr frakcí a detekce. Za tímto účelem je použito několika principů

**tlaku**

**elektroforetického pohybu/EOF**

**elektrochemických a spektrálních metod**



# Integrace analytických operací

## Dávkování vzorku na čip:

je využíváno **hydrodynamického toku** (hydrostatickým tlakem, pomocí gravitace, dávkování z kapky na rezervoáru - kapilární silou

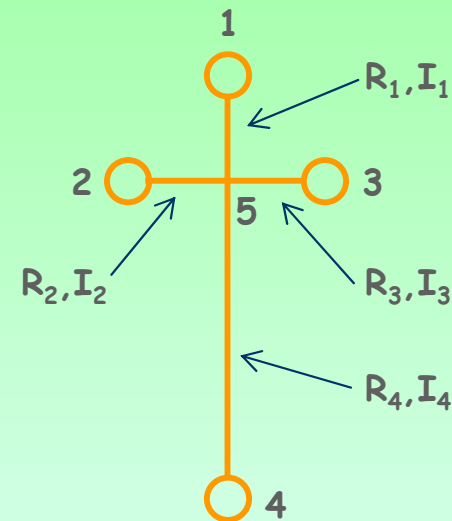
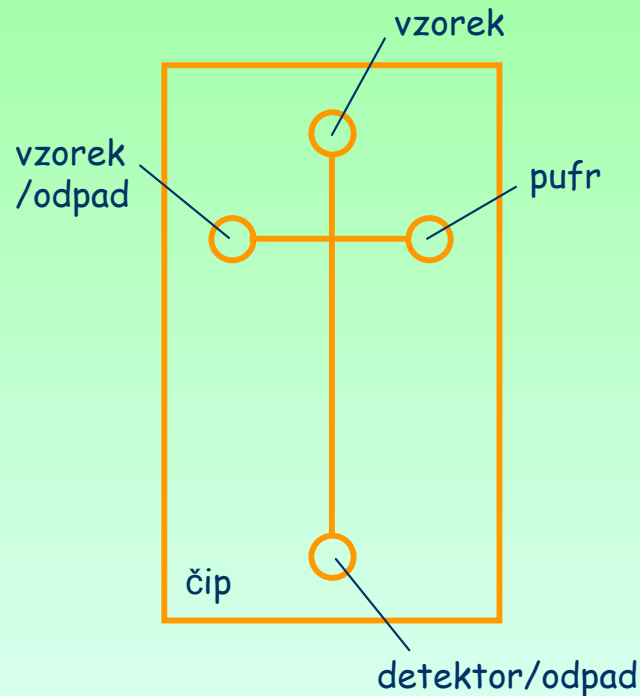
nebo **elektrokineticky a elektroosmotickým tokem** - dávkování krátkých přesných zón, někdy nazývané "aliquoting".

nejběžnějším mikrofluidním schematem je tzv. 'prostý kříž', jenž je často využíván pro kapilární zónovou elektroforézu na čipu (MCE). Obsahuje čtyři rezervoáry, vzorek se dávkuje elektrokineticky napětím





# Integrace analytických operací

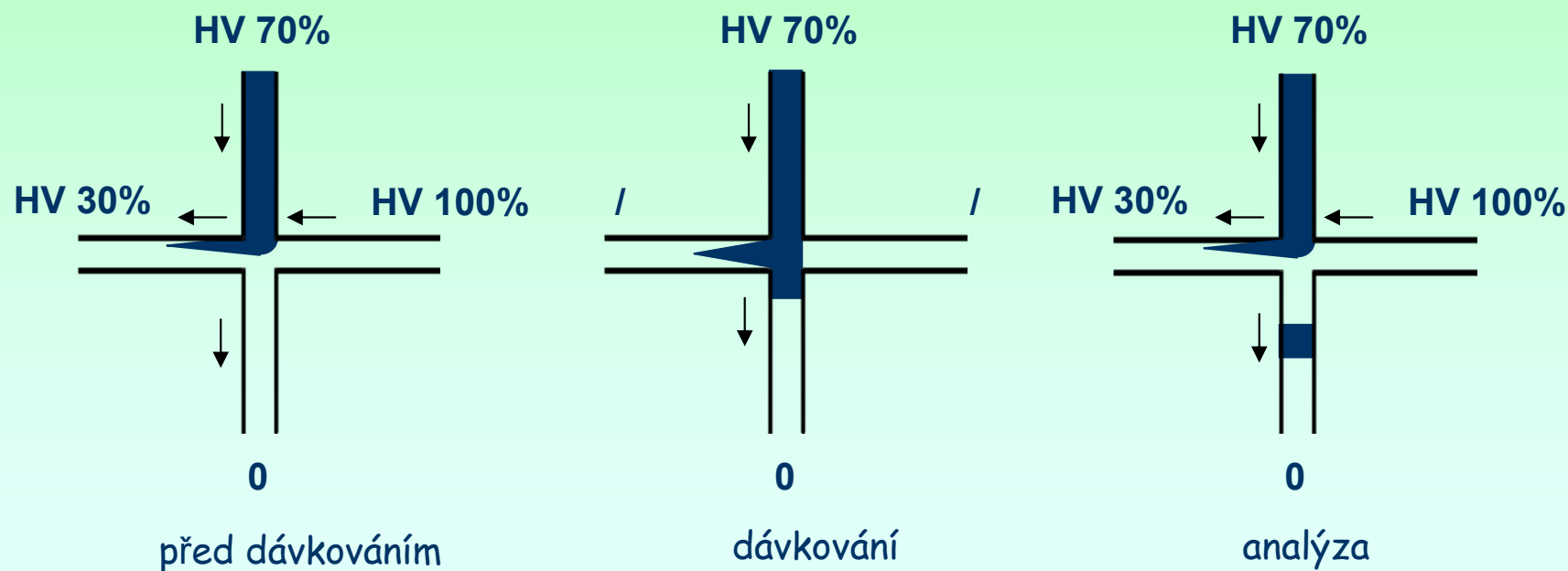


tento systém připomíná **elektrický obvod** obsahující 5 uzlů a čtyři ramena s danými odpory (platí Ohmův a Kirchhoffův zákon). Je možné spočítat, jaké napětí potřebujeme aplikovat na jednotlivé uzly, aby tekla proud určitým směrem

# Integrace analytických operací

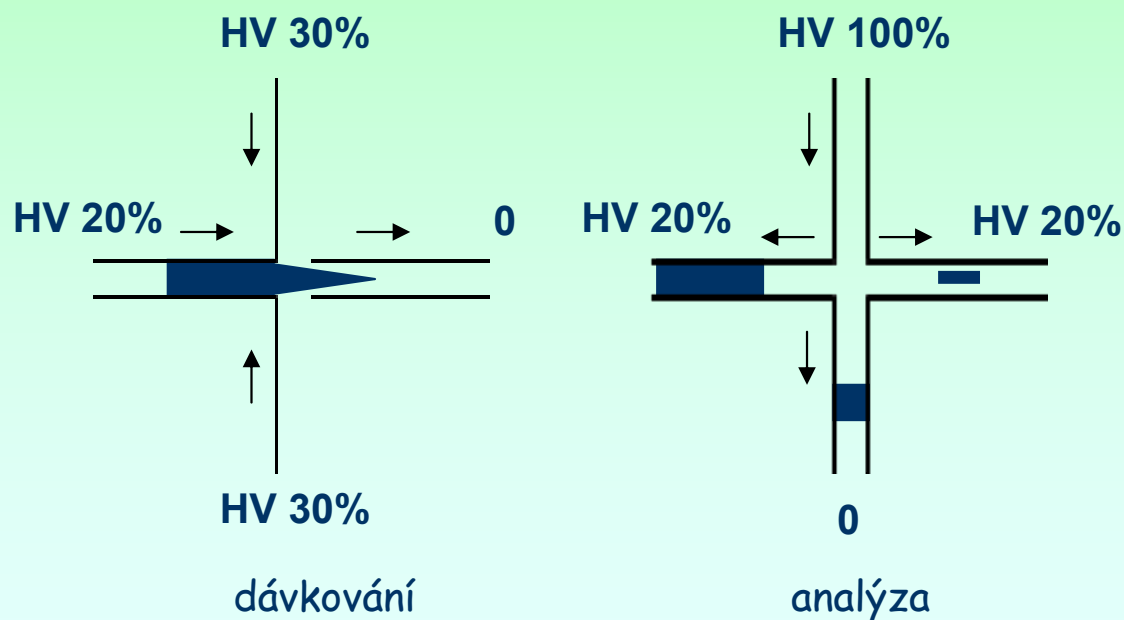
dávkování lze provést třemi způsoby:

**gated injection** je metoda kde se aplikuje napětí na tři rezervoáry při dávkování i analýze. Celý analytický proces má dvě fáze



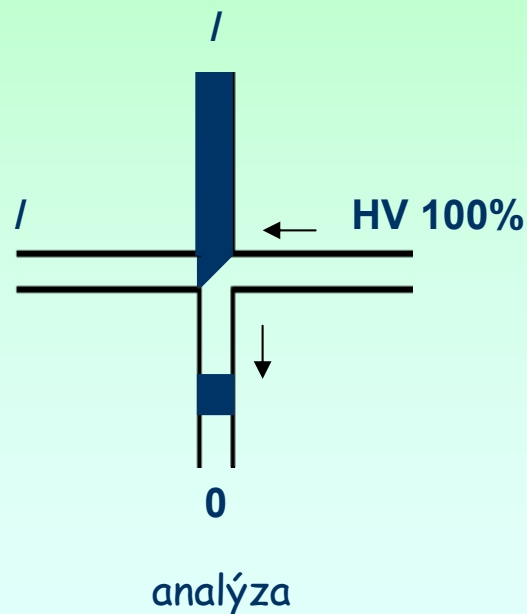
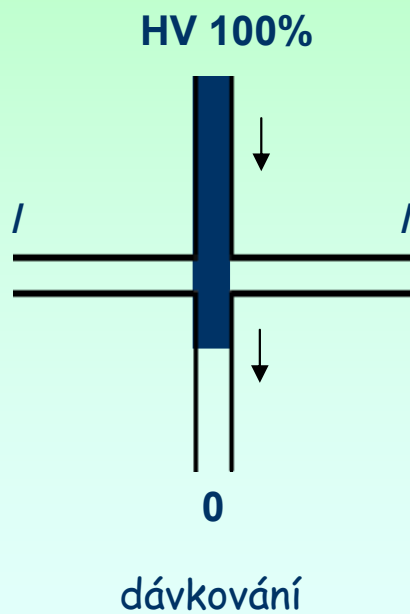
# Integrace analytických operací

**pinched injection** je podobné dávkování, celá metoda má opět 2 kroky

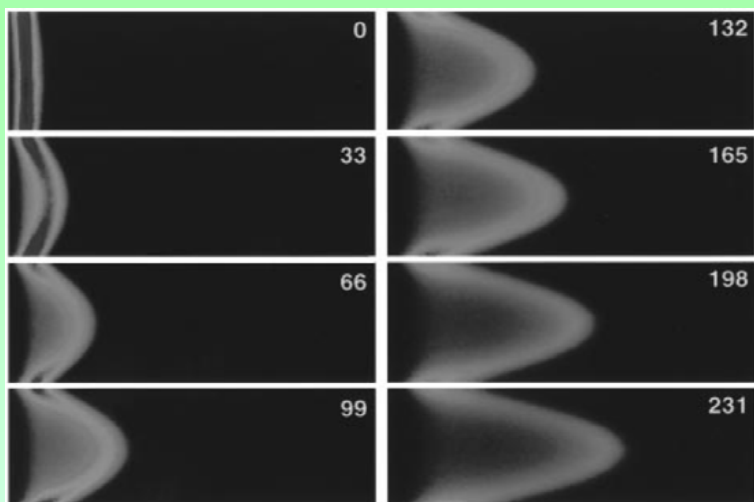


# Integrace analytických operací

Dávkování s jednoduchým zdrojem HV je nejjednodušší možné dávkování, metoda má 2 kroky a používá přepnutí HV z rezervoáru pufru na rezervoár vzorku a zpět

