

УДК 543.422.5; 543.432; 537.363

Ã А. П. Смирнова, М. А. Проскурнин, К. Маватары, А. Хибара, Т. Китамоори

**ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТОЧНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ПРИ ПОМОЩИ  
ТЕРМОЛИНЗОВОЙ МИКРОСКОПИИ В МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПАХ  
НА ПРИМЕРЕ ТРИС-(2-НИТРОЗО-1-НАФТОЛАТА) КОБАЛЬТА(III)**

Проведено исследование проточной экстракции кобальта по реакции с 2-нитрозо-1-нафтолом на границе раздела фаз в системе вода—толуол с термолинзовым детектированием в кварцевом микрофлюидном чипе со сложной формой сечения канала и модификацией части поверхности гидрофобными группами (октадецилсилан). Определены диапазоны стабильности поверхности раздела фаз при различных скоростях водной и органической фаз и оптимальные скорости обеих фаз для проведения процессов экстракции (6 и 0.05 мкл/мин соответственно), а также оптимальное положение детектирования в микроканале. Для инициации процессов переноса вещества через границу раздела фаз предложено использовать прием резкого снижения скорости потока органической фазы (начальная скорость органической фазы 5 мкл/мин) при постоянной скорости водной фазы, что позволило сократить время определения и повысить чувствительность и воспроизводимость определения. Предел обнаружения кобальта  $3 \times 10^{-8}$  М, диапазон определяемых концентраций  $2.0 \times 10^{-7}$ – $8.0 \times 10^{-6}$  М, относительное стандартное отклонение измерений в этом диапазоне не превышает 0.03.

**ВВЕДЕНИЕ**

Системы химического анализа на микрофлюидных чипах являются прототипом аналитических приборов нового поколения, ориентированных на решение широкого круга аналитических задач. Особенно интересна реализация на микрофлюидных устройствах не только отдельных стадий аналитического цикла, но и современных мощных методов разделения, таких как ВЭЖХ или капиллярный электрофорез [1]. Часто решение этой задачи сопряжено с включением предварительной стадии двухфазного экстракционного концентрирования. Основными достоинствами систем *жидкость—жидкость*, интегрированных в микрочип, являются: ламинарное протекание потоков фаз, высокое соотношение площади поверхности к объему жидкости и короткие времена диффузии, а используя каналы с различными профилями, возможно контролировать объемные скорости фаз от равных (одинакового профиля) до разницы в несколько десятков раз (разного профиля) [2–6]. Кроме того, граница поверхности раздела фаз *жидкость—жидкость* представляет удобное реакционное поле, где вступают в контакт гидрофобные и гидрофильные молекулы. Таким образом, поверхность между фазами играет важную роль во многих областях химии, таких как электрохимия, гетерогенный катализ, фармацевтическая химия, коллоидная химия [7]. Однако исследования реакций, протекающих на границе раздела фаз,

достаточно трудновыполнимы по сравнению с измерениями в растворах из-за следовых количеств веществ на границе раздела, а также планарной геометрией самой поверхности. В результате на настоящий момент существует лишь ограниченное число методов, исследующих эти процессы, и они довольно специфичны [8–10].

В качестве методов для изучения процессов, идущих вблизи поверхности раздела фаз *жидкость—жидкость*, немалый потенциал имеет оптическая спектроскопия и прежде всего термолинзовая микроскопия (ТЛМ) [11], поскольку она: 1) обеспечивает высокую чувствительность определения, 2) как метод молекулярной абсорбционной спектроскопии пригодна для детектирования большого числа веществ, 3) за счет своей локальности и разрешающей способности наиболее полно раскрывает свои возможности именно в образцах с малым объемом и низкими концентрациями.

Таким образом, целью работы являлось исследование проточной экстракции при помощи термолинзовой микроскопии в микрофлюидных чипах и выбор оптимальных режимов как разделения (реализация стабильной двухфазной системы с устойчивой поверхностью границы раздела фаз), так и детектирования на примере модельной системы. В качестве последней выбрали реакцию комплексообразования кобальта с 2-нитрозо-1-нафтолом, обеспечивающую высокую чувствительность и селективность при определении кобальта в системе *вода—толуол* [12].

## АППАРАТУРА, РЕАГЕНТЫ И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

### Термолинзовый микроскоп

Оптическая схема термолинзового микроскопа схематично представлена на рис. 1 [13]. Интенсивность луча индуцирующего лазера модулируется механическим лучевым прерывателем (Прер-ль). Частота модуляций и изменение интенсивности индуцирующего луча с одинаковой периодичностью детектируются синхронным усилителем (Усилитель). Луч зондирующего лазера пропускается через диафрагму А и нейтральный фильтр НФ для ослабления исходящей мощности. Оба луча проходят через двухлинзовые уширители (ДЛУ), использующиеся для точной настройки расстояния между перетяжками лучей в канале микроципа, а также размера луча в образце. При помощи дихроичных зеркал (ДЗ) лучи собираются и коаксиально направляются через линзу объектива оптического микроскопа (ЛО1). Изображение образца можно наблюдать визуально или на мониторе компьютера посредством ССD-камеры через вторую линзу объектива (ЛО2). Образец (микрокювета (К) или микроцип) располагается на оптическом столике, положение которого регулируется в трех измерениях. После прохождения через образец и следующую за ним линзу конденсора (КЛ) зондирующий луч отделяется от индуцирующего посредством оптического и интерференционного фильтров. В конечном итоге, пройдя через диафрагму, несущий информацию зондирующий луч

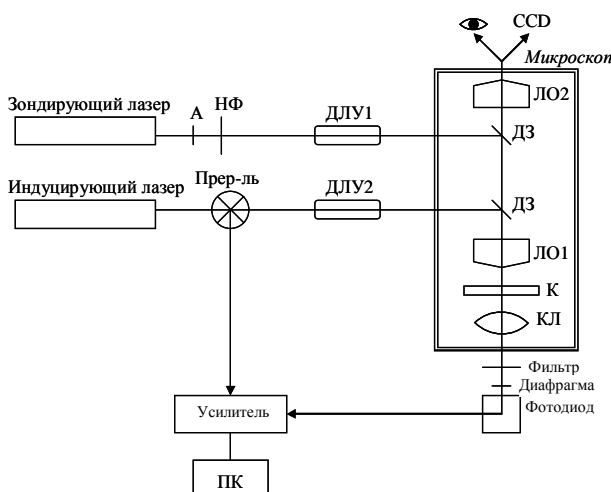


Рис. 1. Схема измерений в термолинзовой микроскопии

попадает на фотодиодный детектор, соединенный с синхронным усилителем. Сигнал, поступающий с усилителя, передается на АЦП-ЦАП ПК.

