

ОТ КЛАССИЧЕСКОГО ЖИДКОСТНОГО ХРОМАТОГРАФА К ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫМ МИКРОФЛЮИДНЫМ АНАЛИТИЧЕСКИМ СИСТЕМАМ (МАС-Ф) (ОБЗОР)

© Б.Г. Беленький, Т.М. Зими́на

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 15 мая 1999 г.

В аналитическом обзоре рассматриваются предпосылки развития интегральных микроаналитических систем (МАС) нового поколения. Классифицируются основные типы МАС. Приводятся основные конструкции, особенности функционирования, технологии изготовления и приложения.

ВВЕДЕНИЕ

Современная биотехнология и фармацевтическая промышленность испытывают потребность в сверхвысокопроизводительном автоматическом анализе для создания новых типов лекарств с использованием биологических молекул, комбинаторной химии и глобальных генетических баз данных. Это привело к кризису инструментальных сепарационных методов, который разрешился уникальным качественным и количественным скачком, изменившим основополагающие концепции и технологии аналитической химии и давшим возможность повышения производительности анализа на несколько порядков. Этот скачок связан с развитием микроаналитических систем полного химического анализа на основе миниатюрных гибридно-интегральных устройств с элементами микрогидравлики и оптоэлектроники, в том числе, микрофлюидных аналитических систем (МАС-Ф), которые непосредственно берут свое начало в классической хроматографии и электрофорезе.

Рассмотрим основные этапы развития сепарационных аналитических систем (Табл. 1). Первым хроматографом, созданным в 1958 году (D.H. Speckman, W.H. Stein and S. Moore [1]), был автоматический анализатор аминокислот. (Это достижение было повторено в СКБ АП в Ленинграде, где в начале 60-х годов был создан хроматограф ХЖ-1301). Тем не менее, появление высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) относят лишь к 70-м годам и связывают с именем Kirckland и американской фирмой Du Pont [2]. В конце 70-х был сделан следующий важный шаг — создание биосовместимых микросферических сорбентов для ВЭЖХ белков [3]. Главной целью развития хроматографии в эти годы была эффективность сепарации и для ее достижения использовали высокие и сверхвысокие давления, длинные колонки, плотную упаковку.

За сравнительно короткий срок были достигнуты предельные, в рамках концепции, результаты — близкая к теоретическому пределу высота тарелки и скорость анализа, измерявшаяся секундами. Затем применение кварцевых капилляров позволило существенно снизить массу пробы и преодолеть диффузионные ограничения [4, 5] — был создан скоростной капиллярный анализ 80-х годов. Затем последовали разработки, связанные с усовершенствованием приборов и разработкой методов применения хроматографии, и, наконец, был достигнут молекулярный предел: предельная эффективность, чувствительность (одна молекула), скорость и т. д. И все же этих достижений оказалось недостаточно, чтобы удовлетворить аналитические потребности современной биотехнологии. Возникла необходимость изменения основополагающих принципов, что привело к концепции микрофлюидных интегральных аналитических систем, наподобие устройств микроэлектроники. Новые принципы позволяли разрешить кризис аналитической химии — низкую производительность и высокую стоимость анализа.

Идея интеграции сепарационных систем на чипе созрела в Ciba Geigy, Швейцария [6] и Oak Ridge National Laboratory, США [7]. Необходимость такой интеграции была инициирована трудностями создания прецизионных микронасосов и бесклапанных систем для ВЭЖХ и высокими требованиями к детектированию.

Если рассмотреть динамику развития сепарационных систем с помощью количественного параметра — числа тарелок в секунду $\langle N \rangle$, то получится зависимость (рис. 1), демонстрирующая изменение качества анализа. Поясним, что для построения графика использовались данные для наивысших достижений по каждому этапу.

Таблица 1.

Этапы развития сепарационных аналитических методов от классической хроматографии до высокопроизводительных аналитических систем на чипах

Метод	Оптимизация	Чувствительность $n[\text{моль}]/\text{с}[\text{M}]$	Производительность в день (n)	Качественный рост	Эффективность N/t , т.т./сек	Год создания
Автоматический анализатор аминокислот		$10^{-3}/10^{-3}$	1 - 5	Автоматизация, повышение производительности	0,2	1958
Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	$d_p^2, \Delta P, L$	$10^{-10}/10^{-8}$ (Abs)	20-100	Скорость анализа, воспроизводимость, разрешение	до 50	1969
Капиллярная жидкостная хроматография	$d_c \sim \sigma_{ex}$	$10^{-18}/10^{-10}$; (LIF)	20-100	Снижение массы пробы, повышение скорости анализа	до 150	1969
ВЭЖХ белков	$R_p, \epsilon_{несп} \rightarrow 0$	$10^{-10}/10^{-8}$ (Abs)	20-100	Неспецифическое взаимодействие, химия поверхности	25	1978
Высокоэффективная мембранная хроматография	$D_s^* \approx 10^3 D, L = x_0$	$10^{-10}/10^{-8}$ (Abs)	20-100	Минимизация длины колонки. Снижение давления	20	1989
Высокоэффективный капиллярный электрофорез (ВЭКЭ)	$N, \Delta P \rightarrow E$	$10^{-21}/10^{-12}$; (LIF)	20-250	Электроосмотический транспорт	до 5500	1978
Капиллярная электроосмотическая хроматография	N	$10^{-4}/10^{-13}$	10-100	Анализ незаряженных молекул, безнасосная подача элюента	100	1981
Многоканальный ВЭКЭ	n	$10^{-21}/10^{-12}$; (LIF)	200 000	Параллельный анализ, автоматизация		
Одномолекулярный ВЭКЭ	$V_d = 1 \text{ пл}$	$0,166 \times 10^{-23}/10^{-15(16)}$ (LIF)		Молекулярный предел чувствительности		1994
Микрофлюидные аналитические системы (МАС-Ф)		$10^{-21}/10^{-12}$ (LIF)	~60 000	Функциональная интеграция и автоматизация. Многоканальный анализ. Быстрая адресная доставка аналита. Снижение времени анализа	20 000-200 000	1991
Гибридизационные чипы	селективность	500 молекул	10^6	Параллельный анализ, молекулярное узнавание, адресный синтез	-	1994

Здесь: n – число анализов, d_p – диаметр частицы сорбента, ΔP – перепад давления в колонке, LIF – лазер-индуцированная флуоресценция, L – длина колонки, d_c – диаметр колонки, σ_{ex} – дисперсия зоны вне колонки, V_d – объем детектирования, E – напряженность электрического поля, N – число теоретических тарелок (т.т.), R_p – радиус пор сорбента, $\epsilon_{несп}$ – энергия неспецифического взаимодействия белка с поверхностью сорбента, D – коэффициент диффузии, D_s^* – коэффициент диффузии в сорбенте, x_0 – длина активного участка колонки в режиме селективной сорбции/десорбции.

В частности, для капиллярного зонного электрофореза эффективность до 1000 000 т.т., а время эксперимента 3 мин ($\langle N \rangle = 5500$); для сверхвысокоскоростного анализа с помощью МАС-Ф, эффективность 186 т.т., а время анализа 0,8 мсек ($\langle N \rangle = 200000$). Резкое увеличение ключевого параметра сепарационных систем, приведенное на рис. 1, — эффективности в единицу времени, может указывать на тенденцию переориентации аналитического приборостроения в целом.

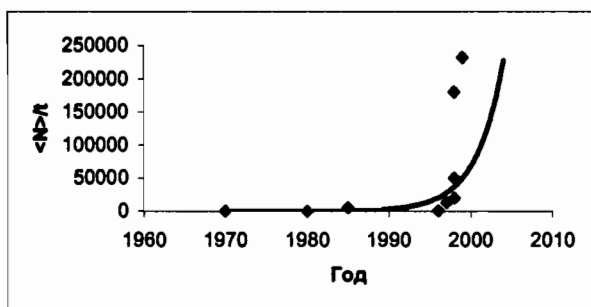


Рис. 1. Изменение параметра приведенной эффективности сепарации ($\langle N \rangle$ – число тарелок в секунду) в процессе развития инструментальной базы хроматографии и электрофореза

ВАЖНЕЙШИЕ ТИПЫ МИКРОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Рассмотрим более подробно особенности микроаналитических систем нового поколения (таблица 2).

