

УДК 53.082.53

© Я. С. Посмитная, А. А. Евстапов

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СОЕДИНЕНИЯ ОПТИЧЕСКИ ПРОЗРАЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ТОНКИХ СЛОЕВ

Одной из важных задач при создании биосенсорных и микрофлюидных устройств является контроль качества фиксации чувствительного слоя, необходимый для обеспечения требуемых функциональных характеристик. Среди методов неразрушающего контроля свойств поверхности материалов выгодно выделяются методы оптической спектрофотометрии как простые, надежные и наиболее доступные для исследовательской лаборатории. В работе рассмотрен спектрофотометрический способ контроля соединения тонкой пленки микронных размеров с оптически прозрачной подложкой. Предложенный подход продемонстрирован на примере контроля качества фиксации полиакриламидного геля на поверхности пластины из полиметилметакрилата, которая предварительно была подвергнута химической (или физической) обработке и силанизации.

Кл. сл.: оптическая спектрофотометрия, чувствительный слой, микрофлюидный чип, полиметилметакрилат, модификация поверхности, иммобилизация геля, полимеразная цепная реакция

ВВЕДЕНИЕ

При создании биоаналитических и микрофлюидных устройств (МФУ) одной из важных задач является целевая модификация поверхности для обеспечения прочной фиксации биологически чувствительного слоя или иммобилизации геля (например, для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в среде геля) [1, 2]. Как в случае физической, так и при химической обработке поверхности меняются ее свойства за счет появления функциональных групп, изменения топологии и т. д. Модификация поверхности в общем случае может оказывать существенное влияние на аналитические характеристики биосенсорных и микрофлюидных устройств. А отсутствие регламентированных или общепринятых способов контроля свойств поверхности при изготовлении этих устройств приводит к высокому проценту некачественных изделий или к существенному разбросу их характеристик. Необходимость контроля соединения тонких чувствительных слоев с подложкой обусловлена тем, что слой, плохо связанный с поверхностью, ухудшает функциональные характеристики устройства и приводит к невоспроизводимым результатам измерений. Оптические методы позволяют осуществлять неразрушающий и оперативный контроль однородности слоев (например, методы эллипсометрии [3, 4]), измерять толщину слоя и оптические показатели [5] и т. д. Методы эллипсометрии и интерферометрии позволяют осуществлять измерения достаточно тон-

ких слоев (толщиной до 10 мкм), но при этом предъявляются высокие требования к исследуемым образцам. Поэтому они не подходят для решения ряда практических задач, в которых требуется измерение слоев толщиной от единиц до нескольких десятков микрометров, причем слои могут быть неоднородными (полимеры и гели).

В данной работе предложен методический подход, основанный на измерении светопропускания тонких слоев на оптически прозрачной подложке и позволяющий оценивать качество фиксации тонкослойных пленок на субстрате. Метод контроля был апробирован при оценке качества иммобилизации полиакриламидного геля в реакционной камере микрочипа из полиметилметакрилата (ПММА) марок ТОСП (ГОСТ 17622-72, ТУ 2216-271-05757593-2001) и АCRYMA®72 (ТУ 2216-030-55856863-2004) для ПЦР в гелевой среде [6].

ОЦЕНКА СВЕТОПРОПУСКАНИЯ СИСТЕМЫ (ТОНКИЙ СЛОЙ—ПОДЛОЖКА)

Основной идеей контроля качества прилегания чувствительного слоя является следующее положение: при плотном прилегании слоя (пленки) 1 к подложке 2 формируется двухслойная система (рис. 1, а), а при непрочном — образуется трехслойная система с воздушным (или иным) зазором 3 (рис. 1, б). Это приводит к появлению дополнительных границ раздела сред и изменениям пропускания и отражения образца, которые могут

