

MIKROFLUIDIKA: NOVÝ ZPŮSOB ÚPRAVY A VNÁŠENÍ VZORKŮ PRO HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII

JAKUB GRYM a FRANTIŠEK FORET

Ústav analytické chemie, Akademie věd České republiky,
Veveří 97, 61142 Brno foret@iach.cz

Došlo 28.8.05, přijato 6.10.05.

Klíčová slova: mikrofluidika, hmotnostní spektrometrie, elektrosprej

Obsah

1. Úvod
2. Mikrotechnologie
3. Základní návrhy spojení mikrofluidiky s hmotnostní spektrometrií
 - 3.1. Rozhraní pro ESI-MS
 - 3.2. Aplikace
4. Závěr

1. Úvod

Detekce a charakterizace látek hmotnostní spektrometrií závisí na účinnosti počátečních stupňů přípravy vzorků. Tyto postupy často vyžadují několik následných stupňů, které jsou časově i finančně náročné. Paralelní postupy a automatizace jsou nezbytné pro většinu projektů vyžadujících analýzu velkého množství vzorků, jako např. v genomice nebo proteomice.

V posledním desetiletí jsme svědky velkého pokroku na poli mikrofluidiky („laborať na čipu“), miniaturizace a integrace analytických procesů. Lze předpokládat, že mikrofluidika bude hrát důležitou roli při vývoji instrumentace pro hromadné analýzy^{1–8}. Hlavní přínosy spojené s miniaturizací spočívají v rychlosti analýz, malé spotřebě vzorku a činidel, integraci funkčních prvků a možnosti paralelních analýz^{9–21}. Typické příklady využití miniaturizace a mikrofluidiky zahrnují vývoj v oblastech mikrokolonové chromatografie (μ LC), kapilární elektrochromatografie (CEC), kapilární elektroforézy (CE)^{4–9}, předkoncentračních jednotek a mikroreaktorů^{10–12}. Tyto techniky lze využít např. pro analýzy DNA, proteinů, peptidů nebo pro screening léčiv^{14,24–31}. Klíčovým prvkem pro využití mikrofabrikovaných zařízení pro proteomiku je spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem (ESI-MS) nebo MALDI-MS (matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry)^{22–25}.

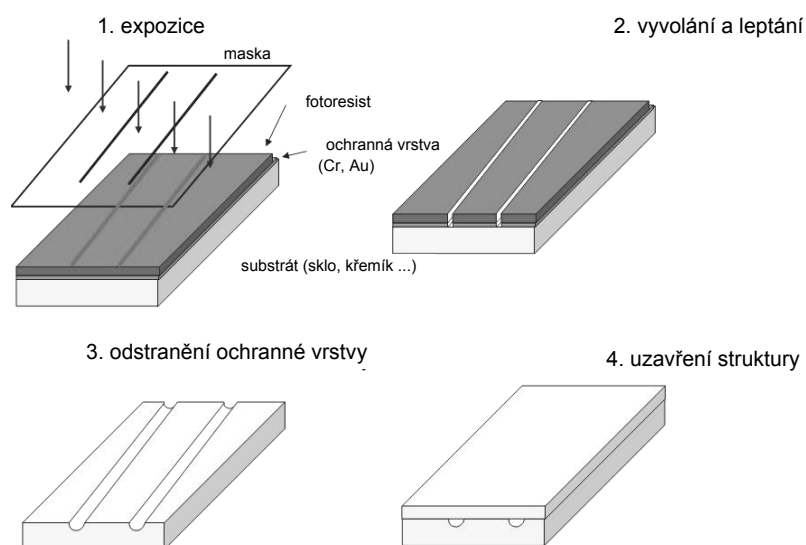
2. Mikrotechnologie

Mikrotechnologie nachází uplatnění hlavně při výrobě elektronických integrovaných obvodů. Standardním materiálem je křemík a velikost obvodů je v rozmezí od jednotek mm^2 (např. operační zesilovač) po jednotky cm^2 u mikroprocesorů. Nejmodernější technologie dnes umožňují tvorbu struktur s velikostí 60 nm. Mikrofluidická zařízení jsou v současném stupni vývoje podstatně jednodušší. Velikosti kanálků se pohybují většinou v rozsahu desítek mikrometrů a celé mikrofluidické bloky dosahují rozměrů 5–100 cm^2 . Mikrofluidické „čipy“ mohou být vyrobeny z různých materiálů, např. skla^{4,6–8}, křemene^{12–13}, křemíku^{5,9} nebo polymerních substrátů^{16–20}. Výběr určitého materiálu závisí na jeho povrchových vlastnostech, dostupné technologii výroby a na ceně. Pro dosud nejrozšířenější optickou detekci (UV, laserem indukovaná fluorescence) jsou důležité i optické vlastnosti použitých materiálů.

