УДК 543.07

Модификация поверхности каналов микрочипа с электрохимическим детектированием для определения биологически активных веществ

Николаев А.В., Карцова Л.А.

Санкт-Петербургский государственный Университет, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 30.04.2012 г.

Аннотация

Описан процесс изготовления чип-анализатора на основе полидиметилсилоксана. Изучены возможности обработки поверхности канала чипа атмосферной плазмой и поверхностно активными модификаторами (ПАВ) - додецилсульфатом натрия (ДДСН) и дезоксихолатом натрия, используемых в качестве добавок к рабочему 10 мМ боратному буферу. Проведена оценка изменения скорости электроосмотического потока (ЭОП). На модельной смеси катехоламинов проведена оценка изменения эффективности и факторов разрешения аналитов после модификации поверхности каналов.

Ключевые слова: микрочиповый капиллярный электрофорез, микрофлюидные системы, электрохимическое детектирование, электроосмотический поток, ПДМС, анализ нейротрансмиттеров

The process of manufacturing of the chip-analyzer, based on polydimethylsiloxane is described. The possibilities of surface treatment by atmospheric plasma as well as surfactants -sodium dodecyl sulfate(SDS) and sodiumdeoxycholate, used as additives to the working 10 mM borate buffer are studied. The change of the electroosmotic flow (EOF) is estimated. On the model mixture of catecholamines changes in the efficiency and resolution of peaks after modification of the surface channels were assessed.

Keywords: microchip capillary electrophoresis, microfluidics, electrochemical detection, electroosmotic flow, PDMS, analysis of neurotransmitters

Введение

Актуальным направлением развития метода капиллярного электрофореза (КЭ) является создание микрофлюидных аналитических систем, позволяющих объединить все стадии химического анализа (ввод пробы, дериватизация, разделение и детектирование) в одном портативном устройстве.

Традиционными вариантами детектирования в капиллярном электрофорезе (КЭ) на микрочипах являются ультрафиолетовое, флуориметрическое, масс-спектрометрическое и электрохимическое (ЭХ). К достоинствам ЭХ детектирования следует отнести высокую чувствительность и селективность (сопоставимость с ЛИФ детектированием).

Отметим также, что микроэлектроды изготавливаются непосредственно на самом микрочипе при помощи обычных фотолитографических методов, что

позволяет получать полностью интегрированное устройство. Пределы обнаружения аналитов для микрочипового капиллярного электрофореза находятся в наномолярном диапазоне [1].

Для изготовления микрофлюидных чип-анализаторов (МФЧА) применяют стекло, кремний, различные полимерные материалы: полиметилметакриллат (ПММА) [2], полидиметилсилоксан (ПДМС) [3-7], поликарбонат [8], полистирол [9], полиэтилентерефталат[10,11], Topas [12]. Активное использование ПДМС обусловлено следующим: он оптически прозрачен; полимеризуется при низких температурах; способен закрепляться на гладких поверхностях путем обратимой адгезии при комнатной температуре.

При проведении анализа в чип-формате возможность управлять химическими свойствами внутренней поверхности каналов крайне важна из-за присущих микроаналитическим системам высоких значений соотношения площадь поверхности/объем. Модификация поверхности каналов позволяет контролировать электроосмотический поток (ЭОП) и предотвращать взаимодействие молекул аналита со стенками каналов микрочипа. Гидрофобность ПДМС ограничивает его применимость в КЭ и требует использования поверхностных модификаций для увеличения гидрофильности и скорости ЭОП. Существуют различные способы обработки поверхности ПДМС: газовой фазой, химическими методами, а также их сочетанием.

Данная работа посвящена оптимизации рабочих параметров микрофлюидной системы для определения катехоламинов – диагностических маркеров многих заболеваний с поражением центральной нервной системы – в биологических жидкостях.

Эксперимент

Аппаратура Использовался самодельный амперометрический детектор с рабочим напряжением 0.7 В. Напряжение высоковольтного источника 500 В.