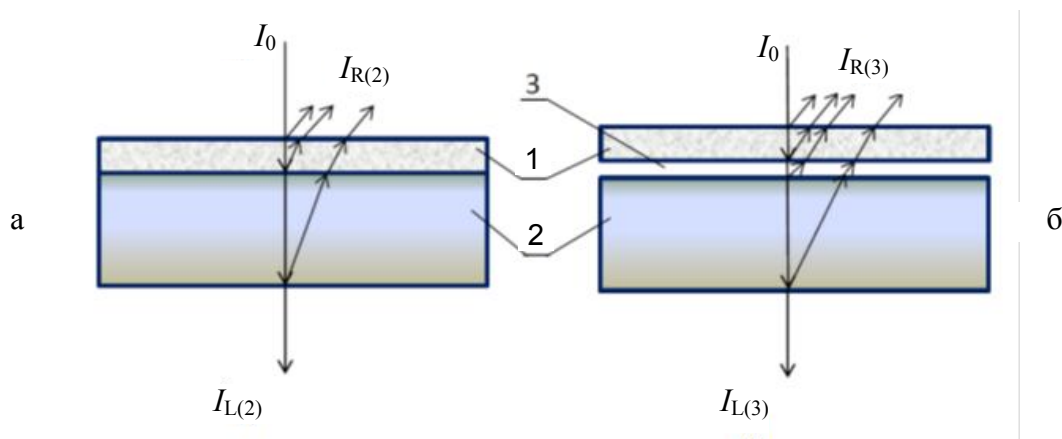


Рис. 1. Пропускание и отражение светового потока от двухслойной (а) и трехслойной (б) систем.

а — пленка 1 плотно связана с поверхностью подложки 2; б — между пленкой и подложкой находится слой воздуха 3, создающий дополнительные границы раздела сред.

I_0 — интенсивность падающего светового потока; $I_{R(2)}$ и $I_{R(3)}$ — интенсивности отраженного потока для двухслойной и трехслойной системы соответственно; $I_{L(2)}$ и $I_{L(3)}$ — интенсивности прошедшего потока для двухслойной и трехслойной системы соответственно

быть зарегистрированы фотометрическим методом.

Важной особенностью таких измерений является выбор спектрального участка, в котором пропускание материала подложки и прилегающего слоя максимально велико. В этом случае можно рассчитать теоретические оценки для подобных измерений, предполагая, что световой поток падает перпендикулярно поверхности слоя, а слой и подложка рассматриваются как плоскопараллельные пластины.

Для случая трехслойной системы, когда слой воздуха находится между пленкой и подложкой, общее светопропускание можно определить, как произведение светопропусканий тонких пластин с разными показателями преломления и, следовательно, с разным отражением от границ раздела сред:

$$T_{L(3)} = T_1 \times T_2 = \frac{(1 - R_{10})^2 \exp(-\alpha_1 h_1)}{1 - R_{10}^2 \exp(-2\alpha_1 h_1)} \times \frac{(1 - R_{20})^2 \exp(-\alpha_2 h_2)}{1 - R_{20}^2 \exp(-2\alpha_2 h_2)},$$

где R_{10} и R_{20} — коэффициенты отражения от границы раздела сред пленка—воздух и подложка—воздух (если пластины находятся в воздушной среде); α_1 и α_2 — коэффициенты поглощения; h_1 и h_2 — толщины пленки и подложки соответственно.

Если выбрать спектральный диапазон измерений, в котором поглощением подложки можно пренебречь, то

$$T_{L(3)} = \frac{(1 - R_{10})^2 \exp(-\alpha_1 h_1)}{1 - R_{10}^2 \exp(-2\alpha_1 h_1)} \times \frac{(1 - R_{20})^2}{1 - R_{20}^2}. \quad (1)$$

Оценка отражения света от границы раздела сред i и j может быть получена по известной формуле

$$R_{ij} = \left(\frac{n_i - n_j}{n_i + n_j} \right)^2,$$

где n_i — показатель преломления среды i , n_j — показатель преломления среды j .