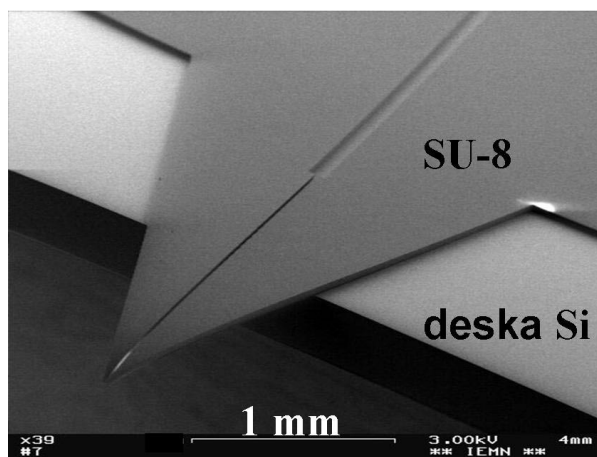
Nejpoužívanější technikou pro výrobu mikročipů je fotolitografie následovaná chemickým leptáním. Typický postup s využitím skla jako výchozího materiálu je na obr. 1.

Na plochu substrátu je ve vakuu nanášena cca 100 nm silná ochranná kovová vrstva (chrom; zlato) a potom tenká vrstva fotoresistu (0,4–2 μm). Poté je přes masku se zvolenou strukturou exponován fotoresist UV zářením při vlnové délce 300–400 nm. Fotochemická reakce během expozice buď rozruší polymerní strukturu fotoresistu (pozitivní resist) nebo ji zesílí (negativní resist). Při následném chemickém vyvolání je fotoresist odstraněn buď z exponované (pozitivní) nebo neexponované (negativní) plochy. Po odstranění ochranné kovové vrstvy je pak exponovaný substrát leptán roztokem HF do požadované hloubky kanálků (5–50 μm). Při použití skla jako substrátu je leptání anizotropické a šířka výsledného kanálku je větší než rozměry masky. Po důkladném vyčištění jsou vyleptané kanálky shora uzavřeny tepelným slinutím křemíku skla (thermal bonding) při 500–600 °C. Samotné masky jsou nejčastěji připravovány na skleněné desce pokryté kovovou vrstvou absorbující UV záření (zlato nebo chrom 800–1000 Å). Obrazec masky je obvykle vytvořen přímým zápisem laserem nebo elektronovým paprskem.

Kromě anorganických materiálů jsou pro výrobu mikrofluidických systémů vhodné i plasty dovolující při hromadné výrobě značně snížit náklady. Plastová mikrofluidika (polyimid, polystyren, polyetylen, polykarbonát atd.) může být připravována různými technologiemi. Nejpoužívanější postupy využívají laserovou ablací^{17,32}, odlévání proti vzoru s negativní mikrostrukturou¹⁷, tepelné vtisknutí šablony (hot embossing)¹⁸, tlakové lití¹⁹ nebo ablace rentgenovým paprskem²⁰. Z dalších technologií, které jsou většinou modifikované postupy z elektronického průmys-



Obr. 1. Schéma fotolitografické přípravy mikrofluidického bloku

Obr. 2. Elektrosprejová špička vytvořená z fotorezistu SU-8 na křemíkovém plátku; 20 μm široká dělicí drážka spojující separační kanálek s vrcholem špičky slouží pro transport sprejované kapaliny kapilárními silami

lu, stojí za zmínku zejména litografie s využitím fotoresistu SU-8. Tento materiál umožňuje tvorbu mikrostruktur s velkým poměrem výška/šířka a je často používán pro přípravu šablon (master) pro replikaci. Příklad mikrofabrikované elektrosprejové špičky připravené na křemíkovém plátku z materiálu SU-8 (www.microchem.com) je na obr. 2 (cit.³⁴). Další podrobné informace o technologiích pro mikrofluidiku lze najít na mnoha webových stránkách specializovaných pracovišť. Přehled řady užitečných odkazů je např. na webových stránkách Ústavu analytické chemie AV ČR (cit.³⁵).

3. Základní návrhy spojení mikročipu a hmotnostního spektrometru

Nejčastějšími strukturami, které jsou vyvíjeny pro mikrofluidická zařízení, jsou separační jednotky, dávkovače vzorku, pumpy a výstupy pro rozhraní MS. Hlavní výhodou integrace jednotlivých prvků do jednoho systému je jednoduchost vytvoření rozvětvených kanálků bez tvorby mrtvých objemů a s tím spojeného rozmytí.

Kapilární elektroforéza je nejčastější separační metodou využívanou pro separace na mikročipech. Souvisí to s jednoduchostí připojení elektrod separačního napětí (na rozdíl od připojení chromatografické pumpy) a také je zájem o separace směsí DNA nebo proteinů, které jsou většinou analyzovány elektroforézou. Není proto překvapující, že první komerční mikrofluidická zařízení jsou určena pro elektroforetickou analýzu^{36–38}.