В использованной в работе модели ITLM-10 (Япония) [11] для миниатюризации фокусные на-стройки применены к лучу индуцирующего лазера, а система линз установлена в верхней части микроскопа. В качестве индуцирующего лазера использован твердотельный полупроводниковый лазер (Coherent, Compass 315M, длина волны 532 нм, мощность 75 мВт), в качестве зондирующего лазера — диодный лазер (длина волны 670 нм, мощность 0.95 мВт). Для модуляции луча индуцирующего лазера использован лучевой прерыватель с настроенной частотой в 1 кГц. После прерывателя луч лазера проходит через систему фокусирующих линз — двухлинзовые уширители, дихроичное зеркало, кубическую призму — и попадает в объектив микроскопа с численной апертурой 0.46 и 20-кратным увеличением (Nikon, CF IC EPI Plan). Луч зондирующего лазера соединяется с индуцирующим вертикально, пройдя через дихроичное зеркало оказывается коаксиально направленным с индуцирующим. После прохождения через образец и его облучения оба луча попадают на конденсирующую линзу, проходят сквозь и, отразившись от зеркала, попадают на фотодиод. Индуцирующий луч перед попаданием на фотодиод отсекается интерференционным фильтром, зондирующий луч беспрепятственно попадает на входное отверстие детектора. Использовали на-стройки (табл. 1), обеспечивающие максимальную чувствительность. Таким образом, оптимизацию геометрии оптических элементов не проводили, но перед каждой серией измерений корректировали положение конденсирующей линзы на оси  $z$  по максимальному сигналу стандартного раствора красителя закатного желтого  $1 \times 10^{-4}$  М.

### Параметры развития термолинзового сигнала

Сигнал в термолинзовой микроскопии, связанный со светопоглощением образца, определяется [11, 14]

$$q = 2.303 E_0 P_e k' e l c, \quad (1)$$

где  $E_0$  — коэффициент чувствительности термолинзовых измерений (табл. 1);  $P_e$  — мощность излучения, индуцирующего термолинзу;  $k'$  — коэффициент усиления синхронного усилителя;  $e$  — молярный коэффициент поглощения исследуемого соединения;  $l$  — глубина микроканала;  $c$  — молярная концентрация исследуемого соединения. Его рассчитывают из изменения интенсивности зондирующего луча, прошедшего через образец:

$$I_p(t) = I_p(0) \left[ 1 - \frac{q}{2} \operatorname{arctg} \left( \frac{2mV}{[(1+2m)^2 + V^2](t_c/2t) + 1 + 2m + V^2} \right) \right]^2, \quad (2)$$

где  $I_p$  — интенсивность излучения зондирующего лазера в плоскости детектора, а уравнения для геометрических параметров  $m$  и  $V$  и характеристического времени развития термолинзы  $t_c$  приведены в табл. 1.

**Табл. 1.** Параметры оптической схемы термолинзового микроскопа

Элемент схемы	Наименование параметра	Расчетная формула	Значение параметра
Индукующий лазер	Длина волны $I_e$ , нм	—	532
	Численная апертура объектива NA	—	0.46
	Конфокальное расстояние $z_{c,e}$ , мкм	$z_{c,e} = \frac{pw_{0e}^2}{I_e}$	2.8
	Исходная мощность лазерного излучения $P_e$ , мВт	—	75
	Диаметр луча в перетяжке $2 \times w_{0e}$ , мкм	$w_{0e} = 0.6 \times \frac{I_e}{NA}$	1.39
Зондирующий лазер	Длина волны; $\lambda_p$ , нм	—	670
	Конфокальное расстояние $z_{c,p}$ , мкм	$z_{c,p} = \frac{pw_{0p}^2}{I_p}$	3.55
	Исходная мощность лазерного излучения $P_p$ , мВт	—	0.95
	Диаметр луча в перетяжке $2 \times w_{0p}$ , мкм	$w_{0p} = 0.6 \times \frac{I_p}{NA}$	1.74
Устройство в целом	Длина оптического пути $l$ , мм	—	0.1
	Расстояние между ячейкой и детектором $z_d$ , см	—	40
	Расстояние между перетяжками лазеров $z_w$ , мкм	—	2
	Соотношение площадей поперечного сечения лучей в кювете $m$	$m = \left( \frac{w_{0p}}{w_e} \right)^2 \left[ 1 + \left( \frac{z_w}{z_{c,p}} \right)^2 \right]^2$	2.92
	Относительное расстояние от перетяжки индуцирующего лазера до кюветы $V$	$V = \frac{z_w}{z_{c,p}} + \frac{z_{c,p}}{z_d} \left[ \left( \frac{z_w}{z_{c,p}} \right)^2 + 1 \right]$	0.56
	Частота прерывателя $j$ , Гц	—	1000
	Время развития термолинзы $t_c$ , мкс	$t_c = \frac{w_{0e}^2 r C_p}{4k}$	$0.83 \pm 0.01$
Фактор увеличения чувствительности $E_0$ , мВт <sup>-1</sup>	$E_0 = -\frac{dn/dT}{I_p k}$	0.286	

Пересчет сигнала  $q$  в оптическую плотность  $A$  производят по уравнению (1). Радиус перетяжки луча лазера в образце оценивают по уравнению  $d = 2l/pnw_0$ . С уменьшением радиуса перетяжки растет расхождение луча в дальней области; в связи с этой особенностью в оптическую схему термолинзового микроскопа включена конденсирующая линза, следующая после образца (микрочип). Расходимость зондирующего луча определяется фокусным расстоянием термолинзы, а ее сила определяется обратным соотношением к фокусному расстоянию

$$\frac{1}{f(\infty)} = \frac{\Phi_0 \alpha l (dn/dT)}{n_0 p k w_e^2}, \quad (3)$$