Для двухслойной системы (пленка—подложка) с общей границей раздела прошедший световой поток будет определяться суммарным потоком, вызванным многократными переотражениями от границ раздела сред. Предположив, что поглощением подложки можно пренебречь, в первом приближении можно оценить светопропускание такой системы как

$$T_{L(2)} = \frac{\sum I_i}{I_0} \approx (1 - R_{01})(1 - R_{12})(1 - R_{20})\tau_1 \times \left\{ 1 + R_{12}R_{20} + \left[R_{12}R_{10} + R_{10}R_{20}(1 - R_{12})^2 \right] \tau_1^2 \right\}. \quad (2)$$

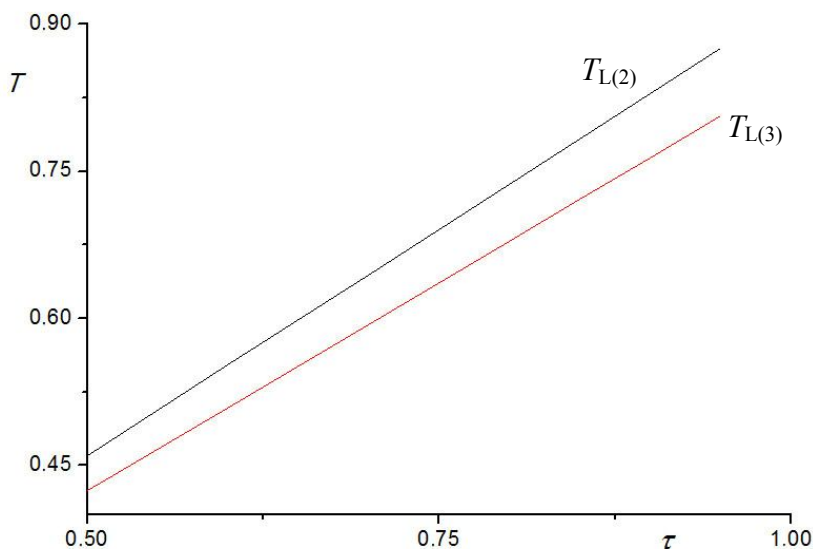


Рис. 2. Зависимости светопропускания T двухслойной $T_{L(2)}$ и трехслойной $T_{L(3)}$ систем от пропускания τ слоя полиакриламидного геля на подложке из полиметилметакрилата

Здесь $\tau_1 = \exp(-\alpha_1 h_1)$, $R_{01} = R_{10}$, R_{12} — коэффициент отражения от границы раздела сред пленка—подложка

На рис. 2 представлены зависимости светопропускания для двухслойной и трехслойной систем от поглощения слоя, вычисленные по формулам (1) и (2) на примере слоя акриламидного геля ($n_{gel}=1.525$) и подложки из полиметилметакрилата ($n_{PMMA}=1.488$). Показатели преломления определялись на длине волны $\lambda = 632.8$ нм. Чем больше поглощение слоя, тем меньше отличие в светопропускании рассматриваемых систем. Поэтому наиболее надежные оценки, характеризующие качество прилегания слоя к подложке можно получить в случае слабого поглощения слоя. Следует также учитывать, что в реальном случае измерения осуществляются в определенной пространственной области, и, следовательно, получаемые результаты содержат данные о некоторой поверхности измерений. На локальных участках поверхности может наблюдаться неравномерное прилегание слоя к подложке. Таким образом, точность получаемых оценок будет зависеть от соотношения площадей областей неплотного и плотного прилегания, а также области детектирования. Особенностью предлагаемого подхода является то, что для получения точных оценок необходимо знать значения показателя преломления слоя и подложки. При модификации и обработке поверхности значения показателя преломления обработанных слоев могут не соответствовать табличным, поэтому в не-

которых случаях необходимо проведение дополнительных измерений, например, эллипсометрическими методами.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ИММОБИЛИЗАЦИИ ГЕЛЯ НА ПОДЛОЖКЕ

Для экспериментальных исследований были изготовлены прототипы полимерных микрочипов из ПММА размером 24×24 мм, представляющие собой двухслойную систему — подложку и пластину с отверстием (диаметр 6.5 мм, глубина 1 мм), которые соединены между собой адгезивом толщиной 50 мкм (фирма 3М, США). Такой метод является оперативным и универсальным для исследовательских лабораторий и позволяет за короткое время осуществить изготовление pilotных образцов устройства. Подобный подход для создания микрочипов для ПЦР в жидкой среде был предложен в работе [7].