Značné úsilí je také zaměřeno na vývoj μLC . Účinnost LC pro separaci směsí peptidů a vyšší dávkovací kapacita oproti elektroforéze vytváří předpoklad pro citlivé separace s mikročipy. V nejjednodušším uspořádání lze plnit kanály mikročipu běžnými stacionárními fázemi³⁹. Novější směr představují polymerní monolitické kolony, ve kterých je stacionární pórovitá struktura polymerována přímo uvnitř separačního kanálku. Tyto kolony jsou charakterizovány vysokou účinností (cca 10^5 teoretických pater $\cdot \text{m}^{-1}$) a vysokou výslednou permeabilitou při nižším tlaku než u náplňových kolon⁴⁰. Monolitické materiály nabízejí potenciál i pro vícekolonové systémy a tvorbu chemických reaktorů⁴¹. Třetí způsob přípravy chromatografické kolony představuje fotolitografická tvorba miniaturních sloupků, které slouží jako částice sorbentu, přímo uvnitř mikrofluidického bloku. Tyto struktury o rozměrech $5 \times 5 \times 10 \mu\text{m}$ byly například připraveny s využitím reak-

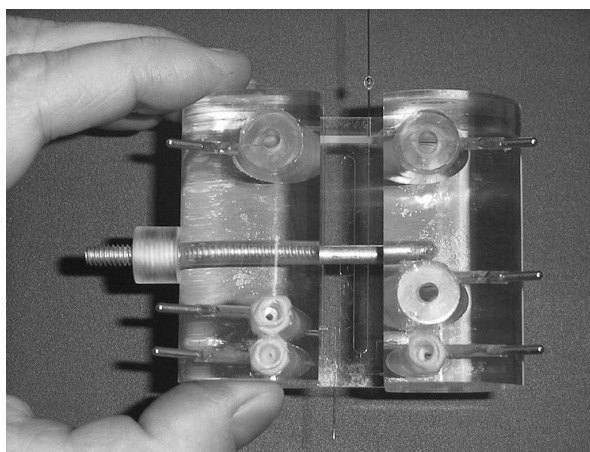
tivního iontového leptání (deep reactive ion etching)⁴².

Pro dávkování vzorku do mikrofluidických systémů je nejčastěji používáno křížové (cross), nebo dvojitě T (double-T) uspořádání^{4,6}. V prvním případě je vzorek přiváděn kanálkem, který kříží separační kolonu, a objem dávkovaného vzorku je definován prostorem v místě křížení. Toto uspořádání sice umožňuje dávkovat velmi malé objemy, ale s nepříliš dobrou reprodukovatelností. V mnoha případech je výhodnější objem (reprodukovatelnost a kapacita) dávkování zvýšit uspořádáním „dvojitě T“, kdy je vzorek přiveden ze strany a po vyplnění určitého segmentu (např. 1 mm) je opět odveden mimo separační kolonu. Pro transport vzorku uvnitř kanálků je často používána elektroosmóza umožňující snadné řízení rychlosti a směru toku vkládaným elektrickým napětím. Alternativně lze pro separaci a dávkování využít také tlak nebo vakuum⁴³, kdy vzorek do kanálku tléká během předem určené doby za předem určeného tlakového rozdílu. Pro off-line spojení s MALDI-MS bylo využito i piezoelektrického elementu^{44,45}, který umožňuje generovat rychlý sled kapiček s pikolitrovým objemem. Na tomto místě stojí též za zmínku i vývoj chemických mikroreaktorů, které lze vytvářet v místech průchodu vzorku. Nejdůležitější současnou aplikací je dnes především imobilizace enzymů (např. trypsinu) buď přímo na stěny kanálků, nebo na segmenty polymerní náplně⁴¹.

3.1. Rozhraní pro ESI-MS

Typické průtoky v mikrofluidických kanálkách jsou v rozsahu 10–300 nl min⁻¹. Tyto hodnoty jsou zároveň blízké optimálním průtokům při mikro/nano elektrosprejové ionizaci. Vhodným uspořádáním výstupu kapaliny z mikrofluidického bloku by tedy mělo být umožněno přímé (on-line) spojení s hmotnostním spektrometrem. Při prvních pokusech o generování ESI z mikrofluidických bloků bylo využito ústí kanálku vystupující na povrch čipu^{22–24}. Dále byly testovány možnosti použití kapalinového spoje (liquid junction) a obtékané elektrosprejové jehly (liquid sheath)^{25–31,43,46–51}. V poslední době, byly testovány i elektrosprejové jehly mikrofabrikované jako součást mikročipu^{32,52,53}.