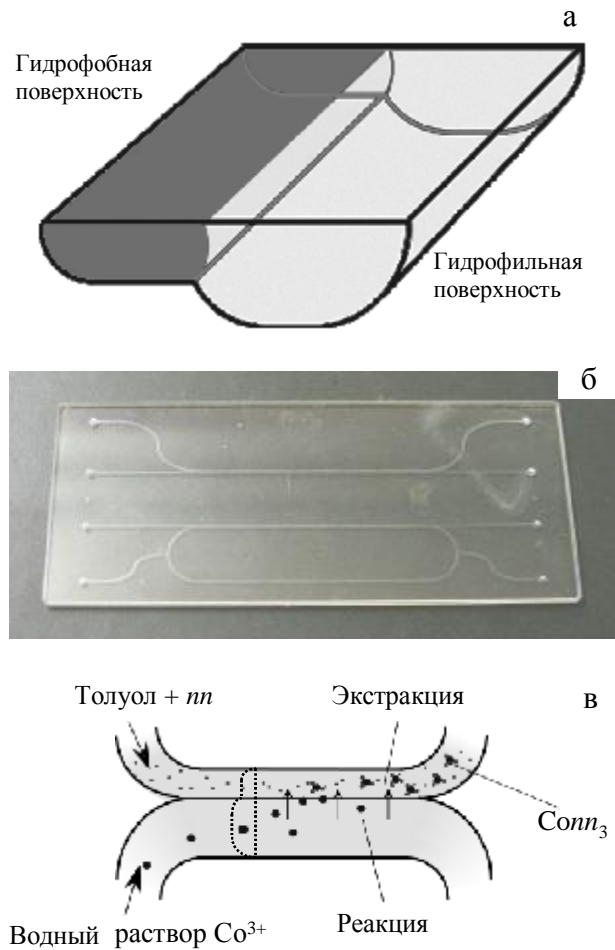
где  $f(\infty)$  — фокусное расстояние полностью развитой термолинзы;  $\Phi_0$  — энергия падающего излучения;  $n_0$  — показатель преломления среды, в которой происходит детектирование (воздух). Исходя из уравнения для силы образующейся линзы, чем меньше радиус индуцирующего луча в образце, тем сильнее линза и сильнее результирующее отклонение зондирующего луча, что также подтверждается фактором увеличения чувствительности для физических свойств образца

$$E_{\text{phys}} = \frac{P_e}{p w_e^2}. \quad (4)$$

Таким образом, если (по оценке)  $\omega_e$  в микрочипе для термолинзовой микроскопии около 2 мкм [15], то относительное увеличение чувствительности составляет около 2–3 порядков, что полностью компенсирует уменьшение сигнала при уменьшении длины оптического пути. При переходе в микропространство величина  $z_w$  по сути является расстоянием между фокусами индуцирующего и зондирующего лучей. При реализации первых термолинзовых измерений в оптическом микроскопе  $z_w$  определялось хроматической абберацией объектива. В работе [16] с использованием традиционной термолинзовой спектроскопии в микропространстве для определения оптимальной величины  $z_w$ , соответствующей максимальной чувствительности, выведено соотношение  $z_w = 1.73 z_{c.p.}$  Расчетная величина  $z_{c.p.}$  для нескомпенсированного объектива с численной апертурой 0.65 составила 1.69 мкм. Оптимальное расстояние между перетяжками оценивается как 2.9 мкм, что практически совпадает с хроматической абберацией объектива микроскопа (2.2 мкм).

### Микрофлюидные чипы

Для реализации двухфазового микрофлюидного потока в микрочипе с микроканалом с асимметричным поперечным разрезом использовали метод



**Рис. 2.** Микрофлюидный чип для проведения экстракции с химическим модифицированием поверхности ограниченной части канала. а — схема каналов; б — фотография (использовали каналы в верхней части микрочипа); в — схематическое изображение происходящих процессов

двухступенчатого химического жидкостного травления. Использовали микрочип с каналом сложной формы (рис. 2), сделанный из стекла пирекс и размерами канала  $(165 \pm 3) \times (210 \pm 3)$  мкм (глубокая часть) и  $(8.0 \pm 0.5) \times (75 \pm 3)$  мкм (неглубокая часть, разброс представляет собой вариации данного параметра вдоль канала). Микрочип имеет два входа и два выхода для потоков водной и органической фаз. При слиянии каналы образуют общий канал с сечением сложной формы, изображенный на рис. 2, б. Используя метод модифицирования поверхности ограниченной части капилляра [17], наносили гидрофобное покрытие (ОДС) на часть канала с неглубоким профилем следующим способом: каплю раствора ОДС в толуоле (концентрация 1% об.) подают на входное отвер-

стие неглубокого канала, под воздействием капиллярных сил толуол заполняет только узкую часть микроканала. Если самопроизвольного затекания не происходит, то прикладывают кратковременное отрицательное давление с противоположного конца к выходу широкого канала. Незадолго до полного заполнения узкой части капилляра каплю толуола удаляют, не допуская избыточного затекания и попадания толуола в широкую часть. Микрочип, частично заполненный толуолом, содержащим ОДС, накрывают стеклянной пластиной для предотвращения испарения толуола и оставляют на 2 ч для реакции связывания октадецилсиланольных групп с поверхностью стенок, после чего через каналы микрочипа пропускают чистый толуол. Для удаления слоев ОДС с поверхности канала микрочипа использовали горячий водный раствор 1M NaOH.

Все примененные в работе микрочипы не являлись одноразовыми и использованы многократно. При работе с водными растворами микрочипы промывали ацетоном и бидистиллированной водой, при работе с двухфазными системами — используемым органическим растворителем. За чистотой микрочипа следили по фоновому термолинзовому сигналу исследуемой системы, значения которого не превышали 0.004 отн. ед.

#### Обеспечение потоков в микроканалах

Для введения растворов в канал микрочипа использовали стеклянные шприцы Hamilton от 250 мкл до 1 мл; контроль скорости жидкости осуществляли посредством насосов для микрошприцев (KD Scientific, Model-200). Каждая игла шприца (Hamilton, KF726) соединена с тефлоновым винтом через тефлоновый капилляр (GL Science; внутр. диаметр 0.2 мм; внеш. диаметр 0.4 мм) склеиванием при помощи эпоксидного клея. В торцевую выемку тефлонового винта помещено резиновое кольцо (NOK, внутр. диаметр 0.74 мм, внеш. диаметр 2.78 мм), обеспечивающее плотное соединение со стеклянной подложкой микрочипа и предотвращающее от утечки жидкости. Соединение капилляра шприца с каналами в микрофлюидном чипе осуществляется посредством составной алюминиевой рамки, нижняя часть которой имеет углубление — впадину по размерам микрочипа (ширина 30 мм, глубина 2 мм), а верхняя — отверстия с резьбой для тефлоновых винтов. После помещения микрочипа в углубление части рамки складывали и скрепляли металлическими винтами. Тефлоновые винты с капиллярами присоединяли к местам расположения выходов микроканалов. Перед подачей жидкости в микрочип, шприцы наполняли рабочими растворами и присоединяли иглы с тефлоновыми капиллярами. Как из шприца, так и из соединительных капилляров

удаляли воздух. Присоединяли винты капилляров к алюминиевой рамке, держащей микрочип. После пропускания рабочих растворов через микрочип в течение минуты (скорость 5–50 мкл/мин), приступали к основным экспериментам, согласно методике.

