



MIKRO- I NANO-SYSTEMY W CHEMII I DIAGNOSTYCE BIOMEDYCZNEJ MNS-DIAG



PROJEKT KLUCZOWY WSPÓLFINANSOWANY PRZEZ UNIĘ EUROPEJSKĄ Z EUROPEJSKIEGO FUNDUSZU ROZWOJU REGIONALNEGO; UMOWA Nr. POIG.01.03.01-00-014/08-00

RAPORT CZĄSTKOWY PROJEKTU MNS DIAG 1A E-LoC Lab-on-a-chip z detekcją elektrochemiczną

Raport 1A - 2. Uzyskane rezultaty projektu (opis wytworzonych demonstratorów, modułów procesowych, procedur i in.)

D. Pijanowska

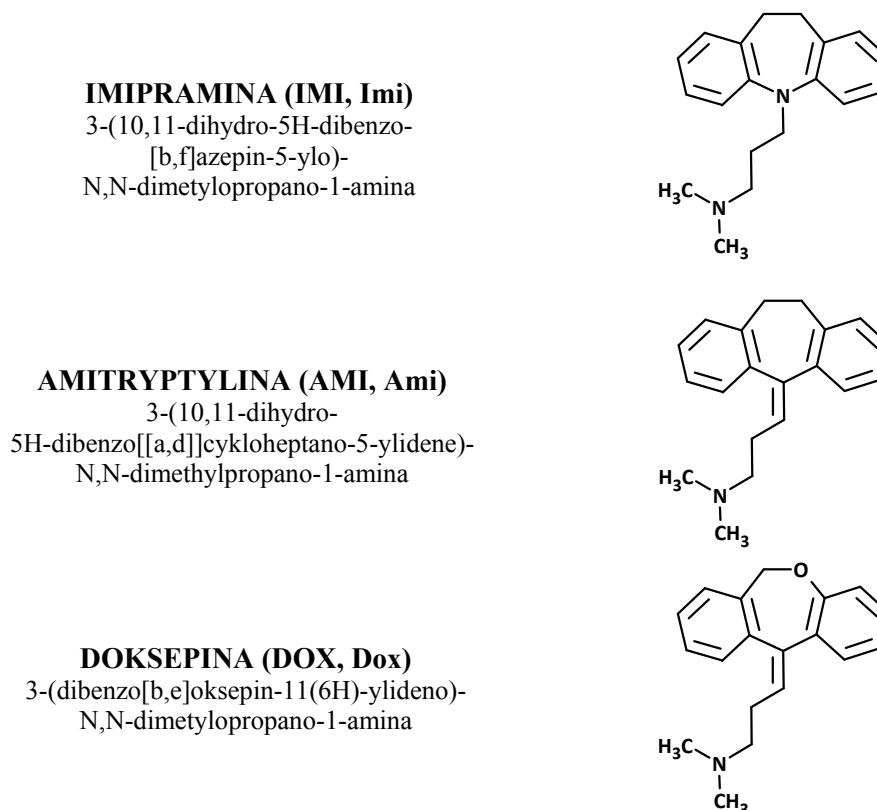
Zatwierdził:

Dr inż. Piotr Grabiec, prof. ITE
Koordynator Projektu MNS DIAG

Data: ...31.01.2014....

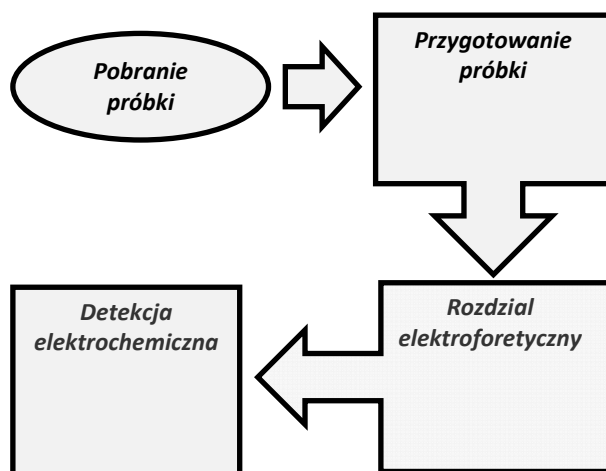
1. Przedmiot badań

Trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (ang.: *tricyclic antidepressants*, TLPD) należą do grupy substancji psychoaktywnych klasyfikowanych jako leki psychotropowe. W swej strukturze posiadają one charakterystyczny układ skondensowanych pierścieni, często zawierający heteroatom. Wzory strukturalne wybranych homo- i heterocyklicznych leków przeciwdepresyjnych przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Nazwy zwyczajowe, systematyczne i wzory strukturalne wybranych związków z grupy trójcyklicznych leków antydepresyjnych.