Generování elektrospreje přímo z ústí kanálku na povrchu čipu vychází z předpokladu, že použitý materiál (sklo) je dobrý elektrický izolant a že malý průřez kanálku umožňuje dosáhnout dostatečně vysoké intenzity elektrického pole pro ionizaci ESI. V praxi tak lze dosáhnout kvalitní ESI-MS spektra při infuzi vzorků peptidů a proteinů^{22,23}. Toto nejjednodušší uspořádání má ovšem i závažný nedostatek pro praktické využití. Tím je smáčení povrchu kolem ústí kanálku, které vede ke tvorbě kapky s objemem několika desítek nanolitřů. Vzniklý mrtvý objem neumožňuje použití tohoto uspořádání pro separaci, kdy celkový objem zón se pohybuje v jednotkách nl. Částečným řešením je silanizace povrchu kolem ústí kanálku²². Hydrofobizace povrchu může omezit roztékání kapaliny vycházející z kanálku čipu. Tato úprava byla použita ve vícekanálovém systému pro ESI-MS analýzu peptidových směsí²⁴. Jako zajímavost lze uvést, že vlastnosti otevřených elek-



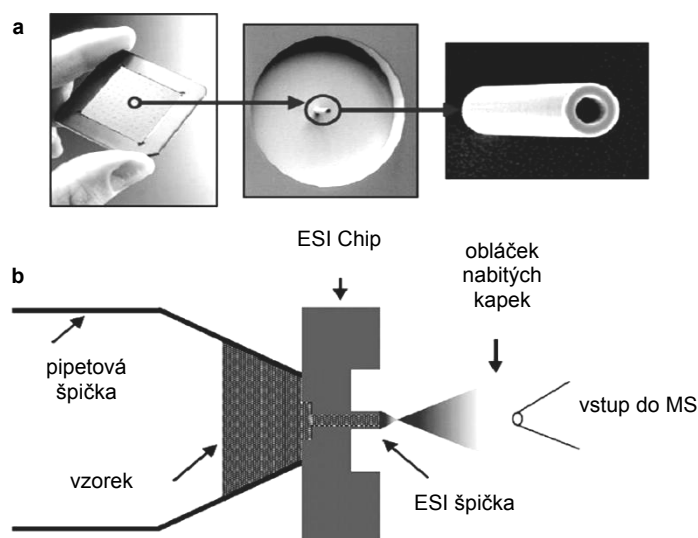
Obr. 3. Mikrofluidický blok pro spojení CE-ESI-MS s externími elektrodovými zásobníky a kapilárami pro dávkování vzorku a elektrosprej

trosprejových kanálků připravených v silně hydrofobních plastech byly nedávno detailněji studovány v rámci vývoje reaktivního pohonu meziplanetárních sond⁵⁴. V souladu s předešlými experimentálními výsledky bylo zjištěno, že elektrosprej aktivovaný z kanálku v hydrofobním materiálu např. (poly(dimethylsiloxan)) je velmi podobný klasickému elektrospreji s jehlou⁵⁵. Pro praktické využití bude však ještě nezbytný další vývoj.

Standardní způsob pro ionizaci ESI v současnosti využívá transport vzorku přes dutou jehlu (zaostřenou kapiláru, skleněnou pipetovou špičku atd.) připojenou na 1–4 kV. Pro studijní účely je možné použít externí ESI jehlu připojenou buď přímo ke konci mikrokanálku^{25–28,43,47,49,51}, nebo s využitím kapalinového spoje⁵⁶. Příklad tohoto uspořádání je na obr. 3 (cit.⁴³).

Mikrofabrikace jehel ESI společně se separačními kanálky není jednoduchá a stále jsou ještě vyvíjeny vhodné technologie. Kromě již zmiňovaného fotorezistu SU-8, byly struktury dutých jehel vyrobeny i z vrstev parylenu (poly(*p*-xylen)) připravených vakuovou polymerizací nanesených na křemíkovém substrátu⁵². Nejpokročilejší technologií je však v současnosti pravděpodobně reaktivní iontové leptání (deep reactive ion etching), s jehož pomocí lze na křemíkovém plátku připravit pole elektrosprejových emitorů (průměr 10 μm, výška 50 μm). Toto uspořádání, které je zobrazeno³² na obr. 4, je dnes dostupné i komerčně⁵⁷ pro hromadnou infuzní analýzu.

Mnoho úsilí je věnováno vývoji mikrofluidických zařízení na jedno použití. Vzhledem ke značnému komerčnímu potenciálu se vývoj zaměřuje hlavně na přípravu mikročipů z plastů. Jednou z prakticky používaných technologií výroby mikrokanálku s integrovanou elektrosprejovou špičkou je plazmové leptání polyimidu⁵⁸. Východním materiálem, je polyimidová fólie (tloušťka 300 až 1000 μm) potažená vrstvou mědi o síle 5–30 μm. Tyto materiály se běžně používají pro výrobu ohebných plošných spojů v elektronice. Vzhledem k chemické odolnosti



Obr. 4. Pole elektrosprejových špiček vytvořené na křemíkovém plátku; část a) zobrazuje celý čip a detaily ESI špičky, část b) znázorňuje princip činnosti, kdy je analyzovaný vzorek přiváděn ze zadní strany běžnou plastovou pipetovací špičkou

je polyimid velmi vhodný i pro mikrofluidické struktury, které se nejprve fotolitograficky vytvoří na měděné vrstvě. Po odleptání slouží takto vytvořená negativní měděná struktura jako maska pro oxidační plazmové leptání polyimidu. Elektrosprejové špičky lze v nejjednodušším případě vytvořit přímo ořezem polyimidové fólie kolem ústí kanálku. Pro jemnější opracování bylo též použito obrábění excimerovým laserem⁵⁹. Obdobné postupy jsou využívány i pro komerční produkci integrovaného systému pro HPLC na čipu ve spojení s hmotnostní spektrometrií³⁶. Vysoké napětí pro generování elektrospreje lze připojit buď vodivou vrstvou (napařené zlato) nanesené přímo na elektrosprejovou špičku, nebo lze využít elektrické vodivosti nosného elektrolytu (nebo i vzorku samotného) a zdroj vysokého napětí připojit elektrodou umístěnou na vhodném místě podél dráhy průtoku vzorku.