При работе с двухфазными микропотоками заполняли микрочип растворами, предотвращая попадание водной фазы в узкую часть капилляра, обработанную ОДС. Для этого вначале вводили органическую фазу в узкую часть микроканала до полного заполнения канала, затем, сохраняя скорость органической фазы постоянной (около 2–5 мкл/мин), вводили водную фазу (при скоростях 5–20 мкл/мин). Дальнейшее регулирование скоростей обеих фаз проводили согласно методике. При остановке потоков первой прекращали подачу водной фазы до полного заполнения капилляра органической фазой, затем останавливали поток органической фазы.

#### Реагенты и растворители

В качестве реагентов и растворителей в работе использовали: стандартный водный раствор нитрата кобальта(II) 1 мг/мл (Kanto Kagaku Co., Ltd, Токио, Япония); гидроксид натрия ос. ч.; кислоты — соляную кислоту ос. ч., серную кислоту ос. ч.; трис-(2-нитрозо-1-нафтолат) кобальта(III)  $3 \times 10^{-5}$  M раствор; 2-нитрозо-1-нафтол ч. д. а. (Kanto Kagaku Co., Ltd, Токио, Япония); октадецилтрихлоросилан (ОДС) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Токио, Япония); буферные растворы — стандартный фосфатный буферный раствор pH 7.1 (Kanto Kagaku Co., Ltd, Токио, Япония).

#### Оптимизация термолинзовых измерений в микрочипе

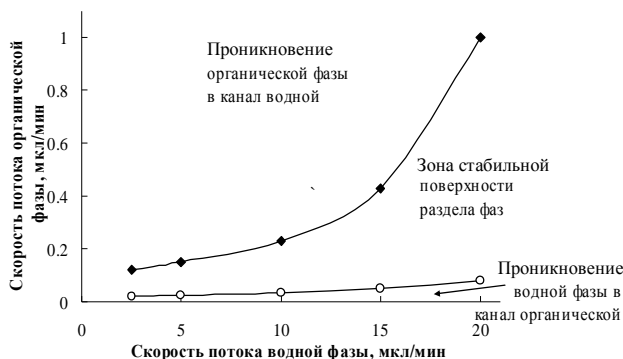
В канал для органической фазы вводили рабочий раствор 2-нитрозо-1-нафтола в толуоле ( $2.3 \times 10^{-4}$  M) со скоростью 5 мкл/мин, а в канал водной фазы — водный раствор Co ( $1 \times 10^{-6}$  M) в буферном растворе со скоростью 6 мкл/мин. Измеряли термолинзовый сигнал в центре органической фазы при полной остановке потоков обеих фаз.

#### Экстракционно-термолинзовое определение Co в микрочиповом варианте

В канал для органической фазы вводили рабочий раствор 2-нитрозо-1-нафтола в толуоле ( $2.3 \times 10^{-4}$  M) со скоростью 5 мкл/мин, а в канал водной фазы — водный раствор Co ( $0.4 \times 10^{-7}$ – $4 \times 10^{-6}$  M) в буферном растворе со скоростью 6 мкл/мин. После сброса скорости органической фазы до 0.05 мкл/мин измеряли термолинзовый сигнал в центре органической фазы.

**Табл. 2.** Метрологические характеристики определения предварительно синтезированного комплекса кобальта с 2-нитрозо-1-нафтолом в толуоле в спектрофотометрическом и термолинзовом вариантах детектирования.  $I_e = 532$  нм;  $P_e = 75$  мВт ( $P = 0.95$ ,  $n = 7$ )

Характеристика	Метод	
	Спектрофотометрия	ТЛМ
Уравнение градуировочной кривой	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^4 c + (3 \pm 1) \times 10^{-3}$ ( $r = 0.999$ )	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^5 c + (3 \pm 2) \times 10^{-4}$ ( $r = 0.996$ )
$c_{\min}$ , М	$2 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-8}$
Диапазон определяемых содержаний, М	$5 \times 10^{-7} - 2.5 \times 10^{-5}$	$6 \times 10^{-8} - 1.6 \times 10^{-5}$
$s_r$ (для конц., М)	0.03 ( $2 \times 10^{-6}$ )	0.03 ( $5 \times 10^{-7}$ )
$E_{\text{теор}} = P_e E_0 k$	—	3300
$E_{\text{эсп}} = \theta \cdot I_1 / 2.303 A \cdot l_2$	—	$3340 \pm 40$



**Рис. 3.** Диапазон стабильности поверхности раздела фаз *толуол—вода* в микроканале в зависимости от скоростей потоков фаз.  $I_e = 532$  нм,  $P_e = 75$  мВт

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

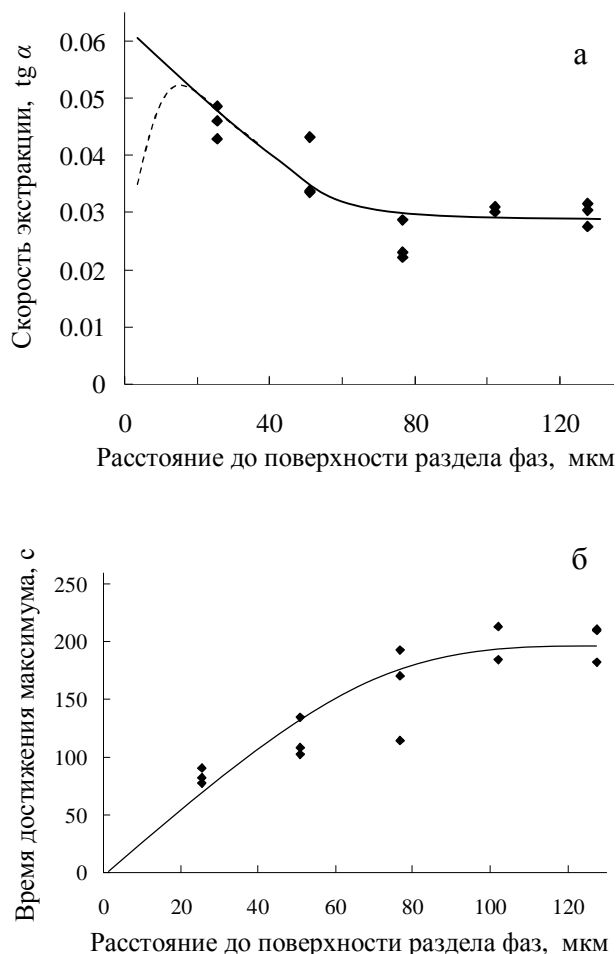
### Модельные исследования предварительно синтезированного комплекса

