

На правах рукописи



БЕЛОУСОВ Кирилл Ильич

МОДЕЛИРОВАНИЕ КОНВЕКТИВНО-ДИФФУЗИОННОГО
МАССОПЕРЕНОСА ВЕЩЕСТВ ПРИ ВЫБОРЕ КОНСТРУКЦИЙ И
РЕЖИМОВ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВ

Специальность:

01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Санкт-Петербургском национальном исследовательском университете информационных технологий, механики и оптики (Университет ИТМО)

Научный руководитель:

доктор технических наук, старший научный сотрудник, заместитель директора по научной работе Института аналитического приборостроения Российской академии наук

Евстрапов
Анатолий
Александрович

Официальные оппоненты:

доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой оптимизации химической и биотехнологической аппаратуры Санкт-Петербургского государственного технологического института (технический университет)

Абиев
Руфат
Шовкетович

кандидат технических наук, доцент кафедры вакуумной и компрессорной техники Московского государственного технического университета имени Н.Э. Баумана

Белова
Ольга
Владимировна

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Высшая школа прикладной математики и вычислительной физики

Защита состоится 23 декабря 2019 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета Д002.034.01 на базе ИАП РАН по адресу: 198095, г. Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31-33, лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайте www.iairas.ru и www.iai.rssi.ru. Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 190103, г. Санкт-Петербург, Рижский пр., д. 26, ИАП РАН, а/я 207.

Автореферат разослан

«__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук



А.Л. Буляница

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Востребованными методами анализа жидких биологических проб являются методы с использованием электрофоретического разделения и аналитических реакций (химических, биохимических, ферментативных) на микрофлюидной платформе. Расчет конфигураций и выбор режима работы микрофлюидных устройств в подавляющем большинстве случаев опирается на результаты моделирования процессов, реализуемых на этих устройствах. Здесь весьма полезными оказываются численные методы моделирования, например метод конечных элементов для решения дифференциальных уравнений в частных производных.

Повысить качество анализа при электрофоретическом разделении пробы на компоненты позволяет уменьшение дисперсии пробки пробы при её электрокинетическом вводе в сепарационный канал. Особый интерес представляет изучение влияния на величину дисперсии управляющих потенциалов. Использование при этом 2D-моделей, не требующих значительных вычислительных ресурсов, позволяет оперативно оценивать распределение концентрации пробы вдоль и поперек каналов.

При проведении аналитических реакций необходимо обеспечить воспроизводимое и эффективное перемешивание её компонентов. Поскольку в микрофлюидике преобладают ламинарные течения, то создание условий для быстрого перемешивания компонентов является достаточно сложной задачей, хотя и существует множество подходов к ее решению, использующих пассивные и активные способы смешивания. При этом отсутствуют адекватные оценки эффективности процесса пассивного перемешивания в микрофлюидном чипе с изогнутыми каналами при растворении вещества с поверхности, а также модели механического перемешивания в замкнутой камере, которые бы позволили определить его эффективные режимы.

Для решения ряда прикладных задач при анализе или синтезе веществ требуется осуществлять перемешивание компонентов внутри замкнутых пиколитровых объемов капель. Таким образом, востребованным является изучение процесса вихреобразования в области формирования капель в различных конструкциях генераторов с фокусировкой потоков и определение режимов наилучшего перемешивания. При этом применимость различных подходов к моделированию течения несмешиваемых фаз для изучения перемешивания в микрофлюидике исследована недостаточно.

Из-за нелинейности основных уравнений гидродинамики, сложных геометрий и многофакторного характера процессов в микрофлюидных чипах построение адекватных аналитических решений затруднено, поэтому основным инструментом анализа эффективности конфигураций устройств является численное моделирование. Как в случае электрофоретического разделения, так и при проведении аналитической реакции распределение вещества описывается непрерывным полем концентрации, а его массоперенос носит конвективно-диффузионный характер. При проведении численного моделирования важно не только правильно определить используемые уравнения, но и грамотно выбрать параметры для их решения, обеспечивающие требуемую сходимость и точность результата при приемлемом быстродействии.

В связи с вышеизложенным, актуальными являются разработка моделей и численное моделирование конвективно-диффузионного массопереноса веществ в различных конструкциях микрофлюидных устройств, предназначенных для анализа жидких проб методами электрофореза или с использованием аналитических реакций, с целью выбора конфигураций и режимов, обеспечивающих заданную точность и воспроизводимость анализа.

Цель и задачи

Целью работы являлась разработка физических моделей и численное моделирование конвективно-диффузионного массопереноса веществ (фрагментов ДНК/РНК, растворенных реагентов) в устройствах: а) электрофоретического разделения пробы с универсальной геометрией инжектора; б) ферментативного анализа с иммобилизованными в чипе реагентами; в) формирования макроэмульсий в генераторах с фокусировкой потока — для обоснования конструкций микрофлюидных чипов и режимов проведения анализа, обеспечивающих его заданную точность и воспроизводимость.

Для достижения данной цели решались следующие задачи:

1) Обоснование уравнений, граничных и начальных условий, адекватно описывающих рассматриваемые физические процессы с учетом принятых упрощений и допущений, определение параметров их численного решения, обеспечивающих приемлемую точность результатов моделирования.

2) Применение численного моделирования для решения задач:

а) оценки дисперсии пробки пробы при различных вариантах электрокинетического ввода на микрофлюидном чипе и выбора условий его проведения;

б) исследования эффективности пассивного и активного механического перемешивания реагентов в конструктивных элементах микрофлюидного чипа, а также определения условий её повышения;

в) оценки влияния расположения каналов и расходов фаз на перемешивание реагентов на этапе формирования капель в микрофлюидном устройстве с фокусировкой потока и нахождения условий, обеспечивающих необходимое качество перемешивания.

Научная новизна

1) впервые предложено заменить в числе Куранта и сеточном числе Пекле размер элемента сетки на среднее квадратичное отклонение, характеризующее ширину переходной области концентрации, что позволило при решении конвективно-диффузионных задач определить шаг времени метода конечных элементов, который обеспечивает уменьшение значения ошибки, связанной с нефизическими осцилляциями значений, при наименьших затратах расчетных ресурсов;

2) впервые оценена величина дисперсии пробки пробы с использованием двумерной модели электрокинетического ввода аналита в микрофлюидный чип для электрофоретического разделения, дополнительно учитывающей эффект поперечного массопереноса в каналах, при различных схемах загрузки (простой крест, Z- и П-ввод). Определены размеры каналов и величины управляющих потенциалов, позволяющие уменьшить дисперсию и улучшить разрешение разделения компонентов пробы;

3) впервые для исследования процесса активного механического перемешивания в замкнутой реакционной камере микрофлюидного чипа объемом порядка двадцати микролитров применена численная модель, основанная на произвольном Лагранж-Эйлеровом методе, которая позволила определить условия (частоту воздействия и амплитуду колебаний расхода жидкости) эффективного перемешивания реагентов, необходимые для обеспечения воспроизводимых результатов ферментативного анализа;

4) предложена оригинальная процедура нахождения параметра мобильности метода фазового поля, обеспечивающего заданную точность расчета профиля скоростей и смещения границы раздела фаз. Процедура основана на оценке и сравнении скоростей на границе фаз с данными, вычисленными методом с явным выделением границы, и не требует проведения дополнительных натуральных экспериментальных исследований;

5) впервые оценено влияние геометрии каналов и расходов потоков дисперсной и непрерывной фаз на эффективность перемешивания растворенных реагентов на стадии формирования капель пиколитровых объемов в асимметричных конструкциях микрофлюидных генераторов при режимах, соответствующих числам Рейнольдса порядка 0,5. Это позволяет выбрать условия формирования капель, обеспечивающие качественное перемешивание.