1. Гибридизационные чипы с топологическим кодированием

Блистательная работа Фодора и соавторов [8], положила начало этому революционному направлению в результате синтеза трех технологий: микроэлектроники, химии поверхности, молекулярной генетики, т. е. за счет миниатюризации, прецизионного адресного синтеза на твердофазном носителе веществ с заданной химической структурой – праймеров, использования метода фотолитографии и светоиницируемого синтеза. В результате возникла целая индустрия геномики [9, 10], наиболее ярко представленная разработками фирмы Affimetrix (Сан-Диего, США), основанной в 1993 году.

2. Гибридно-интегральные биоэлектронные чипы

Этот тип чипов более всего напоминает электронные микрочипы с жидкостным интерфейсом. В них используется принцип электромиграции, электроблоттинга, электронные технологии [11,

12]. Это направление наиболее интенсивно развивается фирмой Nanogen (Сан-Диего, США).

3. Проточные микроаналитические (микрофлюидные) системы

Микрофлюидные системы — это результат оптимизации хроматографии и электрофореза. Они имеют следующие черты: электрофоретический или хроматографический принцип сепарации, безнасосная подача элюента, ввод и адресная доставка пробы с помощью микрогидравлической логики, открытая архитектура, параллельный анализ, сверхвысокоскоростной анализ [6, 7, 13, 14].

Метод микрофлюидных чипов (МАС-Ф) развивается во многих лабораториях и университетах США, в меньшей степени в Европе. Здесь бесспорным лидером стала американская фирма Caliper Technologies, Inc. основанная в 1995 году. Благодаря стратегическому партнерству, эта фирма соединила несколько “интеллектуальных портфелей” и стала мировым лидером по технологиям жидкостных интегральных микросхем — “лабораторий на чипе”, заменяющих “целые комнаты приборов”. Партнерами Caliper Technologies являются Хоффманн-Ла-Рош, Хьюлетт-Паккард, Доу Кемикал.

4. Виртуальная линейка микросфер с двойным кодированием

Это направление представлено аналитической системой FlowMetrix System и представляет собой платформу многократного сбора данных с помощью проточного цитометрического анализа кодированных цветом микросфер с ассоциированными (конъюгированными) молекулами (мишенями), причем проточный цитометр, позволяет выполнять одновременное определение 64 различных аналитов [15].

5. Биосенсоры

Это направление представлено оптоволоконными или электрохимическими зондами, обладающими, высокой избирательностью, как правило, к одному типу молекул, например, диагностически значимым ферментам в крови [16, 17].

В данной статье мы остановимся более подробно на строке 3 таблицы 2. Другие виды современных аналитических систем рассматриваются в данной статье лишь вскользь.

Таблица 2.
Важнейшие виды микроаналитических систем

	Название	Принцип действия	Технология изготовления	Приборная реализация	Главное назначение
1	Планарные биоматрицы: биочипы, геночипы	Гибридизационное и иммунное связывание. Топологическое [x, y] - кодирование	Фотоактивированный параллельный синтез и пришивка олигонуклеотидов. Струйный принтер для адресной подачи олигонуклеотидов или их блоков	Микрочипы. Приборы для приготовления микрочипов, гибридизации. Флюоресцентный микросканер До 1 млн. проб в день	Генетические исследования. Исследование мутаций.
2	Биоэлектронные гибридно-интегральные чипы	Выделение клеток диэлектрофорезом, электролизис, электроактивирование, гибридизация, электрохимическая адресация олигонуклеотидов на чипе	Электроадресация проб. Проточная камера с электродами для диэлектрофореза клеток	Тандем биоэлектронного чипа с двумерной электроактивированной гибридной линейкой. Флюоресцентный микросканер. Десятки каналов	ДНК-анализ (тестирование) бактерий, раковых клеток в физиологических жидкостях. Индикация бактериологического оружия.
3	Проточные микроаналитические системы, МАС-Ф, Lab-on-a-chip, μ -TAS	Электрофорез, иммуноэлектрофорез, электроосмотическая хроматография	Фотолитография, лазерная абляция, полимерное микролитье	Одно- и многоканальные чип-анализаторы: 15 - 200 дорожек	Секвенирование ДНК. Иммуноанализ. Экспресс-производство новой аналитической техники.
4	FlowMatrix System. Статистическое распределение моносенсоров – микросфер	Виртуальная линейка микросфер (латексов). Двойное цветовое кодирование. Гибридизация, иммунное, аллостерическое, энзиматическое взаимодействие	Окрашивание латексов. Пришивка моносенсоров. Создание пула аналитических микросфер	Пул аналитических микросфер. Цветояркометр 64 (до 5000) сетов микросфер	Диагностические панели моносенсоров
5	Оптоволоконные и другие биосенсоры	Топологическое кодирование. Ближнеполюсные эффекты	Фотополимеризация (с использованием фотошаблона)	Интроскопические зонды. Биосенсоры, хемосенсоры. До 1000 волокон	Биохимическая интроскопия

МИКРОФЛЮИДНЫЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Перейдем к проточным микрофлюидным системам (МАС-Ф). МАС-Ф представляют собой чип-реализацию высокоэффективного капиллярного электрофореза (ВЭКЭ) и капиллярной электрохроматографии с интегрированными элементами микрогидравлической логики, функциональными элементами пробоподготовки и дериватизации, оптоэлектроники и другими. Перспективное развитие МАС-Ф видится в создании на основе новых микротехнологий одноразовых приборов со сменными снаряженными реагентами картриджами.

Главными достоинствами МАС-Ф, определяющими их высокий аналитический потенциал, являются:

1. Универсальные аналитические возможности, пришедшие из высокоэффективного капиллярного электрофореза и хроматографии. Технология биоузнавания (ДНК-гибридизация, иммунное связывание в растворе).

2. Возможность интеграции многих аналитических компонентов и их дублирование (многоканальные системы) в одном чипе.

3. Сверхэффективность и скоростной суперпроизводительный анализ, в т. ч. секвенирование ДНК (десятки тысяч проб в сутки). Суперфракционирование без сорбентов.

4. Гидравлическая логика на основе электроосмотического течения для безнасосной подачи реагентов, ввода пробы.

5. Универсальность масштабов сложности: от одноканального до 100-канального чип-ВЭКЭ (для сверхпроизводительного секвенирования ДНК), лабораторий на чипе.

6. Возможность альтернативных путей решения аналитических задач. Перспектива создания сэндвич-сенсоров одноразового пользования.

7. Сверхвысокая – зептамольная – чувствительность детектирования за счет использования лазер-индуцированной флуоресценции.

8. Заимствованные из микроэлектроники высокопроизводительные автоматизированные технологии разработки и изготовления МАС-Ф (компьютерное проектирование, фотолитография, технологии LIGA — глубокая рентгеновская литография, микролите пластика чипов, неограниченное масштабирование производства на единой технологической основе), что обеспечивает быстрый переход от разработки к массовому выпуску — в течение месяца — специализированных приборов для конкретных целей.

9. Беспрецедентные возможности усовершенствования иммуноанализа за счет МАС-Ф-ЛИФ-реализации капиллярного иммуноэлектрофореза: позволяют детектировать одномолекулярную иммунореакцию, повысить производительность им-

муноанализа до рекордных величин – сотен тысяч определений в сутки.

Новейшие достижения в области МАС-Ф:

- 1) создание 100- и 200-канальных чип-анализаторов для сверхпроизводительного фракционирования олиго- и полинуклеотидов при секвенировании ДНК по Сенжеру;
- 2) развитие технологии изготовления дешевых пластиковых МАС-Ф

КОНСТРУКЦИИ МАС-Ф И ИХ ОСОБЕННОСТИ

Основой функционирования МАС-Ф являются электрокинетические эффекты в капилляре. Теоретические положения электрокинетической миграции в капилляре описаны в многочисленных работах, в том числе в [18, 19]. Однако, в системах МАС-Ф с высокой степенью пространственной интеграции капилляров появляются методические проблемы, связанные с дополнительным геометрическим вкладом в дисперсию зоны аналита из-за латеральных вариаций пути миграции и силы поля. Кроме того, важно оптимизировать геометрию и процедуру ввода пробы и найти оптимальные размеры каналов, поскольку в реализации систем МАС-Ф важной задачей является сверхскоростное разделение, требующее уменьшения поперечных размеров канала и его длины.