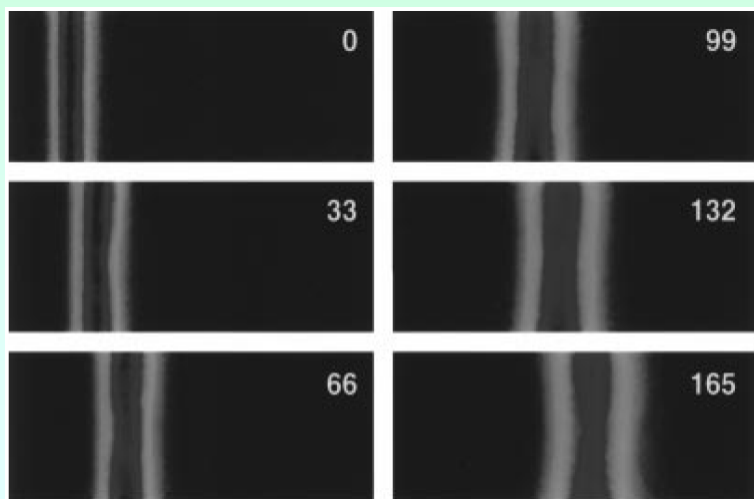


# Integrace analytických operací



## Pohyb vzorku po čipu:

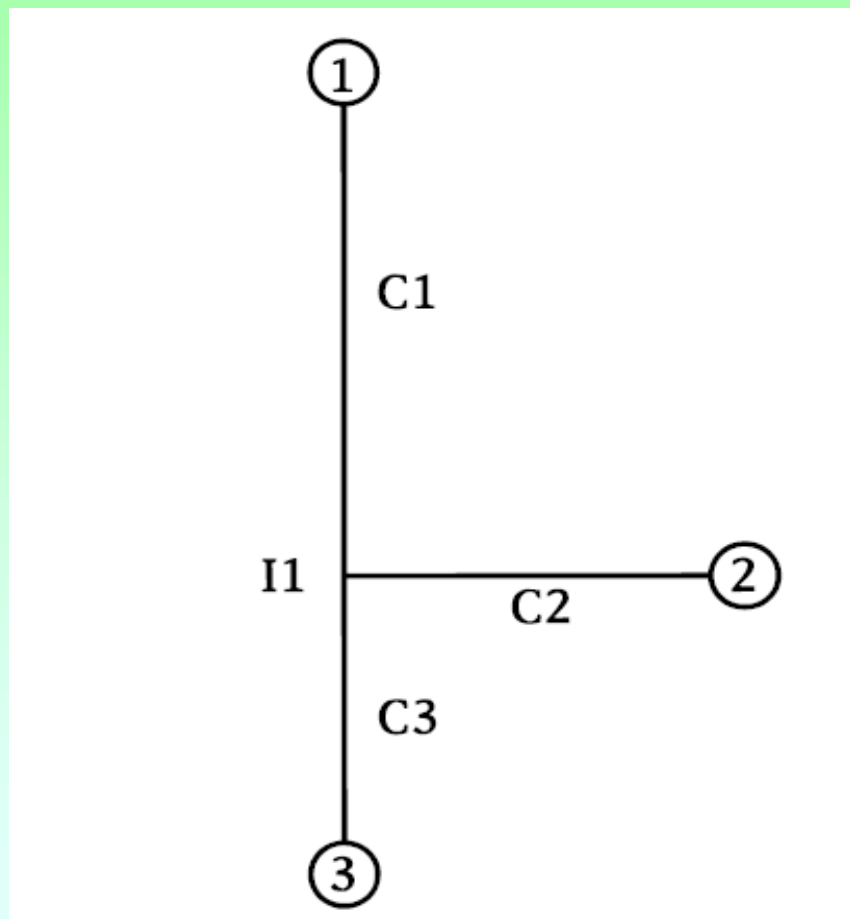
srovnání pohybu vzorku tlakem -  
**hydrodynamického toku** v 100  $\mu\text{m}$  ID  
křemenné kapiláře (scany v ms po zapnutí,  
dextran modifikovaný fluoresceinem )



s **elektroosmotickým tokem** (200V/cm,  
použit rhodamin) je vidět podstatně užší  
zóny a minimální rozmytí vzorku..



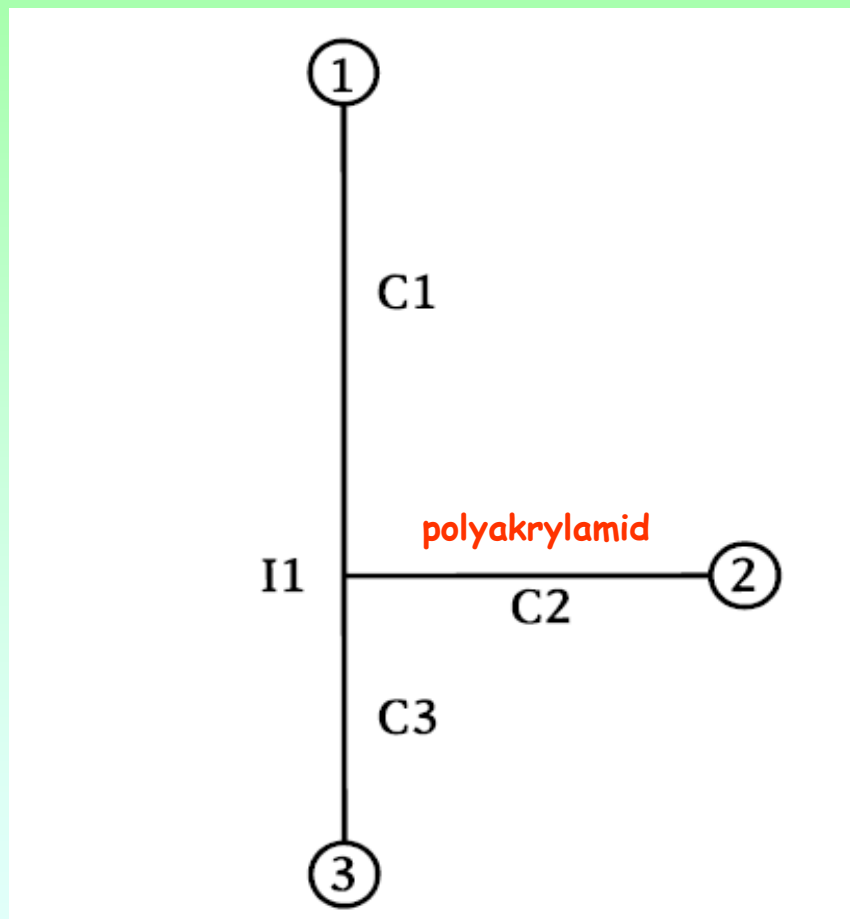
# Integrace analytických operací



Nepřímá EOF pumpa generující hydrodynamický tok:

mikropumpa pro pohyb roztoku k detektoru integrovaná jako vedlejší rameno mikrofluidního čipu využívající rozdílů elektroosmotického toku v hlavním mikrokanálu C1C3 a v bočním kanálu C2

# Integrace analytických operací

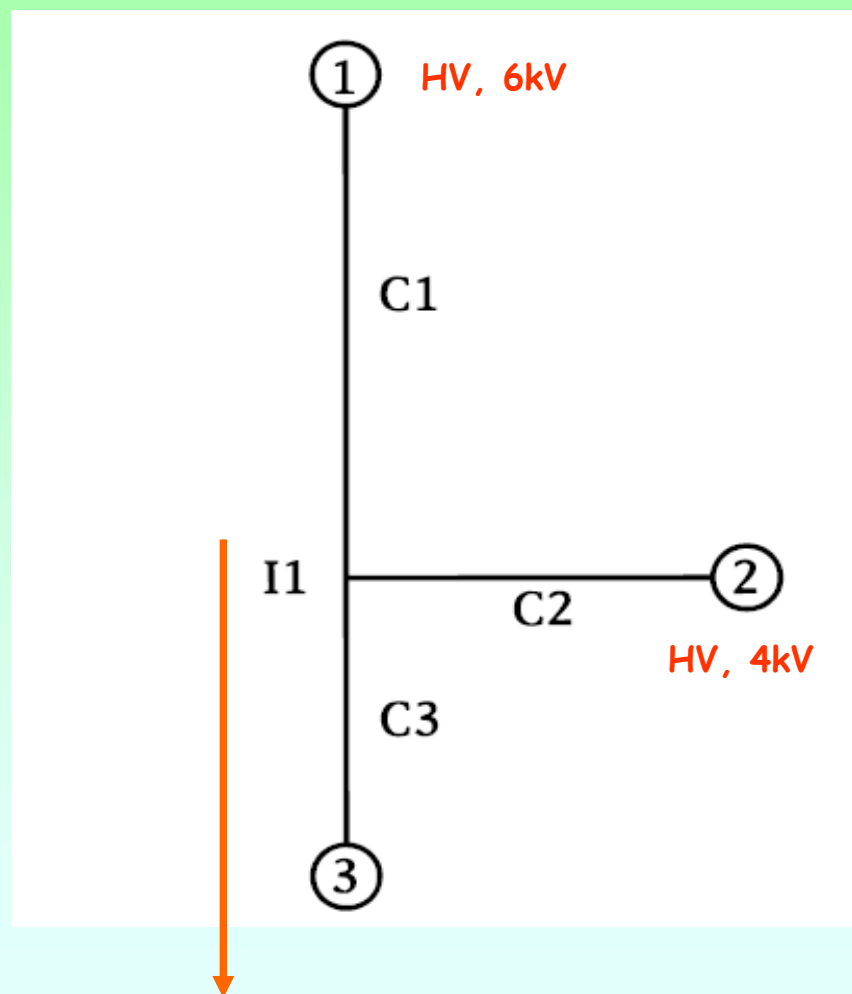


Nepřímá EOF pumpa generující hydrodynamický tok:

mikropumpa pro pohyb roztoku k detektoru integrovaná jako vedlejší rameno mikrofluidního čipu využívající rozdílů elektroosmotického toku v hlavním mikrokanálu C1C3 a v bočním kanálu C2