Практическая значимость определяется:

1) установленными с помощью численного моделирования режимами эффективного управления стадиями анализа и инженерными расчетами конфигураций микрофлюидных чипов:

а) для электрофоретического разделения пробы;

б) для ферментативного анализа с пассивным перемешиванием реагентов в изогнутом канале и активным механическим перемешиванием в замкнутой камере;

в) для перемешивания реагентов на этапе генерации капель пиколитровых объемов;

2) разработанной процедурой выбора параметра мобильности фазового поля, которая позволяет уменьшить время моделирования двухфазных потоков, повысить точность получаемых результатов и не требует проведения дополнительных натуральных экспериментальных исследований.

Положения, выносимые на защиту

1) замена в числе Куранта и сеточном числе Пекле размера элемента сетки на среднее квадратичное отклонение, характеризующее ширину переходной области концентрации, позволяет при решении конвективно-диффузионных задач определить шаг времени метода конечных элементов, который обеспечивает уменьшение ошибки, связанной с нефизическими осцилляциями значений, при наименьших затратах расчетных ресурсов;

2) уменьшение величины дисперсии пробки жидкой пробы при её загрузке под действием электрического поля в микрофлюидном чипе для электрофоретического разделения её компонентов достигается использованием схемы простой крест, уменьшением ширины каналов и двухстадийным регулированием запирающих потенциалов: их повышением относительно потенциала в месте пересечения каналов при загрузке пробы в инжектор и понижением при её вводе в сепарационный канал;

3) активное механическое перемешивание с использованием режима импульсных колебаний жидкости с равномерным возрастанием частоты в течение 3 секунд с 1 до 10 Гц и амплитудой расхода 2 мкл позволяет достичь равномерного распределения концентрации компонентов реакции (коэффициент вариации 0,03) в замкнутой восьмиугольной реакционной камере микрофлюидного чипа объемом 20 мкл;

4) расчет профиля скоростей жидкостей в двухфазной системе с заданной точностью обеспечивается выбором параметра мобильности метода фазового поля по разработанной процедуре, не требующей дополнительных экспериментальных исследований и основанной на оценке и сравнении скоростей на границе фаз с данными, вычисленными методом с явным выделением границы;

5) эффективное перемешивание реагентов на этапе формирования капель пиколитровых объемов в микрофлюидных устройствах достигается за счет использования асимметричных геометрий генераторов с фокусировкой потоков в системе пересекающихся каналов, при этом основное влияние на качество перемешивания оказывают отношение величин потоков дисперсной и непрерывной фаз и расстояние между точками присоединения боковых каналов к центральному вдоль его оси.

Личный вклад автора

заключается в постановке проблематики исследования, определении базовых физических и математических моделей, допустимых упрощений, области расчетов, уравнений, граничных и начальных условий, параметров численного решения для проведения моделирования методом конечных элементов в пакете программ COMSOL Multiphysics процессов электрокинетического ввода пробы, пассивного и активного перемешивания в однофазных и двухфазных системах и выборе на его основе конструкций микрофлюидных устройств и режимов анализа, обеспечивающих заданную точность и воспроизводимость. Экспериментальные данные, использованные для проверки адекватности моделирования, предоставлены сотрудниками Института аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербургского национального исследовательского Академического университета Российской академии наук, Сибирского федерального университета. В работах, опубликованных в соавторстве, автору принадлежат результаты, связанные с проведенным моделированием, его вклад сопоставим со вкладом других соавторов.

Достоверность научных результатов

обеспечивается корректностью постановки задач исследования, получением устойчивых решений при моделировании, сходящихся с уменьшением размера элементов расчетной сетки, соответствием расчетных и экспериментальных данных. Полученные результаты воспроизводимы и соответствуют признанным теоретическим положениям. Они были представлены на международных и всероссийских конференциях, а также опубликованы в журналах (ВАК, Scopus), пройдя обязательное рецензирование.

Апробация работы

Основные результаты докладывались и обсуждались на следующих конференциях: I, VI и VII Всероссийский конгресс молодых ученых (Санкт-

Петербург, 2012, 2017, 2018); Международная научно-техническая конференция «Энергосберегающие процессы и оборудование, моделирование и оптимизация процессов, прикладная механика неоднородных сред» ЭПОМО-2014 (Санкт-Петербург, 2014); III Международная научная Интернет-конференция «Математическое и компьютерное моделирование в биологии и химии» (Казань, 2014); 15th European Conference on Mixing (Санкт-Петербург, 2015); Междисциплинарный научный форум «Новые материалы. Дни науки. Санкт-Петербург 2015» (Санкт-Петербург, 2015); XVI Всероссийская конференция молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям (Красноярск, 2015); NanoBioMed2015, (Barcelona, Spain, 2015); VI Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015); 3rd International School and Conference "Saint-Petersburg OPEN 2016" (Санкт-Петербург, 2016).

Внедрение результатов работы

Результаты диссертации использовались при выполнении работ по гранту Российского научного фонда «Аналитическая система для оперативной оценки интегральной токсичности физиологических жидкостей, природных и промышленных вод на основе микрофлюидных технологий и методов ферментативного биотестирования» (проект №15-19-10041). Также результаты внедрены в учебный процесс университета ИТМО: дисциплины «Физические основы нано- и микрогидродинамики. Применение в бионанотехнологии», «Математическое моделирование систем», «Микро- и нано-аналитические методы исследования жидких сред».

Публикации

Основные научные результаты опубликованы в 23 печатных трудах, из которых 7 входят в перечень журналов ВАК, в том числе 4 — в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы из 202 наименований. Текст диссертации изложен на 175 страницах, содержит 93 рисунка и 28 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснованы актуальность темы диссертации, ее практическое значение, сформулированы цель и задачи исследования, изложена научная новизна работы, приведены положения, выносимые на защиту.

Первая глава представляет собой аналитический обзор, в котором описаны процессы электрофоретического разделения пробы на микрофлюидном чипе и перемешивания в однофазных и двухфазных потоках в микрообъемах; их численное моделирование; изложены теоретические основы массопереноса вещества и рассмотрены численные методы решения дифференциальных уравнений в частных производных.

Среди методов исследования жидких биологических проб на микрофлюидной платформе часто используются электрофоретическое разделение компонентов пробы, проведение аналитических (химических, биохимических, ферментативных) реакций. Значительное влияние на качество электрофоретического разделения многокомпонентной смеси оказывает

величина дисперсии вводящейся пробки пробы. Обычно при оценке дисперсии используют приближенное выражение, не учитывающее её начальное размытие, вклад которого может быть значительным при малых размерах каналов, увеличивающих влияние стенок и диффузии. Варьирование управляющих потенциалов позволяет эффективно регулировать размер пробки пробы. Особый интерес представляет изучение влияния потенциалов на величину дисперсии пробки пробы, вводящейся в сепарационный канал, с целью её минимизации в различных геометриях инжектора микрофлюидного чипа. Использование при этом двумерной модели, не требующей, в отличие от трёхмерной, значительных вычислительных ресурсов, позволяет оперативно оценивать распределение концентрации пробы вдоль и поперек каналов, не влияя на точность результатов, поскольку зависимые переменные в процессе электрофореза не имеют значительных градиентов по третьей, вертикальной оси.