Рассмотрим геометрическую дисперсию. Она пропорциональна отношению времени поперечной диффузии аналита ко времени продвижения зоны аналита, совершающего поворот. Избыточная дисперсия, образующаяся при движении аналита в закруглениях каналов микрочипа может быть предсказана на основе одномерной модели [20]. Такая модель, основанная на расчете разницы миграционных длин, силы поля и поперечного дисперсионного эффекта, достаточно точно, как показано в [20] описывает экспериментальные данные. Повороты потока в каналах микрочипа приводят к уменьшению сепарационной эффективности по сравнению с прямыми каналами такой же сепарационной длины, особенно для молекул с малым коэффициентом диффузии. Дисперсия при движении аналита в искривленных каналах, σ_{turn}^2 , описывается выражением [20]:

$$\sigma_{turn}^2 = (\Delta l)^2 / X = [2\phi w(1 - \exp(-t_D / t_i))]^2 / X, \quad (1)$$

где: Δl – различие пути аналита у наружной и внутренней стенок изогнутого капилляра, X – постоянная, определяемая формой входной функции, которая создает избыточную дисперсию, ϕ – угол поворота в радианах, w – ширина верхнего основания трапеции сегмента, t_D – время поперечной диффузии аналита, t_i – время движения зоны аналита в искривленном участке капилляра.

Глубина канала также влияет на эффективность [21]. Это видно из примера электрохроматографии нейтральных красителей (кумарин С440, С450, С460, С480) в открытом капилляре на стеклянной подложке поверхностно обработанном октадецилсиланом. При варьировании глубины каналов от 10,2 до 2,9 мкм размер капилляра играет существенную роль. Это видно из уравнения Голея, которое описывает высоту тарелки для таких систем [21]:

$$H(u) = \frac{2D_m}{u} + f_m(k) \frac{d_c^2}{D_m} u + f_s(k) \frac{d_f^2}{D_s} u \quad (2)$$

где: D_m , D_s – коэффициенты диффузии в подвижной и стационарной фазах, соответственно, d_c – глубина канала, d_f – толщина стационарной фазы, u – линейная скорость подвижной фазы, $f_m(k)$, $f_s(k)$ – функции фактора емкости k вещества, в подвижной и стационарной фазах соответственно. Из уравнения (2) видно, что с уменьшением глубины канала, высота тарелки будет уменьшаться. Этот результат продемонстрирован в эксперимен-

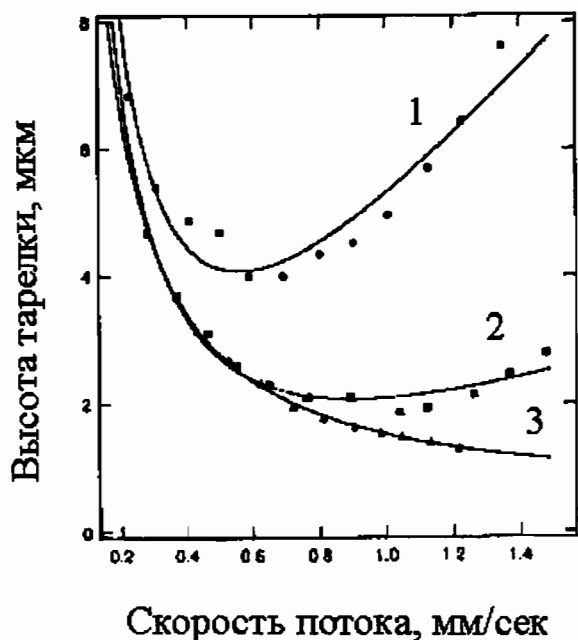


Рис. 2. Зависимость высоты тарелки от линейной скорости в электрохроматографии в открытых капиллярах на микрочипах с различной глубиной канала: (1) 8,7 мкм, (2) 4,7 мкм, (3) 2,9 мкм. Стационарная фаза – октадецилсилан; подвижная фаза – 10 мМ боратный буфер (рН 8,4) с 30% ацетонитрилом; образец – кумарин С460

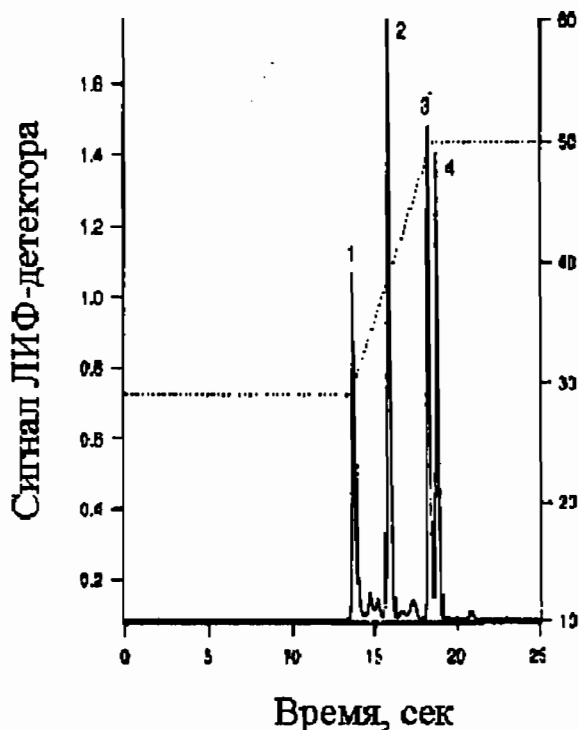


Рис. 3. Скоростная хроматография в открытом капилляре на микрочипах. Глубина канала 5,2 мкм; стационарная фаза – октадецилсилан; подвижная фаза – 10 мМ боратный буфер (рН 8,4) с линейным градиентом ацетонитрила от 29% до 50% за 5 сек, начиная через 1 сек после ввода пробы; образец – (1) С440, (2) С450, (3) С460, (4) С480; напряженность поля 500 В/см

те (рис. 2), при этом минимум зависимостей $H(u)$ смещается в сторону более высоких линейных скоростей и меньших размеров канала.

Полученный результат означает, что скорости анализов могут увеличиваться при сохранении эффективности. Однако из практических соображений размер 5 микрон рекомендуется как наиболее оптимальный для хроматографии в открытых капиллярах (рис. 3). Для такого канала высота тарелки может достигать 2 мкм при коэффициенте емкости $k = 0,5$, а времени хроматографии 20 - 40 секунд.

Важным фактором повышения эффективности разделения является минимизация объема пробы, в том числе, с использованием различных приемов, таких как стэкинг (электрокинетическое сжатие зоны при вводе), точечный ввод, запирающий потенциал [22]. На рис. 4 приводится иллюстрация принципа ввода пробы методом запирающего потенциала. Этот метод удобен тем, что он позволяет получать воспроизводимую зону пробы, без

визуального контроля, и, тем самым, удобен для автоматизации. Дозирование осуществляется при постоянном потоке пробы через инъекционный крест и частичном его перекрывании без попадания на линию сепарации. Ввод пробы получается в результате резкого выключения запирающего потенциала (рис. 4), что отклоняет поток на короткое время, а затем поток восстанавливается, при этом минимальный объем пробы попадает в сепарационный канал.

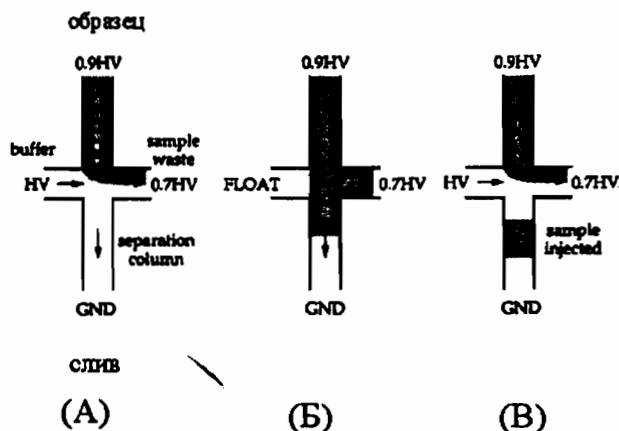


Рис. 4. Схема введения пробы методом запирающего потенциала. (А) Движение образца (заштрихованная область) и буфера до введения пробы. (Б) Зона образца, входящая в колонку в результате отключения запирающего потенциала в буферном резервуаре. (С) Зона образца введена в колонку, а поток в инъекционном кресте восстановлен после включения запирающего потенциала. Стрелки показывают направления потоков образца и буфера. HV – высокое напряжение, FLOAT – отключение запирающего потенциала, GND – земля

Этот метод сравнивается с методом точечного ввода, когда образец движется через инъекционный крест перпендикулярно разделительному каналу, а в момент ввода пробы узкая зона из пересечения каналов направляется в разделительный канал включением высокого напряжения на линии буфер – слив (рис. 5). При сравнении метода запирающего потенциала в сочетании со стэкингом и точечного ввода последний имеет преимущества с точки зрения эффективности разделения (эффективность при стэкинге, составляет только 60% - 74% эффективности при точечном вводе). Однако, с точки зрения пределов детектирования стэкинг имеет явные преимущества (в 10 раз). Использовался кварцевый чип с разделительным капилляром длиной 67 мм, разме-