Реагенты Фоторезист S1813 (Shipley); вода деионизированная; NaOH, 1%-ый раствор (о.с.ч.); NaOH, 0.1М раствор (ч.д.а.); HCl, 0.1М раствор (ч.д.а.); $(NH_2)_2CS$, 10%-ый раствор (о.с.ч.); $K_4[Fe(CN)_6]_3$, 10%-ый раствор (о.с.ч.); $Na_2S_2O_3$, 10%-ый раствор (о.с.ч.); H_2SO_4, 30%-ый раствор (о.с.ч.); NH_4F, 5%-ый раствор (о.с.ч.); ацетон (Нева, Реактив, о.с.ч.); закрепитель Sylgard 184-B (Dow Corning); эластомер Sylgard 184-A (Dow Corning); ДМСО, 6%-ый раствор (ч.д.а.); этанол (Нева, Реактив, о.с.ч.); боратный буфер (pH 10.18, 0.15М); раствор дофамина (Sigma); раствор норадреналина (Sigma)

Изготовление микрочипа

Фотолитография. Матрицы для изготовления полимерной части чипа получали методом негативной фотолитографии. Кремниевые пластины покрывали слоем фоточувствительного полимера (1-2 мкм) методом центрифугирования. Пластины высушивали в сушильном шкафу при температуре 95^0 С в течение 30 мин., закрепляли на них заранее подготовленные маски (*фотошаблоны*) с изображением микроканалов и проводили засвечивание УФ-излучением (410 нм). Необлученный фоторезист удаляли 1%-ым раствором NaOH, пластины промывали в токе деионизированной воды в течение 5 мин. и высушивали при комнатной температуре. Далее щелочным раствором проводили травление матрицы (удаления верхнего слоя кремния) для получения рельефного изображения микроканалов на пластине.

Нанесение электродов на стеклянную пластину. На стеклянную пластинку (предметное стекло), покрытую слоем золота на титановой основе методом напыления, наносили фоторезист способом, аналогичным описанному в предыдущем разделе. После просушки пластину засвечивали в УФ-излучении через шаблон с изображением электродов. Необлученный слой фоторезиста удаляли 1М раствором щелочи.

Далее проводили химическое травление слоя золота, не покрытого затвердевшим фоторезистом. Для этого использовали смесь 10%-ных растворов $(NH_2)_2CS$, $K_4[Fe(CN)_6]_3$ и $Na_2S_2O_3$, взятых в объемном соотношении 2:1:2. Титановое покрытие травили в смеси 100 мл 5%-го раствора NH_4F и 200 мл 30%-ой H_2SO_4, взятых в соотношении 1:2 (объемн.). Завершение процесса в обоих случаях определялось визуально: по исчезновению слоя металла.

Оставшийся фоторезист и следы растворителей удаляли, обрабатывая стекло ацетоном и затем – 1%-ным раствором NaOH в течение 5 мин. После этого пластинку промывали под струей деионизированной воды (2-3 мин) и сушили на воздухе.

Создание реплик (формовка)

Полимерную часть чипа готовили методом формовки – изготовлением полимерных реплик-отпечатков на полученных ранее кремниевых матрицах. В качестве материала для изготовления микрофлюидных чип-анализаторов использовался полидиметилсилоксан (ПДМС). Для проведения полимеризации смешивали мономер и сшиватель в соотношении 10:1, (об.) и выдерживали смесь до её полного затвердевания (1ч при 90°C).

Модификация поверхности каналов

Обработка плазмой. Для обработки поверхности каналов применяли самодельный плазмогенератор, представляющий собой герметично закрывающуюся камеру, из которой откачивали воздух, и два электрода внутри камеры, между которыми помещался ПДМС. Между электродами зажигался тлеющий разряд при подаче высоковольтного высокочастотного напряжения.

Динамическая модификация. Готовились растворы дезоксихолата натрия и ДДСН в 10 мМ боратном буфере. Полученный электролит использовали в качестве рабочего буфера. Перед проведением анализа полученными растворами гидродинамически промывали каналы в течении 60 мин; скорость потока ~1 мкЛ/мин.

Обсуждение результатов

Чип-анализатор представляет собой стеклянную подложку с нанесенными на нее золотыми микроэлектродами и «крышку» из ПДМС с системой каналов и резервуаров (рис.1). Ширина сепарационного канала 35 мкм, длина 4.5 см.

