

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Козаков Василий Александрович

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОЧИПОВЫХ
АНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ ЖИДКОСТНО-ЖИДКОСТНОЙ
ЭКСТРАКЦИИ И ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ**

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург
2005

Работа выполнена на кафедре аналитической химии
Санкт-Петербургского государственного университета

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор Москвин Леонид Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор Зенкевич Игорь Георгиевич,
кандидат технических наук Евстапов Анатолий Александрович

Ведущая организация:

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «20» октября 2005 г.

В 15 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д-212.232.37 по защите диссертации на соискание ученой степени доктора наук при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу: 199004, Санкт-Петербург, Средний пр., д. 41/43, Большая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. А.М. Горького по адресу: 199134, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9.

Автореферат разослан «14» сентября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



А.Г. Папсуева

2006-4
10946

2165571

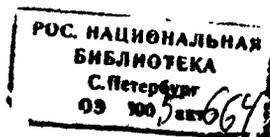
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Увеличение количества объектов анализа и одновременно определяемых аналитов при серийном анализе проб, особенно в областях биоаналитической химии и медицинской лабораторной диагностики, необходимость быстрого определения содержания компонентов в различных объектах окружающей среды, живого мира и человека требует применения производительных автоматизированных аналитических систем. В современной аналитической химии при анализе различных объектов все более широкое применение находят миниатюрные аналитические системы, основанные на применении *микрофлюидных чипов (МФЧ)*. МФЧ представляют собой устройства плапарной геометрии площадью несколько квадратных сантиметров с разветвленной сетью микроканалов и микрореакторов с размерами по ширине и глубине в диапазоне от десятков мкм до нескольких мм.

Интегрирование в одном чипе нескольких дозаторов, смесителей, реакторов и колонок потенциально позволяет совместить стадии пробоподготовки и разделения аналитов с последующим детектированием сигнала в одном устройстве, и возникает возможность появления целого класса устройств с новыми функциональными, пользовательскими и аналитическими характеристиками.

Наряду с переносом традиционных аналитических методов пробоподготовки и определения веществ различными методами в микромасштаб без существенных изменений, при использовании чипов появляются возможности, часто недостижимые или трудно реализуемые в макромасштабе. Это относится и к способам реализации жидкостной экстракции веществ в потоке в микроканалах чипов, и к одновременному проведению нескольких химических реакций в мультиреакторных чипах. В связи с этим необходимы теоретические и экспериментальные исследования по разработке новых микрочиповых аналитических систем, а также изучение процессов массопереноса в микроканалах чипа в гомогенной и мультифазных жидкостных системах и оптимизация условий проведения химических реакций в микрореакторах.

Цель работы. Разработка и создание микрочиповых аналитических систем для проведения жидкостно-жидкостной экстракции веществ в микроканалах и химических реакций в микрореакторах с флуоресцентным детектором, позволяющим с высокой чувствительностью и пространственным разрешением проводить детальное изучение процессов, протекающих в микроструктурах чипов. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: моделирование динамики протекания процессов массопереноса в микроканалах чипа; разработка системы детектирования и оценка её аналитических характеристик; практическое изучение процессов массопереноса в однофазной, двухфазной и трехфазной системах в потоке в микроканале чипа,



а также оптимизация условий проведения химической реакции (derivатизации катехоламинов) в микрореакторах мультиреакторного чипа.

Научная новизна. Предложена модель диффузионного переноса веществ в однофазных и двухфазных системах при контакте ламипарных микрофлюидных жидкостных потоков в микроканале чипа. Сравнением результатов численного моделирования и экспериментальных данных доказана адекватность предложенной модели. На основе результатов моделирования оценены равновесное время контакта потоков в микроканале чипа и соответствующие ему скорости движения жидкостей по микроканалу заданных размеров и формы.

Разработаны, созданы и исследованы аналитические системы на основе микрочипов для проведения жидкостной экстракции и химических реакций с флуоресцентным детектором на основе ПЗС-матрицы (*прибор с зарядовой связью*) и светодиода. Проведена оптимизация и оценка аналитических характеристик данного детектора применительно к микрочиповым системам.

Проведено изучение динамики процессов переноса веществ в поперечном сечении микроканала чипа в однофазной и двухфазной микрофлюидных системах потоков, достигнуто существенное ускорение экстракции веществ по сравнению с макромасштабом. Предложена экстракционная система с образованием трех фаз при контакте двух начальных микрофлюидных потоков жидкостей, обнаружен эффект значительного ускорения распределения вещества в подобной системе даже по сравнению с экстракцией в системе двух несмешивающихся жидкостей в микрочипе.

Оптимизирован ввод малых количеств проб в микрореакторы мультиреакторного чипа при проведении химической модификации внешней поверхности чипа. Выбраны оптимальные условия проведения модельной реакции (derivатизации катехоламинов) в микрореакторах чипа в зависимости от pH и температуры среды. Проведено сравнительное изучение кинетики взаимодействия норадреналина, адреналина и дофамина с 4-фтор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом в микрореакторах чипа.

Практическая значимость работы. Разработаны микрочиповые аналитические системы для проведения жидкостной экстракции в потоке и химических реакций в микрореакторах, на основе которых возможно создание микрочипового анализатора, обеспечивающего возможность проведения аналитических операций за десятки секунд с малым расходом реагентов (десятки нл/с) и малым объемом вводимых проб (2 мкл на реактор). Полученные результаты могут быть использованы при анализе веществ в областях медицинской лабораторной диагностики, биохимии и аналитической химии.