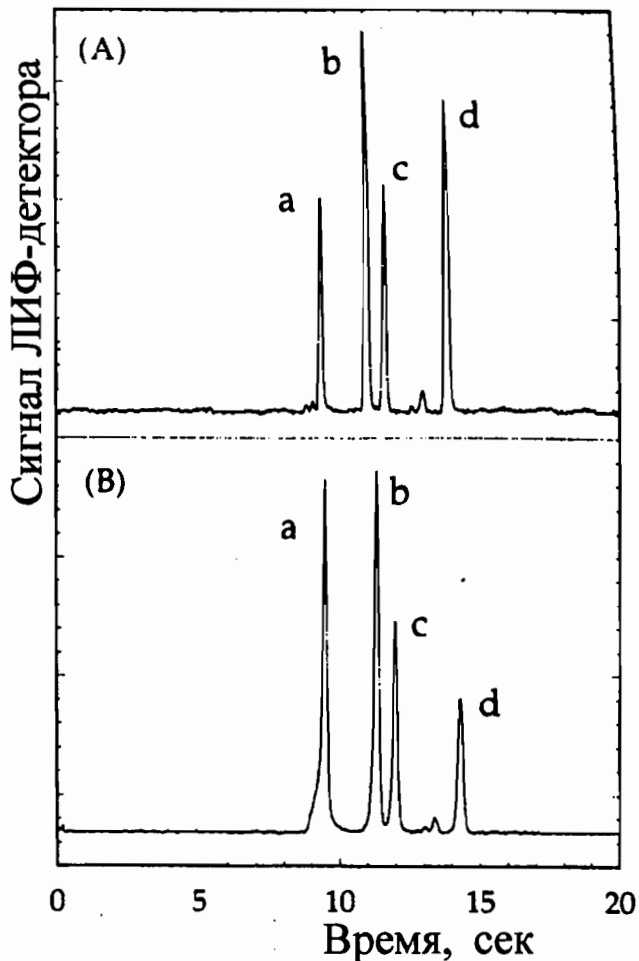


Рис. 5. Электрофореграммы с использованием (А) точечной инъекции при концентрации пробы более 100 мМ и (Б) инъекции со стэкингом методом запирающего потенциала при концентрации пробы около 10 мМ. Образец: (а) данзил лизин, (б) диданзил лизин, (с) данзил изолейцин и (д) диданзил цистин. Напряженность поля 1100 В/см, длина капилляра 67 мм

ценным на площади 7 × 10 мм в виде серпантина для разделения данзиллированных аминокислот

Наиболее эффективные разделения осуществлялись за 15 секунд с эффективностью 40 000 теоретических тарелок. В [22] оцениваются все вклады в высоту теоретической тарелки H согласно уравнению (3):

$$H = \frac{l_{inj}^2}{16L_{sep}} + \frac{l_{det}^2}{16L_{sep}} + \frac{2D_m}{\mu E_{sep}} + \frac{n(dc)^2}{12L_{sep}}, \quad (3)$$

где: l_{inj} – длина зоны пробы, l_{det} – длина окна детектора, L_{sep} – длина разделительного канала, D_m – коэффициент диффузии, μ – электрофоретическая подвижность, E_{sep} – напряженность электрического поля, n – число поворотов, dc – разность длины линии по внешнему и внутреннему контуру капилляра на изгибе.

Эффективность разделения при изменении напряженности электрического поля измерялась в эксперименте и сравнивалась с уравнением (3), в котором вклады размера зоны пробы, геометрии капилляров и размера окна детектора являются постоянными вкладками. Теоретическая величина N при напряженности 1200 В/см составила 1 мкм, при этом вклад геометрии капилляра составил 0,55 мкм. В эксперименте наблюдалось уменьшение высоты теоретической тарелки при увеличении напряженности электрического поля до 1200 В/см и минимальная величина составила 2 мкм, а вклад геометрии капилляра составил при этом величину 0,67 мкм, близкую к теоретической.

Ввод пробы в чип-электрофорезе может осуществляться с помощью системы двойного Т-образного инжектора [23]. Эта система позволяет вводить очень малые объемы пробы 50 - 500 пл, которые могут быть определены геометрически. Ширина канала и симметрия инжектора имеют первостепенное значение для хорошей производительности. Отталкивание избытка пробы в боковые каналы может эффективно производиться, только когда боковые каналы имеют низкое сопротивление потоку. Различие ионной силы буфера образца и анализа может вызвать плохую повторяемость (вариации величин от 1,5 до 10 раз) ввода пробы как по форме зоны, так и по ее размеру. Хотя точное регулирование напряжений, приложенных к различным терминалам, до некоторой степени помогает регулировать форму пробы, тем не менее, вариации могут достигать 30%. Поэтому, стэкинг следует применять в МАС-Ф с большой осторожностью.

Организация постколоночных реакций на чипах является одним из основных направлений разработки архитектуры многофункциональных аналитических устройств. В отличие от хроматографии, где постколоночные реакторы работают после завершения разделения, в электрофоретических устройствах разделение компонентов пробы происходит и после проведения реакции, благодаря градиенту напряженности электрического поля. Такая реакция должна быть быстрой с эффективным перемешиванием компонентов, чтобы избежать уширения зон из-за их различной электрофоретической подвижности. В [24] рассматриваются вопросы влияния геометрии реакционных устройств на чипах на эффективность. При сравнении различных типов постколоночных реакторов от-

мечено, что некоторые дизайны реакторов, позволяют получить лишь довольно низкие эффективности (несколько тысяч т.т.). При этом варьирование режима потоков не дает повышения эффективности, поэтому представляет интерес изучить влияние геометрии постколоночных реакторов на эффективность анализа. Схемы двух вариантов реакторов с различной геометрией смесительной камеры приведены на рис. 6.

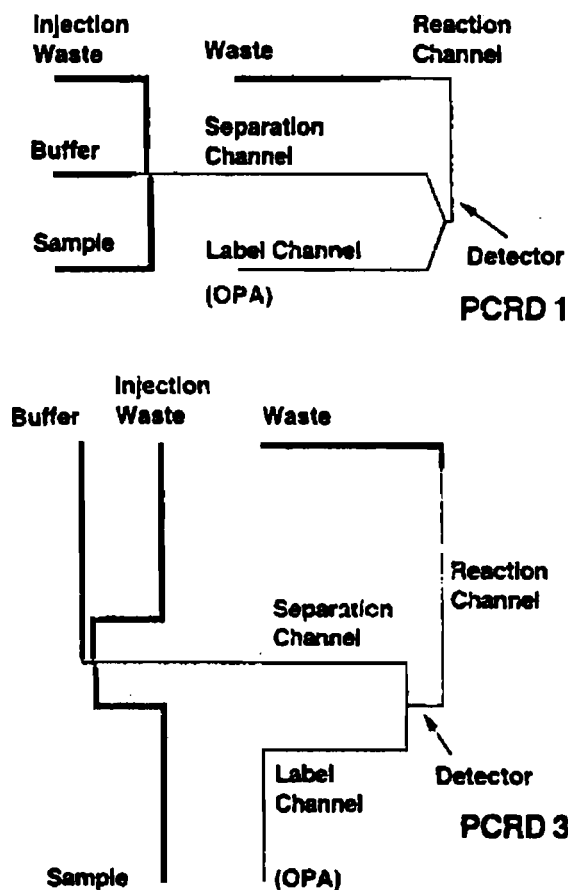


Рис. 6. Схемы двух устройств, используемых для постколоночных реакций с о-фтальевым диальдегидом. Тонкие линии показывают каналы с номинальной шириной 45 мкм для верхнего реактора и 66 мкм для нижнего реактора. Жирные линии соответствуют каналам шириной 240 мкм. Приложение потенциалов и введение растворов осуществляется через резервуары на концах каналов

Так, при использовании Т-образной камеры, наподобие показанной внизу на рис. 6, достигаются эффективности только 2000-4000 т.т. при условиях, когда должно быть 50 000 тарелок или более [24]. Наблюдение точки смешения показало, что

при смешивании реагент вытягивается в сторону по течению из бокового канала, так что реагент (орто-фталевый альдегид) должен диффундировать поперек всего смесительного канала, чтобы полностью перемешаться с зоной анализа. Предложены дизайны (рис. 7А, В), при которых вещества встречаются «головами», так что каждое из них занимает примерно половину канала [24]. В данном случае используется диффузионное перемешивание. Обнаружено также, что ширина каналов, играет такую же важную роль, как и угол пересечения каналов. Кроме того, важно учитывать химию процесса смешения анализа и реагентов: так например, даже небольшое различие в рН реагентов, дает непредсказуемое течение. Получены значения эффективности 20 000 т.т. Пример разделения приведен на рис. 7С.