3.2. Aplikace

Vývoj spojení mikrofluidiky s hmotnostní spektrometrií započal v posledních několika letech a lze očekávat podstatná vylepšení jak v technologii přípravy, tak v praktických návrzích a aplikacích. Zájem o tuto problematiku lze dokumentovat na vzrůstajícím počtu publikací, které se každoročně objevují ve vědecké literatuře.

Přímá infuze vzorků

Na počátku vývoje byly mikročipy využívány hlavně pro přímou infuzi vzorku. Hlavním trendem jsou dnes čipy pro jednorázové použití, které eliminují možnost kontaminace z předchozích analýz. Uspořádání je nejčastěji navrženo tak, aby byla dosažena kompatibilita se standardními mikrotitračními destičkami s 96 (384, 1536) jamkami. Toho lze dosáhnout buď návrhem mikrofluidického zařízení v tomto formátu⁶⁰, nebo využitím robotiky, kde ve spo-

jení s pipetovací špičkou (ZIP TIP[®]) může systém provádět rychlé MS analýzy přímou infuzí bez nebezpečí kontaminace vzorku⁵⁷. Řada publikovaných aplikací zahrnuje kvantitativní analýzu léčiv v plasmě^{61,62}, monitorování ligandů⁶³ nebo analýzu sacharidů^{64,65}.

Zkoncentrování a předseparace vzorku

Zkoncentrování a předseparace vzorku jsou často nezbytné pro dosažení kvalitních výsledků MS. Zlepšení citlivosti, buď fokusací na čipu, např. isotachofórou⁴⁶ nebo externím zkoncentrováním vzorku, který je spojen s mikročipem⁵⁰, je stále věnována značná pozornost. Vzhledem k velmi malým průtokům, které lze ionizovat nanoelektrosprejem, je předkoncentrace vzorku velmi důležitá. Jako příklad lze uvést analýzu trypsinových peptidů proteinů získaných při separaci lyzátu membránových proteinů extrahovaných z *H. influenzae* na 2D PAGE. V tomto případě⁵⁰ byly 3 μ l proteinového digestu zkoncentrovány na náplni sorbentu C18 a potom analyzovány kapilární elektroforézou na čipu ve spojení s ESI na hmotnostním spektrometru-Qq-TOF během 90 s. Typický limit detekce po zkoncentrování byl 2 nM. Alternativní metodou zkoncentrování vzorků peptidů je připojení zásobníku sorbentu C18 mezi mikročip a elektrosprej. V tomto případě byly analyzovány koncentrace 0,1 nM (cit.²⁶). Kromě nespecifických hydrofobních interakcí lze pro zachycení žádané části vzorku využít i afinitních interakcí, např. sorbent s imobilizovanými protilátkami pro identifikaci peptidových fragmentů⁶⁶.

Zajímavé je použití sendvičových struktur s kanálky oddělenými membránou. Jako příklad může sloužit použití dvojité mikro dialýzy pro odstranění nečistot ze vzorku (s malou i velkou molekulovou hmotností), která byla použita v mikrozařízení spojeném s kvadrupólovou ionto-

vou pastí ESI/MS (cit.³⁰). Zde byl polykarbonátový blok s hadovitě tvarovaným kanálkem vložen mezi dvě dialyzační membrány. Příměsi s vybranými molekulovými hmotnostmi byly ze vzorku odstraněny během průchodu vzorku k elektrosprejovému rozhraní. Toto zařízení bylo použito při analýzách vzorků DNA a proteinů. Podobné mikročipy pro odsolování proteinových vzorků byly vyrobeny i v polyimidu^{67,68}.

Separace

Jak již bylo zmíněno, elektroforéza je v současné době nejčastějším módem separace v mikrofluidických zařízeních. Častou aplikací představuje separace směsí proteinů, peptidů a proteinových štěpů (protein digest). Pokud je zařízení dobře navrženo, je dosažená separace podobná jako při použití běžných kapilárních kolon. V přepočtu na jednotku délky separačního kanálku se separační účinnosti pohybují v řádu stovek tisíc teoretických pater na metr. Tato účinnost většinou stačí i při použití relativně krátkých separačních kanálků, typických pro mikrofluidické systémy⁴³. V případě, že se podaří minimalizovat adsorpci na stěny separačního kanálku, lze stejné zařízení s úspěchem použít i pro analýzu proteinů. Ukázka separace proteinů v 11 cm dlouhém separačním kanálku (s polokruhovým průřezem a poloměrem 30 μm) je na obr. 5.