В результатах исследований заинтересованы институты биохимического и медицинского профиля, а также организации аналитического приборостроения: Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (г.Москва),

Институт аналитического приборостроения РАН (г.С-Петербург), НПФ АП «Люмэкс» (г.С-Петербург), Kanagawa Academy of Science and Technology (Япония)

Положения, выносимые на защиту.

1. Модель диффузионного переноса вещества в плоскости поперечного сечения микроканала чипа для однофазной и двухфазной систем и экспериментальное подтверждение ее адекватности.
2. Микрочиповые аналитические системы для проведения жидкостной экстракции веществ в потоке и химических реакций в микрореакторах с флуоресцентным детектором на основе ПЗС-матрицы и светодиода. Характеристики экспериментальных установок флуоресцентного детектирования с использованием эпифлуоресцентной оптической схемы возбуждения и сбора флуоресценции. Их применимость для определения аналитов в микрореакторах чипа и для детального изучения распределения веществ в поперечном сечении микроканала чипа.
3. Исследования динамики распределения веществ (флуоресцентные красители) в однофазной и двухфазной системах ламинарных соприкасающихся микрофлюидных потоков в микроканале чипа.
4. Исследование динамики образования трехфазной системы при контакте двух ламинарных жидкостных потоков в микроканале чипа и одновременного распределения вещества (флуоресцентный краситель) в этой системе.
5. Оптимизация условий протекания модельной реакции (дериватизация катехоламинов) в микрореакторах девятиреакторного чипа в зависимости от температуры и pH среды.

Публикации и апробация работы. Материалы диссертации опубликованы в 4 статьях и 7 тезисах докладов на конференциях. Основные результаты работы докладывались на следующих конференциях: Colloquium Spectroscopicum Internationale CSI XXXIII (2003, Granada, Spain); V Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2003» (2003, С-Петербург) (2 доклада); Всероссийская конференция «Аналитика России-2004» (2004, Москва) (2 доклада); «Pittcon`2005» (2005, Orlando (FL), USA), 2-я Всероссийская конференция «Аналитические приборы» (2005, С-Петербург).

Структура и объём работы. Диссертация состоит из оглавления, списка принятых сокращений, введения, пяти глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста, включая 64 рисунка, 15 таблиц и 169 наименований в списке цитируемой литературы.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Во введении дано обоснование актуальности создания микрочиповых аналитических систем. Здесь же сформулирована цель работы, указаны её новизна и практическая значимость.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Критически, с точки зрения возможности создания микрочиповых систем, интегрирующих несколько стадий химического анализа, рассмотрены основные операции, проводимые в микроструктурах чипов. МФЧ могут использоваться в аналитической химии как при пробоподготовке (жидкостная или твердофазная экстракция, абсорбция), так и при разделении смесей аналитов с последующим их определением (капиллярный электрофорез, электрохроматография). Характерной особенностью является возможность совмещения нескольких аналитических операций с одной или многими пробами на одном чипе, изготовленном из стекла и/или кремния, различных видов пластика.

Основными требованиями, предъявляемыми к микрочиповым системам детектирования являются высокая чувствительность из-за малого абсолютного количества определяемого вещества и совместимость детектора с чипом. Наиболее удовлетворяют этим требованиям спектроскопические методы, среди которых наиболее популярны в микрочиповой практике люминесцентные методы. Преимуществами использования последних являются высокая чувствительность, возможность детектирования сигнала в полупрозрачных структурах в любой локальной области чипа, а также возможность регистрации двумерного распределения сигнала в плоскости чипа.

Следует отметить, что существующие варианты микрочиповых систем не полностью реализуют все потенциальные возможности, что связано, например, с недостаточной изученностью процессов массопереноса в потоке в микроканале. Наряду с распространенным в аналитической практике методом экстракции в двухфазной системе до сих пор не реализованы новые способы проведения экстракции, например, в трехфазной системе.

На основании обзора литературы была сформулирована задача настоящего исследования, заключающаяся в разработке и создании аналитических систем на основе стеклянно-кремниевых микрочипов с флуоресцентным детектором. Кроме того, поставлены задачи теоретического и экспериментального исследования процессов массопереноса, происходящих в микроканале, с целью создания систем и новых способов реализации жидкостной экстракции, а также задачи исследования протекания химических реакций в микрореакторах.

2. СОЗДАНИЕ МИКРОФЛЮИДНЫХ АНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

МФЧ, использованные в настоящей работе, были изготовлены методом анизотропного химического травления микроструктур (микроканалы, микрореакторы) в кремниевых пластинах с последующей аподной посадкой на кремний покровных пластин стекла.

Для изучения процессов массопереноса был разработан *H-образный микрочип (H-чип)*, топология которого и габаритные размеры приведены на *рис.1,а*. Микрочип представлял собой совокупность двух боковых микроканалов подвода жидкостных потоков, центрального микроканала их контакта и двух боковых микроканалов слива жидкостей из микрочипа. Расположение боковых микроканалов под прямым углом по отношению к центральному было обусловлено технологичностью изготовления, а длина центрального микроканала, равная 45 мм, была ограничена стандартом на размер технологических заготовок. Выбор прямой формы микроканалов без поворотов был связан со стабилизацией поверхности раздела при создании соприкасающихся потоков фаз по микроканалу. Форма поперечного сечения микроканала чипа с указанием размеров приведена на *рис.1,б*. Размеры поперечного трапецевидного сечения микроканала были выбраны, как результат компромисса между уверенным детектированием сигнала в микроканале и скоростью распределения вещества в его поперечном сечении.