Рис. 1. Внешний вид МФЧА

Выбор золотых электродов обусловлен тем, что данный материал наряду с платиной и углеродом наиболее часто используют в микрочиповом КЭ [13,14].

Реализованы две различные конфигурации электродов детектора: «*flow by*» (рис.2 А) - поверхность электрода параллельна движению потока и «*flow onto*» - электрод располагается перпендикулярно потоку (рис.2 Б). Последняя в нашем случае представляет так называемую *off-channel* конфигурацию - используется разъединительный электрод для элиминирования высокого напряжения.

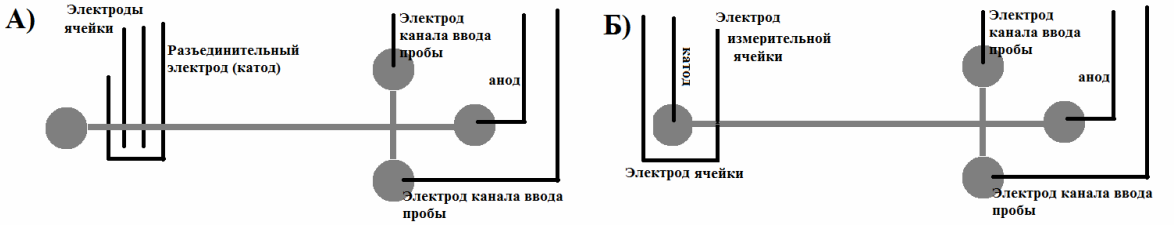

Рис. 2. Расположение электродов на стеклянной пластинке: А - электроды расположены перпендикулярно потоку электролита, В - параллельно

Изначально в работе использовалась *off-channel* конфигурация электродов, расстояния между которыми (рис. 3) подбирали на основании литературных данных [15-18]. Для сравнения были выбраны расстояния в 275 мкм, 175 мкм и 150 мкм

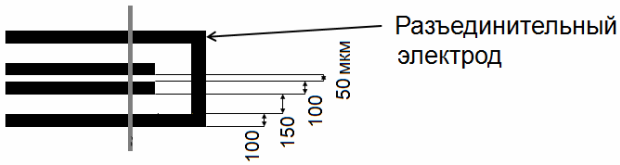

Рис. 3. Расположение электродов в *off-channel* конфигурации ЭХ ячейки

Оптимальную конфигурацию, представленную на рис. 3, выбирали по стабильности базовой линии и низкому уровню шума на амперограммах, полученных после кондиционирования каналов (рис.4). Как видно из рис. 4, уровень шума и стабильность фонового тока сильно различаются для чип-анализаторов с разными конфигурациями детектирующих элементов.

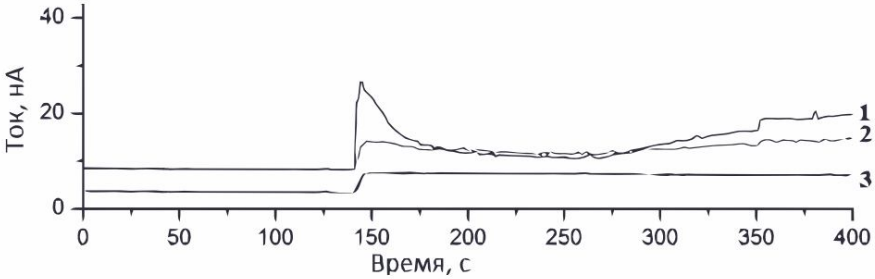

Рис. 4. Амперограммы, полученные при различных расстояниях между электродами э.х. ячейки и разъединительным электродом:1 - 275 мкм, 2 - 175 мкм, 3-150 мкм. Рабочий буфер - боратный, 2 мМ. Сепарационное напряжение 500 В

Однако в ходе работы было отмечено значительное влияние высоковольтного источника на ток ЭХ ячейки. На рис.5 представлены электрофореграммы фона, полученные на боратном буферном растворе с разными концентрациями: 2, 5 и 10 мМ с включенным высоковольтным источником. Отмечен значительный рост фонового тока (ток увеличивается при переходе к более концентрированному буферу), увеличивается шум, что повышает пределы обнаружения.