Для иммобилизации полиакриламидного геля в реакционной камере двухслойного микрочипа применялись следующие способы модификации поверхности ПММА с целью получения гидроксильных групп: для марки ТОСП — реакция гидролиза в кислой среде (обработка 3М серной кислотой с предварительной промывкой в 30 %-м этиловом спирте), для марки АCRYMA — плазменная обработка в среде аргона. За основу процедур иммобилизации и отливки геля был принят

протокол для стеклянных поверхностей, который содержал стадии силанизации и полимеризации акриламида [6].

После высыхания геля чипы исследовались спектрофотометрическим методом. Идеальным случаем являлась бы ситуация, когда спектральная зависимость светопоглощения слоя геля отличалась бы от поглощения материала чипа (ПММА). Но акриламидный гель и ПММА имеют схожие спектральные зависимости в видимом диапазоне. Толщина высохшего геля составляет десятки микрометров, а толщина ПММА в области реакционной камеры 1 мм. В этом случае необходимо проведение относительных измерений, когда в канале сравнения спектрофотометра установлен чип без слоя геля. Относительные измерения также позволяют в некоторой степени исключить влияние возможной вариации толщины подложки — пластины ПММА — на экспериментальные данные.

После полимеризации гель представляет собой тонкий слой, обладающий светорассеивающими свойствами, поэтому следует учитывать ослабление светового потока слоем геля. Оценка τ_{gel} была определена экспериментально и составила $\tau_{\text{gel}} = 0.86$.

Используя значения показателей преломления слоя силана на поверхности полимеров двух марок до и после обработки, полученные эллипсометрическим методом, по формулам (1) и (2) можно вычислить теоретические оценки светопропускания для двухслойной (случай качественной фиксации геля) и трехслойной системы (содержащей слой воздуха).

Для образца из ПММА марки ТОСП после химической обработки и силанизации поверхности теоретические оценки составили: для двухслойной системы $T_{L(2)} \approx 0.793$, для трехслойной — $T_{L(3)} \approx 0.729$.

Разность между этими оценками ($T_{L(2)} - T_{L(3)} = 0.064$), что составляет 6.4 % пропускания и может быть зарегистрирована фотометрическим методом. При спектрофотометрических измерениях геля, иммобилизованного на ПММА марки ТОСП (вариант химической обработки), было получено значение $T_L \approx 0.791$, близкое к теоретическому значению $T_{L(2)}$, что позволяет сделать вывод о плотном прилегании слоя геля к поверхности реакционной камеры.

Для образца из ПММА марки АСРЬМА (для плазменной обработки в среде аргона с последующей силанизацией) теоретические оценки составили: для двухслойной системы $T_{L(2)} \approx 0.768$ и для трехслойной системы $T_{L(3)} \approx 0.706$. При спектрофотометрических измерениях геля, иммобилизованного на ПММА, марки АСРЬМА было получено значение $T_L \approx 0.661$, соответствующее случаю неплотного прилегания геля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Теоретически и экспериментально показано, что использование оптической спектроскопии в видимой области спектра позволяет контролировать качество иммобилизации гелевой среды в реакционной камере микрочипового устройства из полимерного материала, что дает возможность снизить число некачественных изделий при создании микрочипов и улучшить их аналитические характеристики.

На основании экспериментально полученных оценок светопропускания микрочипов из ПММА двух марок с гелем можно сделать вывод о том, что наиболее эффективным и надежным методом предварительной обработки, позволяющим получить систему с плотно прилегающим тонким слоем геля, является реакция гидролиза в кислой среде образца марки ТОСП.

Предложенный вариант неразрушающего контроля качества фиксации тонкого чувствительного слоя к подложке методом оптической спектроскопии в видимой области спектра является перспективным и экспрессным и может применяться при создании биосенсорных и микрофлюидных устройств.

Авторы выражают благодарность д.ф.-м.н. С.Г. Ястребову (ФТИ им. А.Ф. Иоффе, РАН) за консультацию в проведении эллипсометрических измерений.