Для проведения химических реакций был разработан *9-ти реакторный чип (9р-чип)*. В микрочипе, как видно из *рис.1,с*, были расположены 9 ячеек ввода проб, которые соединялись с 9 микрореакторами и общим каналом слива. Плотность расположения микрореакторов задавалась из учета одновременного детектирования сигнала от всех реакторов и была ограничена возможностями технологии изготовления. Выбранные размеры микрореакторов, приведенные на *рис.1,д*, являлись результатом компромисса между малым количеством используемых проб и уверенным детектированием сигнала.

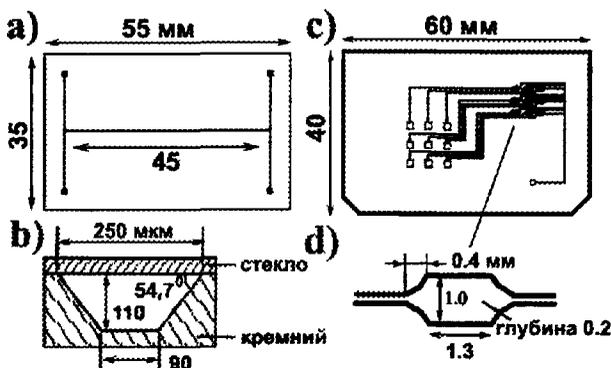


Рис.1 Микрофлюидный H-чип для изучения массопереноса веществ (а). Форма и размеры поперечного сечения микроканала H-чипа (б) Микрофлюидный 9р-чип для проведения химических реакций (с) Форма и размеры микрореактора 9р-чипа (д).

Разработанная экспериментальная установка, в которой использовались Н-чип или 9р-чип, состояла из трех систем. В системе создания микрофлюидных жидкостных потоков в качестве побудителей потоков жидкостей использовались микроприцевые насосы. Типичные скорости жидкостных потоков в микроканале составляли единицы-десятки мкл/мин. Система детектирования была создана на основе эпифлуоресцентной схемы возбуждения и сбора флуоресценции при использовании микроскопа. Подобная схема характеризуется расположением потоков возбуждающего излучения и флуоресценции на одной оптической оси, расположенной под прямым углом к плоскости чипа. На рис.2 приведена схема экспериментальной микрочиповой установки флуоресцентного детектирования. Источником возбуждения флуоресценции служил твердотельный светодиод 3, для фильтрации длинноволнового излучения которого использовался светофильтр 4. Для отражения излучения диода на плоскость чипа 1 использовалось дихроичное зеркало 5, которое было прозрачно для флуоресцентного излучения пробы. Регистрация флуоресценции после выделения спектрального диапазона флуоресценции светофильтром 6 производилась при помощи ПЗС-матрицы 7, находящейся в корпусе видеокамеры. Оцифрованный платой АЦП 8 сигнал с матрицы выводился на компьютер 9.

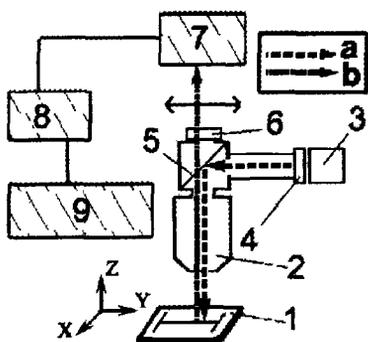


Рис.2. Микрочиповая установка флуоресцентного детектирования: 1-микрочип; 2-объектив; 3- светодиод; 4,6-светофильтры; 5-дихроичное зеркало; 7-ПЗС-матрица; 8-АЦП; 9-компьютер. Стрелками показаны потоки возбуждающего (a) и флуоресцентного (b) излучения.

В качестве модельных веществ при изучении массопереноса были выбраны красители флуоресцеин и родамин 6Ж; изучение протекания реакций в микрореакторах проводили на примере дериватизации катехоламинов с образованием флуоресцирующих продуктов. На основании характеристик используемых веществ были выбраны спектральные характеристики элементов системы детектирования, которые позволяли проводить регистрацию флуоресценции в спектральном диапазоне 530-580 нм или 580-640 нм при возбуждении флуоресценции излучением в диапазоне 470-490 нм или 520-540 нм. Оптические характеристики установок, такие как поле наблюдения и разрешающая способность позволяли проводить одновременное детектирование флуоресцентного сигнала сразу от всех микрореакторов 9р-чипа или наблюдать за протеканием процессов массопереноса в поперечном сечении микроканала Н-чипа.

Разработанная система поддержания и контроля температуры в микрореакторах 9p-чипа позволяла проводить нагревание реакционной смеси в диапазоне температур от 30 до 60° С, при использовании внешних по отношению к чипу термoeлектрических модулей. Скорости нагрева жидких проб в микрореакторах составляли ~4.5 °С/с.