Другим недостатком данной конфигурации является то, что при концентрациях рабочего буфера > 15 мМ происходит закипание электролита в месте контакта с разъединительным электродом, что может быть решено за счет увеличения площади последнего, однако приведет к необходимости вновь оптимизировать расстояния между электродами.

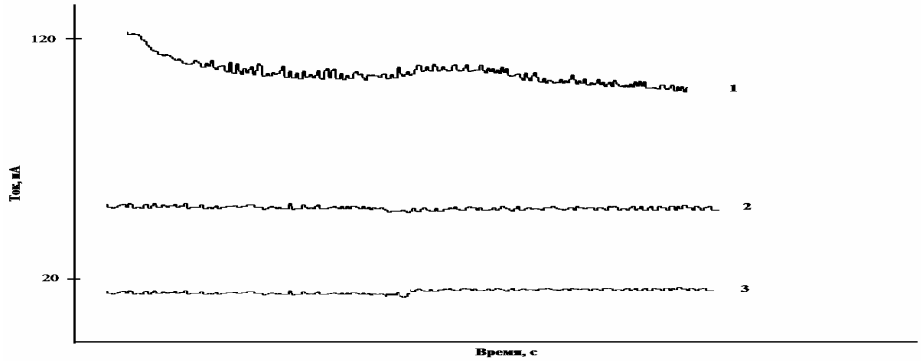

Рис. 5. Фоновые токи при включенном высоковольтном источнике, полученные при использовании боратного буфера с концентрацией 2 мМ (3), 5 мМ (2) и 10 мМ (1)

Выявлены возможности «*flow by*» конфигурации ячейки. Ток в ячейке при выключенном сепарационном напряжении составлял 8 нА (10 мМ боратный буфер), при включенном 15 нА. Таким образом, при включении высоковольтного источника рост фонового тока и шумов незначителен, поэтому дальнейшие эксперименты проводили именно с этой конфигурацией электродов.

Основной проблемой при использовании золотых электродов обычно является то, что их поверхность быстро загрязняется (рис.6).

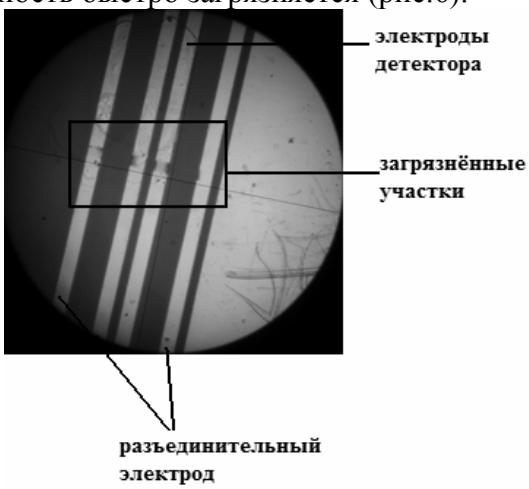

Рис. 6. Увеличенное изображение электрохимической ячейки

Это приводит к увеличению шума и снижению чувствительности ЭХ ячейки. Для продления срока службы электродов используемый нами детектор подает напряжение на электроды импульсно, т.е. часть времени на рабочем электроде не идет процесс окисления компонентов. Такая схема работы детектора позволила увеличить срок службы чипа (возможно проведение до 10 анализов). Для большего продления срока службы электродов мы провели эксперимент по электроосаждению Pd на отработавшие электроды (рис.7)

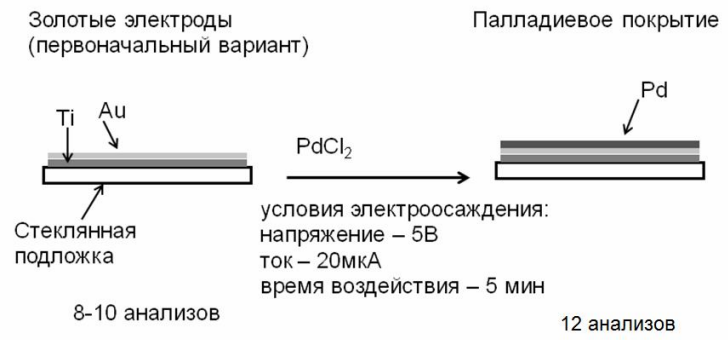

Рис. 7. Покрытие электродов слоем Pd

Покрытие Pd привело к значительному увеличению фонового тока (для 10 мМ боратного буфера с 8 нА для золотых электродов до 60 нА для Pd) и как следствие к увеличению шума. Чувствительность детектирования на таких электродах крайне низкая, таким образом данный подход себя не оправдал.