EOF je v tomto mikrokanálu pasivován PAA

# Integrace analytických operací

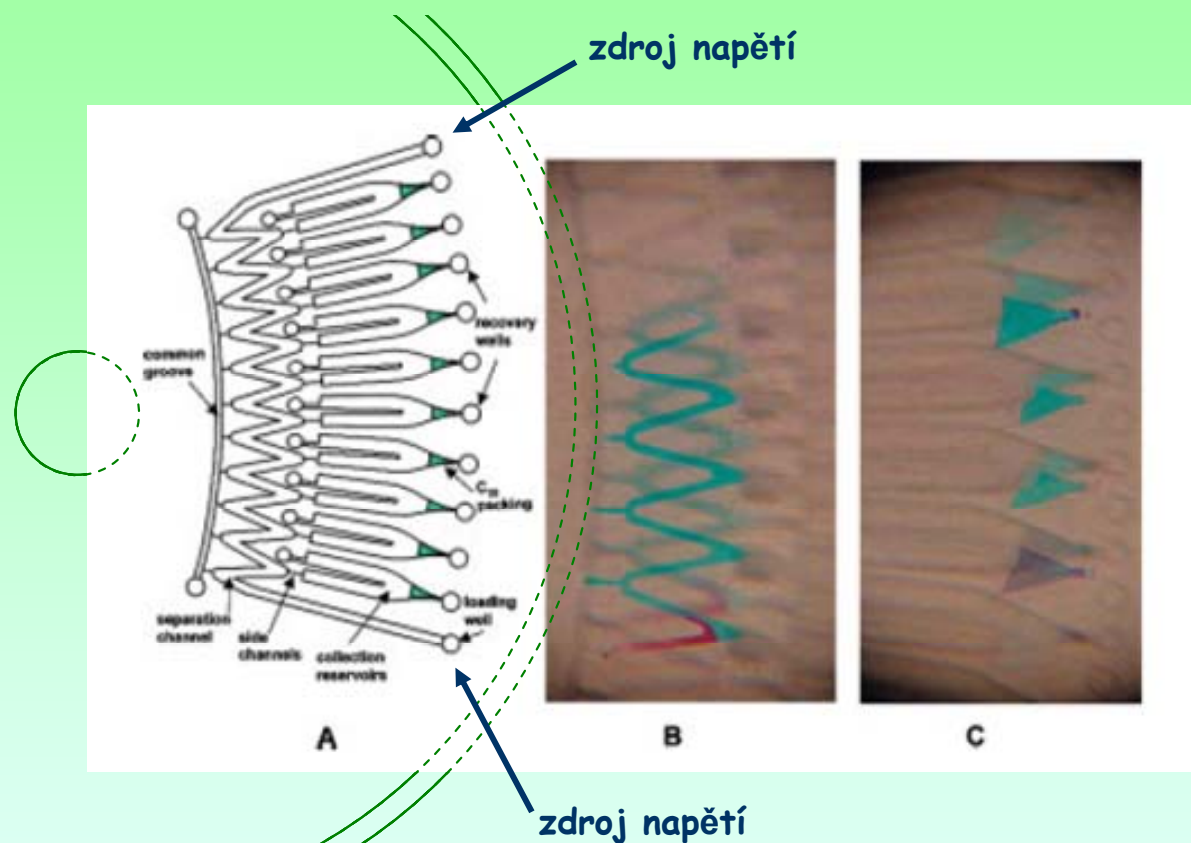


Nepřímá EOF pumpa generující hydrodynamický tok:

mikropumpa pro pohyb roztoku k detektoru integrovaná jako vedlejší rameno mikrofluidního čipu využívající rozdílů elektroosmotického toku v hlavním mikrokanálu C1C3 a v bočním kanálu C2 pasivovaným PAA

rameno C3 není zapojeno do elektrického pole, vzniká hydro-dynamický tlak, tok se rozděljuje mezi 2,3 a dochází k pohybu roztoku k detektoru

# Integrace analytických operací



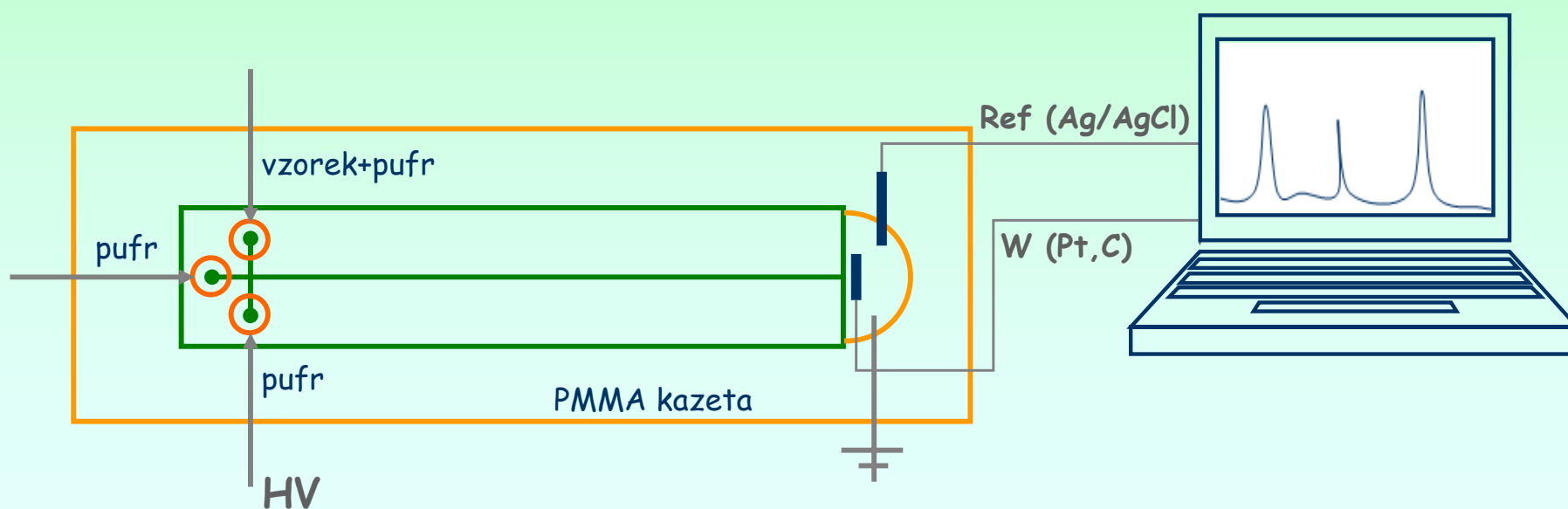
## Sběr frakcí pro ITP:

isotachoforetická separace probíhá v zakřiveném širším mikrokanálu (A), zóny jsou sbírány v druhém kroku pomocí odstředivé síly na CD mechanice (B,C)

# Integrace analytických operací

## Integrovaná elektrochemická detekce:

Většina detektorů je stále ještě mnohem větší, než analytické mikročipy. Proto jsou vyvíjeny integrovatelné způsoby detekce. Velice výhodnými se jeví elektrochemické metody (amperometrie, vodivostní detektory), kde jsou integrovány detekční obvody přímo na čipu



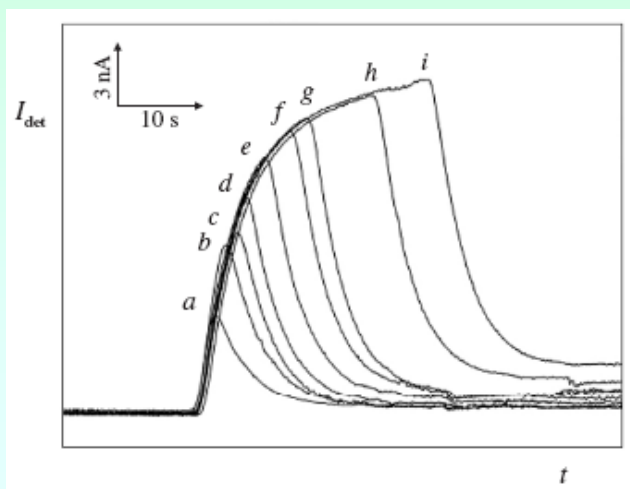


# Elektrochemické aplikace

## MIKROFLUIDNÍ ZAŘÍZENÍ PRO PRŮTOKOVOU INJEKČNÍ ANALÝZU S ELEKTROCHEMICKOU DETEKCÍ

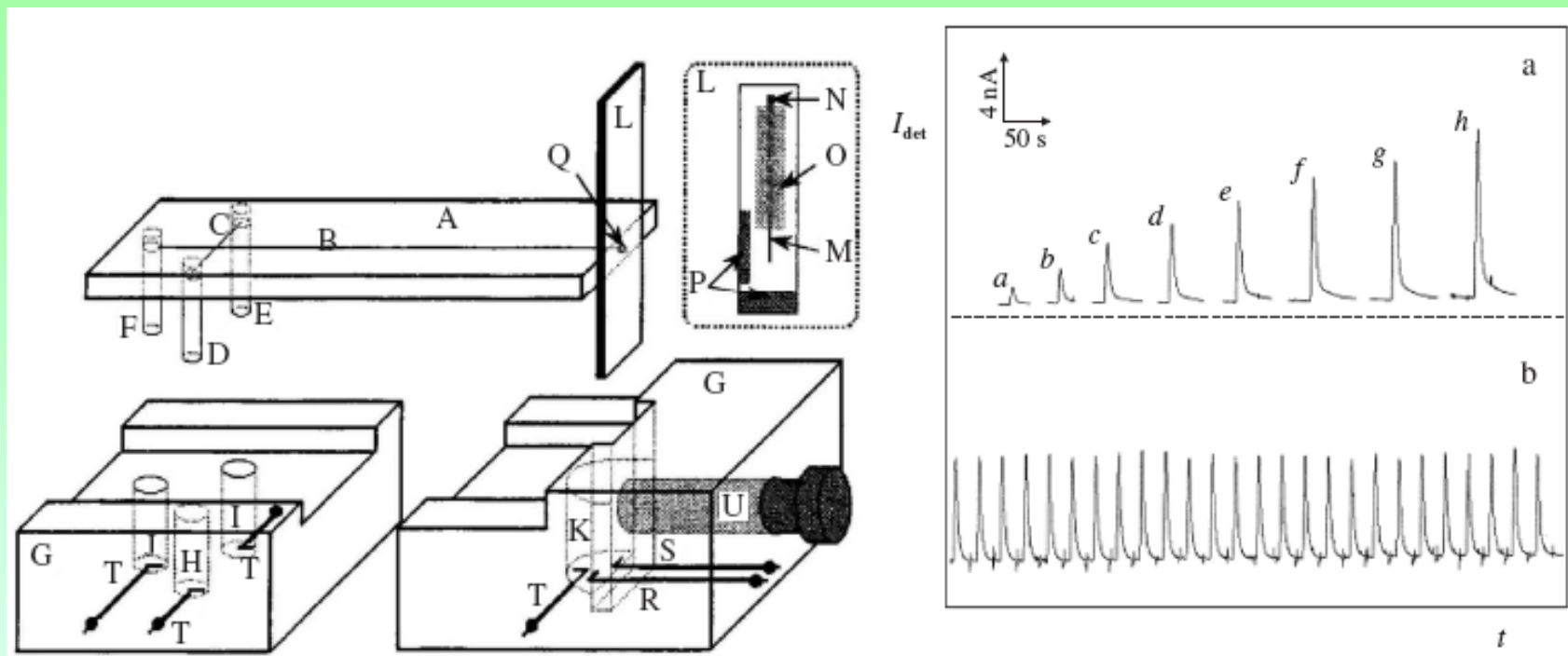
ALEXANDR MUCK JR.<sup>a</sup>, JOSEPH WANG<sup>b</sup>  
a JIŘÍ BAREK<sup>c</sup>

možnost integrace mikroprůtokové injekční analýzy na mikrofluidním zařízení byla studována na skleněném čipu v pH podmínkách, kdy nejsou látky ionizovány a jsou pumpovány na čipu elektroosmotickým tokem. Jako integrovaný detektor byla použita **síťotisková elektroda** (SPE) modifikovaná Au pro amperom. detekci



vliv injekční doby na tvar píku p-kresolu, dávkování 1,2,3,4,6,8,10,15, 20 s, PB pufr pH 7.9, 3kV catodický tok, 0.9 V Au-uhlík

# Elektrochemické aplikace



integrované mikroprůtokové injekční zařízení  
s detailem pracovní síťotiskové elektrody

odezva detektoru na vzrůstající  
koncentrace dopaminu 10-80  $\mu\text{mol}$ , a jeho  
opakované dávkování do proudu pufru

tento systém byl použit pro **stanovení glukózy** po enzymatické reakci s  
glukosoxidázou a detekci vzniklé kys. glukonové na pracovní elektrodě s mMol  
citlivostí umožňující 6 analýz ve 3 min.