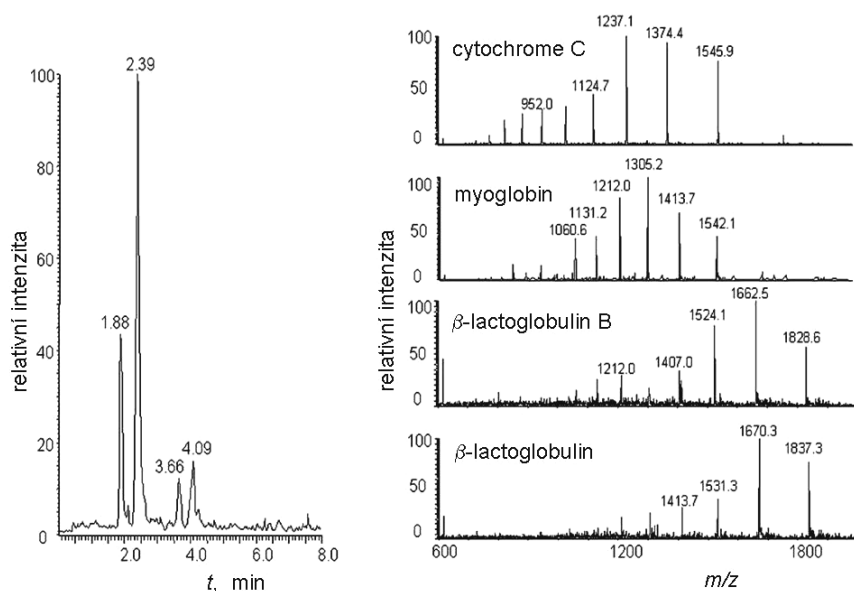
Dalším příkladem je analýza peptidů připravených trypsinovým štěpením 25 ng (5 μl) proteinu izolovaného po SDS elektroforéze⁵¹. Původní vzorek extraktu membránových proteinů z *H. influenzae* byl pro SDS elektroforézu aplikován v rozmezí 1–2 μg . Toto velmi malé počáteční množství vzorku dokumentuje schopnost mikrofluidických zařízení manipulovat a analyzovat stopová množství vzorků.

Odlíšná koncepce mikroanalyzátoru byla uplatněna při návrhu sendvičového typu mikrozařízení z polykarbonátového bloku uzavřeného poly(ethylenetereftalátovým) filmem. V tomto návrhu byla laserovou ablací připravena i pyramidová ESI špička a zařízení bylo používáno pro isoelektrickou fokusaci a detekci proteinů MS (cit.^{53,69}).

Kromě analýzy proteinů a peptidů bylo použití mikrofluidiky testováno i na řadě dalších vzorků, zejména pak pro separaci léčiv a metabolitů v tělesných tekutinách, což obvykle vyžaduje předúpravu vzorku (odsolení, deproteinaci atd.). Také zde se očekává, že mikrofluidika by mohla hrát důležitou roli, zvláště s využitím systémů integrujících separační kolonu s rozhraním ESI (cit.^{70–72}). Je však třeba zdůraznit, že pro komerční úspěch bude třeba ještě ve vývoji pokračovat.

4. Závěr

Velké pokroky na poli mikrofluidiky mění bioanalytickou instrumentaci. Nejnovější trendy jsou publikovány ve specializovaných časopisech nebo speciálních číslech renomovaných časopisů⁷³. Více detailních prací o mikrofluidice lze nalézt v nejnovějších souhrnných článkách^{74,75}. Mikročipy mohou nabízet podstatné výhody, zvláště v souvislosti s on-line reaktory (IMER), pro čištění a zkoncentrování vzorku, nebo i pro jeho separaci. Vysoká rychlost separací na čipu je plně kompatibilní s velkým počtem analýz, které jsou ve spojení s hmotnostním spektrometrem vyžadovány v proteomice. Kapilární elektroforéza je nyní ve velké míře testována i na čipech. Spojení CE-MS umožňuje provést velké množství analýz ve velmi



Obr. 5. Analýza CE-MS směsí proteinů; základní elektrolyt 20 mM octan amonný-kyselina octová (pH 4,4), rozhraní ESI s kapalinovým spojem

krátké době. Stejně rychle lze provádět analýzy i s využitím chromatografických principů a lze předpokládat, že jak CE-MS, tak LC-MS budou dále vyvíjeny i v mikrofluidice. Dále lze očekávat, že paralelní separační mikrokolony⁷⁶ budou využívány i pro nanášení vzorků na MALDI terčíky pro hromadnou analýzu s využitím TOF (TOF-TOF) spektrometrů.

Tato práce byla podpořena z výzkumného záměru UIACH Z40310510 a projektů GA AV ČR S4031209 a GA ČR 203/03/0515.