На изготовленном чипе провели анализ смеси дофамина и норадреналина (рис.8 А). Из рис. 8 видно, что разрешение пиков низкое. Для улучшения разделения проведены эксперименты по модификации поверхности канала микрочипа.

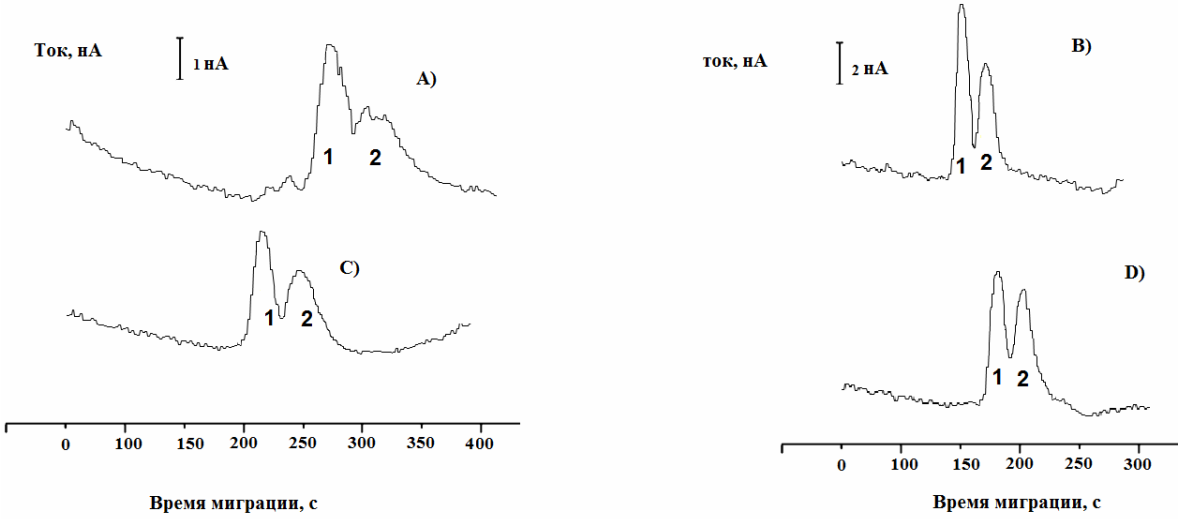

Рис. 8. Электрофореграмма смеси норадреналина (1) и дофамина (2), (С~ 10 ppm). Боратный буфер 10 мМ, амперометрическое детектирование, сепарационное напряжение 500 В. А) Немодифицированный чип. В) Модификация чипа плазмой. С) Модификация ДДСН. D) Модификация деоксихолатом натрия

Нами исследованы два различных варианта обработки чипа. В *первом случае* чип в собранном варианте помещался в камеру, после чего подвергался обработке плазмой в течении 1 ч. Поверхность канала становилась гидрофильной: при введении капли дистиллированной воды в любой из резервуаров жидкость смачивала канал полностью. Для необработанного чипа смачивание канала не происходило.

Второй вариант предполагал обработку плазмой ПДМС, и лишь после этого проводили склеивание чипа. Предпочтение было отдано первому варианту.

Из литературных данных известно [19], что после обработки плазмой происходит постепенное увеличение гидрофобности ПДМС, вызванное миграцией олигомеров из толщи полимера к поверхности.

Для оценки этого эффекта проведен следующий эксперимент. Обработали поверхность ПДМС плазмой, после чего на нее помещалась капля дистиллированной воды. Для необработанной поверхности угол смачивания составляет ~110^0. Через определенные промежутки времени проводили измерение угла смачивания. Данные занесены в табл. 1.