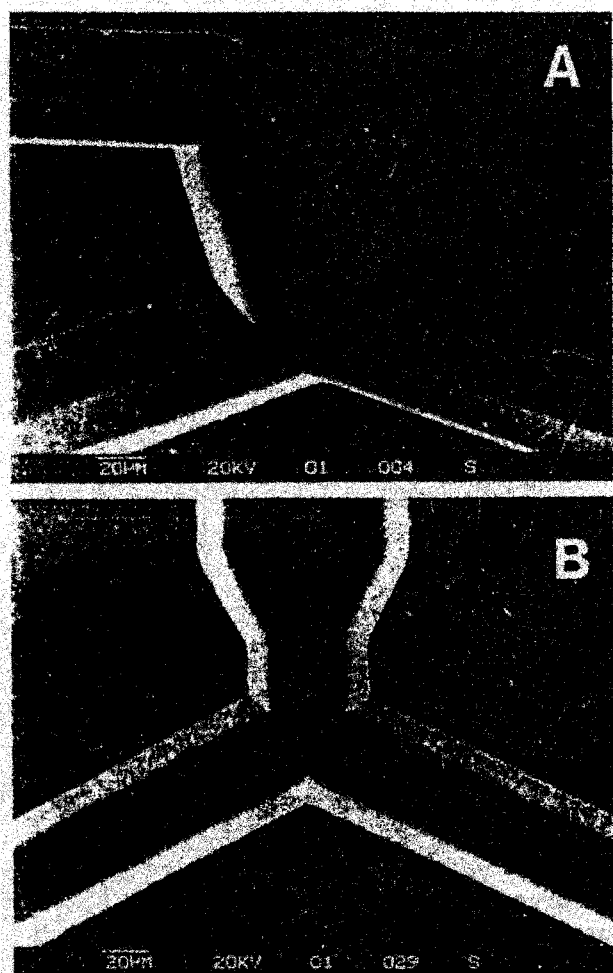


Рис. 7. Электронные микрофотографии, демонстрирующие два типа объединения каналов в смесительных устройствах, полученных травлением в кварце. (А) глубина 13 мкм, (В) глубина 9 мкм

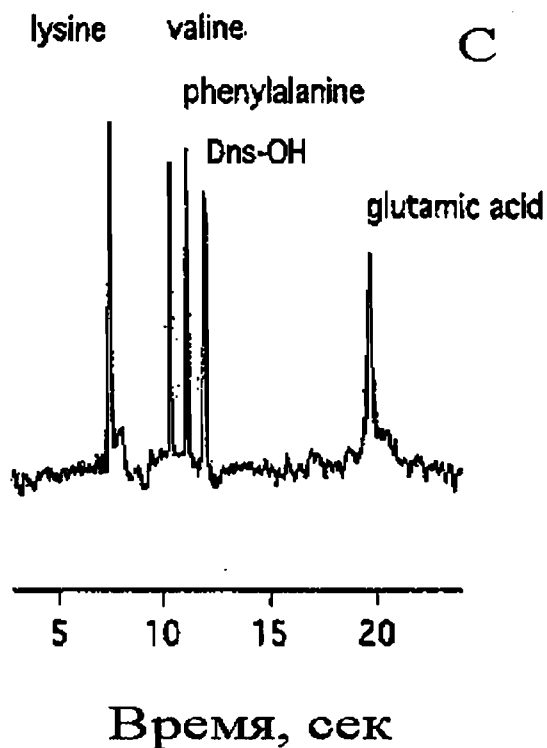


Рис. 7С. . Электрофореграмма аминокислот и гидролизованного данзил хлорида с постколоночной дериватизацией ортофталевым альдегидом в устройстве рис. 7А. Элюент – карбонатный буфер, рН 9,7

Недавно продемонстрирован выдающийся результат по высокоскоростному разделению на чипе [25]. Достигнуто разделение двухкомпонентной смеси за 0.8 мсек при напряженности электрического поля 53 кВ/см в капилляре с длиной сепарационного канала 200 мкм. Разделены родамин и дихлорфлюоресцеин (рис. 8А, Б). Высота тарелки составила $1,1 \pm 0,3$ мкм, при этом высота тарелки повышалась при повышении напряженности поля (рис. 9). Предполагается, что это возрастание высоты тарелки происходит благодаря выделению Джоулева тепла, которое можно оценить по формуле (4)

$$H_{th} = \frac{4,4 \times 10^{-7} a^6 E_{sep}^5 \lambda^2 c^2 \mu_{av}}{Dk^2}, \quad (4)$$

где: a – половина глубины канала (3,5 мкм), E_{sep} – напряженность электрического поля в сепарационном канале, λ – молярная электропроводность

буфера ($0,0332 \text{ м}^2/\Omega\text{моль}$), c – концентрация буфера (1 мМ), D – коэффициент диффузии ($3 \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$), κ – теплопроводность буфера (0,6 W/мК).

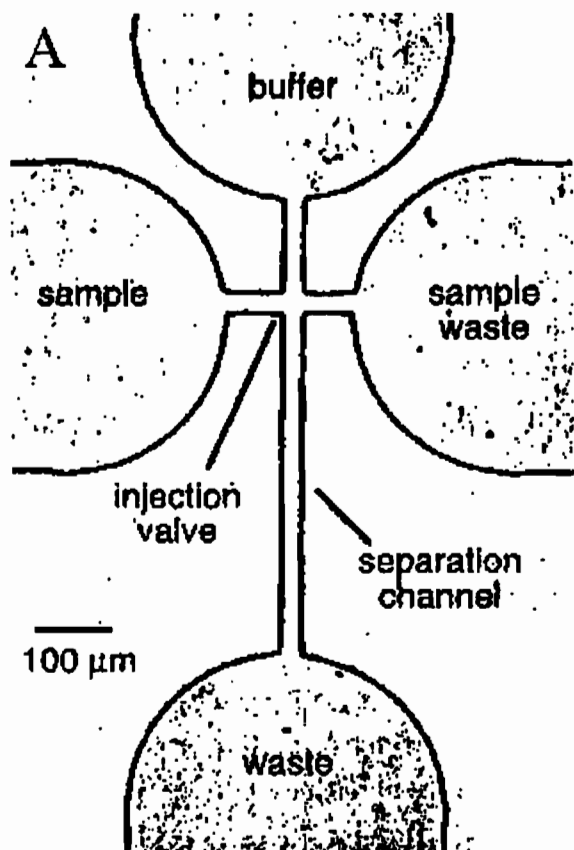


Рис. 8А. Фотография микрочипа, использованного для высокоскоростных электрофоретических разделений. Площадь фотографии $0,8 \times 1,2$ мм. Показана область инъекции и сепарационный канал. Широкие каналы имеют поперечный размер 440 мкм, а узкие – 26 мкм

Демонстрация субмиллисекундного разделения является чрезвычайно многообещающей для применения в сверхвысокопроизводительных системах разработки фармацевтических препаратов, изучения кинетики миллисекундных химических и биохимических процессов.

В МАС-Ф могут применяться системы детектирования, как в ВЭКЭ, но наряду с этим можно использовать особенности МАС-Ф, такие как планарность, неограниченные возможности архитектуры. В настоящее время распространение получили детекторы с применением реакторов для визуализации компонентов [24, 27].