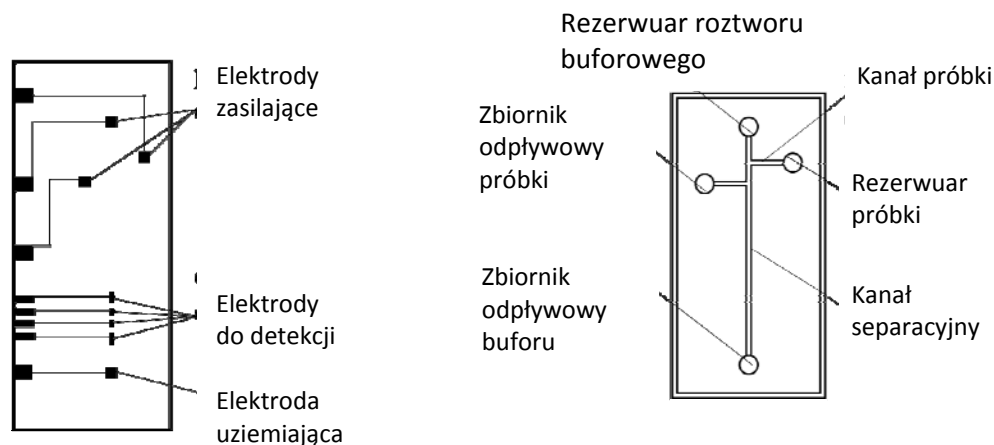
Demostartor układu analitycznego przeznaczony do detekcji TLPD w ślinie zaprojektowano w postaci modułowego układu lab-on-a-chip zawierającym moduł rozdzielania elektroforetycznego i detekcji elektrochemicznej. Schemat blokowy demonstratora przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Schemat blokowy demonstratora układu analitycznego przeznaczony do detekcji TLPD.

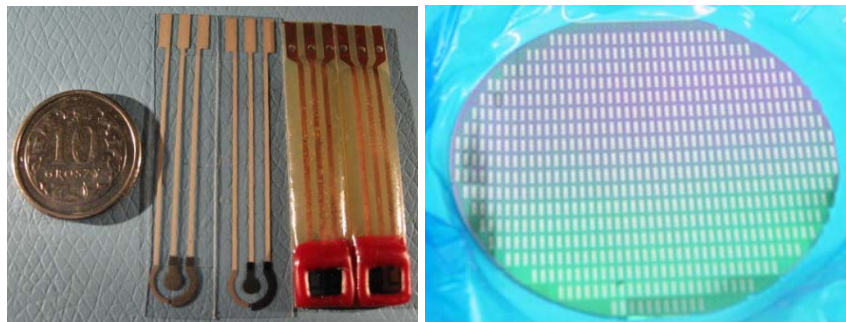
W badaniach, prowadzonych na WCh UJ, poświęconych mikroekstrakcji wybranych leków przeciwnadciśnieniowych, na etapie **przygotowywania próbek śliny**, wykorzystywano strzykawkę do mikroekstrakcji na upakowanym sorbencie MEPS® o objętości 250 μL oraz igły wraz z wypełnieniem M1 (C8/SCX), tzw. BIN-ami do MEPS® firmy SGE Analytical Science (Australia), łaźnię ultradźwiękową firmy Polsonic (Polska) i wirówkę Allegra X-30R Centrifuge firmy Beckman Coulter™ (Stany Zjednoczone).

Na rysunku 3 przedstawiono jeden z projektów struktur **układu do elektroforezy** składający się z dwóch części: części górnej wykonanej z PDMS (IBIB PAN) zawierającej kanał i rezerwuary roztworów buforowych oraz dolna struktura wykonana ze szkła z nadrukowanymi elektrodami złotymi (ITE).