Проведена оценка метрологических характеристик предварительно синтезированного трис-(2-нитрозо-1-нафтолата) кобальта(III) в толуоле при термолинзовых измерениях. Измерение сигнала проводили в узком канале микроципа в статических условиях. Полученные метрологические характеристики представлены в табл. 2. Экспериментальный коэффициент чувствительности  $E_0$  незначимо отличается от рассчитанного теоретического значения. Предел обнаружения синтезированного комплекса кобальта в толуоле составил  $2 \times 10^{-8}$  М (1.1 нг/мл), что на порядок ниже преде-

ла спектрофотометрических измерений. Верхняя граница определяемых концентраций методом ТЛМ достигает  $2 \times 10^{-5}$  М (1 мкг/мл). Таким образом, диапазон определяемых содержаний перекрывает три порядка, что на порядок превышает аналогичную величину для спектрофотометрии. Воспроизводимость измерений обоих методов сравнима.

### Стабилизация поверхности раздела фаз *жидкость—жидкость* в микроканале

На основании данных [18, 19], проведение экстракционных процессов в микропространстве требует подбора условий, при которых граница раздела фаз оставалась бы стабильной, а экстракционные процессы шли бы с максимальным выходом. В результате модификации поверхности канала органическая фаза удерживалась в узком канале, а проникновению водной фазы препятствовало гидрофобное покрытие. Такие условия обеспечивали стабильность поверхности при минимальных скоростях потока фаз. Исследовали возможный диапазон стабильности границы раздела при различных скоростях водной и органической фаз для экстракционной системы *вода—толуол* (рис. 3). При увеличении скорости водной фазы диапазон стабильности границы раздела фаз также увеличивается. Такое увеличение полностью зависит от формы микроканала (площадей сечения водной и органической частей), степени модифицирования поверхности и полярности растворителя. Однако при больших скоростях фаз степень извлечения в экстракционных процессах будет падать вследствие снижения времени контакта фаз. Таким образом, необходимо исследовать влияние скоростей потоков обеих фаз на



**Рис. 4.** Зависимости скорости переноса в органическую фазу (а) и времени достижения максимального значения термолинзового сигнала (б) трис-(2-нитрозо-1-нафтолата) кобальта(III) от расстояния до границы раздела фаз при остановке потоков.  $c_{\text{Co}} = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $I_e = 532 \text{ нм}$ ,  $P_e = 75 \text{ мВт}$

протекание экстракции через поверхность раздела фаз *жидкость—жидкость*.

#### Зависимость положения перетяжки луча индуцирующего лазера от расстояния до границы раздела фаз

За кинетикой экстракционных процессов в двухфазных потоках в микроципе на основании опыта предыдущих исследований [19] следили в условиях полной остановки потоков обеих фаз (метод остановки потока). Определена оптимальная позиция перетяжки луча индуцирующего лазера вдоль оси  $\dot{Y}$  (по ширине канала) в микрокана-

ле для органической фазы. Положение фокуса вдоль оси  $X$  (вдоль канала) не изменяли, измерения проводили в точке перед разветвлением микроканала на два потока, водный и органический. Изменение сигнала органической фазы обусловлено переходом кобальта через границу раздела фаз и образованием комплекса кобальта(III). Скорость экстракции комплекса  $\text{Co}$  в органическую фазу оценивали по тангенсу наклона  $\alpha$  начального участка кривой развития сигнала от времени. Получена зависимость скорости экстракции от расстояния до границы раздела фаз (рис. 4, а).

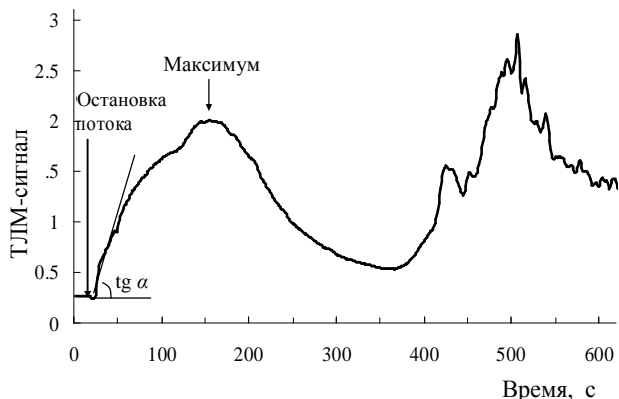
Скорость экстракции падает при удалении от границы раздела фаз и в центре микроканала (80  $\mu\text{m}$ ) выходит на постоянное значение. Отсутствие линейного падения скорости на больших расстояниях говорит о том, что термодиффузионный массоперенос (эффект Сорэ), вызванный развитием термолинзы и являющийся важным лимитирующим фактором в макровариантах термолинзовой спектроскопии [12], не вносит вклада в массоперенос в микропространстве вследствие быстрой диссипации теплоты [14, 20]. Зависимость времени выхода на максимальный сигнал от расстояния до границы раздела фаз (рис. 4, б) согласуется с данными по скорости экстракции (рис. 4, а) и подтверждает факт массопереноса исключительно за счет диффузии. Таким образом, дальнейшие измерения проводили при положении фокуса луча индуцирующего лазера в центре органической фазы на равном расстоянии от поверхности раздела фаз и границы канала.

#### Положение перетяжки луча индуцирующего лазера вдоль границы раздела фаз

Для нахождения оптимальной точки измерения вдоль оси  $X$  (вдоль канала) следили за изменением ТЛМ сигнала в зависимости от положения точки фокуса вдоль поверхности раздела фаз. Инициацию экстракционных процессов проводили с помощью остановки потоков. Скорость экстракции комплекса  $\text{Co}$  в органическую фазу также оценивали по тангенсу наклона начального участка кривой развития сигнала. Начиная с дистанции 23  $\mu\text{m}$  от точки слияния фаз наблюдали установление одинаковой скорости переноса комплекса. На основании полученных данных выбрали условия для наблюдения экстракционных процессов через границу раздела фаз *жидкость—жидкость* в микроципе. Так, за изменением сигнала следили в центре органической фазы на расстоянии в 25  $\mu\text{m}$  от места слияния каналов фаз вдоль экстракционного канала микроципа.