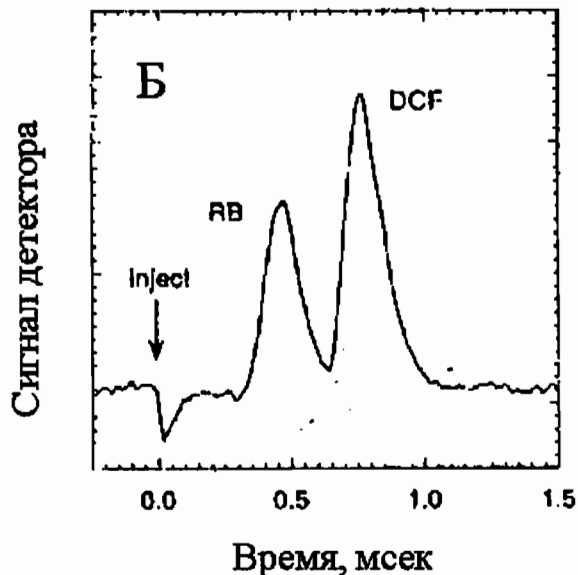


Рис. 8Б. Высокоскоростная электрофореграмма родамина В и дихлорфлуоресцеина, полученная за 0,8 мсек при напряженности электрического поля 53 кВ/см и длине сепарационного канала 200 мкм

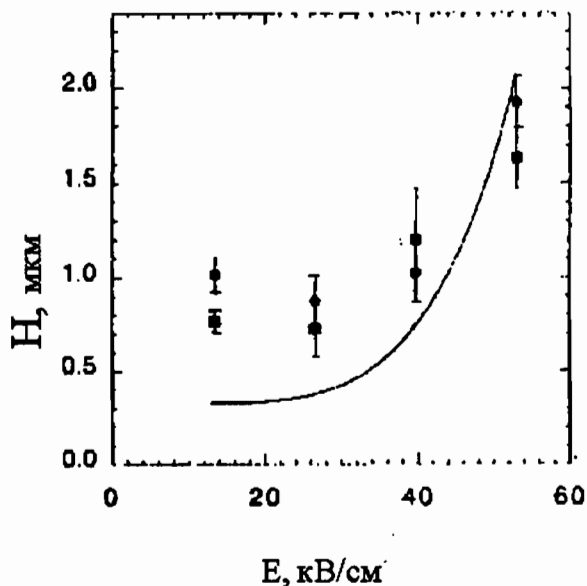


Рис. 9. Зависимость величины высоты тарелки (H) от напряженности электрического поля (E) для родамина В (круги) и дихлорфлуоресцеина (квадраты). Отрезки соответствуют погрешности $\pm \sigma$. Линия представляет собой теоретическую зависимость H от E с учетом вкладов диффузии, инъекционного размера пробы, размера окна детектора и Джоулева нагрева

Например, в [27] хемилюминесцентное детектирование с помощью пероксидазы из хрена катализирует реакцию люминола с перекисью водорода для детектирования в чип-электрофорезе. Такая система удобна тем, что не требует источника света. Описанное в [27] устройство изготовлено из стекла с каналами глубиной 10 мкм и с алюминиевым зеркалом, встроенным в стенку чипа для усиления сбора света. Чувствительность детектирования по концентрации при отношении сигнала к шуму, равном 3 для пробы в 1 нл, составила 35 нМ.

ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИП-АНАЛИЗАТОРОВ

МАС-Ф представляют собой стеклянные, кварцевые, кремниевые, полимерные или иные пластины (чипы) с каналами и отверстиями, через которые каналы чипа заполняются рабочими растворами, вводится проба и реагенты. С помощью электродов подводится высокое напряжение для электрофореза и управления потоками жидкости. Снаружи чипа могут располагаться в качестве навесных элементов в микроисполнении: стабилизированный источник высокого напряжения (до 2500 В), лазер-индуцируемый флюоресцентный

(ЛИФ) детектор, микрооптика (возможно, в интегральном исполнении), фотоприемник и микропроцессорный контроллер для управления напряжением при вводе пробы, работой детектора, обработки и хранения информации. Наряду с ЛИФ-детектором используются электрохимический и хемолюминесцентный детекторы.

Для изготовления МАС-Ф используются заимствованные из микроэлектроники планарные технологии. Последние развиваются в аналитическом приборостроении по линии от изготовления приборных компонентов — к прибору в целом.

В основе разработки и изготовления МАС-Ф лежит компьютерное проектирование, создание и использование специальных технологий и компонентов.

К настоящему времени у нас и за рубежом разработан и испытан ряд основных конструкций МАС-Ф, которые можно классифицировать как:

- А) полимерные (и стекляннопolyмерные)* [30, 31];
- Б) стеклянные (кварцевые)* [27, 323, 33];
- В) кремниевые* [34].

Основные технологические проблемы изготовления проточных чипов классов А, Б и В приведены в табл. 3.

Таблица 3.

Технологии и компоненты для разработки и производства одно- и многоканальных микрофлюидных чип-анализаторов (МАС-Ф)

Группа технологий		Технологические ступени
А	Стеклянные технологии	1. Изготовление канализированных стеклянных пластин (фотолитография, травление) 2. Сверление отверстий в стекле 3. Спекание (склеивание) стеклянных пластин 4. Микрооптика (голографические и интегральные элементы, светоделители, фильтры)
Б	Пластиковые технологии	1. LIGA-технологии – изготовление прецизионных металлических форм для литья пластиковых изделий (корпусов чипов, картриджей) 2. Прецизионное микролитье полимеров 3. Лазерная фотоабляция 4. Герметизация корпусов микрочипов (склеивание, спекание, ламинирование)
В	Кремниевые технологии	1. Глубинное высокоскоростное объемное травление кремния для формирования капилляров, резервуаров, реакторов 2. Формирование низкоинерционных высокостабильных микронагревателей и высокочувствительных датчиков температуры на основе карбида кремния методами интегральной технологии 3. Нанесение и формообразование слоев нитрида алюминия для акустических микросепараторов 4. Нанесение химически инертного высокостабильного покрытия из карбида кремния

ПРИМЕНЕНИЕ МАС-Ф

Важнейшие перспективные направления широкого применения МАС-Ф:

1) Массовый скрининг, в т. ч. портативными приборами.

2) Эффективный поиск новых лекарств на основе комбинаторного синтеза и суперпроизводительного анализа.

3) Фармакогенетика — наложение фармакологии на мутационный (энзиматический) портрет человека, поиск соответствующих геному пациента эффективных безопасных лекарств. Изучение однонуклеотидного полиморфизма (SNP), поиск мутаций. Суперпроизводительное (100 каналов) секвенирование и генотипирование ДНК.

4) Контроль пищевых продуктов и медикаментов, экологический мониторинг, диагностика микроорганизмов в полевых условиях.

Характерно, что решение этих и других проблем биомедицинского и генетического анализа с помощью МАС-Ф в десятки и сотни раз быстрее и дешевле, чем с использованием классических методов.

МАС-Ф предназначены для количественного анализа, объем пробы составляет несколько пЛ (с системой обогащения пробы — несколько нЛ). Предельная величина пробы — зептамоль, предельная концентрация — фемтомоль. МАС-Ф позволяет анализировать свыше 500 компонентов в одной пробе.

К настоящему времени известны применения МАС-Ф для сепарации посредством капиллярного электрофореза [35, 36], синхронизированного циклического ЭФ [37], свободно-поточного ЭФ [38], электрохроматографии в открытом капилляре [21], мицеллярной электрохроматографии [39], с применением ПЦР-реакторов на чипе [40], капиллярного изоэлектрофокусирования [41] с постколочными реакторами [29] и другие. Преимущества этих чип-анализаторов: компактная геометрия, быстрота анализа, низкая стоимость, параллельная архитектура.

Перспективные направления использования МАС-Ф, в значительной степени, определяются возможностями ВЭКЭ, но существенно превосходят их по потенциалу реализации различных функций пробоподготовки и дериватизации. В пределе, МАС-Ф являются базой для создания аналитических систем класса "образец-ответ".

В США проводятся научные и технологические разработки в области использования микрочиповой диагностики в военных целях: военно-полевой медицине, индикации бактериологического оружия. В 1996 году учеными Стенфордского университета и Ливерморской национальной лаборатории создана фирма "Cepheid"

(Sunnyvale, California, USA), концепция которой — применение достижений в микрофлюидике и микроэлектронике для создания революционных методов диагностики на основе анализа ДНК (концепция обозначена как *microDiagnostics & trade*) [42]. Компания разрабатывает полностью интегрированные портативные приборы и лабораторные системы для быстрого и эффективного детектирования инфекций, человеческих генов и экологических токсикантов в армейских условиях. Компания "Cepheid" недавно объявила о внедрении в армию портативной системы анализа ДНК для определения загрязнений пищи, воды, идентификации патогенных бактерий на поле боя и криминалистического ДНК-анализа.

Коммерчески перспективные микрофлюидные ЧИП-анализаторы

Перечислим те аналитические применения МАС-Ф, которые непосредственно могут быть трансформированы в формат чип-анализа из области ВЭКЭ анализа.