LITERATURA

- Manz A., Graber N., Widmer H. M.: *Sens. Actuators B 1*, 244 (1990).
- Manz A., Miyahara Y., Miura J., Watanabe Y., Miyagi H., Sato K.: *Sens. Actuators B 1*, 249 (1990).
- Manz A., Fettinger J. C., Verpoorte E. M. J., Lüdi H., Widmer H. M., Harrison D. J.: *Trends Anal. Chem.* **10**, 144 (1991).
- Harrison D. J., Manz A., Fan Z. H., Lüdi H., Widmer H. M.: *Anal. Chem.* **64**, 1926 (1992).
- Harrison D. J., Glavina P. G., Manz A.: *Sens. Actuators B 10*, 107 (1993).
- Jacobson S. C., Hergenröder R., Koutny L. B., Wärmack R. J., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* **66**, 1107 (1994).
- Jacobson S. C., Hergenröder R., Koutny L. B., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* **66**, 1114 (1994).
- Jacobson S. C., Hergenröder R., Koutny L. B., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* **66**, 2369 (1994).
- McEnery M., Tan A. M., Alderman J., Patterson J., O'Mathuna S. C., Glennon J. D.: *Analyst* **125**, 25 (2000).
- Murakami Y., Takeuchi T., Yokoyama K., Tamiya E., Karube I., Suda M.: *Anal. Chem.* **65**, 2731 (1993).
- Jacobson S. C., Koutny L. B., Hergenröder R., Moore A. W., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* **66**, 3472 (1994).
- Jacobson S. C., Ramsey J. M.: *Electrophoresis* **16**, 481 (1995).
- Jacobson S. C., Moore A. W., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* **67**, 2059 (1995).
- Woolley A. T., Mathies R. A.: *Anal. Chem.* **67**, 3676 (1995).
- Bousse L., Mouradian S., Minalla A., Yee H., Williams K., Dubrow R.: *Anal. Chem.* **73**, 1207 (2001).
- Roberts M. A., Rossier J. S., Bercier P., Girault H.: *Anal. Chem.* **69**, 2035 (1997).
- Duffy D. C., Schueller O. J. A., Brittain S. T., Whitesides G. M.: *J. Micromech. Microeng.* **9**, 211 (1999).
- Martynova L., Locascio L. E., Gaitan M., Kramer G. W., Christensen R. G., MacCrehan W. A.: *Anal. Chem.* **69**, 4783 (1997).
- Xu J. D., Locascio L., Gaitan M., Lee C. S.: *Anal. Chem.* **72**, 1930 (2000).
- Ford S. M., Kar B., McWhorter S., Davies J., Soper S. A., Klopff M., Calderon G., Saile V.: *J. Microcolumn. Sep.* **10**, 413 (1998).
- Madou M.: *Fundamentals of Microfabrication*. CRC Press, Boca Raton 1997.
- Xue Q. F., Foret F., Dunayevskiy Y. M., Zavracky P. M., McGruer N. E., Karger B. L.: *Anal. Chem.* **69**, 426 (1997).
- Ramsey R. S., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* **69**, 1174 (1997).
- Xue Q. F., Dunayevskiy Y. M., Foret F., Karger B. L.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1253 (1997).
- Figeys D., Ning Y. B., Aebersold R.: *Anal. Chem.* **69**, 3153 (1997).
- Figeys D., Aebersold R.: *Anal. Chem.* **70**, 3721 (1998).
- Figeys D., Gygi S. P., McKinnon G., Aebersold R.: *Anal. Chem.* **70**, 3728 (1998).
- Figeys D., Lock C., Taylor L., Aebersold R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, 1435 (1998).
- Xu N. X., Lin Y. H., Hofstadler S. A., Matson D., Call C. J., Smith R. D.: *Anal. Chem.* **70**, 3553 (1998).
- Xiang F., Lin Y. H., Wen J., Matson D. W., Smith R. D.: *Anal. Chem.* **71**, 1485 (1999).
- Li J. J., Thibault P., Bings N. H., Skinner C. D., Wang C., Colyer C., Harrison D. J.: *Anal. Chem.* **71**, 3036 (1999).
- Schultz G. A., Corso T. N., Prosser S. J., Zhang S.: *Anal. Chem.* **72**, 4058 (2000).
- Tang K. Q., Lin Y. H., Matson D. W., Kim T., Smith R. D.: *Anal. Chem.* **73**, 1658 (2001).
- Le Gac S., Arscott S., Ronaldo C.: *Electrophoresis* **24**, 3640 (2003).
- <http://www.iach.cz/ins/Useful%20Links.htm>, staženo 20.10.05.
- <http://www.agilent.com/>, staženo 20.10.05.
- <http://www.calipertech.com/>, staženo 20.10.05.
- <http://www.biorad.com/>, staženo 20.10.05.
- Colón L. A., Maloney T. D., Fermier A. M.: *J. Chromatogr., A* **887**, 43 (2000).
- Švec F.: *J. Sep. Sci.* **27**, 1419, (2004).
- Křenková J., Foret F.: *Electrophoresis* **25**, 3550, (2004).
- He B., Tait N., Regnier F.: *Anal. Chem.* **70**, 3790 (2000).
- Zhang B. L., Foret F., Karger B. L.: *Anal. Chem.* **72**, 1015 (2000).
- Laurell T., Wallman L., Nilsson J.: *J. Micromech. Microeng.* **9**, 369 (1999).
- Laurell T., Nilsson J., Marco-Varga G.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* **752**, 217 (2001).
- Zhang B., Liu H., Karger B. L., Foret F.: *Anal. Chem.* **71**, 3258 (1999).
- Lazar I. M., Sundberg S., Ramsey R. S., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* **71**, 3627 (1999).
- Lazar I. M., Ramsey R. S., Jacobson S. C., Foote R. S., Ramsey J. M.: *J. Chromatogr., A* **892**, 195 (2000).
- Bings N. H., Wang C., Skinner C. D., Colyer C. L., Thibault P., Harrison D. J.: *Anal. Chem.* **71**, 3292