Для проведения воспроизводимой аналитической реакции важно обеспечить качественное перемешивание реагентов. Среди различных подходов для ускорения перемешивания следует выделить применение специальных конфигураций чипов, например с серпантинными каналами, и активных средств для механического перемешивания, например акустических, не влияющих на активность ферментов. При этом отсутствуют оценки эффективности процесса пассивного перемешивания в изогнутых каналах микрофлюидного чипа при растворении вещества с поверхности, а также модели механического перемешивания в замкнутой камере, которые бы позволили определить оптимальные режимы. В условиях иммобилизации реагентов в камере чипа для выбора времени начала перемешивания необходимо знать динамику их выхода из матрицы. Существующие модели выхода узкоспециализированы, и в рамках работы потребовалось провести подробное исследование процесса с целью создания микрофлюидного устройства для биолюминисцентного ферментативного анализа воды.

Другим направлением организации аналитических реакций является их проведение внутри капель макроэмульсий объемом от нано- до фемтолитров. Преимуществом такого подхода является ускорение перемешивания за счет малых размеров и создания вихревых потоков в замкнутом объеме. Востребованным является изучение процесса вихреобразования в области формирования капель в различных конструкциях генераторов с фокусировкой потоков для ускорения перемешивания.

Вследствие нелинейности уравнений (в частности, Навье-Стокса), используемых для описания процессов в микрофлюидных устройствах, их решение преимущественно проводится численными методами. При этом важной составляющей получения точного результата за разумное время является грамотный выбор схемы и шага дискретизации по пространству и времени. Преимуществом метода конечных элементов при решении дифференциальных уравнений в частных производных является возможность работы со сложными геометриями и локального повышения точности расчетов.

Как в случае электрофоретического анализа, так и при проведении биохимической реакции распределение вещества описывается непрерывным полем концентрации, а его массоперенос носит конвективно-диффузионный характер. Основными подходами к моделированию течения несмешиваемых фаз являются явное выделение границы, использование уравнений массопереноса, энергетической формулировки, которые, в частности, реализованы

соответственно в методе конечных элементов с подвижной сеткой, функции уровня и фазового поля. При этом применимость этих методов для изучения перемешивания в микрофлюидике исследована недостаточно.

В заключительной части первой главы сформулированы цель и задачи исследования, а также определены пути их решения.

Вторая глава посвящена численному моделированию электрокинетического ввода пробы для её последующего разделения методом электрофореза на микрофлюидном чипе и вопросам точности решения конвективно-диффузионных задач.

В первой части проведено изучение влияния линейных и квадратичных базисных функций, стандартного и стабилизированного метода Галёркина, размера расчетной сетки Δx и шага времени Δt на точность решения конвективно-диффузионных задач с сонаправленным или поперечным диффузионным потоком для значений сеточного числа Пекле Pe_c от 1 до 50.

Основными числами, характеризующими устойчивость численного решения, являются число Куранта C и сеточное число Пекле Pe_c :

$$C = \frac{U \Delta t}{\Delta x}, \quad (1)$$

$$Pe_c = \frac{U \Delta x}{2D}, \quad (2)$$

где U — конвективная скорость, м/с; Δt — шаг дискретизации по времени, с; Δx — размер элемента сетки, м; D — диффузионный коэффициент, м²/с.

Исследование продольной диффузии проводилось на примере движения вещества с гауссовым профилем концентрации. Точность решения определялась по ошибкам осцилляций e_{osc} и определения высоты пика e_{max} (рисунок 1). В первом случае допустимым считалась относительная амплитуда осцилляций в 0,01%, во втором — отклонение в 1%.

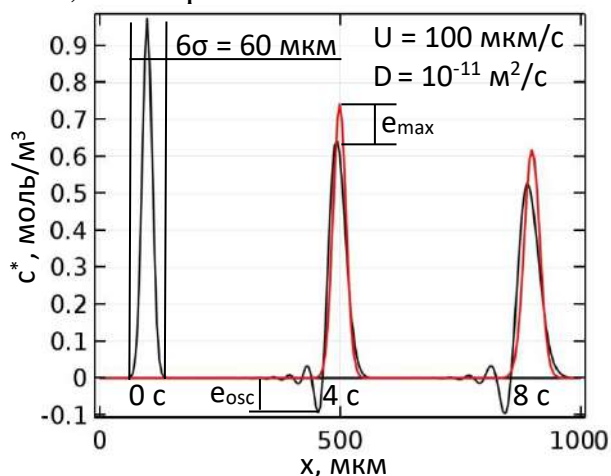


Рисунок 1 — Профили концентрации c^* в моменты времени 0, 4 и 8 с, полученные при численном моделировании с использованием стандартного метода Галёркина с линейными базисными функциями, размере элемента сетки $\Delta x = 10$ мкм, шаге времени $\Delta t = 0,04$ с (черный), и аналитическое решение (красный)

Зависимость от числа Куранта ошибки e_{osc} при использовании линейных базисных функций и стандартного метода Галеркина имеет сигмовидный характер (рисунок 2).

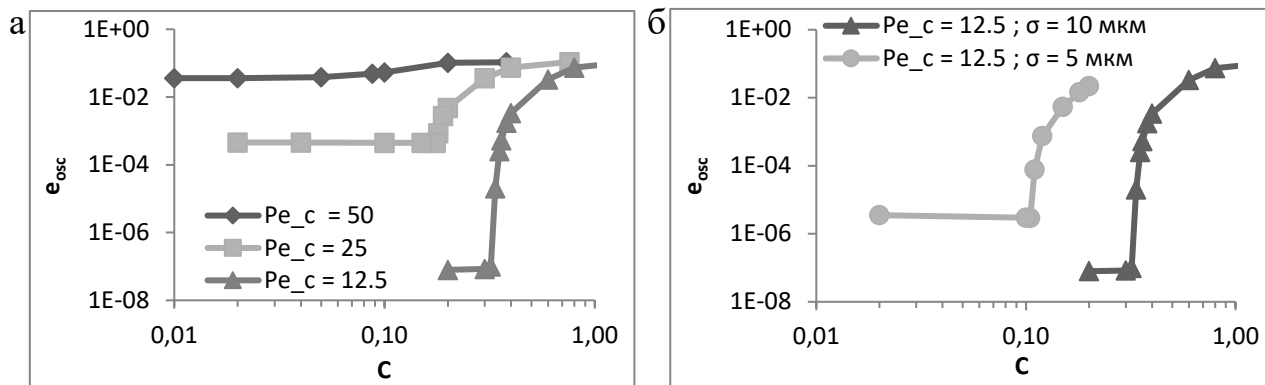


Рисунок 2 — Зависимость от числа Куранта C ошибки осцилляций e_{osc} , полученной при использовании линейных базисных функций и стандартного метода Галеркина: а) для разных сеточных чисел Пекле Pe_c ; б) для разных ширин пика концентрации

Таким образом, для обеспечения наиболее быстрого расчета с наименьшими осцилляциями необходимо выбрать шаг времени Δt непосредственно перед началом роста ошибки e_{osc} . Поскольку это значение зависит от шага сетки Δx и ширины пика, было предложено заменить в определениях числа Куранта C и сеточного числа Пекле Pe_c размер сетки Δx на среднее квадратичное отклонение σ , характеризующее ширину переходной области концентрации, что привело к сближению графиков (рисунок 3). Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что рекомендуемым шагом времени Δt является тот, который обеспечивает значения модифицированного числа Куранта C_σ в районе 0,07–0,1.