В аналитической биохимии и биомедицинском анализе: определение катехоламинов, гормонов, энзимов, идентификация изоэнзимов, идентификация аминокислот, пептидов и других биохимических маркеров, получение пептидных карт, анализ рестрикционных фрагментов ДНК, синтетических олигонуклеотидов, исследование их фармакокинетики, определение нуклеотидной последовательности ДНК, генетический анализ, секвенирование и генотипирование ДНК, усовершенствование методов лечения, обеспечение дешевых биологических и генетических исследований.

Изготовлен микрочип, содержащий сосуды с β галактозидазой — субстратом, гидролизуемым в флюоресцирующий продукт резорурфин [43]. Исследовалось ингибирование реакции фенилэтил- β -D-тиогалактозидом. Определение энзима требует 20 мин, 120 пг энзима и 7,5 нг субстрата. По сравнению с обычным анализом можно уменьшить количество реагентов на 4 порядка.

Сконструирована и изготовлена чип-линейка капиллярного электрофореза для быстрого (160 с) параллельного анализа 12 образцов ДНК на примере диагностики наследственного геохромотоза путем электрофореза рестрикционных фрагментов *pBR322 MspI DNA*, окрашенных красным красителем-интерколатором (*butyl TOYIN*) с присоединением в колонке метки *thiazole orange*. [44]. Фрагменты детектировались с помощью конфокального флюоресцентного сканера при возбуждении флюоресценции лазером $\lambda = 488$ нм, 5 мВт и детектировании флюоресценции

$\lambda = 510 - 540$ нм и $\lambda = 645$ нм. Сканирующая система детектирования оказалась в 10 раз чувствительней, чем при использовании ПЗС-матрицы.

В иммунологии : иммунодиагностика микроорганизмов и токсинов в объектах окружающей среды, болезней и патологических состояний, аллергенов. Описаны применения микрочипов в иммуноанализе. Так, описан интегральный иммунореактор, представляющий собой стеклянный микрочип, в котором реагенты и образец сыворотки для конкурентного иммуноанализа сывороточного теофиллина могут смешиваться и реагировать [45]. Устройство работает как автоматическая микрофлюидная система для иммуноанализа. Образец сыворотки с меткой, теофиллином и антитеофиллином смешиваются в реакторе объемом 51 нл, а затем проба объемом 100 пл поступает в разделительный канал. Связанный и свободный трейсеры затем детектируются с помощью флуориметрического детектора. Предел детектирования составляет 0,26 мг/л.

Разработано определение кортизола в крови на 96-канальном чипе с помощью электрофоретического иммуноанализа [46]. Система позволяет проводить 200 000 анализов в сутки.

В фармацевтическом анализе: определение подлинности и чистоты синтетических медикаментов, гормонов, антибиотиков, витаминов, изучение фармакокинетики, высокопроизводительный скрининг для разработки лекарственных препаратов, поиск кандидатов для разработки лекарств методом комбинаторного синтеза/высокопроизводительного анализа. Фармакогенетика.

В экологическом анализе: определение пестицидов, ПАВ, промышленных экотоксикантов, неорганических и органических катионов и анионов, в т. ч. ионов тяжелых металлов, нитрозаминов, компонентов ракетного топлива, взрывчатых веществ.

В экспертизе пищевых продуктов: определение подлинности продуктов и напитков, определение пищевых добавок, антиоксидантов, красителей, пестицидов, микотоксинов, ионов тяжелых металлов.

В криминалистической экспертизе: анализ наркотиков, взрывчатых веществ, красителей, генетический анализ, таможенный контроль.

На основе анализа литературных данных в качестве коммерчески перспективных МАС-Ф можно предположить:

1. Синергистическую диагностическую панель для иммунодиагностики с помощью капиллярного иммуноэлектрофореза биохимических маркеров инфаркта миокарда (Табл.4). Поскольку инфаркт миокарда может провоцировать токсичность дигоксина, последний добавляется в кардиомаркерную панель. Она значительно эффективнее в диагностике и прогнозе инфаркта миокарда, чем соответствующие индивидуальные маркеры.

В кардиомаркерную панель могут быть добавлены и другие маркеры, например, связывания протеином жирных кислот, гликоген фосфорилазы или *atrial natriuretic peptide*. Панель может быть дополнена маркерами регулирования кровяного потока и давления (альдостерон, ренин, проренин, антидиуретический гормон).

Синергистические диагностические панели на основе микрофлюидики (с использованием биохимического и иммуно-электрофоретического анализа), помимо получения надежных результатов (за счет комплексности исследований) способны:

- 1) резко снизить расход реагентов,
- 2) обеспечить несколько биохимических определений за один тест,
- 3) использовать в анализе единственную аликвоту, что уменьшает риск потери пробы,
- 4) обеспечить экономию посуды, уменьшить отходы,
- 5) резко снизить время анализа до 5 - 15 минут.

Таблица 4.

Функциональные пределы детектирования и динамический диапазон для кардиомаркерной панели

Антиген	Предел детектирования, нг/мл	Динамический диапазон, нг/мл
Creatine kinase-MB (СК-МВ)	1,95	1,95 - 250
Myoglobin	2,7	2,7 - 175
Troponin I	0,4	0,4 - 25
Digoxin	0,05	0,05 - 3,13

2. 100 - 200-канальные чипы для капиллярного электрофореза олиго- и полинуклеотидов в сверхпроизводительном (*high throughput*) анализе нуклеотидной последовательности (секвенировании) ДНК по методу Сенжера.

3. Многоканальный аналитический чип для секвенирования и генотипирования с ПЦР для диагностики СПИД и особо опасных инфекций (лаборатория на чипе). Скорость секвенса — 1 последовательность (более 500 нуклеотидов) в минуту, скорость генотипирования — 1 генотип в секунду.

Перспективы использования в научных исследованиях

Главное применение МАС-Ф — техника массового анализа. Помимо этого, МАС-Ф могут потребоваться и в уникальных научных экспериментах, когда возникает необходимость использования лабораторных биоаналитических приборов, в сверхпроизводительном анализе, моделировании биотехнологических процессов и производств, предназначенных для работы в режиме “on line”, для быстрой проверки разработанных в лабораториях новых методов биотестирования. Очевидно, что возможность быстрого изготовления МАС-Ф в ближайшем будущем будет определять научный потенциал исследовательских лабораторий.

Одним из направлений развития таких биочипов является создание полноценных микроаналитических μ -TAS - систем, обеспечивающих работу со сверхмалыми количествами веществ, вплоть до единичных молекулярных комплексов за счет их многократной репродукции для повышения чувствительности анализа непосредственно в микрореакторе микроаналитического чипа [40]. Такие чип-лаборатории не обладают высокой производительностью, однако в ее конструкции предусматривается возможность параллельного анализа по нескольким каналам, а также полная автоматизация процесса пробоподготовки, работы микрохимического реактора, разделения и детектирования веществ, включая их идентификацию. Ориентировочное время проведения всего комплекса анализов — от 3-х до 45 минут.

В [47] демонстрируется применение анализа продуктов ПЦР быстрого аффинного связывания с последующей замедленной экстракцией *DE-MALDI-TOF mass spectrometry*. Подобное применение включает множественное короткое тандемное повторное типирование (*STR*), которое демонстрируется для *STR-систем* обычного и микрочипового термоциклера. Используя комбинацию микроизготовленного ПЦР-прибора и *DE-MALDI-TOF-MS* можно получить полное генотипирование за 50 мин. с точным определением ММ, начиная с

концентрации ≥ 100 ppm с использованием внешней калибровки. Наблюдаемое разрешение и точность определения масс позволяет для 69-основного продукта ПЦР идентифицировать единичное основание прямым определением ММ.