В [20] авторы предлагают для сохранения гидрофильных свойств ПДМС выдерживать поверхность в контакте с дистиллированной водой. Для поддержания гидрофильных свойств поверхность ПДМС периодически обрабатывалась 0.1 М раствором NaOH, а при проведении анализов чип кондиционировали 0.1 М раствором щелочи в течение 30 мин. Значения углов смачивания при обработке щелочью также занесены в табл.1.

Таблица 1. Изменение величины угла смачивания со временем

Время, прошедшее с момента обработки, мин	Угол смачивания, контакт поверхности ПДМС с атмосферой, (^{0})	Угол смачивания, контакт поверхности ПДМС с р-ром NaOH, (^{0})
0	0	0
30	60	10
60	70	15
120	75	15
180	80	15
600	90	20

Из полученных результатов следует, что кондиционирование раствором щелочи позволяет поддерживать поверхность гидрофобной продолжительное время.

Для измерения скорости электроосмотического потока (ЭОПа) использовали 6%-ый раствор диметилсульфоксида (ДМСО). Проба вводилась электрокинетически в течение 20 с. Для необработанного чипа скорость составила $(3.1\pm0.3)*10^{-4}$ см^2/В*с. После обработки получили значение $(5.3\pm0.2)*10^{-4}$ см^2/В*с.

Определив скорость ЭОП, провели анализ модельной смеси дофамина и норадреналина. После обработки пики практически полностью разрешены (рис.7 В). На рис. 8 представлены сравнительные данные по эффективности для модифицированного и немодифицированного плазмой чипа. При этом улучшается и воспроизводимость времен миграции (с 17 до 11 % для дофамина, с 15 до 8 % для норадреналина, n=4).

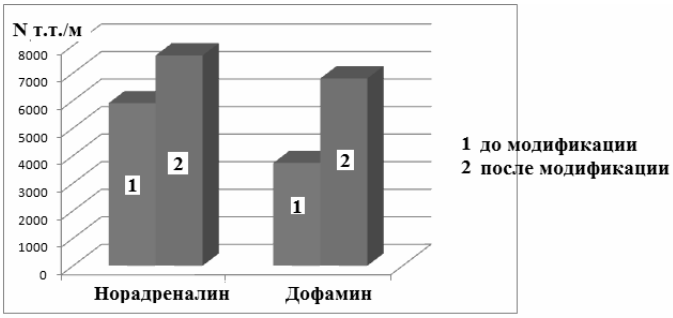

Рис. 8. Значения эффективности, полученные для модифицированного и не модифицированного микрочипов

После проведения ковалентной модификации и изучения влияния на параметры разделения перешли к динамической модификации.

Известно, что анионные ПАВ при сорбции на поверхности ПДМС приводят к увеличению скорости электроосмотического потока [21]. В данной работе в качестве модификаторов использовали ДДСН и дезоксихолат натрия Готовились растворы ПАВ в 10 мМ боратном буфере с концентрацией 4,2 и 1 мМ/л, т.е. ниже критической концентрации мицеллообразования.

Обработка ПАВ привела к увеличению скорости ЭОП (рис. 9) При этом результаты указывают на то, что большая скорость ЭОПа достигается при использовании в качестве модификатора ДДСН. Отметим, что уменьшение концентрации ПАВ приводит к большим скоростям ЭОП.

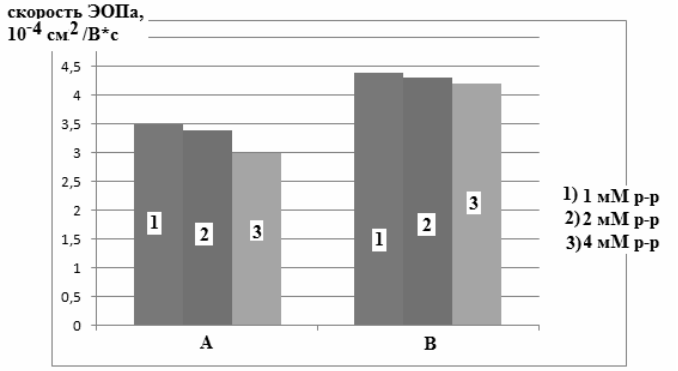

Рис. 9. Зависимость скорости ЭОП от концентрации ПАВ
А)- дезоксихолат натрия, Б) - ДДСН