Rys. 3. Projekt struktur układu do elektroforezy: (a) górna struktura wykonana z PDMS z kanałami i rezerwuarami; długość kanału - 60 mm, przekrój kanału 100 μm x 70 μm i (b) dolna struktura wykonana ze szkła z nadrukowanymi elektrodami złotymi.

W celu przeprowadzenia **detekcji elektrochemicznej** zostały zaprojektowane i wykonane dwa typy czujników amperometrycznych, wykonanych technikami grubo- i cienkowarstwowe (Rys. 4). Czujniki złote i platynowe wykonano w technologii cienkowarstwowej (m.in. technika *lift-off*, ITE w Warszawie) na podłożu krzemowym. Każdy czujnik składał się z trzech metalicznych elektrod połączonych z własnym wyprowadzeniem elektrycznym. W celu zwiększenia adhezji metalu do tlenku krzemu, stosowano warstwę pośrednią tytanu. Następnie czujniki po połączeniu ze ścieżkami wyprowadzającymi na laminacie (PCB), były hermetyzowane żywicą epoksydową. Czujniki złote i platynowe badano stosując nasyconą elektrodę kalomelową, jako zewnętrzną elektrodę referencyjną – (SCE, Thermo, Polska). Elektrodą pomocniczą była jedna z elektrod metalicznych czujnika. Natomiast czujniki pasty grafitowej i węglowej przygotowano metodą grubowarstwową (sitodruk, IBIB PAN w Warszawie) oraz techniką drukowania bezpośredniego przy użyciu robota 325 Ultra TT (EFD, USA) na podłożu z folii poliestrowej (Autostat). Każdy czujnik składał się z trzech elektrod, każda posiadała własne wyprowadzenie elektryczne. Elektrody pracujące i przeciwelektrody wykonano z pasty grafitowej (ITME w Warszawie) lub węglowej (DuPont), natomiast elektrody referencyjne oraz wszystkie wyprowadzenia elektrod – z pasty srebrowej (DuPont).



Rys. 4. Czujniki stosowane do detekcji TLPD. Z elektrodami grafitowymi i węglowymi - wykonane w IBIB PAN (od lewej) oraz czujniki cienkowarstwowe platynowe i złote (od prawej) wraz z płytą krzemową z czujnikami cienkowarstwowymi wykonanymi w ITE w Warszawie.

2. Wyniki badań

W ramach projektu został opracowany demonstrator technologii w postaci modułowej zawierający moduł do elektroforezy kapilarnej, oraz układ do detekcji elektrochemicznej wraz z przepływową celką pomiarową.

Opracowano i zoptymalizowano procedurę analizy badanych leków TLPD w ślinie oparta na metodzie MEPS/HPLC-UV, którą następnie poddano procesowi walidacji. W tym celu sporządzono próbki śliny dotowane sześcioma lekami, tak aby otrzymać trzy poziomy stężenia: 45, 90, 180 ng/mL. Przed analizą do każdej z przygotowanych próbek dodawano wzorzec wewnętrzny (Clo, 2 µg/mL). Procedurę przygotowania próbek śliny przedstawiono schematycznie na Rys. 5.

etapy	ultradźwięki: 50 min
	wirowanie: 10 min, 10000rpm, -1°C
	wirowanie zebranego supernatantu: 10 min, 10000rpm, -1°C
	mikroekstrakcja na upakowanym sorbencie: C8-SCX

Rys. 5. Schematyczne przedstawienie procedury wstępnego przygotowania próbek śliny do analizy.

Uzyskane rezultaty wskazują, że metoda MEPS/HPLC-UV charakteryzuje się zadowalającą precyzją (wartości RSD% nie przekraczały 8%), jednocześnie jest metodą selektywną co sprawdzono ekstrahując próbki bez dodatku badanych związków. Wyznaczając błąd względny (RE) określono dokładność metody. Stwierdzono, iż metoda jest dokładna (RE% w granicach $-12 \div 2\%$), przy czym największą dokładność uzyskano w przypadku oznaczeń amitryptyliny, natomiast najmniejszą - nordoksepinu. Niestety, z powodu braku komercyjnie dostępnych certyfikowanych materiałów referencyjnych śliny zawierającej badane substancje, nie sprawdzono wiarygodności metody, jednakże na podstawie uzyskanych rezultatów stwierdzono, że spełnia ona podstawowe kryteria metod analiz ilościowych.