В настоящем сообщении описываются определение размеров некоторых прямых ПЦР-продуктов, которое стало возможным благодаря аффинному связыванию и замедленной экстракции с *MALDI-TOF-MS*. Долгосрочная цель этой работы — развить минимизованный во времени общеприменяемый способ информативного генотипирования, исходя из грубого экстракта ДНК. Как недавно установлено в *ESI - FTICR* работах, масс-спектрометрия может максимизировать информативность, полученную через единичное высокоточное определение ММ образцов ДНК. *MALDI-MS* имеет значительные практические преимущества перед *ESI-FTICR*, однако полные возможности *MALDI-MS* для прямого анализа ПЦР-продуктов остаются неизвестными. Это иллюстрируется использованием *MALDI-TOF-MS* для анализа однолокусных и множественных коротких тандемных (*STR*) фрагментов. В добавление, получены обескураживающие результаты в анализе фрагментов ДНК, продуцируемых в быстром портативном приборе ПЦР-амплификации на чипе. Такое использование *DE-MALDI-TOF-MS* демонстрирует точный воспроизводимый и универсальный способ анализа ПЦР-продуктов, совместимый с последующей генерацией высококачественных технологий генетического анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое внедрение микроаналитических систем — многоканальных универсальных анализаторов, дешевых и удобных в массовом производстве — это путь создания современных средств биомедицинского и генетического анализа. Создание микроаналитических систем, означает технологический прорыв в ответ на социальный заказ современности — необходимость:

- (1) резкого увеличения числа точек анализа и измеряемых параметров,
- (2) повышения оперативности анализа путем приближения прибора к анализируемому объекту (постели больного),
- (3) увеличения достоверности анализа, в первую очередь, за счет его комплексности,
- (4) резкого снижения стоимости единичного анализа,
- (5) возможности быстрого, диктуемого обстановкой, оснащения медицинских профилактических служб, включая военную медицину, необходимыми диагностическими приборами.

Возможность широкого использования МАС-Ф рождает новую идеологию аналитической химии: вместо приспособления дорогостоящих универсальных приборов к конкретным аналитическим задачам — разработка специализированных индивидуальных, изготавливаемых *ex tempore* чип-анализаторов.

В Институте аналитического приборостроения РАН, начиная с 70-х годов, ведутся работы в области капиллярных сепарационных методов, в частности, микроколоночной хроматографии. Созданы микроколоночные хроматографы нескольких поколений: ХЖ-1305, ХЖ-1309, ХЖ-1311. Эти работы велись совместно с Институтом высокомолекулярных соединений РАН, где прошли апробацию и отладку все эти приборы. В настоящее время на основе этих традиций разработан опытный образец прибора капиллярного электрофореза, НАНОФОР-01. Институт ведет работы и в области новейших аналитических методов, в частности, разработки МАС-Ф. К настоящему времени разработан лабораторный прототип ВЭКЭ-анализатора на чипе с конфокальным флуориметрическим детектором. Ведутся работы по разработке новых топологий чипов и методик анализа с применением чип-электрофореза. В 2000 году институт продемонстрирует опытный образец первого в России чип-анализатора МАС-Ф.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Specman D.H., Stein W.N., Moor S.* // Anal. Chem. 1958. V. 30. P.1190.
2. *Snyder L.R., Kircland J.J.* Introduction to Modern Liquid Chromatography. 1979. John Wiley & Sons. Second. Ed. 863 p.
3. *Regnier F.E., Gooding K.M., Chang S.H.* // Contemporary Topics in Analytical and Clinical Chemistry. 1977. Hercules et al., eds.: Plenum, New York. V. 1. P.1.
4. *Mikkers F., Everaerts F., Verheggen T.* // J. Chromatogr. 1979. V. 169. P.1.
5. *Jorgenson J.W., Lukas. K.D.* // Anal. Chem. 1981. V. 53. P.1298.
6. *Harrison D.J., Manz A., Fan Z.* // Anal. Chem. 1992. V. 64. P.1926-1932.
7. *Jacobson S.C., Hergengroeder R., Koutny L.B.* // Anal. Chem. 1994. V. 66. P.1114-1118.
8. *Fodor S., Read J.L., Perring M.C.* // Science. 1991. V. 251. P.767-773.
9. *Hacia J.C., Makalovski W., Edgemon K.* // Nature Genetics. 1998. V. 18. P.155-158.
10. *Cronin M.T., Fucini R.V., Kim S.V.* // Human Mutation, 1996. V. 7. P.244-255.
11. *Heller M.* // IEEE Engineering in Medicine and Biology. 1996. V. 15. P.100-103.
12. *Chung J., Sheldon E.L., Wu L.* // Anal. Chem. 1998. V. 70. P.2321-2326.
13. *Harrison D.J.* // Anal. Chem. 1992. V. 64. P.1926-1932.
14. *Wolley A.T., Sensabaugh G.F., Mathies R.A.* // Anal. Chem. 1997. V. 69. P.2181-2186.
15. *Fulton R.J., Cedar H.* // Патент США. N 5736330. 1998.
16. *Sirkar K., Pishko M.V.* // Anal. Chem. 1998. V. 70. P.2888-2894.
17. *Shram N.F., Netchiporouk L.I., Martelet C.* // Anal. Chem. 1998. V. 70. P.2618-2622.
18. *Li S.F.Y.* Capillary Electrophoresis principles. 1992. Elsevier. 586 p. P.6-28.
19. *Беленький Б.Г., Зимица Т.М., Комяк Н.И.* // Заводская лаборатория. 1996. V. 251. P.767.
20. *Culbertson Ch.T., Jacobson S.C., Ramsey J.M.* // Anal. Chem. 1998. V. 70. P.3781-3789.
21. *Kutter J., Jacobson S.C., Matsumara N.* // Anal. Chem. 1998. V. 70. P.3291-3297.
22. *Jacobson S.C., Ramsey J.M.* // Electrophoresis. 1995. V. 16. P.481-486.
23. *Effenhauser C.S., Manz A., Widmer H.M.* // Anal. Chem. 1993. V. 65. P.2637-2642.
24. *Schultz-Lockyear L.L., Colyer C.L., Fan Z.H.* // Electrophoresis. 1999. V. 20. P.529-538.
25. *Fluri K., Fitzpatrick G., Chiem N., Harrison D.J.* // Anal. Chem., 1996, P.4285-4290.
26. *Jacobson S.C., Culbertson C.T., Daler J.E.* // Anal. Chem. 1998. V. 70. P.3476-3480.
27. *Jacobson S.C., Michael J.* // Anal. Chem. 1996. V. 68. P.720-723.
28. *Woolley A.T., Sensabaugh G.E., Mathies R.A.* // Anal. Chem. 1997. V. 69. P.2181-2186.
29. *Mangru S.D., Harrison D.J.* // Electrophoresis. 1998. V. 19. P.2301-2307.
30. *Dutton G.* // Gen. Eng. News. 1996. September 15. P.18-19.
31. *Effenhauser C.S., Bruin G.J. M., Paulus A.* // Anal. Chem. 1997. V. 69. P.3451-3457.
32. *Effenhauser C.S., Manz A., Widmer H.M.* // Anal. Chem. 1993. V. 65. P.2637-2642.
33. *Jacobson, S.C., Moore A.W., Ramsey J.M.* // Anal. Chem. 1995. V. 67. P.2059-2063.
34. *Harrison D. J., Glavina P.G., Manz A.* // Sens. Actuators B. 1993. V. 10. P.107-116.
35. *Harrison D.J., Manz A., Fan Z.* // Anal. Chem. 1992. V. 64. P.1926.
36. *Jacobson S.C., Ramsey J.M.* // Anal. Chem. 1996. V. 68. P.720-723.
37. *Buggraf N., Manz A., Widmer H.M.* // J. High Resolut. Chromatogr. 1993. V. 16. P.594.
38. *Raymond D., Manz A., Widmer H.M.* // Anal. Chem. 1994. V.66. P.2858-2865.
39. *von Heeren F., Veerporte E., Manz A.* // Anal. Chem. 1996. V. 68. P.2044-2053.

40. *Wooley A.T., Hadley D., Landre P.* // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P.4081-4086.
41. *Jacobson S.C., Ramsay J.M.* // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P.3212-3217.
42. Website of company at address - <http://www.cerpheid.com>
43. *Hadd A.G., Raymond D.E., Halliwell J.W.* // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P.3407-3412.
44. *Wooley A.T., Sensabaugh G.F., Mathies R.A.* // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P.2181-2186.
45. *Chiem N.H., Harrison D.J.* // *Clin. Chem.* 1998. V. 44. P.591-598.
46. *Koutny L., Schmalzing D., Taylor T.A.* // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P.18-22.
47. *Ross P.L., Davis P.A., Belgrader P.* // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P.2067 - 2073.

FROM THE CLASSICAL LIQUID CHROMATOGRAPH TO HIGH THROUGHPUT MICROFLUIDIC ANALYTICAL SYSTEMS (MAS-F)

(REVIEW)

B.G. Belenkii, T.M. Zimina

Institute for Analytical Instrumentation RAS, St. Petersburg

The analytical review describes conditions for development of new generation integrated microanalytical systems (MAS). A classification of the principal types of MAS has been presented. Typical designs, peculiarities of operation mode, technologies of preparation and applications of MAS are described.