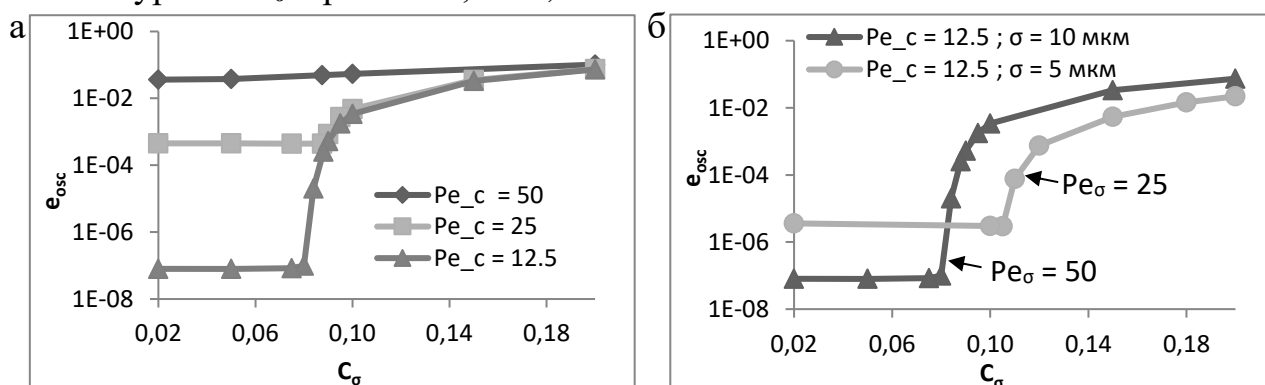


Рисунок 3 — Зависимость от модифицированного числа Куранта C_σ ошибки осцилляций e_{osc} , полученной при использовании линейных базисных функций и стандартного метода Галеркина: а) для разных сеточных чисел Пекле Pe_c ; б) для разных ширин пика концентрации и модифицированных сеточных чисел Пекле Pe_σ

Рекомендуемым размером сетки будет тот, при котором значение ошибки e_{osc} , обеспеченное выбором шага времени, равно пороговому качеству 10^{-4} . Данный размер можно определить по рисунку 4.

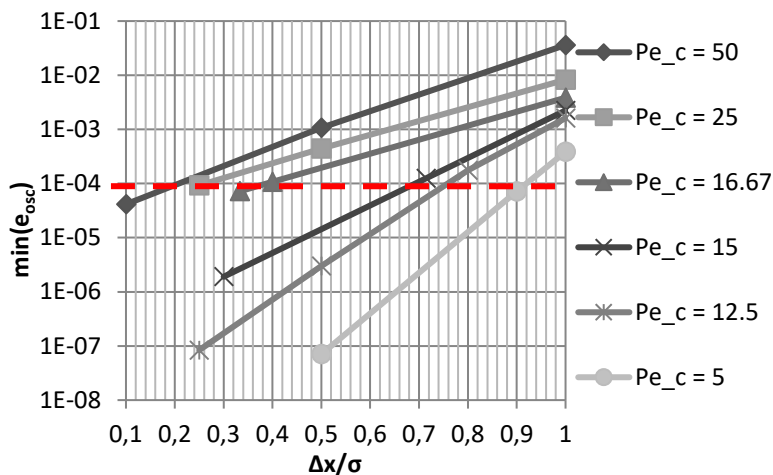


Рисунок 4 — Наименьшая ошибка осцилляций e_{osc} в зависимости от отношения $\Delta x/\sigma$ при постоянных числах Pe_c для линейных базисных функций и стандартного метода Галеркина. Пунктирная линия соответствует границе допустимых значений e_{osc}

Ошибки определения высоты пика e_{max} при рассматриваемых выше условиях связаны с осцилляциями, и при достижении e_{osc} уровня в сотые процента e_{max} приближается к проценту. Стабилизированные методы дискретизации в данном диапазоне сеточных чисел Пекле Pe_c хуже чем стандартный Галеркина, так как, хотя они убирают осцилляции, они усиливают ошибку e_{max} , добавляя искусственную диффузию. Квадратичные базисные функции лучше линейных, так как при затрате тех же ресурсов получают сопоставимые ошибки e_{osc} , но точнее определяется высота пика (ошибка e_{max} в среднем уменьшается в 2 раза).

При численном моделировании поперечной диффузии установлено, что наилучшие результаты с наименьшими затратами ресурсов также обеспечивает стандартный метод Галеркина с квадратичными базисными функциями, а количество элементов сетки на ширину переходной зоны должно быть не менее пяти, чтобы гарантировано обеспечить точность расчета профиля концентрации порядка 1%.

Во второй части представлены результаты моделирования электрокинетической загрузки фрагментов ДНК длиной 100 пар оснований, характерной для продуктов амплификации генетических маркеров, в инжектор микрофлюидного чипа и его дальнейшего ввода в сепарационный канал. Рассматривались каналы шириной от 12,5 до 50 мкм. Условия численного решения выбирались на основании выводов, сделанных в первой части главы.

Минимальная дисперсия пробки пробы ко второй секунде ввода в сепарационный канал, равная $7,8 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2$, была достигнута при использовании схемы простой крест (рисунок 5а) с шириной каналов 12,5 мкм, повышенными относительно перекрестия каналов запирающими потенциалами загрузки и пониженными при вводе пробы в сепарационный канал. Эта дисперсия в 2 раза меньше, чем при ширине каналов 50 мкм и тех же режимах потенциалов, и в 35 раз меньше, чем при той же ширине и нейтральных запирающих потенциалах относительно перекрестия. Установлено, что схемы Z- и П-ввода (рисунок 5б, в) без использования дополнительных процедур концентрирования обеспечивают большую дисперсию пробы по сравнению со схемой простой крест.

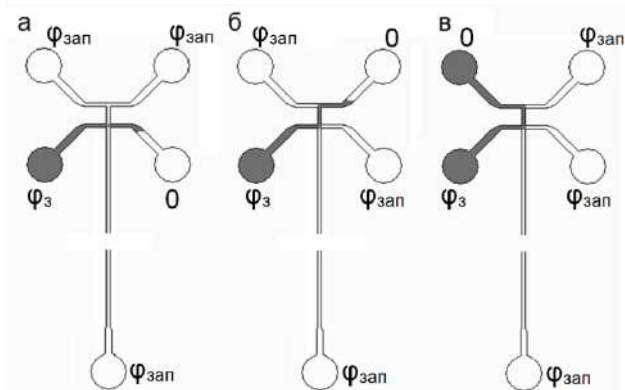


Рисунок 5 — Схемы ввода пробы: а) простой крест; б) Z-ввод; в) П-ввод. Кружками изображены резервуары для ввода пробы и буфера и их слива. φ_z — потенциалы загрузки, $\varphi_{зап}$ — запирающие потенциалы

Таким образом, уменьшение дисперсии пробки аналита достигается использованием схемы ввода простой крест, малой шириной каналов и двухстадийным режимом управления запирающих потенциалов: повышенными относительно потенциала перекрестия каналов при загрузке пробы в инжектор и пониженными при вводе в сепарационный канал.

Для проверки адекватности моделирования были проведены электрокинетические загрузки и ввод пробы флуоресцеина. Оценка коэффициента корреляции между распределениями интенсивности люминесценции, полученными экспериментально с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leika TCS-SL, и расчетными данными по распределению концентрации показала его высокие значения (0,83–0,97), что свидетельствует об адекватности модели.

В заключительной части второй главы проводится обсуждение результатов проведенных исследований.

Третья глава посвящена численному моделированию перемешивания иммобилизованных реагентов на микрофлюидном чипе для биолуминесцентного ферментативного анализа воды.

В первой части произведена оценка эффективности пассивного перемешивания флавинонуклеотида (FMN) в серпантинном канале при его растворении с поверхности микрофлюидного чипа.

Исследовались геометрии микрофлюидных чипов с изогнутыми каналами (рисунок 6), форма которых при характерных для ввода скоростях жидкости от 0,04 до 0,08 м/с обеспечивает значение числа Дина от 40 до 80, что говорит о высокой интенсивности образования вихрей.