# Elektrochemické aplikace

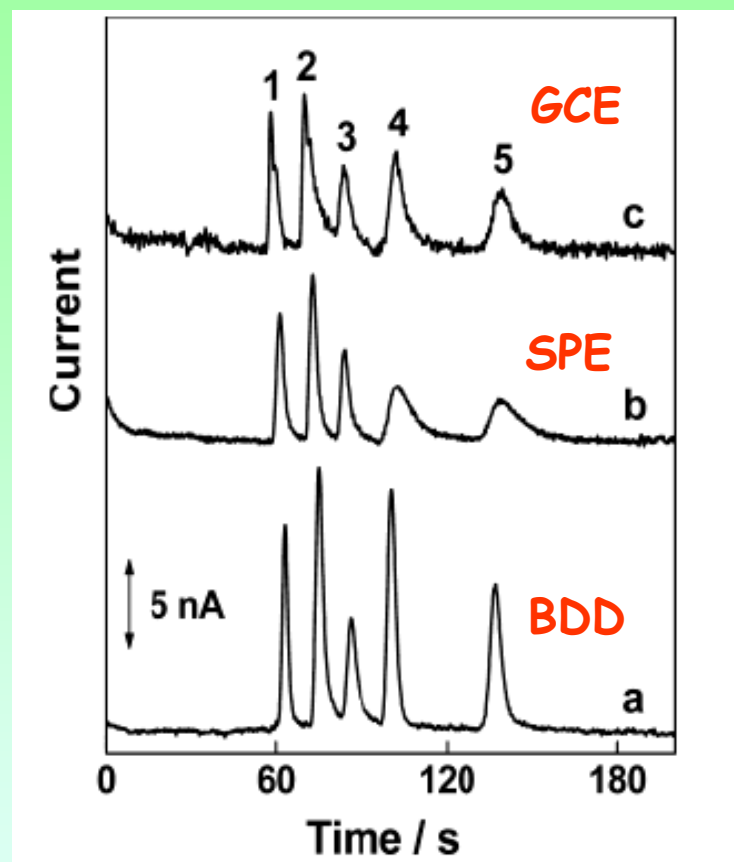
Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrochemical detector for analysis of aromatic amines

v posledních letech jsou publikovány práce používající pracovních **diamantových elektrod dopovaných borem** (BDD), tyto jsou srovnávány s elektrodami ze skelného uhlíku nebo SPE elektrodami

prokazují velice nízké hodnoty šumu (důležité pro stabilní základní linii, rozlišení a citlivost, jakož i dlouhou životnost a nízkou pasivaci

připravují se na Si (100) substrátech v tlakových reaktorech pomocí **CVD procesů** (chemical vapor deposition) v mikrovlnné plasmě, jako zdrojů uhlíku se používá acetonu, methanolu s rozpuštěným  $B_2O_3$ . Si lze odleptat -> vznikne **film BDD**

# Elektrochemické aplikace



citlivost BDD elektrody ve srovnání s GCE a SPE elektrodami pro MCE separaci aromatických aminů (produkty barvářského průmyslu, polutanty). 1s dávkováno 50  $\mu\text{M}$  4-aminofenolu (1), 1,2-fenyldiaminu (2), 2-aminonaftalenu (3), 2-chloroanilinu (4) a aminobenzoové kyseliny (5) v acetátovém pufru pH 4,5, 1,5 kV separace, detekce při 0,9 V

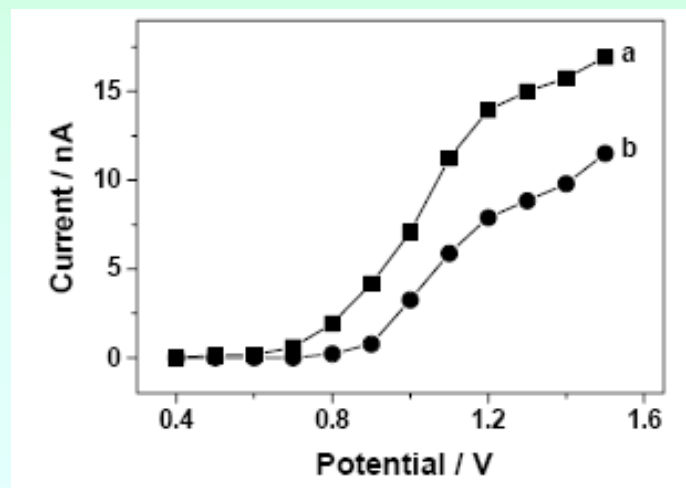


# Elektrochemické aplikace

## Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrode for rapid separation and detection of purines

Joseph Wang<sup>a,\*</sup>, Gang Chen<sup>a</sup>, Alexander Muck, Jr.<sup>a</sup>, Dongchan Shin<sup>b</sup>, Akira Fujishima<sup>b,1</sup>

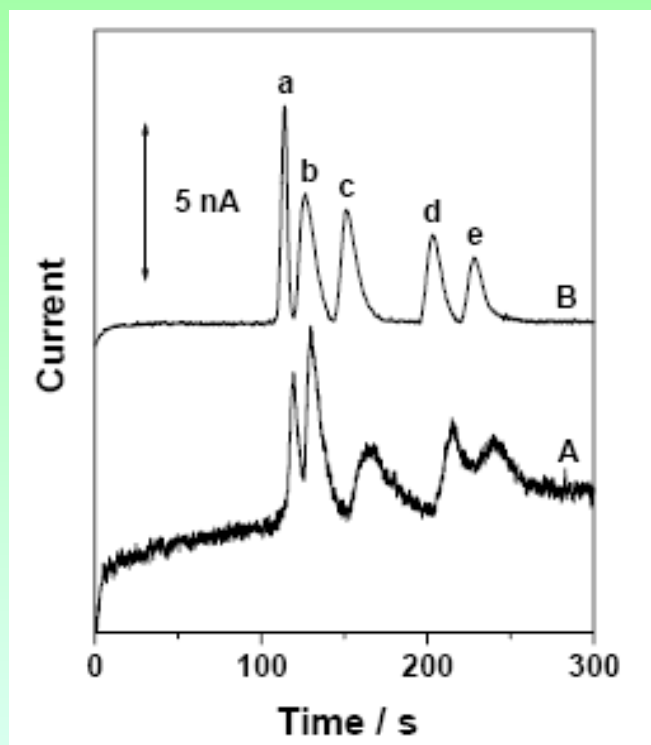
tyto báze složkami nukleových kyselin a jsou proto důležité při syntéze proteinů. Hrají také důležitou úlohu při kontrole potravin (metabolity přítomny ve stárnoucím mase, rybách atd. Rychlá metoda detekce guaninu, guanosinu, hypoxanthinu, xanthinu a kys. močové používá MCE na skl. čipu s pracovní el. z sp<sup>3</sup> hybridizovaného uhlíku (BDD) a amperometrickou detekcí



optimalizace citlivosti detektoru - hydrodynamický voltamogram pro BDD elektrodu. Detekce 50  $\mu\text{M}$  guaninu (a) a guanosinu (b)



# Elektrochemické aplikace



**srovnání citlivosti** SPE uhlíkové elektrody (A) a BDD elektrody (B) pro detekci mikromolárních koncentrací guaninu (a), hypoxanthinu (b), guanosinu (c), xanthinu (d) a kys. močové (e) při 1kV separačním a injekčním napětí a 1.3 V na elektrodě. dávkováno 2s, N 2400

# Elektrochemické aplikace

*Anal. Chem.* 2003, 75, 4475–4479

## **Movable Contactless-Conductivity Detector for Microchip Capillary Electrophoresis**

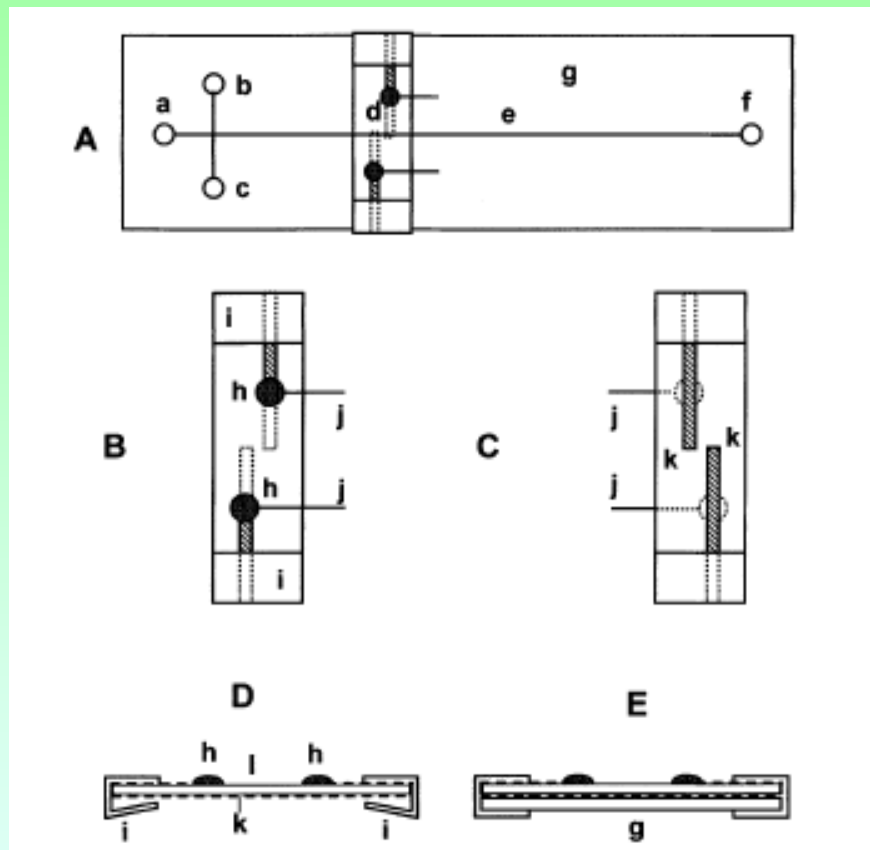
**Joseph Wang,\* Gang Chen, and Alexander Muck, Jr.**

*Department of Chemistry and Biochemistry, New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico 88003*

dalším způsobem detekce na čipu je vodivostní detekce. V posledních letech je studována především **bezkontaktní vodivostní detekce** (CCD).