3. ОЦЕНКА И ОПТИМИЗАЦИЯ РАБОЧИХ ПАРАМЕТРОВ СИСТЕМЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ ПЗС-МАТРИЦЫ

Экспериментальные микрочиповые установки флуоресцентного детектирования были созданы на основе ПЗС-матриц. Выбор ПЗС-матрицы в качестве детектора флуоресцентного излучения был обусловлен возможностью получения двумерного распределения интенсивности флуоресценции в микроструктурах чипа, возможностью одновременного считывания сигнала от различных зон в плоскости микрочипа в пределах наблюдаемой области и возможностью накопления сигнала во времени непосредственно на самой матрице. Используемые в работе ПЗС-матрицы характеризовались размерами фотоприемной поверхности 6 (*тип 1/3''*) или 8 мм (*тип 1/2''*).

Сначала в качестве детектора флуоресценции была выбрана наиболее доступная матрица *типа 1/3''*, которая управлялась в режиме телевизионного сигнала с фиксированным временем экспозиции кадра (40 мс) и была несхлаждаемой в ходе работы. Оцифровка сигнала матрицы проводилась при использовании 8-битной платы АЦП. Измерение интенсивности флуоресценции проводили в стеклянных капиллярах внутренним диаметром 600 мкм при использовании боратных буферных растворов (10 мМ, рН 9.18) флуоресцеина и родамина 6Ж. Для расширения диапазона определяемых концентраций за счет увеличения отношения сигнал/шум использовали алгоритм усреднения и математической обработки нескольких кадров изображения. При этом значение шума уменьшалось пропорционально корню квадратному из числа обработанных кадров. Пределы обнаружения детектора по флуоресцеину или родамину 6Ж для 50 кадров при этом составляли ~ 10⁻⁶ М, а линейный диапазон определяемых концентраций составлял примерно 2 порядка (~ 2×10⁻⁶ - 3.5×10⁻⁴ М).

С целью улучшения характеристик детектора была выбрана ПЗС-матрица *типа 1/2''*, режим управления которой позволял изменять время экспозиции кадра изображения в диапазоне от 160 мс до 20 минут. При этом температура матрицы в ходе работы поддерживалась равной -10 °С. Оцифровка аналогового сигнала от матрицы проводилась с разрядностью 12 бит. Оценку аналитических возможностей охлаждаемой ПЗС-матрицы типа 1/2'' проводили при использовании боратных буферных растворов флуоресцеина (10 мМ, рН 9.18) или спиртовых растворов родамина 6Ж, помещенных в микрореакторы 9p-чипа или микроканалы Н-чипа. Пределы обнаружения детектора по родамину при проведении измерений интенсивности флуоресценции в микроканале Н-чипа

составляли $\sim 5 \times 10^{-6}$ М, а по флуоресцеину при проведении измерений в микрореакторах 9p-чипа составляли $\sim 2 \times 10^{-9}$ М при времени экспозиции кадра 1.6 с. Подобная разница объясняется изменением светосилы и эффективности сбора флуоресценции установки детектирования при изменении ее оптических характеристик, таких как поле зрения и интегральное увеличение системы, а также изменением характеристик объекта наблюдения (МФЧ). В диапазоне времен экспозиции 0.16-1.6 с линейный диапазон определяемых детектором концентраций составлял ~ 2.5 порядка. Следует отметить высокую чувствительность разработанного флуориметрического детектора: например, в пересчете на абсолютное количество определяемого вещества концентрация 2×10^{-9} М, исходя из объема микрореактора 260 нл, соответствует $\sim 5 \times 10^{16}$ молекул или $\sim 10^7$ молекул (флуоресцеин).

4. ПРОЦЕССЫ МАССОПЕРЕНОСА В МИКРОКАНАЛЕ ЧИПА

Моделирование процессов переноса вещества в поперечном сечении микроканала проводилось для предварительной оценки скоростей потоков жидкостей по микроканалу. Модельные представления, учитывающие реальные размеры сечения микроканала (рис.1,б), позволяли оценить равновесное время контакта жидкостей в нем. Построение моделей базировалось на принципе диффузионного распределения вещества (родамин, флуоресцеин) в гомогенной водной среде или двухфазной системе с учетом коэффициента распределения. Данное допущение является вполне оправданным при создании двух ламинарных соприкасающихся потоков жидкостей в микроканале чипа.

Математический аппарат для количественного описания процессов диффузии был основан на применении дифференциального уравнения Фика и его численном решении в частных производных. При моделировании диффузии флуоресцеина в водной среде и моделировании диффузионного переноса родамина из водной в органическую фазу (октанол-1) проводили расчеты изменения концентрации во времени в отдающей и принимающей частях системы при условии равенства их объемов. Коэффициент распределения флуоресцеина в водной системе принимался равным 1, а коэффициент распределения родамина в системе «вода-октанол» на основании экспериментальных данных составлял 11.7. При расчетах использовали компьютерные программы *Macsyma Front End V.2.7.0* и *MathCad 2001*.

Численные расчеты изменения концентрации вещества во времени в каждой точке плоскости поперечного сечения микроканала проводили при использовании дифференциального уравнения Фика для двух координат диффузии (двухмерная модель диффузии):

$$\frac{dC(x, y, t)}{dt} = D_1 \times \left(\frac{\partial^2 C(x, y, t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C(x, y, t)}{\partial y^2} \right)$$

где C - концентрация вещества I , моль/дм³, в момент времени t в точке раствора внутри канала с координатами x и y ; D_1 - коэффициент диффузии вещества I в воде или коэффициент диффузии вещества I в октаноле.