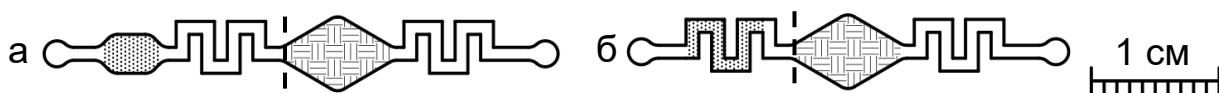


Рисунок 6 — Геометрии микрофлюидных чипов для пассивного перемешивания с иммобилизацией FMN: а) в отдельной камере; б) в серпантинном канале. Точками обозначены места иммобилизации FMN, полосками — остальных компонент биолуминесцентной реакции. Пунктирная линия обозначает сечение, в котором оценивалась равномерность распределения концентрации FMN

Были проведены расчеты времен растворения. Установлено, что оно оканчивается менее чем за секунду, что значительно меньше характерного времени ферментативной реакции (5 с). Для оценки неравномерности

распределения концентрации по поперечному сечению канала на входе в реакционную камеру рассчитывался коэффициент вариации V :

$$V = \frac{\sigma}{\bar{c}}, \quad (3)$$

где σ — среднее квадратичное отклонение концентрации в сечении канала, моль/м³; \bar{c} — средняя концентрация реагента по сечению, моль/м³.

Полученные значения V , превышающие 1, свидетельствуют о высокой степени неравномерности. Это оказывает отрицательное влияние на протекание аналитической реакции и на её воспроизводимость. Таким образом, необходимо использовать другие подходы для достижения равномерности ($V < 0,1$ [1]) распределения FMN в реакционной камере чипа, например применение активного механического перемешивания реагентов.

Во **второй части** представлено моделирование динамики выхода FMN из 7%-го крахмального геля, что необходимо для обеспечения контроля количества используемого реагента и выбора времени начала активного перемешивания. Получено, что основное количество FMN (~75%) покидает гель через 30 секунд после ввода пробы, после чего скорость его выхода замедляется, так что данное время было выбрано для начала активного перемешивания.

В **третьей части** приведены результаты численного исследования активного механического перемешивания с помощью пьезомембраны, подсоединенной к микрофлюидному чипу. Область моделирования представляла собой восьмиугольную реакционную камеру шириной 5 мм, длиной 11 мм и углом раствора 60° у входа и выхода и включала подводящие каналы шириной 1 мм и длиной 8 мм, чтобы обеспечить запас для перемещения жидкости при её колебаниях. Применялся произвольный Лагранж-Эйлеровый метод, при этом для сохранения постоянного количества растворенного реагента его массоперенос был ограничен двумя подвижными границами, имитирующими линии раздела фаз.

Было установлено уменьшение эффективности перемешивания с ростом частоты колебаний расхода жидкости, а также показано преимущество импульсных колебаний (продолжительность импульса 0,05 с) переменной частоты (рисунок 7) перед синусоидальными для ускорения перемешивания.

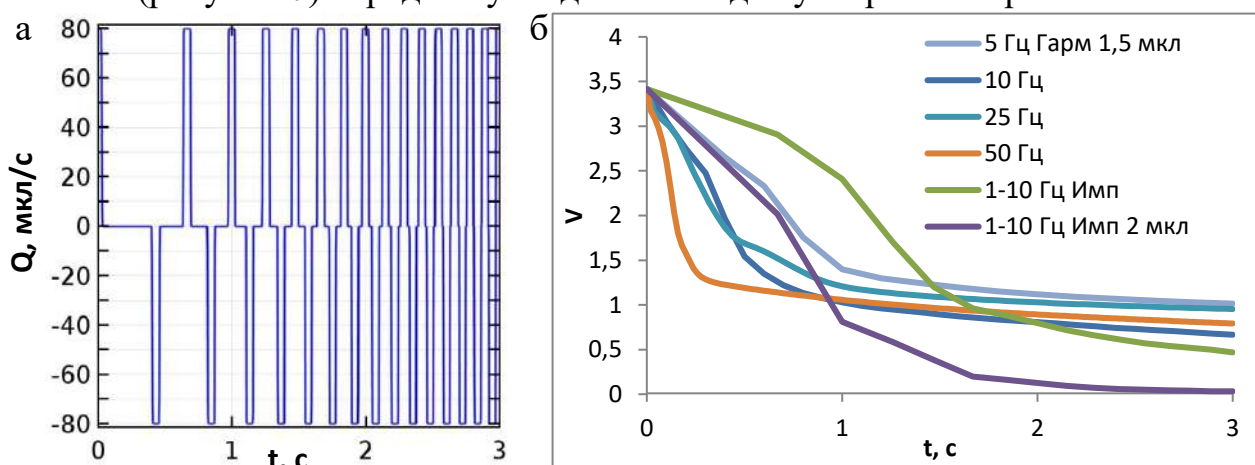


Рисунок 7 — а) Импульсная зависимость расхода жидкости Q на входе в подводящий канал от времени t с переменной частотой от 1 до 10 Гц и амплитудой 2 мкл. б) Зависимость коэффициента вариации V распределения FMN в камере микрофлюидного чипа при различных режимах расходов жидкости Q

При первых колебаниях с низкой частотой реагент распределяется по всей камере, а затем при увеличении частоты происходит его быстрое перемешивание. Увеличение амплитуды расхода жидкости до 2 мкл позволяет достигнуть достаточной равномерности распределения реагента по камере к 3-ей секунде ($V = 0,03$).

Эксперимент по перемешиванию красителя при различных частотах колебаний жидкости подтвердил эффективность применения переменной частоты импульсных колебаний, а также отсутствие перемешивания при частотах выше 20 Гц. Эффективность выбранного способа перемешивания также подтверждена при проведении ферментативной реакции, в которой наблюдается значительный рост интенсивности люминесценции (в 3 раза) после начала перемешивания.

В заключительной части третьей главы проводится обсуждение полученных результатов.

Четвертая глава посвящена изучению влияния геометрии генератора капель микрофлюидного чипа и отношения величин потоков дисперсной и непрерывной фаз на процесс перемешивания реагентов на этапе формирования капли пиколитрового объёма, выбору метода моделирования многофазных систем и значений его параметров.

В первой части проведено сравнение методов подвижной сетки, функции уровня и фазового поля для расчета движения фаз при малых капиллярных числах от $2 \cdot 10^{-6}$ до $2 \cdot 10^{-3}$ и изучения процесса перемешивания на этапе формирования капель.

Метод подвижной сетки, в котором её узлы лежат на границе раздела фаз, сочетает в себе высокую точность и быстроту расчета, но с его помощью нельзя воспроизвести момент формирования капли. При использовании метода функции уровня в результатах наблюдается излишнее вихреобразование, вызванное перепадом давлений на углах, образованных пересечением каналов, что влияет на оценку качества перемешивания. Скругление углов уменьшает этот эффект, но не устраняет его полностью. Метод фазового поля лишен данного недостатка, но, в то время как параметр реинициализации метода функции уровня, служащий для обеспечения устойчивости решения, имеет ясные инструкции по своему выбору, для параметра мобильности фазового поля таких инструкций нет, при этом от него существенно зависят получаемые решения. Поэтому при исследовании перемешивания на этапе формирования капель предпочтительнее использовать метод фазового поля, но необходимо разработать процедуру выбора параметра мобильности.

Во второй части предложена процедура выбора параметра мобильности χ метода фазового поля.