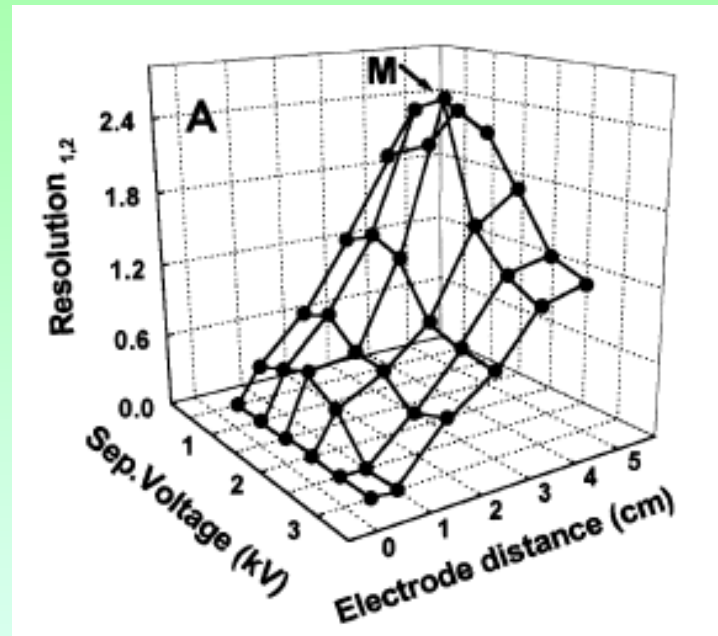
**system s pohyblivým CC detektorem** byl vyvinut pro detekci složek výbušnin na PMMA elektroforetickém čipu. Systém umožňuje posun detektoru po separačním mikrokanálu pro záznam různých fází separace nebo pro velmi rychlou detekci „celkového množství“ výbušnin

# Elektrochemické aplikace



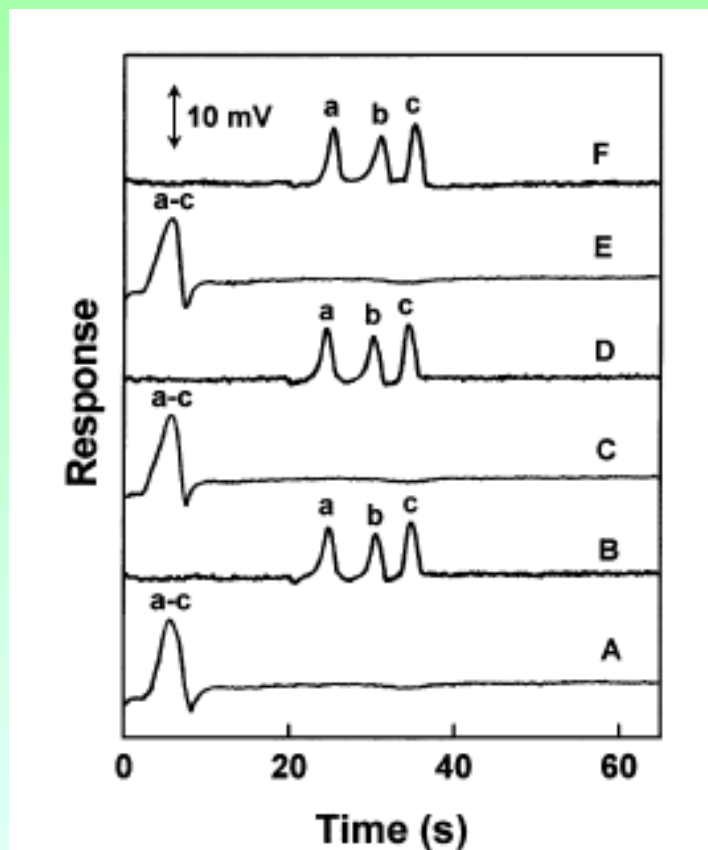
spona (C) objímající čip (E) umožňující citlivou bezkontaktní detekci Al elektrodami (H, dva 500  $\mu\text{m}$  proužky) upevněnými nad laminační folií mikrokanálu a celkový pohled na čip (A)

# Elektrochemické aplikace



optimalizace separace postupnou změnou vzdálenosti detektoru od dávkovacího rezervoáru a volbou různého separačního napětí - **automatizovatelnost**

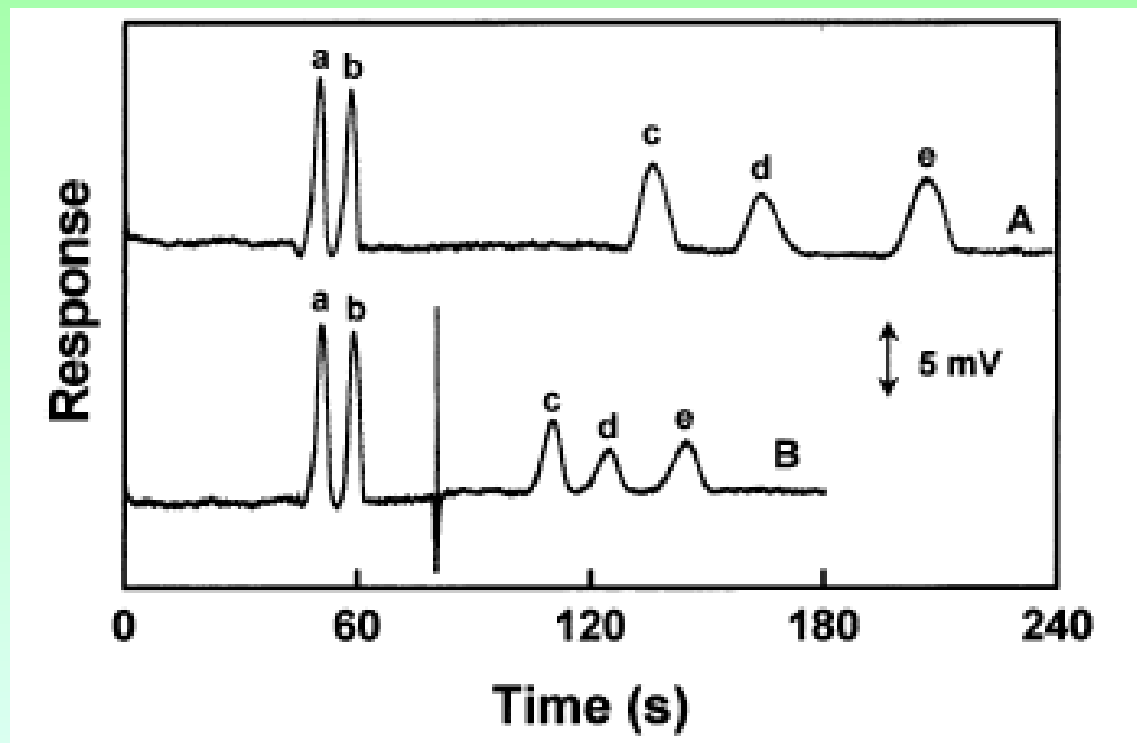
# Elektrochemické aplikace



přepínání mezi 'celkovým' a individuálním analytickým mode. Signály amonných (a), methylamonných (b) a sodných iontů (c)



# Elektrochemické aplikace



(A) analýza složek výbušnin a nervově aktivních látek: chlorid (a), chlorečnan (b), fosfonová- (c), methyl fosfonová- (d) a pinakoyl fosfonová kyselina (e), **zkrácení času analýzy posunem detektoru po eluci anorganických iontů (B)**

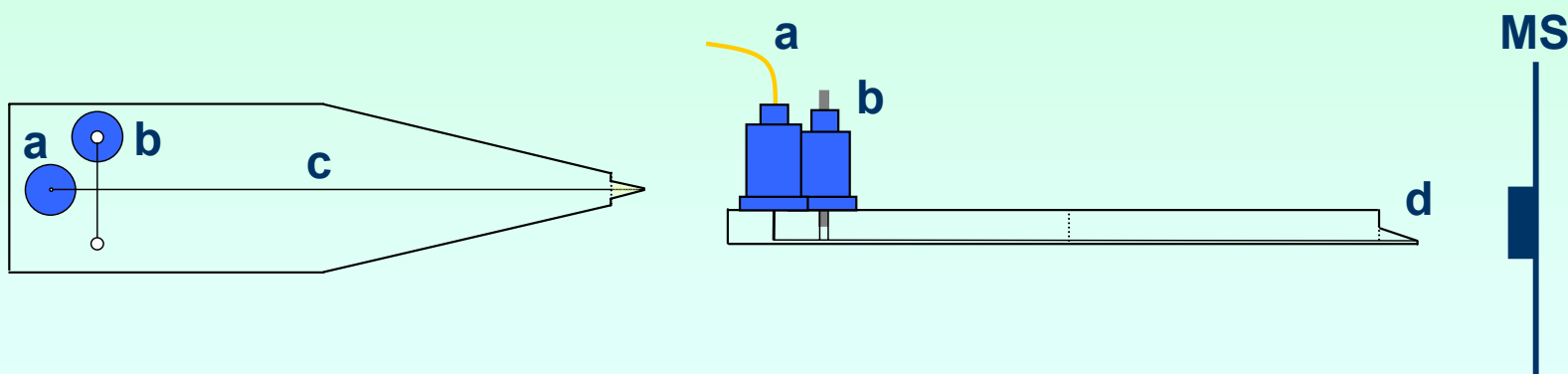
# Hmotnostní spektrometrie

## Atmospheric molded poly(methylmethacrylate) microchip emitters for sheathless electrospray

Alexander Muck and Aleš Svatoš\*

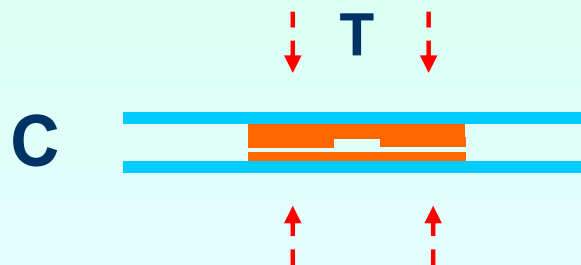
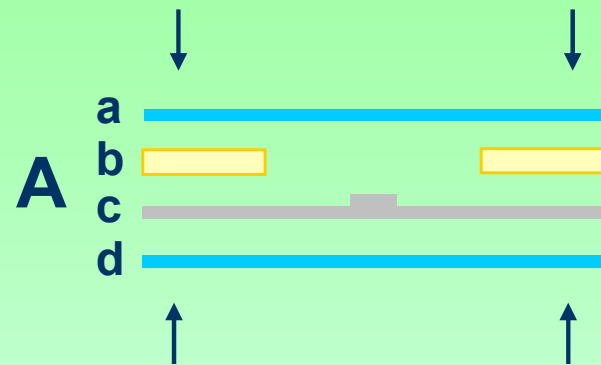
mikrofluidní čipy zatím prezentovány jako zařízení používající EOF jako hybnou sílu. Další skupinou jsou čipy používající **pumpování mikropumpami**

v hmotnostní spektrometrii jsou vyvíjeny **jednorázové emittery**. Ty mohou použít 'liquid junction' pro přívod ESI napětí a nevyžadují sprejovací plyn



(a) přívod pufu, (b) HV elektroda, (c) vstupní mikrokanál, (d) vývod emitteru

# Hmotnostní spektrometrie



Fabrikační proces:

(A) sestavení formy:

(a,d) skleněné desky

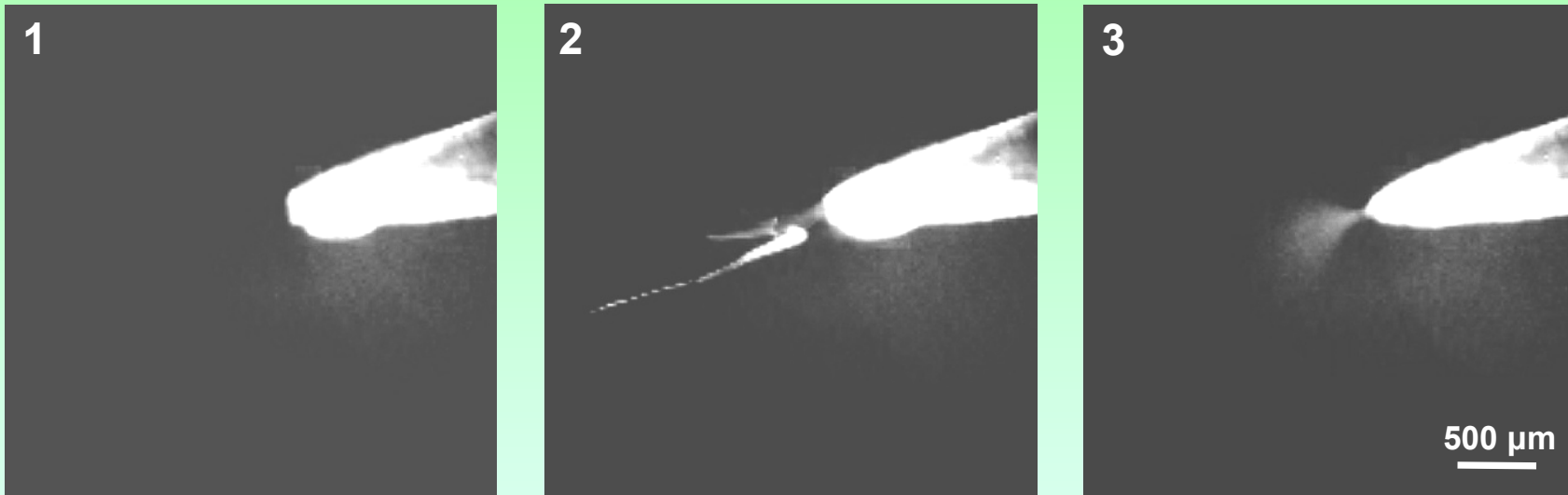
(b) hliníkový spacer

(c) kremíkový substrát

(B) odlití a polymerace PMMA

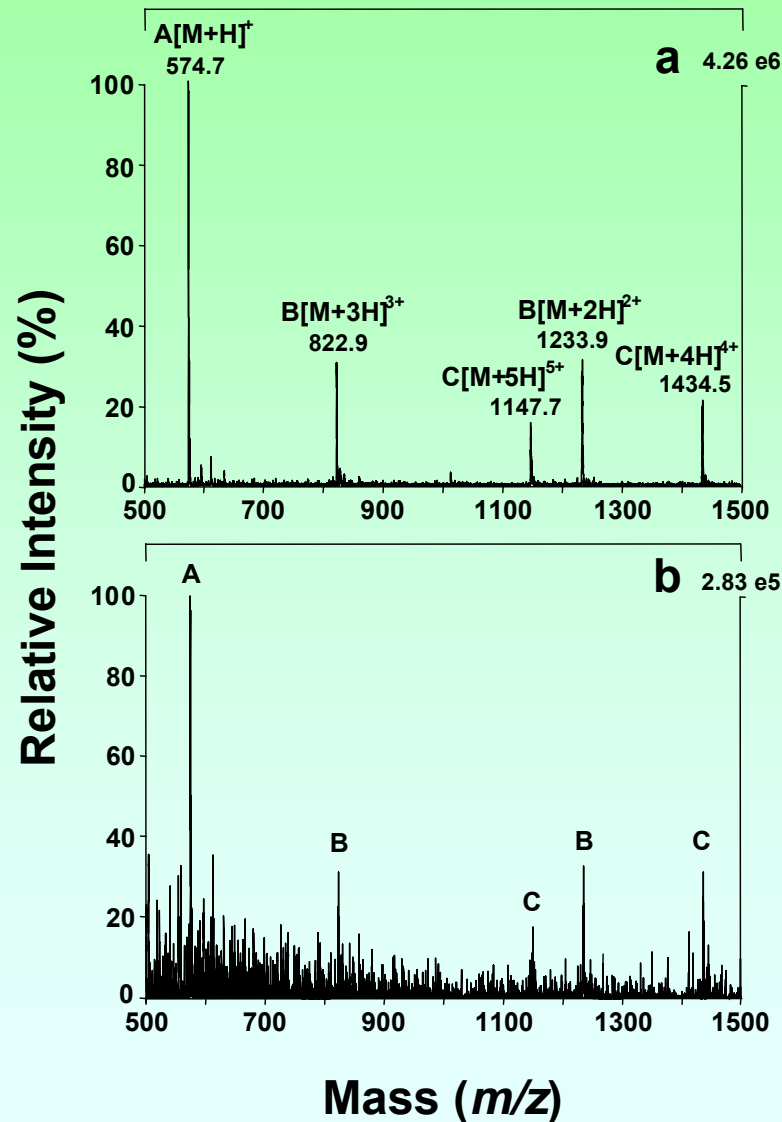
(C) tepelná laminace čipu

# Hmotnostní spektrometrie



tři po sobě následující sekce záznamu vzniku mikroeletrospreje na tomto čipu, 5 mM mravenčan amonný pH 4.5/MeOH 80/20 v/v, průtok 1.2  $\mu\text{l}/\text{min}$ , napětí 4.6 kV, expozice 10 ms.

# Hmotnostní spektrometrie

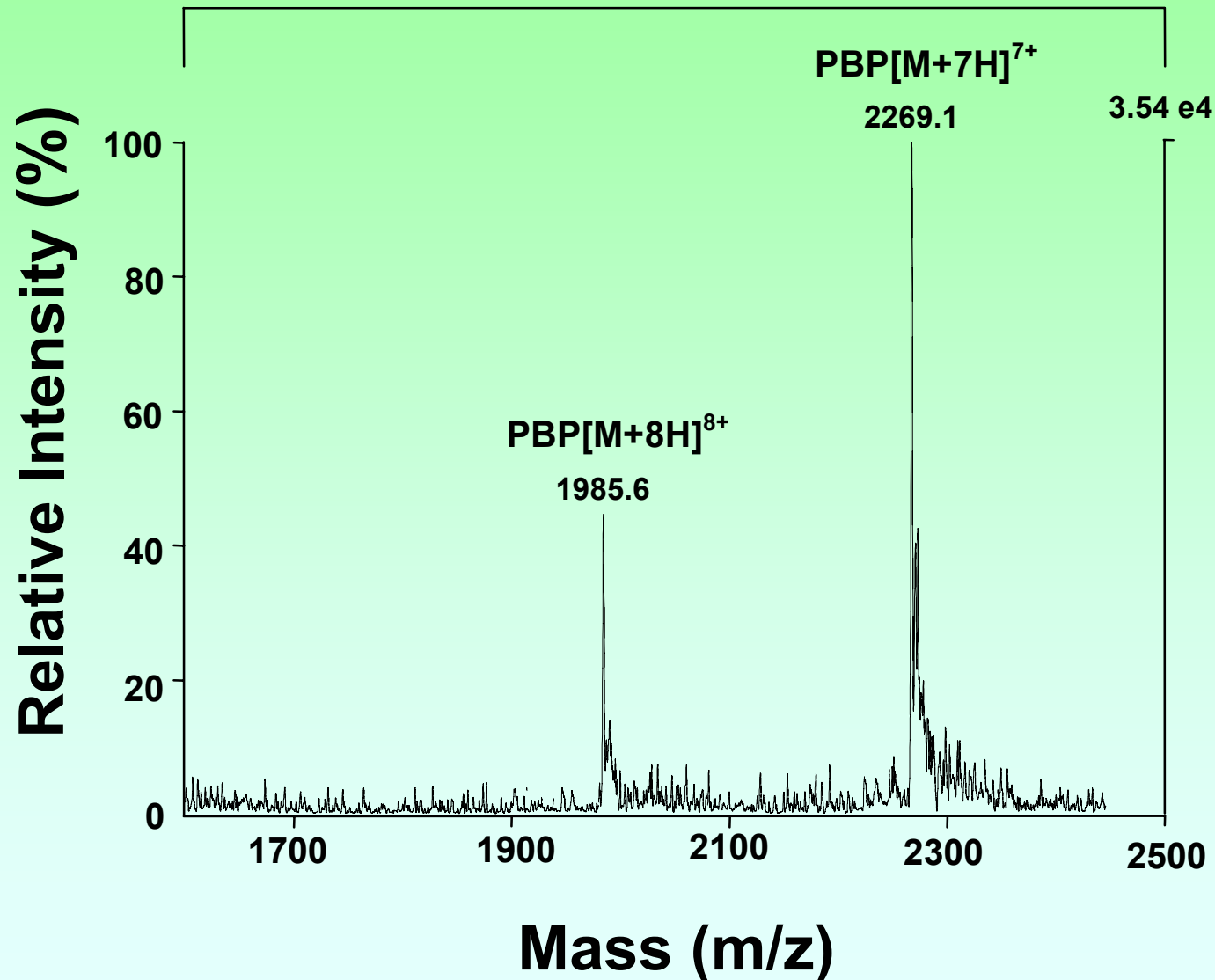


MS spektrum 5 pmol směsi  
peptidů a proteinu:  
(A) methionin enkephalin (MW  
573.7), (B) adrenokortikotropní  
hormon (MW 2465.7), (C)  
insulin (MW 5733.5)

stejně spektrum odpovídající  
100 fmol (1  $\mu$ M roztok)