В результате моделирования были получены профили аналитического сигнала (интенсивность флуоресценции) в поперечном сечении микроканала для различных времен диффузии вещества (контакта фаз) в гомогенной и двухфазной системах. На основании полученных результатов моделирования была проведена оценка скоростей потоков, необходимых для достижения равновесного распределения модельного вещества в системе. Скорости потоков, необходимые для равновесного распределения модельного вещества в поперечном сечении микроканала Н-чипа составили 21 нл/с для однофазной системы и 8 нл/с для двухфазной системы.

Адекватность моделей диффузионного распределения вещества проверяли при сравнении полученных практических результатов с результатами расчетов для условий эксперимента.

Экспериментальное изучение динамики процессов массопереноса в однофазной системе проводилось при создании и водных соприкасающихся ламинарных потоков раствора флуоресцеина и боратного буферного раствора в микроканале Н-чипа. На рис.3 показаны экспериментальные фотографии смешивания микрофлюидных потоков жидкостей в микроканале Н-чипа и соответствующие им профили интенсивности флуоресценции в поперечном сечении микроканала в зависимости от времени контакта потоков.

Сравнением практических результатов при равных скоростях потоков и модельных представлений был доказан диффузионный характер процессов смешивания потоков при их ламинарном течении по микроканалу (рис.3, b).

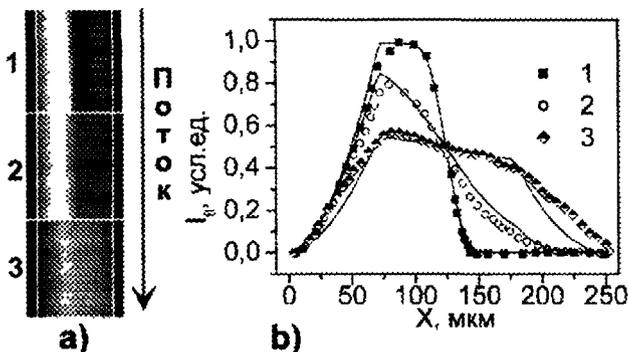


Рис.3. Протекание смешивания соприкасающихся водных потоков в микроканале Н-чипа во времени (а). Профили флуоресцентного сигнала детектора в поперечном сечении микроканала (соответствуют фотографиям) (б). Времена контакта потоков (с): 1- 0.1, 2- 1.7, 3- 12.4. Кривые - результаты модельных расчетов.

Система: боратный буферный раствор (10 мМ, рН 9.18) флуоресцеина ($C_0=5 \times 10^{-5}$ М) / боратный буферный раствор.

Изучение динамики массопереноса в двухфазной системе проводили на примере жидкостно-жидкостной экстракции родамина в системе «октанол-вода» при ламинарном тчении соприкасающихся потоков фаз по микроканалу Н-чипа. На *рис.4* представлены фотографии и профили интенсивности флуоресценции, полученные для данной системы.

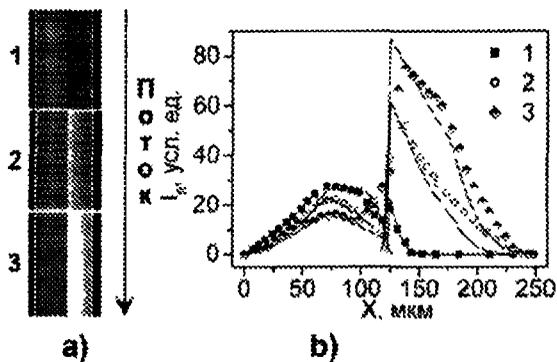


Рис 4 Жидкостная экстракция родамина 6Ж из водной фазы в октанол в микроканале Н-чипа (а). Профили интенсивности флуоресценции в поперечном сечении микроканала при различных временах контакта фаз (соответствуют фотографиям) (б) Времена контакта потоков фаз (с): 1- 0.1/0.5; 2- 1.8/7.1; 3- 3.4/13.6 (води/орг). Кривые – результаты модельных расчетов.

Система: боратный буферный раствор (10 мМ, рН 9.18) родамина ($C_0=5 \times 10^{-5}$ М) / октанол-1.

Сравнение практических результатов и модельных представлений для условий проведения эксперимента показало адекватность описания процессов с помощью предложенной модели диффузионного массопереноса (*рис.4.б*). Как показано в этом разделе, модельные расчеты позволяют также оценивать равновесное время контакта фаз в проточных экстракционных системах для микроканалов различной формы и геометрических размеров.

Наблюдаемое в условиях эксперимента различие в объемных скоростях потоков фаз по микроканалу (временах контакта фаз) позволяло достичь концентрирования родамина в принимающей фазе ($K_{конц}=2.3$) даже в условиях неравновесного протекания экстракции в потоке (*рис.4*). Таким образом, было показано, что при реализации жидкостной экстракции в микрочипе путем создания в микроканале двух соприкасающихся ламинарных потоков фаз можно достичь быстрого и достаточно эффективного концентрирования вещества в несколько раз.