При моделировании перемешивания на этапе формирования капель методом фазового поля возникает два типа ошибок. С одной стороны, скорость смещения границы раздела фаз получается меньше скорости течения жидкости, что вызывает перенос растворенного вещества из одной фазы в другую. При этом с уменьшением параметра мобильности данная ошибка уменьшается. С другой стороны, с уменьшением параметра мобильности уменьшается рассчитываемая тангенциальная скорость на границе раздела фаз при её движении в перекрестии каналов (рисунок 8), что уменьшает вихреобразование и влияет на наблюдаемое качество перемешивания. Установлено, что с ростом параметра мобильности

значения скоростей на границе фаз приближаются к методу подвижной сетки, точно рассчитывающему профили скоростей. Таким образом, сравнением данных, полученных двумя методами, можно определить условия наиболее точного расчета методом фазового поля. Степень близости оценивалась по коэффициенту ошибки E между зависимостями максимальных скоростей на межфазной границе от её крайней координаты по оси X :

$$E = \frac{\sum (u_{phf}^{max} - u_{mm}^{max})^2}{\sum (u_{mm}^{max} - \bar{u}_{mm}^{max})^2}, \quad (4)$$

где u_{mm}^{max} и \bar{u}_{mm}^{max} — максимальные скорости на границе и их среднее значение, полученные методом подвижной сетки; u_{phf}^{max} — максимальные скорости на границе, полученные методом фазового поля. Коэффициент ошибки равен нулю при полном совпадении, а значения менее 0,2 свидетельствуют о хорошем совпадении данных [2].

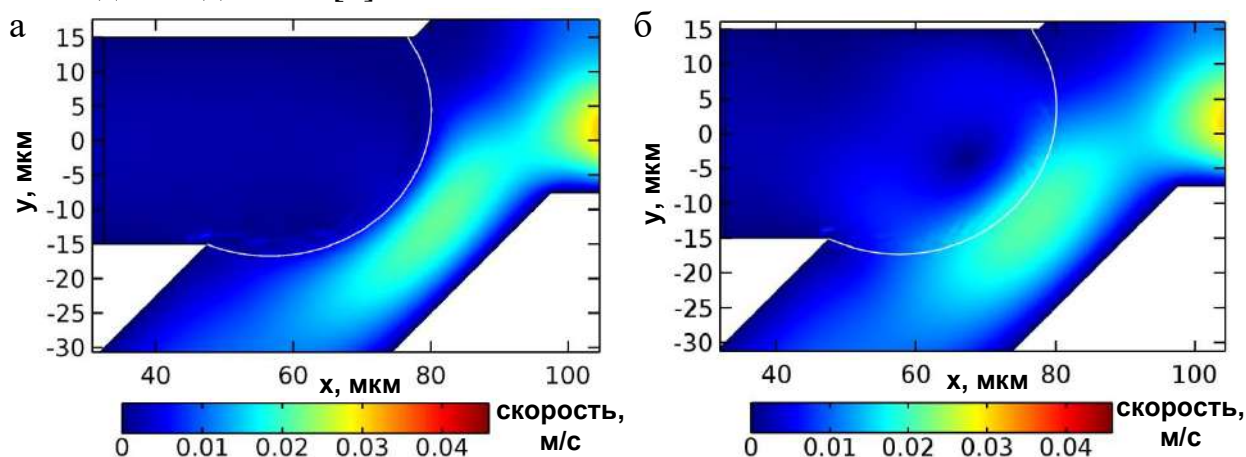


Рисунок 8 — Профили скоростей, рассчитанные методом фазового поля при параметре мобильности: а) $\chi = 0,1$ [м·с/кг]; б) $\chi = 10$ [м·с/кг]

Для выбора параметра мобильности был выработан следующий компромисс: минимальный параметр с коэффициентом ошибки $E < 0,2$ — на основании которого для дальнейших расчетов установлен параметр мобильности χ равный 10 м·с/кг.

В **третьей части** исследовалось влияние положения боковых каналов друг относительно друга (рисунок 9) и отношения потоков дисперсной и непрерывной фаз на качество перемешивания в процессе формирования капли.

Установлено, что геометрическим параметром, оказывающим основное влияние на эффективность перемешивания, является величина смещения между боковыми каналами L_d . При этом способ увеличения данного расстояния (использование наклонных каналов по отношению к центральному или смещения перпендикулярных боковых каналов) не оказывает значительного влияния на качество перемешивания, а основное отличие заключается в размере получаемых капель (рисунок 10).

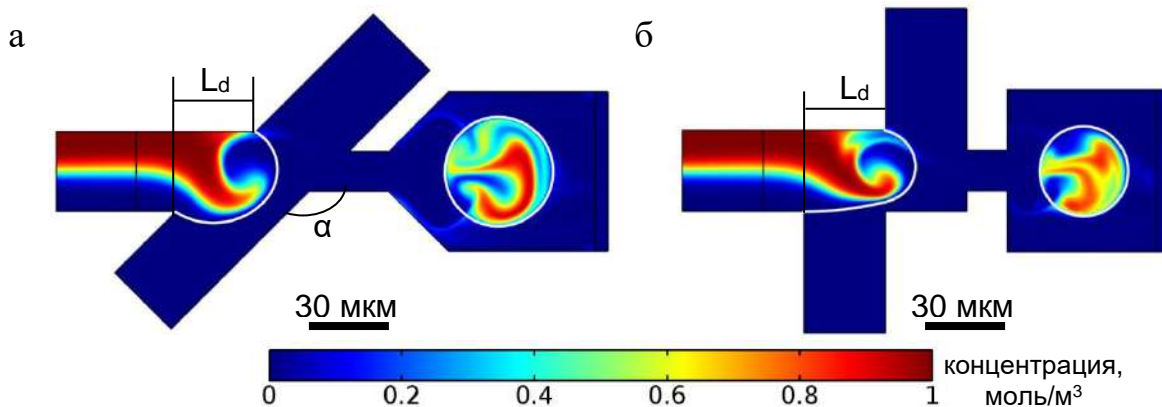


Рисунок 9 — Распределения концентрации при коэффициенте диффузии $D = 4 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$, расходе дисперсной фазы $Q_1 = 0,5 \text{ мкл/мин}$, непрерывной фазы $Q_2 = 1 \text{ мкл/мин}$: а) при угле наклона боковых каналов $\alpha = 135^\circ$ и $L_d = 30 \text{ мкм}$; б) при смещении $L_d = 30 \text{ мкм}$ перпендикулярных боковых каналов

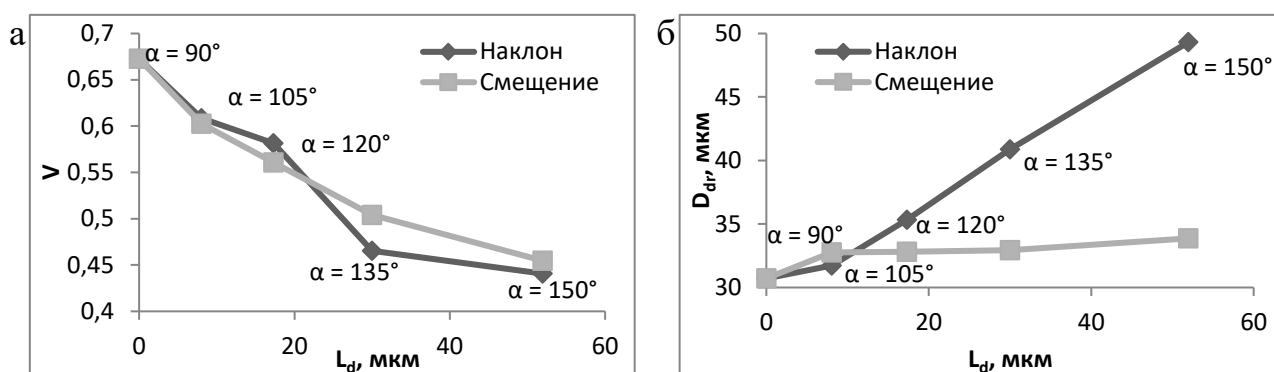


Рисунок 10 — Зависимости: а) коэффициента вариации V ; б) диаметра капли D_{dr} — от расстояния между боковыми каналами L_d , полученные при изменении угла наклона α и смещении перпендикулярных каналов, коэффициенте диффузии перемешиваемого вещества $D = 4 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$, скорости дисперсной фазы $Q_1 = 0,5 \text{ мкл/мин}$ и непрерывной фазы $Q_2 = 1 \text{ мкл/мин}$