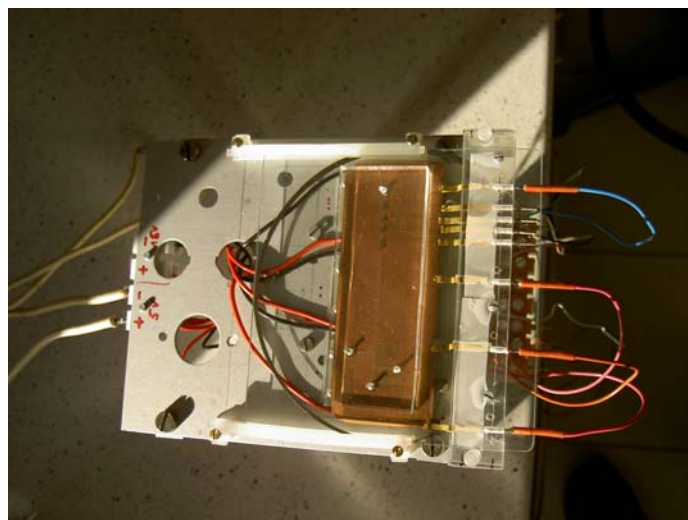
Do przygotowania 6 wersji układów do elektroforezy (chipów CE) wybrano technologię hybrydową PDMS/szkło. Elementy z PDMS oraz łączenie szkło/PDMS przy użyciu odpowiednich matryc wykonano w laboratorium IBIB PAN. Matryce do odlewania elementów z PDMS zostały wykonane w technice krzem/SU-8. Zarówno matryce krzemowe jak i płytki szklane z napyłonymi elektrodami złotymi zostały wytworzone w ramach projektu MNS-DIAG w ITE. Na rysunku 6 przedstawiono kompletny chip do elektroforezy wraz z wyprowadzeniami elektrod wysokonapięciowych i padów przyłączeniowych na płytkach szklanych w slocie pomiarowym.

W celu poprawy przepływu elektroforetycznego w chipach wykonano hydrofilizację kanałów. Operację tą wykonano poprzez przyłączenie dimetakrylanu glikolu etylenowego (EGDMA) w plazmie tlenowej do powierzchni PDMS. Hydrofolizację przeprowadzano w następujący dwóch etapach: (1) aktywacja powierzchni PDMS, (2) przyłączanie EGDMA do powierzchni polimeru i (3) mdyfikacja w plazmie tlenowej. Przed rozpoczęciem procedury hyrofilizacji, wszystkie powierzchnie poza kanałami zabezpieczano taśmą samoprzylepną. Tak przygotowany element z PDMS umieszczano w reaktorze plazmowym i poddawano działaniu plazmy tlenowej przez 30 s.



Rys.6. Chip elektroforetyczny trzeciej i czwartej generacji. Z lewej widoczny chip umieszczony w slotcie z wyprowadzeniami elektrycznymi.

Wykonano również układu elektroforetycznego wykonanego ze szkła i PDMS, moduł podstawy chłodzącej (ogniwa Peltiera) i slot z wyprowadzeniami elektrycznymi chipa elektroforetycznego szóstej generacji (rys. 7).



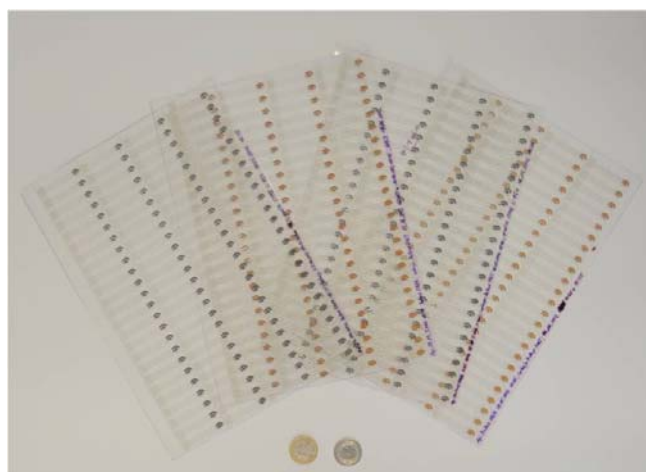
Rys. 7. Chip szóstej generacji wraz z modulem chłodzącym oraz slotem z przyłączami elektrycznymi.