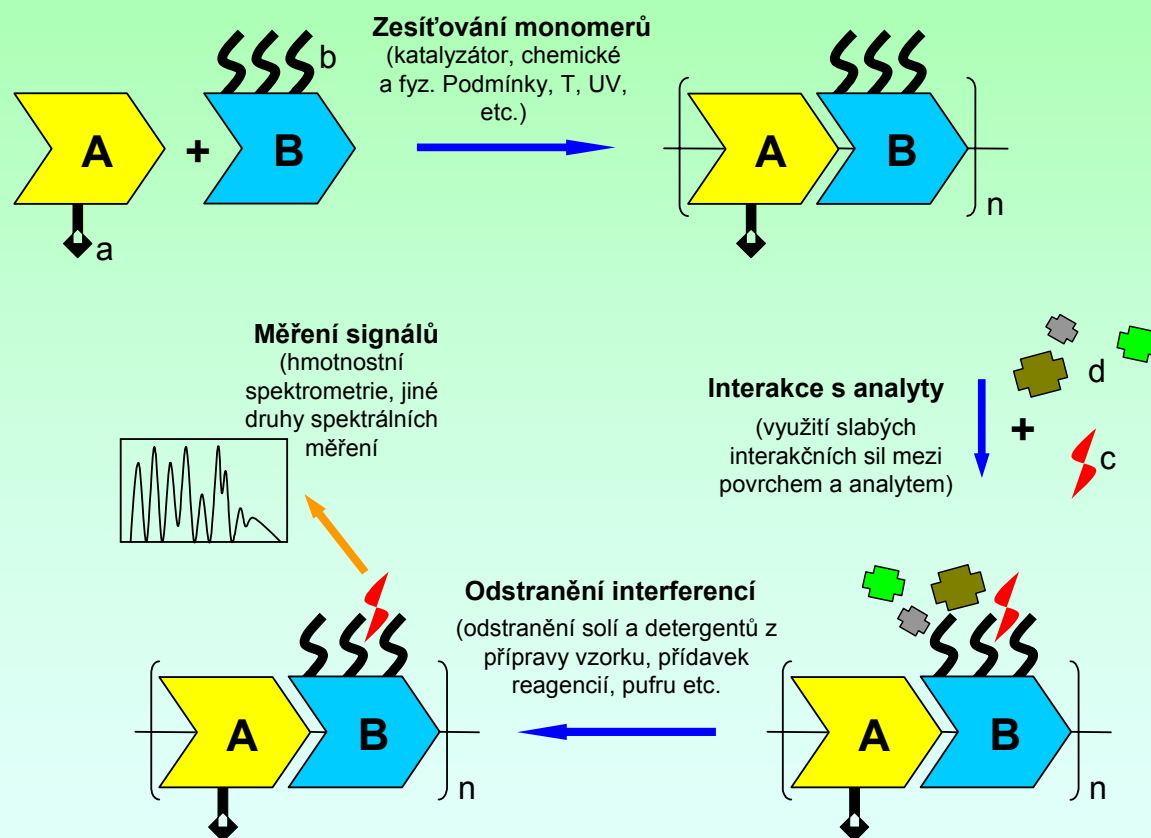
# Hmotnostní spektrometrie



Hmotnostní spektrum receptoru sexuálního feromonu *Manduca sexta*, 15,8 kDa

# Hmotnostní spektrometrie

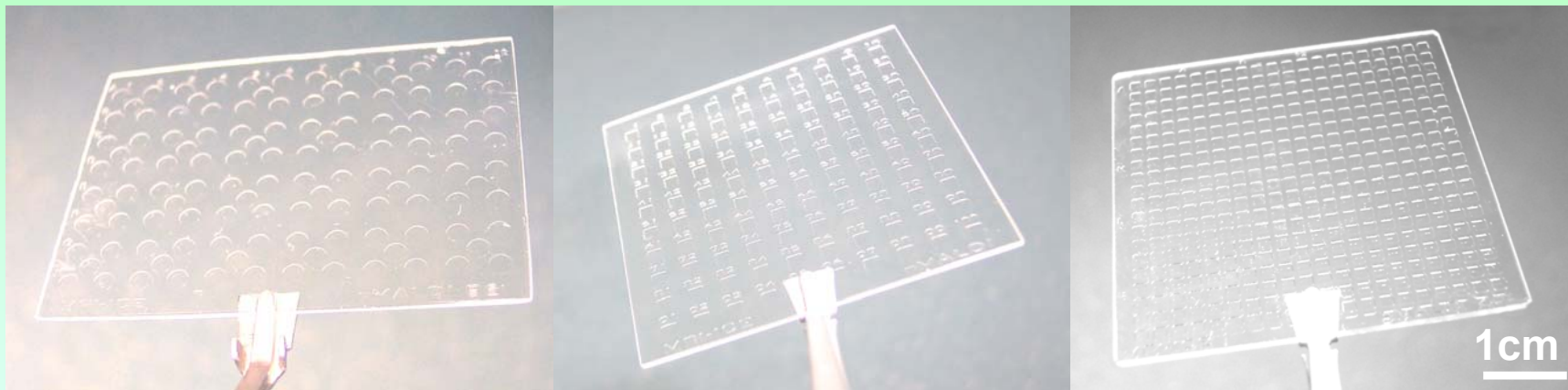
kopolymerace monomerů obsahujících speciální funkční skupiny (**analyte tailoring**) byla představena pro planární struktury v MALDI-TOF/MS



využívá principů **SPE** pro předúpravu vzorku, umožňuje **tvorbu speciálních čipů**

# Hmotnostní spektrometrie

Fast prototyping of hydrophobic disposable polymer support arrays for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry of proteins by atmospheric molding



96 MTP formát

10X10 formát

20X20

vyvinuty hydrofobní MALDI arrays pro odsolení a měření proteinů, atm. odlití umožnilo vysokou přesnost a inkorporovat **butyl metakrylát** do materiálu čipu

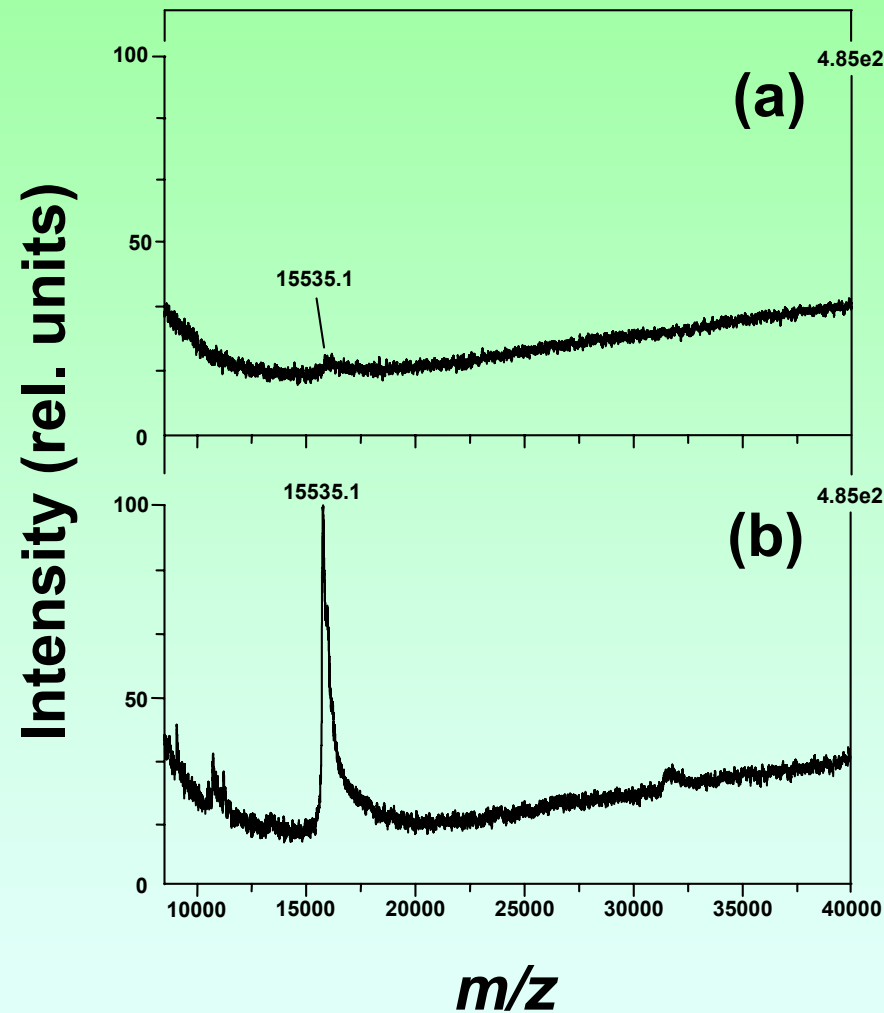
# Hmotnostní spektrometrie



čipy o tloušťce 0.5 a 0.2 mm obsahují 2x2mm zóny pro adsorpci vzorku a měření, které jsou o 50  $\mu\text{m}$  nižší, tak je **definovatelná plocha/reprodukovatelnost/archivovatelnost**



# Hmotnostní spektrometrie



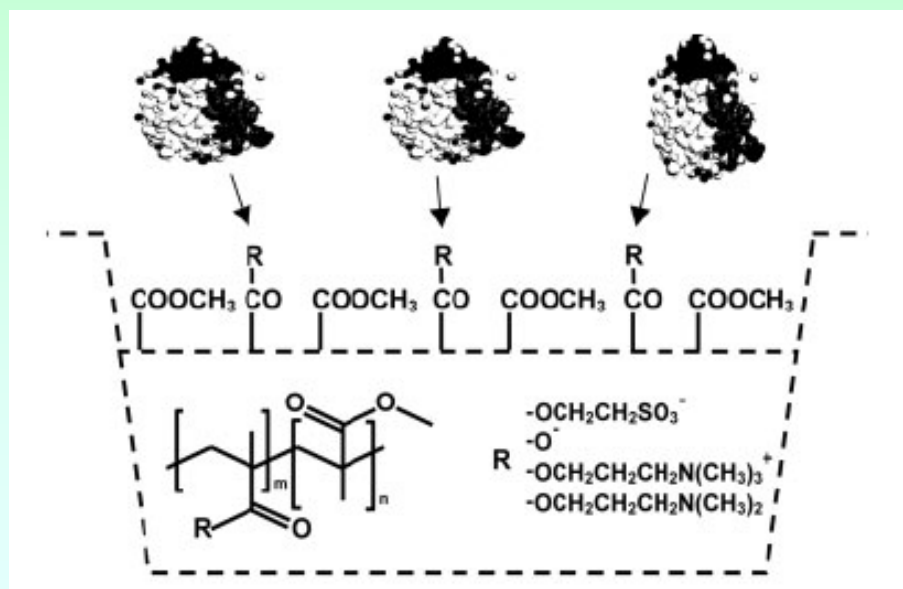
MALDI-TOF spektra úseku membránového proteinu *Trichoplusia Ni* (20 pmol/ $\mu$ L) před odstraněním 100 mM fosfátu, 10mM TRIS, 0.5 M NaCl a 10 mM EDTA (a), a po předúpravě na C4 čipu (b)



# Hmotnostní spektrometrie

Atmospheric molding of ionic copolymer  
MALDI-TOF/MS arrays: A new tool for protein  
identification/profiling

další možností pro speciální modifikaci čipu je inkorporace **iontových funkčních skupin**. Takové array čipy umožňují pH selektivní předúpravu směsí proteinů

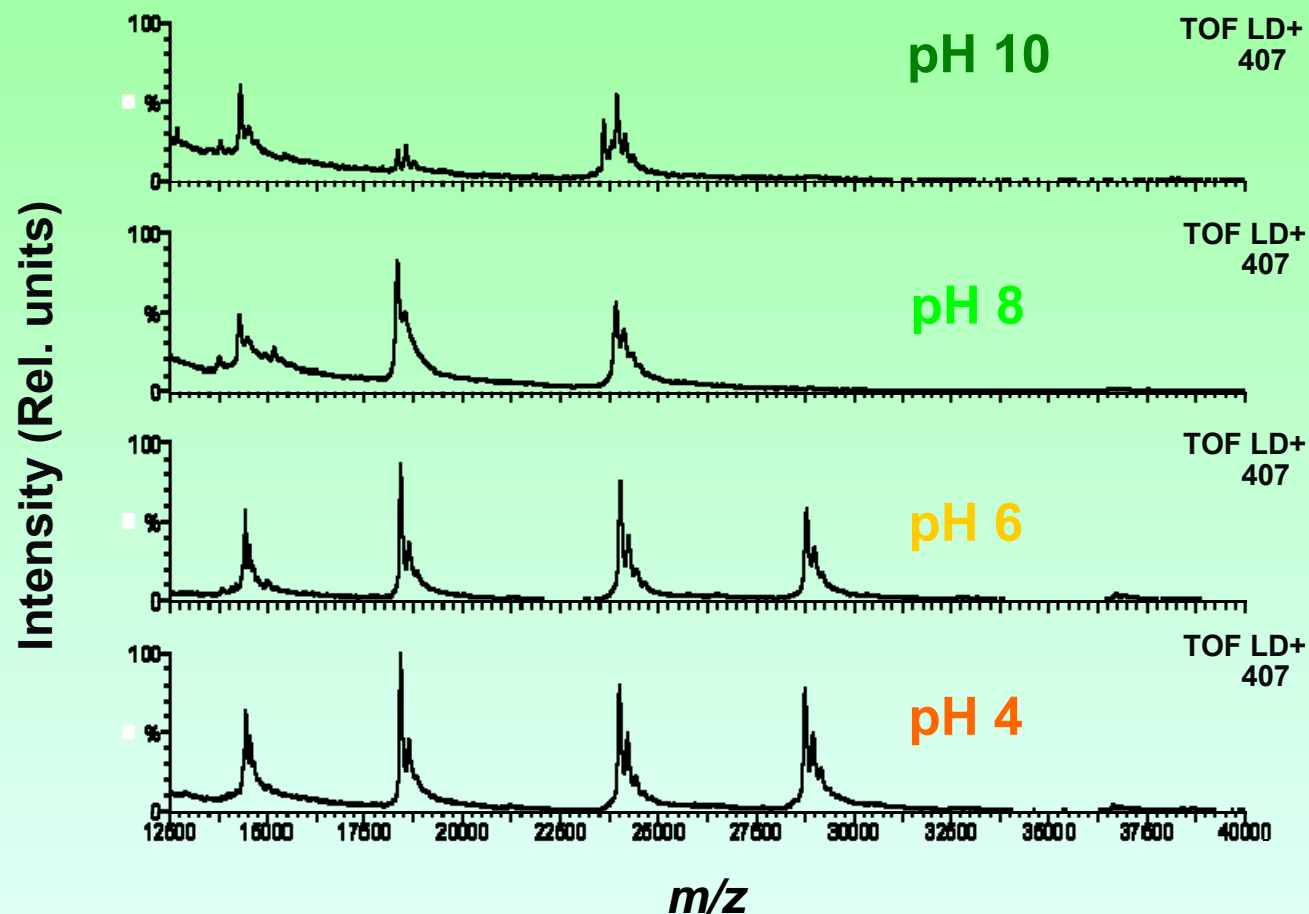


schema inkorporace funkčních skupin v  
materiálu čipu: **eliminace nutnosti**  
**povrchových modifikací** jež jsou  
komplikované