При исследовании влияния отношения потоков дисперсной и непрерывной фаз с использованием геометрии генератора капель с наклонными (135°) боковыми каналами (рисунок 11) обнаружено, что при отношении потоков 1:10 для диапазона коэффициентов диффузии перемешиваемого

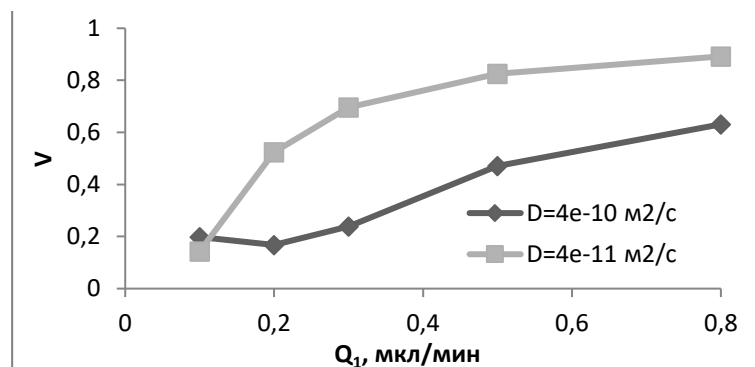


Рисунок 11 — Зависимость коэффициента вариации V от расхода дисперсной фазы Q_1 для геометрии с углом наклона боковых каналов 135° при постоянном расходе непрерывной фазы $Q_2 = 1 \text{ мкл/мин}$ и разных коэффициентах диффузии D перемешиваемого вещества

вещества D от $4 \cdot 10^{-10}$ до $4 \cdot 10^{-11}$ м²/с достигается низкое значение коэффициента вариации его концентрации в капле — менее 0,2. Таким образом, для обеспечения наилучшего перемешивания оптимальным является угол наклона боковых каналов 135° , а для повышения стабильности размера капель — смещения перпендикулярных боковых каналов на 30 мкм.

Экспериментальные данные по визуализации линий тока жидкости с помощью флуоресцентных микрочастиц подтвердили характер потоков, полученных в ходе моделирования. Экспериментальные зависимости качества перемешивания от отношения потоков также имеют характер, схожий с модельными данными (коэффициент корреляции 0,93–0,98). Отличия могут быть связаны как с погрешностями расчета, так и эксперимента.

В заключительной части четвертой главы проводится обсуждение результатов исследований.

В заключении диссертации приведены основные результаты работы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1) При решении конвективно-диффузионных задач методом конечных элементов стандартным методом Галёркина минимальное значение ошибки, связанной с нефизическими осцилляциями значений, при наименьших затратах расчетных ресурсов обеспечивается при значениях числа Куранта от 0,07 до 0,1 в зависимости от сеточного числа Пекле. При этом размер элемента сетки в определении данных чисел был заменен на среднее квадратичное отклонение, характеризующее ширину переходной области концентрации.

2) На основе моделирования электрокинетической загрузки пробы в инжектор микрофлюидного чипа и её ввода в сепарационный канал по схемам простой крест, Z- и П-ввода установлено, что уменьшение дисперсии пробки анализита достигается использованием схемы простой крест, малой шириной каналов и двухстадийным режимом запирающих потенциалов: повышенными относительно перекрестия каналов при загрузке пробы в инжектор и пониженными при вводе в сепарационный канал. Адекватность результатов моделирования подтверждена результатами экспериментальных исследований.

3) Установлено, что пассивное перемешивание за счет вихрей Дина в серпантинном канале не обеспечивает однородности (коэффициент вариации (V) > 1) ввода реагента (FMN) в реакционную камеру при его растворении с поверхности чипа. Поэтому необходимо использовать активное перемешивание для достижения равномерности ($V < 0,1$) распределения реагента в реакционной камере за время менее 3 секунд.

4) С помощью численной модели активного механического перемешивания на основе произвольного Лагранж-Эйлера метода определено, что перемешивание реагента в реакционной камере микрофлюидного чипа для ферментативного анализа пробы с использованием режима импульсных колебаний жидкости с равномерным возрастанием частоты в течение 3 секунд с 1 до 10 Гц при заданной амплитуде расхода и геометрии камеры позволяет обеспечить условия равномерного распределения концентрации по камере ($V < 0,1$). Результаты моделирования подтверждены экспериментальными данными.

5) Разработана процедура определения параметра мобильности метода фазового поля, обеспечивающего заданную точность расчета профиля скоростей и смещения границы раздела фаз, на основе оценки и сравнения скоростей на

границе фаз с данными, вычисленными методом с явным выделением границы. Это позволило выбрать значение параметра мобильности $\chi = 10$ м·с/кг для расчетов в рамках исследования влияния геометрии каналов и отношения потоков дисперсной и непрерывной фаз на качество перемешивания.

б) Установлено, что факторами, оказывающими основное влияние на эффективность перемешивания на этапе формирования капли в асимметричных геометриях микрофлюидного чипа, являются отношение величин потоков дисперсной и непрерывной фаз и расстояние между точками присоединения боковых каналов к центральному вдоль его оси. Для обеспечения качественного перемешивания ($V < 0,2$) выбраны отношения потоков 1:10 и угол наклона боковых каналов 135° . Результаты моделирования подтверждены экспериментальными данными.

7) Результаты, полученные в ходе моделирования были использованы при разработке приборов и устройств для проведения электрофоретического разделения компонент пробы, ферментативного анализа на месте забора пробы, генерации капель с ускоренным перемешиванием реагентов на этапе их формирования, а также выборе режимов их функционирования.

Диссертационная работа выполнена при поддержке Минобрнауки России, номер задания 16.8939.2017/8.9.

Список литературы:

1. Общая теория статистики: Учебник / Под ред. чл.-корр. РАН И.И. Елисеевой. — М.: Финансы и статистика, 2001. - 480 с.
2. Магнус Я.Р., Катышев П.К., Пересецкий А.А. Эконометрика. Начальный курс: Учеб. — М.: Дело, 2007. — 504 с.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и WoS:

1. **Belousov K.I.**, Filatov N.A., Evstrapov A.A., Kukhtevich I.V., Bukatin A.S. The study of mixing of reagents within a droplet in various designs of microfluidic chip // Journal of Physics: Conference Series. – 2016. – Vol. 741. – № 1. – P. 012052.
2. **Belousov K.I.**, Denisov I.A., Lukyanenko K.A., Yakimov A.S., Bukatin A.S., Kukhtevich I.V., Sorokin V.V., Esimbekova E.N., Belobrov P.I., Evstrapov A.A. Dissolution and mixing of flavin mononucleotide in microfluidic chips for bioassay // Journal of Physics: Conference Series. – 2016. – Vol. 741. – № 1. – P. 012058.
3. Lukyanenko K.A., **Belousov K.I.**, Denisov I.A., Yakimov A.S., Esimbekova E.N., Bukatin A.S., Evstrapov A.A., Belobrov P.I. Active mixing of immobilised enzymatic system in microfluidic chip // Micro & Nano Letters. – 2017. – Vol. 12 – № 6 – P. 377-381.
4. Lukyanenko K.A., Denisov I.A., Yakimov A.S., Esimbekova E.N., **Belousov K.I.**, Bukatin A.S., Kukhtevich I.V., Sorokin V.V., Evstrapov A.A., Belobrov P.I. Analytical Enzymatic Reactions in Microfluidic Chips // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2017. – Vol. 53. – № 7. – P. 775-780.