W tabeli 1 zestawiono wyniki pomiarów czasu przepływu elektroforetycznego w mikrokanalach bez zintegrowanych elektrod detekcyjnych. Chipy wykonane z PDMS hydrofilizowanego w plazmie tlenowej były nietrwałe. Jednakże przepływ elektroforetyczny (w kierunku katody) generowany w tych chipach był bardzo stabilny. W pozostałych przypadkach generowany przepływ w kanale separacyjnym odbywał się na zasadzie migracji anionów w kierunku anody.

Tabela 1. Wyniki pomiarów czasu przepływu elektroforetycznego w chipach bez elektrod detekcyjnych.

Opis struktury	Roztwór buforowy	Napięcie zasilania [V]	Czas przepływu próbki fluoresceiny w kanale sparacyjnym [s]
Struktura wykonana z PDMS modyfikowanego EGDMA i plazmą tlenową	PBS pH 7,4 Triton X-100 0,08%	-300	686
Struktura wykonana z niemodyfikowanego PDMS	PBS pH 7,4 Triton X-100 0,08%	-300	809
		-600	1394
		-800	762
	HEPES pH 8,0	-300	635
		-600	784
		-800	817
	TRIS pH 8,0	-600	657
			-600

Na potrzeby realizacji projektu opracowano technologię produkcji grubowarstwowych czujników elektrochemicznych, pokazanych na rysunku 8. Czujniki wytwarzane są za pomocą robota mikrodozującego Ultra TT (EDF) z wykorzystaniem past sitodrukarskich. Zoptymalizowano procedurę produkcji kompletnego, trójelektrodowego układu czujników do pomiarów amperometrycznych na podłożu z folii poliestrowej. Wyprowadzenia oraz elektroda odniesienia wytwarzane są z pasty srebrnej, zaś elektrody pracująca i referencyjna, w zależności od aplikacji, przygotowywane są z past: grafitowej, węglowej, złotej i innych. Czujniki produkowane są w standardzie 96 sztuk na arkusz.



Rys. 8. Zdjęcie czujników grubowarstwowych złotych i grafitowych wyprodukowanych technologią drukowania bezpośredniego opracowaną w IBIB PAN dla potrzeb realizacji projektu 1A, E-LoC MNS-DIAG. Standardowy arkusz 96 sztuk czujników.

W celu doboru materiału elektrody pracującej, metodą woltamperometrii cyklicznej wykonano kalibracje na wybrany, modelowy lek – imipraminę – w buforach fosforanowych o stężeniu 50 mM (0,1 M KCl) i pH odpowiednio: 2,0, 5,0 i 7,0. Zakres potencjałów roboczych elektrody pracującej oraz stężeń leku był zależny od rodzaju materiału elektrodowego i zostały wyszczególnione w tabeli 2, zestawiającej wyniki uzyskane w badaniach eksperymentalnych.

RAPORT MNS-DIAG

Tabela 2. Wyniki badań metodą woltamperometrii cyklicznej mających na celu dobór materiału elektrodowego optymalnego do detekcji związków z grupy TLPD. Pomiar w buforach fosforanowych o stężeniu 50 mM, 0,1 M KCl i pH podanym w tabeli. Szybkość skanowania 100 mV/s, Estep 5 mV. Czas inkubacji TLPD przed rejestracją krzywej woltamperometrycznej: 2 min.