На практике не удалось достичь равновесного распределения родамина в двухфазной системе экстракции в потоке, что было связано с нестабильностью поверхности раздела фаз при реализации скоростей микрофлюидных жидкостных потоков меньше 50 мкл/мин (водная фаза) и 10 мкл/мин (органическая фаза). Стабилизации поверхности раздела при малых скоростях потоков по литературным данным можно достичь при использовании микрочипов со специальной геометрией сечения микроканалов.

На основании полученных результатов по численному моделированию и практических данных (рис.3-4) можно сделать общий вывод, что равновесное распределение модельного вещества в сечении микроканала чипа наблюдается при времени контакта микрофлюидных потоков несколько десятков секунд. Такие малые равновесные времена контакта потоков в системе без применения механических смесителей обусловлены большим соотношением площадь контакта/объем жидкости в микроканале и малыми расстояниями диффузии веществ.

Для повышения скорости распределения вещества в поперечном сечении микроканала была предложена *трехфазная система экстракции (ТФСЭ)*. На основании предварительного изучения условий образования ТФСЭ в стационарных условиях в сосуде была выбрана система двух гомотенных растворов P1 (гептан-хлористый метилен-ацетонитрил = 10:2.5:1 по объему) и P2 (вода-ацетонитрил = 1.25:1 по объему), при контакте которых происходит образование трех сосуществующих фаз. В качестве модельного вещества при изучении образования ТФСЭ в микроканале использовали родамин 6Ж, вводимый в состав P2 ($C_0=5.72 \times 10^{-4}$ М).

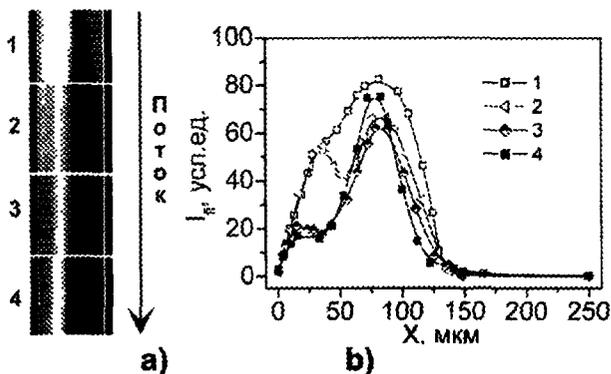


Рис.5. Экстракция в образующейся трехфазной системе в микроканале Н-чипа. Образование потоков трех фаз в микроканале (а). Профили интенсивности флуоресценции в сечении микроканала для разных времен контакта двух исходных микрофлюидных потоков (соответствуют фотографиям) (б). Время контакта потоков (с): 1- 0.05; 2- 0.15; 3- 0.75; 4- 1.10.

При контакте двух начальных микрофлюидных потоков в микроканале чипа происходило образование неполярной органической фазы, содержащей преимущественно гептан; водной фазы (ВФ) и принимающей по отношению к красителю органической фазы (ПФ). Стабилизации «струйного» течения трех сосуществующих фаз по микроканалу достигли при соотношении объемных скоростей потоков P1:P2=2:1 (рис.5,а).

Для повышения коэффициента распределения родамина между ПФ и ВФ вводили в состав исходного раствора красителя (P2) добавку KCl. При этом $K_{распр}$ родамина при наблюдаемых в эксперименте условиях изменялся от 2.6 (без добавки KCl) до 43.0 ($C_{KCl}=300$ мМ), а $K_{конц}$ родамина в ПФ по отношению

к P2 составлял соответственно 1.4 или 1.7. Состав принимающей фазы, содержащей ацетонитрил (~55 %), хлористый метилен (~23 %) и гептан (~22 %) был измерен газохроматографически при наблюдаемом в эксперименте (рис.5) соотношении объемов (объемных скоростей потоков в микроканале) исходных растворов 2:1 (P1:P2). Полученные результаты являются обоснованием применимости ГФСЭ на стадии пробоподготовки: возможно выделение аналитов из исходных матричных растворов в новую фазу, преимущественно содержащую широко распространенные в аналитической практике растворители. Более высоких показателей $K_{\text{конц}}$ и $K_{\text{распр}}$ можно достичь дальнейшей оптимизацией составов исходных растворов, а также реализацией, например, ион-парного механизма экстракции.

На рис. 5,б приведены экспериментальные профили аналитического сигнала (АС) в поперечном сечении микроканала. Наблюдаемое значение АС от ПФ (кривая 4), было сравнимо со значением АС от исходного раствора P2 (кривая 1), хотя равновесный $K_{\text{конц}}$ для этих условий составлял 1.7. Подобный факт объяснялся более высокой скоростью течения потока ПФ по микроканалу по сравнению со скоростью образующегося отдающего водного потока, что обуславливало разбавление красителя при переходе в эту фазу в 1.48 раза (соотношение скоростей потоков) по сравнению со стационарными условиями проведения экстракции. Сравнение $K_{\text{конц}}$, полученного в равновесных условиях проведения экстракции в сосуде и $K_{\text{конц}}$, полученного в микроканале и приведенного к стационарным условиям, показало высокую эффективность протекания экстракции родамина в ПФ. Для условий эксперимента наблюдался перенос родамина в ПФ на уровне 80 % от равновесного. Малое время установления равновесия в системе обусловлено механизмом протекания массопереноса в условиях выделения большей части ацетонитрила из исходного водно-органического раствора в отдельную фазу с одновременным переходом в нее молекул красителя, а также малой шириной образующейся ПФ в сечении микроканала. Отметим, что подобная мультифазная система экстракции в микроканале чипа предложена впервые. Реализация трехфазной системы в потоке является характеристичной только для микроканалов, а результаты показывают, что достигнуто значительное ускорение экстракции по сравнению даже с микроциклоидной реализацией двухфазной системы.

5. ДЕРИВАТИЗАЦИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ В МИКРОРЕАКТОРАХ ЧИПА

Задача проведения и оптимизации условий химической реакции в микрореакторах 9p-чипа была решена с использованием в качестве модельной реакции дериватизации катехоламинов с реагентом *NBD-F* (4-фтор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазол) с образованием флуоресцирующих продуктов ($\lambda_{\text{ex}}=460-490$ нм; $\lambda_{\text{em}}=515-540$ нм). Определение содержания катехоламинов (КА) в биопробах, являющихся гормонами в организме человека, является важной задачей при диагностике нервных и психических заболеваний. С точки

зрения минимизации расхода проб и дорогостоящих реагентов в ходе анализа и возможности одновременного анализа нескольких образцов проб привлекательным является использование мультуреакторного чипа.

Ввод проб в микрореакторы 9p-чипа (рис.1) осуществлялся при использовании шприца с предварительным раскачиванием образцов в ячейки ввода. С целью оптимизации ввода малых количеств проб в микрореакторы и предотвращения их неконтролируемого растекания по поверхности кремниевой подложки чипа проводили химическую модификацию поверхности подложки. При использовании модификатора диметилдихлорсилана удалось повысить контактный угол смачивания кремния водой от 40-50 до 80-90°. При этом минимальный объем пробы для успешного заполнения одного реактора чипа составлял 2 мкл.

С целью минимизации влияния конкурирующей реакции гидролиза реагента в щелочной среде и ускорения протекания дериватизации при использовании 12 мМ боратных буферных растворов норадrenalина проводили оптимизацию условий проведения реакции от рН (от 7.0 до 9.0) и температуры реакционной смеси в микрореакторах (от 20 до 60 °С). Реакционную смесь готовили смешиванием буферного раствора катехоламина с ацетонитрильным раствором реагента в соотношении 1:1 по объему. Оптимальными с точки зрения скорости проведения дериватизации и минимизации вклада продукта гидролиза реагента NBD-F в общий сигнал флуоресценции были признаны рН реакционной смеси 8.3-8.6 и температура внутри микрореактора, $T=50^{\circ}\text{C}$. В этих условиях дериватизация проходила за 3-4 минуты с момента приготовления смеси при расходе реакционной смеси на один микрореактор 4 мкл. Было продемонстрировано одновременное проведение дериватизации норадrenalина в 9 микрореакторах с детектированием флуоресцентного

сигнала от всех реакторов.

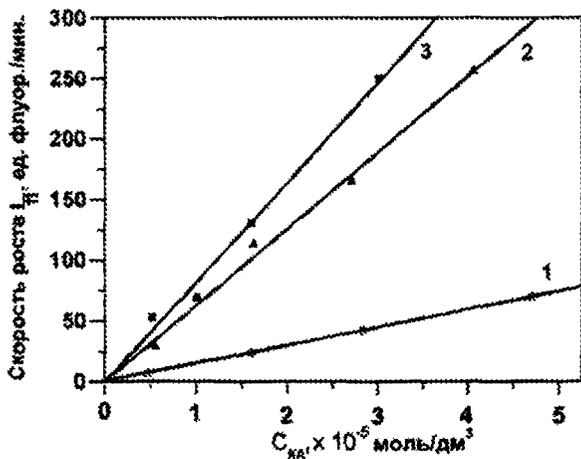


Рис 6 Зависимости скорости возрастания АС от концентрации катехоламина в растворе в микрореакторах 9p-чипа.

1- адреналин;
2- норадrenalин;
3- дофамин
Условия: рН реакционной смеси 8.5; температура реакционной смеси 22 °С.

Было проведено сравнительное изучение кинетики взаимодействия норадrenalина, адреналина и дофамина с реагентом NBD-F в микрореакторах чипа. При построении зависимостей скорости роста флуоресцентного сигнала от концентрации КА в реакционной смеси проводили вычитание из общего сигнала детектора фонового сигнала и сигнала флуоресценции продукта гидролиза реагента, измеренных в отдельных микрореакторах, заполненных водой или холостой реакционной смесью соответственно.

По наклону кривых 1-3 (рис.б) и с учетом квантовых выходов продуктов дериватизации, дофамин взаимодействовал с NBD-F в 3 раза быстрее, чем норадреналин, и в 7 раз быстрее, чем адреналин. Подобный факт объясняется различиями в химическом строении молекул КА.

Полученные зависимости скорости роста флуоресцентного сигнала от концентрации катехоламина в реакционной смеси линейны, что может служить основой для определения КА в растворах кинетическими методами при использовании микрочипов.