#### Инициирование экстракции: остановка потока или без остановки?

Характер кривых развития сигнала в случае



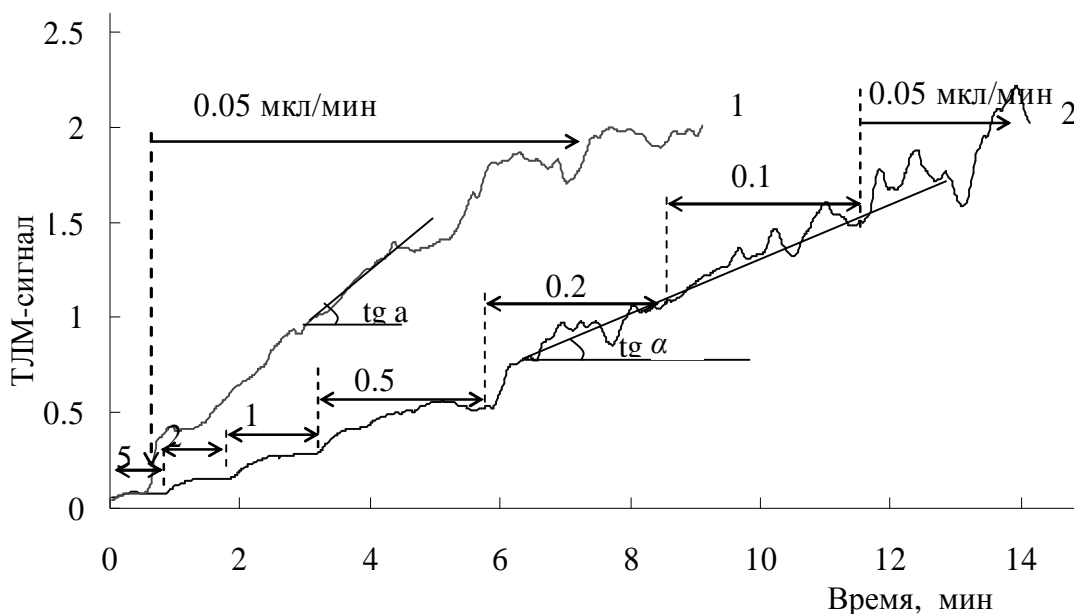
**Рис. 5.** Полная кривая поведения термолинзового сигнала при экстракции трис-(2-нитрозо-1-нафтолата) кобальта(III) в органическую фазу при остановке потоков.  $c_{Co} = 2 \times 10^{-6}$  М,  $I_e = 532$  нм,  $P_e = 75$  мВт

полной остановки потоков фаз носит колебательный характер (рис. 5). Предполагается, что такое поведение сигнала вызвано резкой остановкой потоков и возникновением локальных областей сжатий и растяжений на границе раздела фаз в микро-

канале, что влияет как на перенос вещества через границу, так и на диффузию вещества в органической фазе.

Поскольку это должно оказывать принципиально отрицательное влияние на характеристики проточной экстракции, предложено использовать снижение скорости органической фазы без изменения скорости водной.

Первый вариант проведения экспериментов заключался в том, что скорость водной фазы выдерживали, равной 6 мкл/мин, а скорость органической фазы изменяли ступенчато по схеме  $5 \rightarrow 2 \rightarrow 1 \rightarrow 0.5 \rightarrow 0.2 \rightarrow 0.1 \rightarrow 0.05 \rightarrow 0$  мкл/мин. Временной интервал между переходом от большей скорости к меньшей составил 1 мин для начальных скоростей (до 0.2 мкл/мин), затем время снижения скорости контролировали в зависимости от выхода сигнала на плато. Общее время измерений составило 15 мин (до полной остановки) и 20 мин (с остановкой потока). Ровная поверхность раздела фаз *жидкость—жидкость* на границе изменения профиля в канале микроципа формировалась при скорости толуола 0.1 мкл/мин. Найдено, что в интервале изменений скоростей потока толуола  $5-0.05$  мкл/мин сигнал растет ступенчато, с выходом на плато для каждой скорости (рис. 6, кривая 2), однако удовлетворительная воспроизводимость не была достигнута.



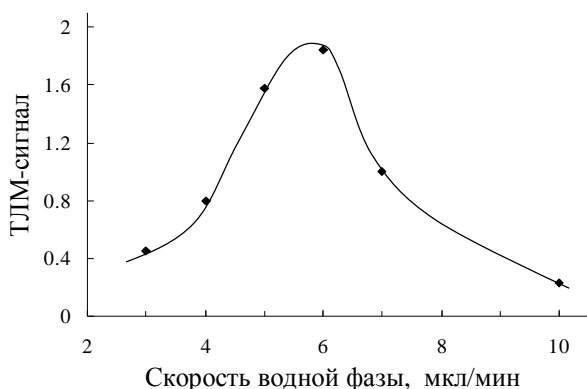
**Рис. 6.** Кривые развития термолинзового сигнала при экстракции трис-(2-нитрозо-1-нафтолата) кобальта(III) в органическую фазу при резком (1) и ступенчатом (2) изменении скорости органической фазы при сохранении скорости потока водной фазы.  $V_{\text{вод}} = 6$  мкл/мин,  $V_{\text{толуол, нач}} = 5$  мкл/мин,  $c_{Co} = 2 \times 10^{-6}$  М. ТЛМ:  $I_e = 532$  нм,  $P_e = 75$  мВт



В результате предложено выполнить снижение скорости органической фазы без изменения скорости водной другим путем: скорость органической фазы снижали не постепенно и ступенчато, а резко до минимальных (но ненулевых) значений. Измерения такого типа выполняли при скорости водной фазы 6 мкл/мин, скорость органической изменяли резко от 5 мкл/мин до 0.05 мкл/мин и следили за изменением сигнала. В данных условиях сигнал растет с линейной скоростью, затем выходит на плато. Общее время достижения равновесия составило 6 мин (рис. 6, кривая 1). В этом случае, помимо снижения времени измерений, достигалась и большая стабильность поверхности раздела и воспроизводимость измерений. Далее все описанные эксперименты проведены в условиях инициации экстракции при помощи описанного способа.