použity **carboxy-**, **sulfo-**, **amino** a  
**kvarterní amino methacryláty**

výběr pH pufru ovlivní náboj proteinů a  
náboj povrchu čipu

# Hmotnostní spektrometrie



MALDI-TOF spektra směsi lysozymu (a),  $\beta$ -laktoglobulinu A (b), trypsinogenu (c) a carboxyl dehydrogenázy (d) na čipu mod. 6% metakrylovou kys. Jako matrice použita kys. sinapová

# Hmotnostní spektrometrie

pH	$\beta$ LG-A pI = 5	CA1 pI = 7	TRP pI = 9	LYS pI = 11
4	*	*	*	*
6	*	*	*	*
8	*	-	*	*
10	*	-	*	*

adsorpce na 6%MAA čip, pKa povrchu ~ 4.66 (methakrylová kyselina)

diferenciace  
adsorpce

- \* iontové přitažlivé síly/adsorpce
- \* částečné hydrofobní interakce/adsorpce (~2 pH nad pI)

# Hmotnostní spektrometrie

## Trypsin-Linked Copolymer MALDI Chips for Fast Protein Identification

Alfredo J. Ibáñez, Alexander Muck, Vincentius Halim, and Aleš Svatoš\*

použití reaktivních funkčních skupin umožňuje vývoj 'hybridních' zařízení, obsahujících kromě funkčních skupin také linkery a enzymy.

provedení selektivních operací jako enzymová hydrolýza, nebo studium aktivity enzymů a inhibice substráty, screening ve velkém množství (array uspořádání)

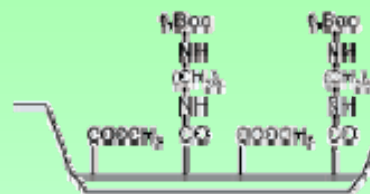
pro vázání enzymů byly vypracovány standardní postupy, používané především v ELISA metodách

pro fabrikaci MALDI-TOF array čipu byla použita kopolymerace methakrylátu s 2-aminoethyl methakrylamidem chráněným t-BOC skupinou



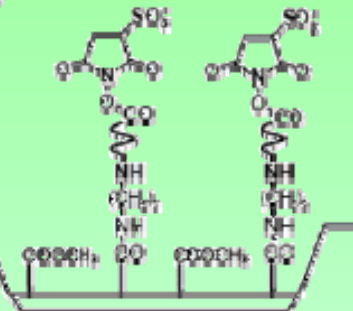
# Hmotnostní spektrometrie

(A) Polymerization:



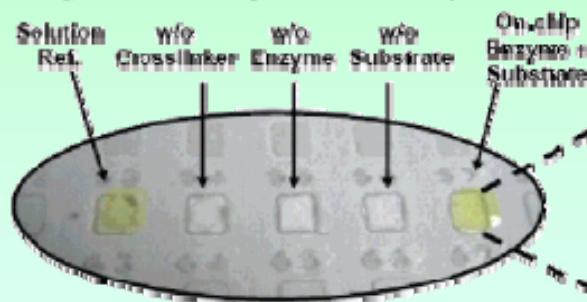
1)  $\text{HCl/MeOH}$   
+ catalyst  
2) Sulfu-EGS

(B) Activation/cross-linking:

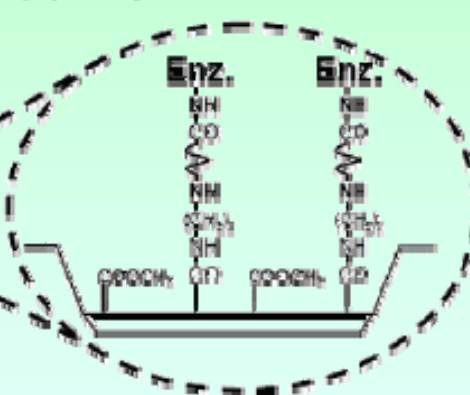


1)  $\text{Enz/NH}_2$

(D) Enzymatic assay: control/experiment



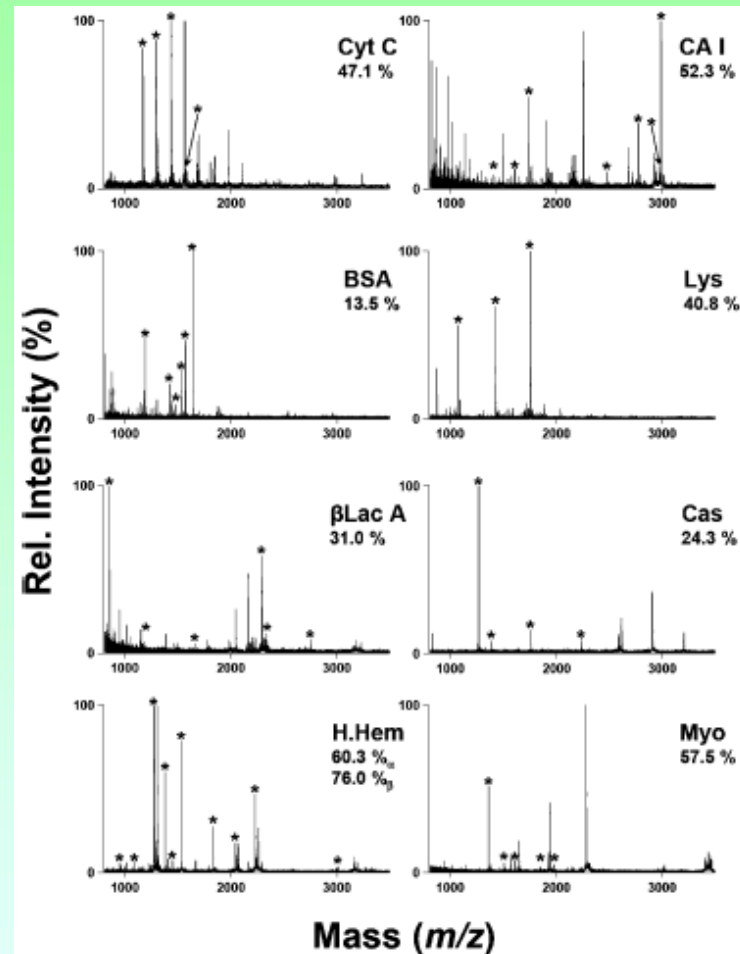
(C) Enzyme immobilization:



kyselá aktivace a reakce aminů s polyetylenglykol disukcinátem bis(sulfo-succinimidem) (**EGS**) a reakcí s 1.2 nmol trypsinu nebo jiného enzymu (např. fosfatázy: hydrolýza nitrofenylfosfátu na žlutý nintrofenol)

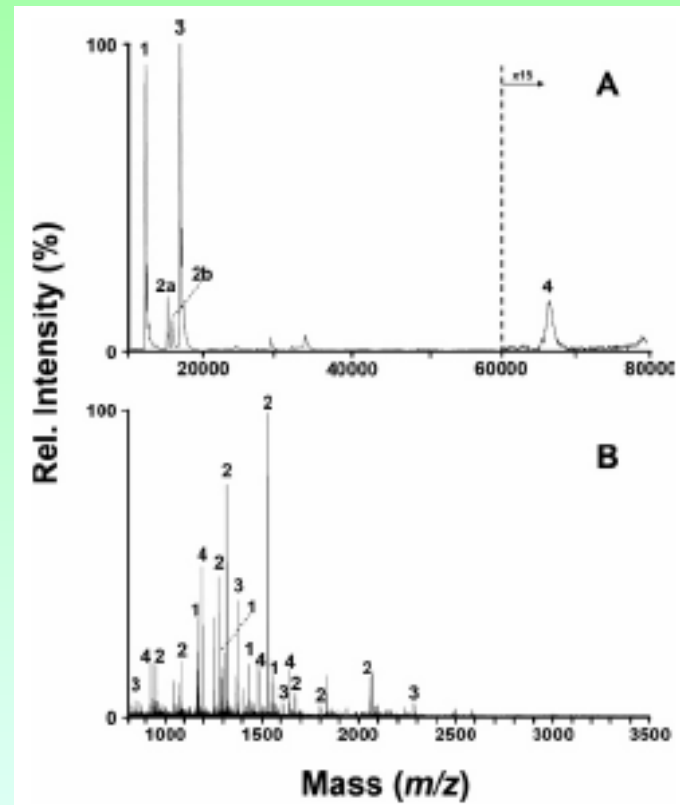


# Hmotnostní spektrometrie



krátké doby reakce (15 min-1h), **identifikace a pokrytí sekven**ce adsorbovaných **proteinů** 'po on-chip' digesci pomocí bioinformatického softwaru (PLGS) např. v databázi Swissprot

# Hmotnostní spektrometrie



použití **lineárního** modu (A) pro měření proteinových spekter (určení MW), provedení hydrolýzy a měření v **reflektronovém** modu (B) pro určení individuálních peptidů poskytuje **dvě hladiny informací** (1-Cyt C, 2-Hemoglobin, 3-myoglobin, 4-BSA)

# Nové směry vývoje

-> výzkum elektroforetických aplikací je pomalu kompletní

-> současné trendy se soustřeďují na **mikrostruktury** pro on-chip nanoLC (také plnění separačních kanálů částicemi se ukazuje v praxi užitečné. Aplikace **monolitických materiálů**

-> prosazují se planární čipy typu '**array**' umožňující screening velkého množství vzorků a snižující cenu těchto zařízení



# Shrnutí

-> tento přehled či úvod to problematiky není zdaleka kompletní, ale může zájemcům poskytnout určitý startovací bod

-> za posledních 17 let vznikl nový velice zajímavý interdisciplinární obor a došlo i k jeho určitému dozrání. V příštích letech bude záviset více na užitečných aplikacích, ty rozhodnou, kde v praxi se tyto chemické MEMS (CMEMS?) uplatní



# Poděkování



Prof. Jiří Barek, UK



Prof. Joe Wang, ASU



Max-Planck-Institut für chemische Ökologie  
Hans-Knöll-Str. 8