Работа выполнена при поддержке ФЦП ФМБА "Национальные системы химической и биологической безопасности РФ", проект "Разработка методик регистрации результатов цифровой полимеразной цепной реакции и технологий создания микрочиповых устройств для ее постановки".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kirsch J., Siltanen C., Zhou Q. et al. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42, N 22. P. 8733–8768.
2. Евстапов А.А., Буляница А.Л., Рудницкая Г.Е. и др. Оценка результатов полимеразной цепной реакции в реальном времени кДНК онкомаркеров СК-19 методом электрофореза на микрофлюидном чипе // Научное приборостроение. 2012. Т. 22, № 4. С. 77–85.
3. Morton D.E., Johs B., Hale J. Optical monitoring of thin-films using spectroscopic ellipsometry // Society of Vacuum Coaters. Proceedings 45th Annual Technical Conference. 2002. P. 1–7.
4. Hilfiker J.N., Synowicki R.A., Woollam J.A. et al. Spectroscopic ellipsometry methods for thin absorbing coatings // Society of Vacuum Coaters. Proceedings 51st Annual Technical Conference. 2008. P. 511–516.
5. Poelman D., Smet P.F. Methods for the determination

- of the optical constants of thin films from single transmission measurements: a critical review // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2003. V. 36, N 15. P. 1850–1857.
6. Четверина Е.В., Четверин А.Б. Нанокolonии: обнаружение, клонирование и анализ индивидуальных молекул // *Успехи биологической химии*. 2008. Т. 48. С. 3–64.
7. URL: (<http://www.asee.org/public/conferences/8/papers/3683/view>).

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики (Посмитная Я.С., Евстратов А.А.)

Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург (Посмитная Я.С., Евстратов А.А.)

Контакты: Посмитная Яна Станиславовна, posmitnaya@rambler.ru

Материал поступил в редакцию 27.11.2013

SPECTROPHOTOMETRIC CONTROL OF CONNECTION OPTICALLY TRANSPARENT MATERIALS AND THIN LAYERS

Y. S. Posmitnaya^{1,2}, A. A. Evstrapov^{1,2}

¹*Saint-Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, RF*

²*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, RF*

One of the important tasks while creating biosensor and microfluidic devices is to control the quality of sensitive layer fixation needed to achieve the required functional characteristics. Among the methods of non-destructive testing of the surface properties of materials are favorably allocated optical spectrophotometry as simple, reliable and the most accessible for the research laboratory. We consider a spectrophotometric method for control of coupling of film micron sizes with an optically transparent substrate. The proposed approach is demonstrated by the example of control fixation polyacrylamide gel on the surface of a plate of polymethylmethacrylate, which has previously been subjected to chemical (or physical) treatment and silanization.

Keywords: optical spectrophotometry, sensitive layer, microfluidic chip, poly(methyl methacrylate), surface modification, gel immobilization, polymerase chain reaction

REFERENCES

1. Kirsch J., Siltanen C., Zhou Q. et al. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine // *Chem. Soc. Rev.* 2013. V. 42, N 22. P. 8733–8768.
2. Evstrapov A.A., Bulyanitsa A.L., Rudnitskaya G.E. i dr. Otsenka rezultatov polimeraznoy tsepnoy reaktsii v realnom vremeni kDNK onkomarkerov SK-19 metodom elektroforeza na mikroflyuidnom chipe // *Nauchnoye priborostroyeniye*. 2012. T. 22, № 4. С. 77–85. (in Russian).
3. Morton D.E., Johs B., Hale J. Optical monitoring of thin-films using spectroscopic ellipsometry // *Society of Vacuum Coaters. Proceedings 45th Annual Technical Conference*. 2002. P. 1–7.
4. Hilfiker J.N., Synowicki R.A., Woollam J.A. et al. Spectroscopic ellipsometry methods for thin absorbing coatings // *Society of Vacuum Coaters. Proceedings 51st Annual Technical Conference*. 2008. P. 511–516.
5. Poelman D., Smet P.F. Methods for the determination of the optical constants of thin films from single transmission measurements: a critical review // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2003. V. 36, N 15. P. 1850–1857.
6. Четверина Е.В., Четверин А.Б. Нанокolonии: обнаружение, клонирование и анализ индивидуальных молекул // *Успехи биологической химии*. 2008. Т. 48. С. 3–64. (in Russian).
7. URL: (<http://www.asee.org/public/conferences/8/papers/3683/view>).