На модифицированных ПАВ чипах проведены анализы электроактивных компонентов. Полученные электрофореграммы представлены на рис. 8 (C и D). Из них следует, что обработка ПАВ приводит к уменьшению времен миграции аналитов. При этом удается достичь лучшего разрешения и повысить эффективность (рис.10).

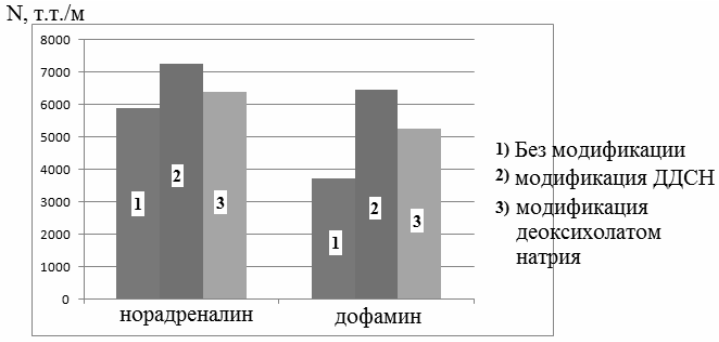

Рис. 10. Зависимость эффективности от применяемого модификатора

Отметим, что воспроизводимость времен миграции также улучшилась (при модификации ДДСН - с 17 до 12 % для дофамина и с 15 до 10 % для норадреналина, n=4). Максимальное увеличение эффективности наблюдается при использовании ДДСН, однако полученные значения оказались меньшими, чем при обработке плазмой. (дофамин: на 60% - для ДДСН, на 80% - плазмой).

Заключение

В данной работе описаны основные этапы изготовления и способы модификации поверхности каналов микрофлюидного чип-анализатора. Показано,

что обработка плазмой позволяет увеличить скорость ЭОП более, чем на 80%, что превосходит значения, получаемые при динамической модификации додецилсульфатом натрия и дезоксихолатом натрия. При этом улучшается и воспроизводимость времен миграции. Обработанная плазмой поверхность ПДМС довольно быстро теряет гидрофильные свойства на воздухе; для избежания этого эффекта в работе периодически проводилось кондиционирование поверхности канала 0.1 М раствором NaOH. Для проверки работоспособности системы проанализировали биологически активные вещества - норадреналин и дофамин. Показано, что обработка модификация поверхности позволяет улучшить разрешение пиков и воспроизводимость времен миграции компонентов.

Список литературы

1. Lacher, N. A.,Garrison, K. E.,Martin, R. S., Lunte, S. M. Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry // Electrophoresis 2001, 22, 2526–2536.

2. Wang J., Pumera M., Chatrathi M. P., Escarpa A., Konrad R., Griebel A., Dorner W., Lowe H. Towards disposable lab-on-a-chip: Poly(methylmethacrylate) microchip electrophoresis device with electrochemical detection // Electrophoresis 2002, 23, 596–601.

3. Wu M.H. Simple poly(dimethylsiloxane) surface modification to control cell adhesion // Surf. Interface Anal. 2009, 41, 11–16.

4.Wang B., Abdulali-Kanji Z., Dodwell E., Horton J.H., Oleschuk R.D. Surface characterization using chemical force microscopy and the flow performance of modified polydimethylsiloxane for microfluidic device applications // Electrophoresis 2003, 24, 1442–1450.

5. Leclerc E., Sakai Y., Fujii T. Microfluidic PDMS (Polydimethylsiloxane) bioreactor for large-scale culture of hepatocytes // Biotechnol. Prog.2004, 20, 750–755.

6. Mehta G., Kiel M.J., Lee J.W., Kotov N., Linderman J.J., Takayama S.Polyelectrolyte-clay-protein layer films on microfluidic PDMS bioreactor surfaces for primary murine bone marrow culture // Adv. Funct. Mater. 2007, 17, 2701–2709.