ВЫВОДЫ

1. Созданы микрочиповые аналитические системы на основе разработанных стеклянно-кремниевых чипов для проведения жидкостной экстракции в потоке или химической реакции в микрореакторах с использованием флуоресцентного детектора на основе ПЭС-матрицы и твердотельного светодиода.
2. Предложена и подтверждена экспериментально модель диффузионного переноса вещества при ламинарном течении соприкасающихся микрофлюидных потоков по микроканалу, позволяющая предсказать размеры микроканалов и топологию чипа.
3. Проведено изучение динамики процессов массопереноса в гомогенной водной среде и системе двух несмешивающихся жидкостей. Показано, что время, необходимое для диффузного смешивания и экстракции в микроканале чипа с размерами поперечного сечения порядка 200 мкм (ширина)×100 мкм (глубина), может быть значительно сокращено по сравнению с аналогичными процессами, реализуемыми в макромасштабе (20 с для смешивания и 50 с для экстракции).
4. Предложена система экстракции с образованием трех сосуществующих фаз в микроканале при контакте двух начальных микрофлюидных потоков. Показано, что механизм массопереноса существенно отличается от двухфазной системы и продемонстрирована высокая эффективность экстракции модельного вещества в образующуюся принимающую фазу для времени контакта двух исходных растворов около 1 с.

5. Оптимизирована процедура ввода малых количеств реакционной смеси в мультуреакторный чип путем проведения химической модификации поверхности чипа. Объемы вводимых проб составили 2-4 мкл при заполнении одного микрореактора. На примере дериватизации катехоламинов с реагентом NBD-F проведена оптимизация условий протекания реакции в микрореакторах в зависимости от pH и температуры, и показана возможность применения созданной микрочиповой системы для проведения стадии дериватизации при анализе катехоламинов.

Основные материалы диссертации опубликованы в следующих работах:

Статьи:

1. Сляднев М. Н., Казаков В. А., Щербаева М. В., Ганеев А. А., Москвин Л. Н., Золотов Ю. А. Система детектирования для микрофлюидных чипов на принципах эпифлуоресцентной видеомикроскопии и ее аналитические возможности// Журнал аналитической химии. 2005. Т.60. № 4. С. 357-366.
2. Сляднев М.Н., Казаков В.А., Макаров Е.Д., Ганеев А.А., Москвин Л.Н. Микрофлюидная система экстракции с химически индуцированным образованием трех фаз в потоке// Научное Приборостроение. 2005. Т.15. №2. С.11-20.
3. Сляднев М.Н., Казаков В.А., Лаврова М.В., Ганеев А.А., Москвин Л.Н. Микрочиповая мультуреакторная система для биохимического анализа// Научное Приборостроение. 2005. Т.15. №2. С.41-50.
4. Kazakov V.A., Lavrova M.V., Ganeev A.A., Moskvin L.M., Slyadnev M.N. Surface Modification of Microchip Input Reservoirs for Pressure-induced Sample Injection into Microreactors//Analytical Sciences. 2005. V.21. No.4. P 293-294.

Тезисы докладов:

1. Slyadnev M., Kazakov V., Scherbaeva M., Ganeev A. Development of a CCD-based Fluorescence Imaging Detector for Multiplex PCR System on a microchip//Colloquium Spectroscopicum Internationale CSI XXXIII. Granada (Spain), 7-12 September 2003. MO-O-18, P. 35.
2. Сляднев М.Н., Казаков В.А., Щербаева М.В., Ганеев А.А., Москвин Л.Н. Флуориметрический детектор для микрофлюидных систем//Тез. докл. V Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2003». Санкт-Петербург, 6–10 октября 2003 г. С. 83.
3. Сляднев М.Н., Казаков В.А., Щербаева М.В., Ганеев А.А. Микрочиповые аналитические системы для биохимической и медицинской диагностики// Тез. докл. V Всероссийской конференции по анализу объектов

окружающей среды «Экоаналитика-2003». Санкт-Петербург, 6–10 октября 2003 г. С. 84.

4. *Сляднев М.Н., Казаков В.А., Щербаева М.В., Ганеев А.А., Москвин Л.Н.* Микрофлюидные аналитические системы для жидкостно-жидкостной экстракции//Тез. докл. Всероссийской конференции «Аналитика России-2004». Москва, 27 сентября – 1 октября 2004 г. С. 95.
5. *Сляднев М.Н., Казаков В.А., Щербаева М.В., Ганеев А.А.* Бесконтактный нагрев жидкости и контроль температуры в микрочиповом ПЦР-анализаторе//Тез. докл. Всероссийской конференции «Аналитика России-2004». Москва, 27 сентября – 1 октября 2004 г. С. 99.
6. *Slyadnev M.N., Kazakov V.A., Scherbaeva M.V., Ganeev A.A., Moskvina L.N.* Development of a Microchip Real-Time PCR System with a Fluorescence Imaging Detector//Pitcon`2005. Orlando (FL, USA), 27 Feb.- 04 March 2005. P. 910.
7. *Сляднев М.Н., Казаков В.А., Ганеев А.А., Москвин Л.Н.* Микрофлюидная трехфазная система экстракции в потоке с образованием акценторной фазы//Тез. докл. 2-ой Всероссийской конференции «Аналитические приборы». Санкт-Петербург, 27 июня – 1 июля 2005 г. С. 126-127.

**Отпечатано копировально-множительным участком отдела
обслуживания учебного процесса физического факультета СПбГУ.
Приказ № 571/1 от 14.05.03.**

**Подписано в печать 09.05 с оригинал-макета заказчика.
Ф-т 30х42/4, Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз., Заказ № 247/с
198504, СПб, Ст. Петергоф, ул. Ульяновская, д. 3, тел. 428-43-00.**

№ 16596

РНБ Русский фонд

2006-4

10946