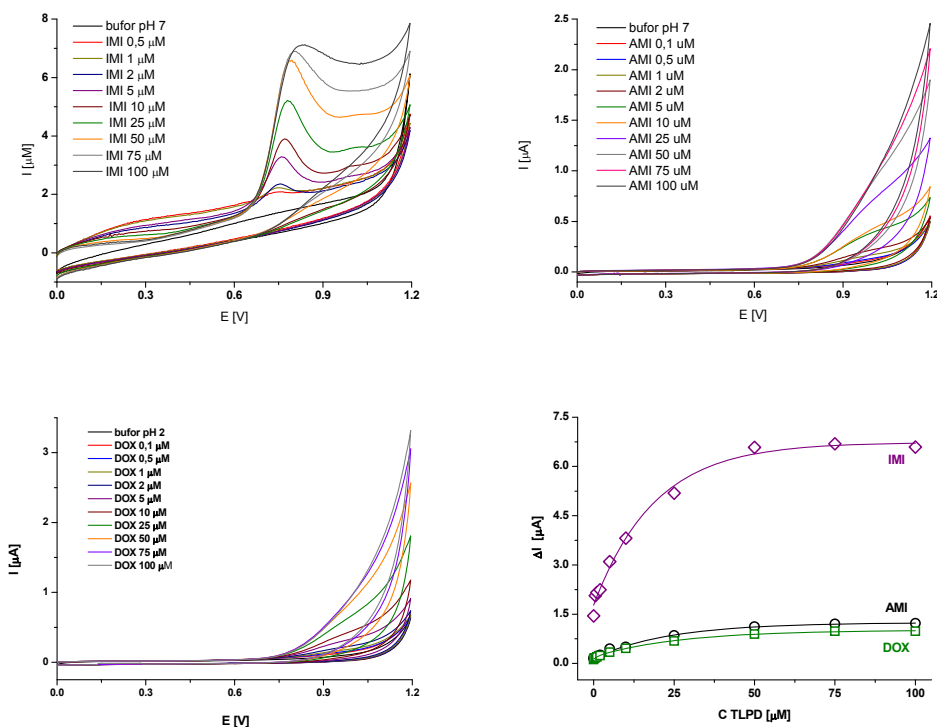
Elektroda	pH	Zakres roboczy E [V]	Zakres Ep [mV]	Linioowy zakres stężeń [μM]	Czułość [nA/μM]	R ²
SP grafitowa	2	0,0 – 1,2	835 – 850	1 – 100	23	0,9819
	5		770 – 870	1 – 25	68	0,8454
	7		785 – 870	1 – 25	86	0,9257
SP węglowa	2	0,0 – 1,2	855 – 895	1 – 100	15	0,9871
	5		805 – 910	1 – 25	59	0,9806
	7		750 – 855	1 – 25	88	0,9789
Platynowa	2	0,0 – 1,1	–	–	–	–
	5		–	–	–	–
	7		800 – 870	5 – 75	9	0,8884
Złota	2	0,0 – 0,8	730	10 – 2000	284	0,9857
	5		400	10 – 200	433	0,8800
	7		520	5 – 200	603	0,9064

Przeprowadzone badania pozwoliły na wybranie czujników grafitowych jako najlepszych do prowadzenia elektrochemicznego oznaczania imipraminy. Z użyciem czujników grafitowych sprawdzono możliwość oznaczania innych trójcyklicznych leków antydepresyjnych. Optymalne środowisko chemiczne do prowadzenia oznaczenia z ich użyciem zapewnia bufor fosforanowy o pH równym 7. W tych warunkach oznaczenie charakteryzuje się wysoką czułością, dobrą powtarzalnością i niewielkim przesunięciem maksimum piku utleniania. Zakres liniowości mieści się w zakresie 1 - 25 μM. W przypadku IMI stwierdzono również możliwość oznaczenia tego związku w szerszym zakresie stężeń w buforze o pH 2. Warto jednak podkreślić, że czułość takiego oznaczenia jest znacznie niższa niż w pH 7 (23 nA/μM).

W przeprowadzonych badaniach nie uzyskano odpowiedzi czujników na AMI i DOX w pH 2 i 5. Dlatego też, jako optymalny do prowadzenia indywidualnej detekcji każdej z testowanych substancji psychoaktywnych wybrano bufor o pH 7 (Rys. 9). Analityczne charakterystyki wybranej metody oznaczenia dla poszczególnych TLPD zestawiono w tabeli 3.