7. Zhang Q., Xu J. J., Chen H. Y. Patterning microbeads inside poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels and its application for immobilized microfluidic enzyme reactors // Electrophoresis 2006, 27, 4943–4951.

8. Hashimoto M., Barany F., Soper S.A. Polymerase chain reaction/ligase detection reaction/hybridization assays using flow-through microfluidic devices for the detection of low-abundant DNA point mutations // Biosens. Bioelectron. 2006, 21, 1915–1923.

9. Liu Y.J., Rauch C.B. DNA probe attachment on plastic surfaces and microfluidic hybridization array channel devices with sample oscillation // Anal. Biochem. 2003, 317 , 76–84.

10. Liu C., Li J.-M., Liu J.-S., Wang L.-D., Hao Z.-X., Chen H.-W. Fracture mechanism of metal electrode integrated on a chip and fabrication of a poly(ethylene terephthalate). // Talanta 2009, 79 (5) , pp. 1341-1347

11.Liu A.-L., He F.-Y., Hu Y.-L., Xia X.-H. Plastified poly(ethylene terephthalate) (PET)-toner microfluidic chip by direct-printing integrated with electrochemical detection for pharmaceutical analysis.// Talanta 2006, 68 (4) , pp. 1303-1308.

12. Nielsen T., Nilsson D., Bundgaard F., Shi P., Szabo P., Geschke O., Kristensen A.. Nanoimprint lithography in the cyclic olefin copolymer, Topas, a highly UV-transparent and chemically resistant thermoplast // J. Vac. Sci. Technol. 2004. B. 22. P. 1770-1775.

13. Lacher N.A., Garrison K.E., Martin R.S., Lunte S.M. Microchip capillary electrophoresis / electrochemistry // Electrophoresis. 2001. V. 22. P. 2526–2536.

14. Vandaveer W.R., Pasas S.A., Martin R.S., Lunte S.M. Recent developments in amperometric detection for microchip capillary electrophoresis // Electrophoresis. 2002. V. 23. P. 3667–3677.

15. Martin R.S., Gawron A.J., Lunte S.M., Henry C.S. Dual electrode detection on poly(dimethylsiloxane)-fabricated microchips // Anal. Chem. 2000. V. 72. P. 3196–3202.

16. Lacher N.A., Lunte S.M., Martin R.S. Development of a Microfabricated Palladium Decoupler/Electrochemical Detector for Microchip Capillary Electrophoresis Using a Hybrid Glass/Poly(dimethylsiloxane) Device. // Anal. Chem. 2004. V. 76. P. 2482–2491

17. Bruin G.J.M.. Recent developments in electrokinetically driven analysis on microfabricated devices // Electrophoresis. 2000. V. 21. P. 3931–3951.

18. Cannon D.M., Kuo T.C., Bohn P.W., Sweedler J.V. Nanocapillary array interconnects for gated analyte injections and electrophoretic separations in multilayer microfluidic architectures // *Anal. Chem.* 2003, *75*, 2224–2230.

19. Bodas D., Khan-Malek C. Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment-An SEM investigation // Sens. Actuator B Chem. 2007, 123 , 368–373.

20. Ren X., Bachman M., Sims, C., Li, G. P., Allbritton, N., J. Electroosmotic properties of microfluidic channels composed of poly(dimethylsiloxane) // Chromatogr. B 2001, 762 , 117–125.

21. Badal M.Y., Wong M., Chiem N., Salimi-Moosavi, H., Har-rison, D. J., Protein separation and surfactant control of electroosmotic flow in poly(dimethylsiloxane)-coated capillaries and microchips // J. Chromatogr. A 2002, 947 , 277–286.

Карцова Людмила Алексеевна - д.х.н. профессор кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, тел. (812) 428-40-44

Николаев Андрей Валерьевич - аспирант кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

Kartsova Ludmila A. - Dr.Sc.Chem. the professor of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, St. Petersburg, e-mail: kartsova@gmail.com

Nikolaev Andrey V. - the post-graduate student of organic chemistry department of chemical faculty, St. Petersburg state university, St. Petersburg