#### Влияние скорости потока водной фазы на экстракционные процессы в микроканале

Изучили эффект скорости водной фазы на комплексообразование и диффузию комплекса вглубь органической фазы. Скорость органической фазы резко изменяли по постоянной программе от 5 мкл/мин до 0.05 мкл/мин и следили за протекающим процессом с момента снижения скорости. Зависимость плато термолинзового сигнала от скорости водной фазы представлена на рис. 7. Видно, что значительный рост сигнала наблюдается при скоростях водной фазы 5–6 мкл/мин, максимальная степень извлечения соответствует скорости 6 мкл/мин. Такой характер кривой можно объяснить тем, что на сигнал влияют два фактора: степень извлечения в экстракционных процессах и абсолютное концентрирование. Эффективность



**Рис. 7.** Зависимость плато термолинзового сигнала для трис-(2-нитрозо-1-нафтолата) кобальта(III) от скорости водной фазы.

$V_{\text{толуол, нач}} = 5$  мкл/мин;  $V_{\text{толуол, кон}} = 0.05$  мкл/мин;  
 $c_{\text{Co}} = 1 \times 10^{-6}$  М;  $I_e = 532$  нм;  $P_e = 75$  мВт

экстракции определяется временем контакта фаз, за которое успевают произойти реакция комплексообразования на границе раздела фаз, поскольку ионы кобальта находятся в водной фазе, а реагент — в органической, и затем экстракция продукта с поверхности вглубь органической фазы. Таким образом, снижение скорости водной фазы приводит к увеличению времени контакта фаз и увеличению степени извлечения. Абсолютное концентрирование в микрочипе определяется соотношением объемных скоростей потоков органической и водной фаз, которое в макропространстве соответствует соотношению объемов воды и органики в делительной воронке. Таким образом, увеличение разницы между скоростями приводит к росту сигнала за счет концентрирования, но только до тех пор, пока степень извлечения остается высокой.

При выбранной скорости водной фазы 6 мкл/мин варьировали скорость органической фазы — как начальную (высокую), так и конечную, соответствующую процессу инициации экстракционных процессов. Найдено, что начальная скорость органической фазы почти не влияет на конечный сигнал (плато), но определяет сигнал фона (сигнал при  $t = 0$  мин). Так, при уменьшении начальной скорости органической фазы с 5 до 1 мкл/мин начальный сигнал растет вдвое. Высокий фон объясняется уже начавшимися процессами экстракции и присутствием продукта в органической фазе. Скорость в 5 мкл/мин не позволяет экстракционным процессам набрать силу и обеспечивает исходные условия, при которых стартовый сигнал соответствует сигналу фона в отсутствие кобальта.

При снижении конечной скорости органической фазы от 0.2 до 0.05 мкл/мин (скорость водной фазы 6 мкл/мин, начальная скорость органической — 5 мкл/мин) наблюдали рост термолинзового сигнала. При скорости 0.2 мкл/мин поверхность раздела фаз неустойчива (уходит с границы изменения профиля канала в водную фазу). Достижение максимального значения сигнала происходит при скорости органической фазы 0.05 мкл/мин. Дальнейшее уменьшение скорости приводит к уменьшению отклика.

#### Метрологические характеристики экстракционного определения кобальта

В найденных оптимальных условиях (позиция фокуса луча лазера в центре органической фазы в 25 мм от слияния воды и толуола; скорости водной и органической фаз — 6 и 5 (0.05) мкл/мин соответственно) провели изучение кинетики экстракции трис-(2-нитрозо-1-нафтолата) кобальта(III) в микрочипе в зависимости от содержания кобальта в водной фазе. Изучение процессов экс-

тракции и комплексообразования проводили в условиях, когда ион металла (кобальта) находится в водной фазе, а лиганд (2-нитрозо-1-нафтол) — в органической. Следили за процессами образования комплекса на границе поверхности раздела фаз и диффузии его вглубь органической фазы посредством измерения термолинзового сигнала органической фазы в центре узкой части канала, полагая, что скорость комплексообразования гораздо больше скорости перехода металла через поверхность раздела фаз [21]. Доля кобальта, перешедшего в органическую фазу, незначимо зависит от количества кобальта в водной фазе, т. е. массоперенос кобальта через границу раздела фаз идет с постоянной скоростью. Абсолютное концентрирование кобальта составило 120. Градуировочная зависимость, построенная на основании результатов экстракции кобальта в потоке (плато сигнала), описывается уравнением

$$\text{tga} = (6.01 \pm 0.05) \cdot 106 \cdot c - (0.220 \pm 0.006),$$

$$n = 6, P = 0.95, r = 0.998,$$

где  $c$  — молярная концентрация кобальта в водной фазе. Предел обнаружения  $3 \times 10^{-8}$  М. График линейен в диапазоне концентраций кобальта  $2.0 \times 10^{-7}$ – $8.0 \times 10^{-6}$  М. Относительное стандартное отклонение измерений в этом диапазоне не превышает 0.03 ( $n = 6$ ). Таким образом, предел обнаружения кобальта в условиях проведения проточной экстракции только незначительно выше, чем предел обнаружения кобальта в виде предварительно синтезированного комплекса (т. е. без пробоподготовки) в статических условиях.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракция в системе *жидкость—жидкость* с термолинзовым детектированием на микрофлюидном чипе со сложной формой сечения канала и модификацией части поверхности гидрофобными группами (октадецилсилан) и определение кобальта на уровне малых содержаний выполнена впервые. Для инициации процессов переноса вещества через границу раздела фаз предложено использовать прием резкого снижения скорости потока органической фазы (начальная скорость органической фазы 5 мкл/мин) до малой ненулевой скорости при постоянной скорости водной фазы, который приводит к лучшим параметрам определения по сравнению с известным приемом остановки потока. Определен диапазон стабильности поверхности раздела фаз при различных скоростях водной и органической фаз и найдены оптимальные скорости обеих фаз, необходимые для инициации экстракции при помощи предложенного приема снижения скорости (6 и 0.05 мкл/мин для системы *вода—толуол*). Полученные результаты

для микропотока могут найти применение при разработке интегрированных систем анализа, включающих стадию экстракционного концентрирования и разделения, например пестицидов [22, 23].