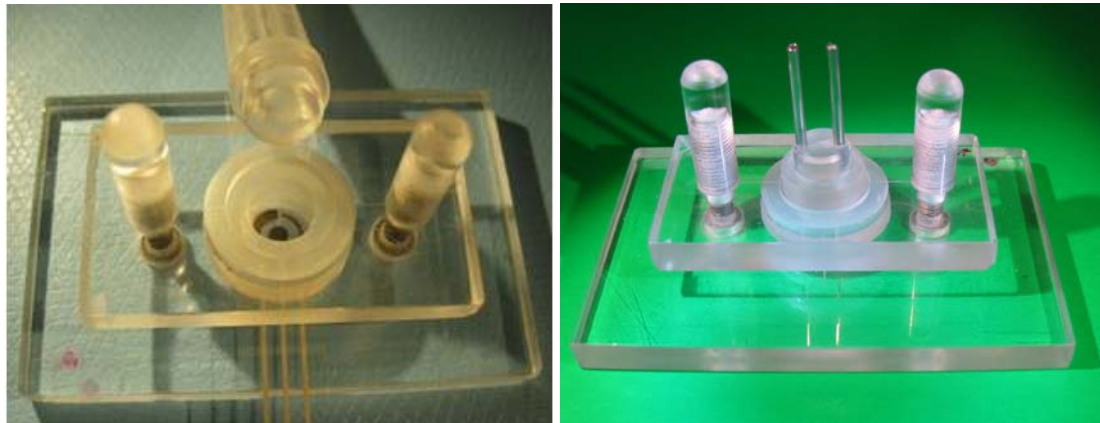
Tabela 3. Charakterystyka analityczna detekcji trzech wybranych TLPD zaproponowana metodą oznaczania użyciem czujników grafitowych (przygotowanych robotem). Warunki optymalne: 50 mM bufor fosforanowy o pH 7,0 (0,1 M KCl). CV w zakresie 0,0 V – 1,2 V, szybkość skanowania 100 mV/s, Estep 5 mV. Czas inkubacji leku przed rejestracją krzywej woltamperometrycznej: 2 min.

Optymalizowane parametry	Trójcykliczna substancja psychoaktywna		
	IMI	AMI	DOX
Linioowy zakres stężeń	1 – 25 μM	0,1 – 25 μM	0,1 – 10 μM
Czułość	86,0 nA/μM	27,6 nA/μM	32,0 nA/μM
Potencjał utleniania	0,780 V	1 V	1 V



Rys. 9. Detekcja trzech wybranych TLPD metodą CV (warunki opisano w tabeli 2).

Zaproponowane zostały także inne rozwiązania konstrukcyjne z celką przystosowaną do pracy z wytworzonymi czujnikami grubowarstwowymi w warunkach stacjonarnych i przepływowych (rys. 10).



Rys. 10. Celka do pracy z wytworzonymi czujnikami grubowarstwowymi w warunkach stacjonarnych i przepływowych.

Tabela 4. Wyniki oznaczenia DEZY w materiale biologicznym.

Analizowana objętość [μL]	Próbka 1 [ng mL^{-1}] \pm SD	RE [%]	Próbka 2 [ng mL^{-1}] \pm SD	RE [%]	Metoda referencyjna (U-HPLC-UV) [ng mL^{-1}]
150	68.2\pm1.1	1.7	69.5\pm0.9	3.7	67.0
3000	72.6 \pm 2.1	8.3	70.9 \pm 3.3	5.8	

SD - odchylenie standardowe, n=3

Uzyskane wyniki badań (Tabela 4) świadczą, że opracowana metoda dostarcza dokładnych i precyzyjnych wyników dla pomiarów zarówno w mikro-, jak i makro- naczynku. Otrzymana granica wykrywalności jest wystarczająca do oznaczania DEZY w płynie z jamy ustnej na poziomach terapeutycznych z zastosowaniem omówionych czujników oraz metodyki badań oraz daje możliwość zastosowania opracowanej procedury

w badaniach przesiewowych czy oznaczeniach ilościowych. Wyniki powinny przyczynić się do opracowania w przyszłości elektrochemicznego urządzenia służącego do oznaczania substancji psychoaktywnych pod kątem badań klinicznych czy u osób kierujących pojazdami mechanicznymi.