- (1999).
50. Li J. J., Wang C., Kelly J. F., Harrison D. J., Thibault P.: *Electrophoresis* 21, 198 (2000).
 51. Li J. J., Kelly J. F., Chemushevich I., Harrison D. J., Thibault P.: *Anal. Chem.* 72, 599 (2000).
 52. Licklider L., Wang X. Q., Desai A., Tai Y. C., Lee T. D.: *Anal. Chem.* 72, 367 (2000).
 53. Wen J., Lin Y. H., Xiang F., Matson D. W., Udseth H. R., Smith R. D.: *Electrophoresis* 21, 191 (2000).
 54. Lozano P., Martinez-Sanchez M., Lopez-Urdiales J. M.: *Colloid Interface Sci.* 276, 392 (2004).
 55. Svedberg M., Veszelei M., Axelsson J., Vangbo M., Nikolajeff F.: *Lab. Chip* 4, 322 (2004).
 56. Foret F., Zhou H. H., Gangl E., Karger B. L.: *Electrophoresis* 21, 1363 (2000).
 57. <http://www.advion.com>, staženo 20.10.05.
 58. Rohner T. C., Rossier J. S., Girault H. H.: *Anal. Chem.* 73, 5353, (2001).
 59. Rossier J. S., Vollet C., Carnal A., Lager G., Gobry V., Girault H. H., Michel P., Reymond F.: *Lab. Chip* 2, 145 (2002).
 60. Liu H. H., Felten C., Xue Q., Zhang B. L., Jedrzejewski P., Karger B. L., Foret F.: *Anal. Chem.* 72, 3303 (2000).
 61. Kapron J. T., Pace E., Van Pelt C. K., Henion J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2019 (2003).
 62. Leuthold L. A., Grivet C., Allen M., Baumert M., Hopfgartner G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1995 (2004).
 63. Keetch C. A., Hernandez H., Sterling A., Baumert M., Allen M. H.: *Anal. Chem.* 75, 4937 (2003).
 64. Zamfir A., Vakhrushev S., Sterling A., Niebel H. J., Allen M., Peter-Katalinic J.: *Anal. Chem.* 76, 2046 (2004).
 65. Zhang S., Chelius D.: *J. Biomol. Technol.* 15, 120 (2004).
 66. Li Y., Cooper J. W., Lee C. S.: *J. Chromatogr., A* 979, 241 (2002).
 67. Lion N., Gobry V., Jensen H., Rossier J. S., Girault H. H.: *Electrophoresis* 23, 3583 (2002).
 68. Lion N., Gellon J. O., Jensen H., Girault H. H.: *J. Chromatogr., A* 1003, 11 (2003).
 69. Zhang B. L., Foret F., Karger B. L.: *Anal. Chem.* 73, 2675 (2001).
 70. Deng Y. Z., Zhang N. W., Henion J.: *Anal. Chem.* 73, 1432 (2001).
 71. Deng Y. Z., Henion J., Li J. J., Thibault P., Wang C., Harrison D. J.: *Anal. Chem.* 73, 639 (2001).
 72. Kameoka J., Craighead H. G., Zhang H. W., Henion J.: *Anal. Chem.* 73, 1935 (2001).
 73. Miniaturization 2004, *Electrophoresis* 25, 2004.
 74. Marco-Varga G., Nilsson J., Laurell T.: *Electrophoresis* 24, 3521 (2003).
 75. Lion N., Gellon J. O., Girault H. H.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1614 (2004).
 76. <http://www.nanostream.com>, staženo 20.10.05.

J. Grym and F. Foret (*Department of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno*): **Mikrofluidics: New Method of Treatment and Introduction of Samples for Mass Spectrometry**

Microfluidics is of special interest for handling very small samples without dead-volume connections and danger of sample cross-contamination typical of standard liquid couplings. Although the majority of the current systems is designed with optical or electrochemical detection coupling, those with mass spectrometry have been also demonstrated. The instruments for automated sample infusion analysis are now commercially available and micro-devices utilizing chromatographic or capillary electrophoresis separation are developed. Background information on microchip manufacturing and microfluidic designs for interfaces to MS is presented. In addition to selected applications, potential future directions are also discussed.