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Manz A., Harrison D.J., Verpoorte E.M.J., et al. Planar Chips Technology for Miniaturization and Integration of Separation Techniques into Monitoring Systems – Capillary Electrophoresis on a Chip // *J. Chromatogr.* 1992. V. 593. P. 253–258.
2. Tokeshi M., Minagawa T., Uchiyama K., et al. Continuous-Flow Chemical Processing on a Microchip by Combining Microunit Operations and a Multiphase Flow Network // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 1565–1571.
3. Shinohara K., Sugii Y., Aota A., et al. High-Speed Micro-PIV Measurements of Transient Flow in Microfluidic Devices // *Meas. Sci. Technol.* 2004. V. 15. P. 1965–1970.
4. Kikutani Y., Hisamoto H., Tokeshi M., Kitamori T. Micro Wet Analysis System Using Multi-Phase Laminar Flows in Three-Dimensional Microchannel Network // *Lab. Chip.* 2004. V. 4. P. 328–332.
5. Ueno K., Kim H.B., Kitamura N. Channel Shape Effects on the Solution-Flow Characteristics and the Liquid/Liquid Extraction Efficiency in Polymer Microchannel Chips // *Anal. Sci.* 2003. V. 19. P. 391–394.
6. Kim H.B., Ueno K., Chiba M., et al. Spatially-Resolved Fluorescence Spectroscopic Study on Liquid/Liquid Extraction Processes in Polymer Microchannels // *Anal. Sci.* 2000. V. 16. P. 871–876.
7. Watarai H., Teramae N., Sawada T. *Interfacial Nanochemistry*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. 321 p.
8. Tsukahara S. Recent Analytical Methodologies on Equilibrium, Kinetics, and Dynamics at Liquid/Liquid Interface // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 556. P. 16–25.
9. Yui H., Ikezoe Y., Sawada T. Dynamic Behaviors of Molecular Assemblies at Liquid/Liquid Interfaces Studied by Time-Resolved Quasi-Elastic Laser Scattering Spectroscopy // *Anal. Sci.* 2004. V. 20. P. 1501–1507.
10. Watarai H., Tsukahara S., Nagatani H., Ohashi A. *Interfacial Nanochemistry in Liquid-Liquid Extraction Systems* // *B. Chem. Soc. Jpn.* 2003. V. 76. P. 1471–1492.
11. Kitamori T., Tokeshi M., Hibara A., Sato K. Thermal Lens Microscopy and Microchip Chemistry // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 52a–60a.

12. Смирнова А.П., Шимко Р.Ю., Проскурнин М.А. Исследование процессов в двухфазных системах при помощи термолинзовой спектроскопии на примере трис-(2-нитрозо-1-нафтолата) кобальта (III) // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 2004. V. 43. P. 168–173.
  13. Proskurnin M.A., Slyadnev M.N., Tokeshi M., Kitamori T. Optimisation of Thermal Lens Microscopic Measurements in a Microchip // Anal. Chim. Acta. 2003. V. 480. P. 79–95.
  14. Bialkowski S.E. Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis. New York: A Wiley-Interscience publication, 1996. 584 p.
  15. Uchiyama K., Hibara A., Kimura H., et al. Thermal Lens Microscope // Jpn. J. Appl. Phys. 1. 2000. V. 39. P. 5316–5322.
  16. Shen J., Snook R.D. A Radial Finite-Model of Thermal Lens Spectrometry and the Influence of Sample Radius Upon the Validity of the Radial Infinite-Model // J. Appl. Phys. 1993. V. 73. P. 5286–5288.
  17. Hibara A., Iwayama S., Matsuoka S., et al. Surface Modification Method of Microchannels for Gas-Liquid Two-Phase Flow in Microchips // Anal. Chem. 2005. V. 77. P. 943–947.
  18. Tokeshi M., Minagawa T., Kitamori T. Integration of a Microextraction System on a Glass Chip: Ion-Pair Solvent Extraction of Fe(II) with 4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolinedisulfonic acid and tri-n-octylmethylammonium chloride // Anal. Chem. 2000. V. 72. P. 1711–1714.
  19. Tokeshi M., Minagawa T., Kitamori T. Integration of a Microextraction System – Solvent Extraction of a Co-2-nitroso-5-dimethylaminophenol Complex on a Microchip // Journal of Chromatography A. 2000. V. 894. P. 19–23.
  20. Arnaud N., Georges J. On the Analytical Use of the Soret-Enhanced Thermal Lens Signal in Aqueous Solutions // Anal. Chim. Acta. 2001. V. 445. P. 239–244.
  21. Марченко З. Фотометрическое определение элементов. М.: Мир, 1971. 502 с.
  22. Smirnova A., Mawatari K., Hibara A., et al. Micro-Multiphase Laminar Flows for the Extraction and Detection of Carbaryl Derivative // Anal. Chim. Acta. 2006. V. 558. P. 69–74.
  23. Smirnova A., Shimura K., Hibara A., et al. Application of a Micro Multiphase Laminar Flow on a Microchip for Extraction and Determination of Derivatized Carbamate Pesticides // Anal. Sci. 2007. V. 23. P. 103–108.
- Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет (Смирнова А.П., Проскурнин М.А.)*
- Японское агентство по науке и технологии (JST), Хончо, Кавагути, Саитама, Япония (Смирнова А.П., Китамори Т.)*
- Факультет прикладной химии, Отделение технических наук, Токийский университет, Япония (Маватари К., Хибара А., Китамори Т.)*
- Материал поступил в редакцию 6.06.2007.

## STUDY OF FLOW EXTRACTION BY THERMAL-LENS MICROSCOPY IN MICROFLUIDIC CHIPS USING COBALT(III) TRIS-(2-NITROSO-1-NAPHTHOLATE)

A. P. Smirnova<sup>1,2</sup>, M. A. Proskurnin<sup>1</sup>, K. Mawatari<sup>3</sup>, A. Hibara<sup>3</sup>, T. Kitamori<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University

<sup>2</sup> Japan Science and Technology Agency (JST), Honcho, Kawaguchi, Saitama, Japan

<sup>3</sup> Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, Japan

The flow extraction of complex of Co with 2-nitroso-1-naphthol on the liquid–liquid interface of a water-toluene two-phase flow with thermal-lens detection was studied on a microchip with a complex-shape microchannel partially modified with ODS. The controllable range of flow rates of aqueous and organic phases for establishing a stable liquid–liquid interface and the optimum flow rates for carrying out the extraction processes (6 and 0.05  $\mu\text{l}/\text{min}$ , respectively), were determined as well as optimum detection position in a microchannel. The method of the abruptly dropping flow rate of the organic phase (in initial flow rate of 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) to the optimum with a constant flow rate of aqueous phase was proposed in order to initiate the extraction processes through the liquid–liquid interface which resulted in the reduction of time of analysis and increase of the sensitivity and reproducibility of determination. The calibration for complex of Co showed good linearity in the range of concentrations of  $2.0 \times 10^{-7}$ – $8.0 \times 10^{-6}$  M with a limit of detection of  $3 \times 10^{-8}$  M and the standard deviation in this range of no higher than 0.03.