в изданиях, входящих в перечень российских рецензируемых журналов из перечня ВАК:

5. **Белоусов К.И.**, Евстрапов А.А., Буляница А.Л. Моделирование концентрационных зависимостей распределения пробы в каналах микрофлюидного чипа при электрокинетической инъекции // Научное приборостроение. – 2013. – Т. 23. – № 4. – С. 76–84

6. Кухтевич И.В., Посмитная Я.С., **Белоусов К.И.**, Букатин А.С., Евстрапов А.А. Принципы, технологии и устройства "капельной" микрофлюидики // Научное приборостроение. – 2015. – Т. 25. – № 3. – С. 65–109
7. Лукьяненко К.А., Денисов И.А., Якимов А.С., Есимбекова Е.Н., **Белоусов К.И.**, Букатин А.С., Кухтевич И.В., Сорокин В.В., Евстрапов А.А., Белобров П.И. Аналитические и ферментативные реакции в микрофлюидных чипах // Биотехнология. – 2016. – Т. 32. – № 5. – С. 69-76

публикации в других изданиях:

8. **Белоусов К.И.**, Кухтевич И.В., Букатин А.С., Евстрапов А.А. Моделирование процессов формирования капель в различных топологиях микрофлюидных чипов // Химическая промышленность. – 2014. – Т. 91. – № 1. – С. 38-40
9. **Белоусов К.И.**, Евстрапов А.А., Буляница А.Л. Моделирование концентрационных зависимостей распределения пробы в каналах микрофлюидного чипа при электрокинетической инжекции // Сборник тезисов докладов конгресса молодых ученых. – 2012. Выпуск 2. – С. 249-251.
10. **Белоусов К.И.**, Кухтевич И.В., Букатин А.С., Евстрапов А.А. Моделирование процессов формирования капель в различных топологиях микрофлюидных чипов // Материалы международной научно-технической конференции «Энергосберегающие процессы и оборудование, моделирование и оптимизация процессов, прикладная механика неоднородных сред» ЭПОМО-2014. – 2014. – С. 145-147.
11. **Белоусов К.И.**, Кухтевич И.В., Букатин А.С., Евстрапов А.А. Моделирование процессов формирования капель в топологиях микрофлюидных чипов с Т-вводом и с фокусирующими потоками при различных значениях капиллярных чисел // Материалы III Международной научной Интернет-конференции «Математическое и компьютерное моделирование в биологии и химии». – 2014. – С. 25-30.
12. **Belousov K.I.**, Kukhtevich I.V., Bukatin A.S., Evstrapov A.A. Simulation of mixing within a droplet during its formation in various designs of microfluidic chip // Proceedings of 15th European Conference on Mixing. – 2015. – P. 57-62
13. **Белоусов К.И.**, Кухтевич И.В., Букатин А.С., Евстрапов А.А. Микрофлюидные устройства для биологических исследований и медицинской диагностики // Междисциплинарный научный форум «Новые материалы. Дни науки. Санкт-Петербург 2015». Сборник аннотаций. – 2015. – С. 45
14. **Белоусов К.И.**, Кухтевич И.В., Букатин А.С., Евстрапов А.А. Численное моделирование перемешивания веществ внутри капли в различных инжекторах микрофлюидного чипа // Материалы XVI Всероссийская конференция молодых ученых по математическому моделированию и информационным технологиям. – 2015. – С. 24-25
15. Belobrov P.I., Denisov I.A., Lukyanenko K.A., Yakimov A.S., Esimbekova E.N., **Belousov K.I.**, Bukatin A.S., Kukhtevich I.V., Sorokin V.V., Evstrapov A.A. Microfluidic bioassay based on bacterial luciferase and NADH:FMN-oxidoreductase // NanoBioMed2015. – 2015. –
- http://www.nanobiomedconf.com/nanobiomedAbstracts/2015/2015_Belobrov_Peter%20I_peter.belobrov@gmail.com_nanoBio&Med2015_Belobrov_Peter.pdf
16. **Белоусов К.И.**, Букатин А.С., Денисов И.А., Евстрапов А.А., Есимбекова Е.Н., Кухтевич И.В., Лукьяненко К.А., Сорокин В.В., Якимов А.С., Белобров П.И. Микрофлюидные технологии создания сторожков и лабочипов для биомедицинских исследований // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Материалы VI Международной научно-практической конференции. – 2015. – С. 124-125
17. **Belousov K.I.**, Filatov N.A., Evstrapov A.A., Kukhtevich I.V., Bukatin A.S. The study of mixing of reagents within a droplet in various designs of microfluidic chip//Book of

abstracts. 3rd International School and Conference "Saint-Petersburg OPEN 2016". – 2016. – P. 146-147

18. **Belousov K.I.**, Denisov I.A., Lukyanenko K.A., Yakimov A.S., Bukatin A.S., Kukhtevich I.V., Sorokin V.V., Esimbekova E.N., Belobrov P.I., Evstrapov A.A. Dissolution and mixing of flavin mononucleotide in microfluidic chips for bioassay // Book of abstracts. 3rd International School and Conference "Saint-Petersburg OPEN 2016". – 2016. – P. 133-134

19. **Белоусов К.И.**, Кыздарбекова А.С., Евстрапов А.А. Исследование растворения и диффузии компонентов ферментативной реакции из геля, иммобилизованного в микрофлюидном чипе для оценки токсичности воды // Сборник тезисов докладов конгресса молодых ученых. Электронное издание. – 2017. – <http://openbooks.ifmo.ru/ru/file/4725/4725.pdf>

20. **Белоусов К.И.**, Кыздарбекова А.С., Евстрапов А.А. Оптимизация параметра мобильности в методе фазового поля для моделирования перемешивания в микрофлюидных чипах // Сборник тезисов докладов конгресса молодых ученых. Электронное издание. – 2018. – <http://openbooks.ifmo.ru/ru/file/7387/7387.pdf>

Учебные пособия:

21. **Белоусов К.И.**, Посмитная Я.С., Евстрапов А.А., Кухтевич И.В. Наноразмерные структуры в микрофлюидных устройствах. – СПб : Университет ИТМО, 2017. – 56 с.

22. **Белоусов К.И.**, Евстрапов А.А., Кухтевич И.В., Посмитная Я.С. Основы нанотехнологий. Часть 1. Микро- и нанотехнологии для биологических и медицинских исследований. Часть 2. Капельная микрофлюидика. – СПб : Университет ИТМО, 2015. – 56 с.

Монографии:

23. Евстрапов А.А., Белобров П.И., Буляница А.Л., **Белоусов К.И.**, Букатин А.С., Денисов И.А., Есимбекова Е.Н., Кухтевич И.В., Лукьяненко К.А., Посмитная Я.С., Сорокин В.В., Якимов А.С. Микрофлюидные технологии биологического анализа природных и промышленных вод. – Новосибирск : Издательство СО РАН, 2017. – 162с. – ISBN 978-5-7692-1562-9