

УДК 681.7.024

© Т. А. Лукашенко, А. Н. Тупик, Г. Е. Рудницкая,
А. Л. Буляница, А. И. Цымбалов, А. А. Евстапов

СПОСОБЫ СПЕКАНИЯ, СКЛЕИВАНИЯ И ХИМИЧЕСКОЙ СВАРКИ РАСТВОРИТЕЛЕМ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ПОЛИМЕРНЫХ И ПОЛИМЕР-СТЕКЛЯННЫХ МИКРОЧИПОВЫХ УСТРОЙСТВ

Одним из направлений развития современного приборостроения является создание аналитических систем на микрочиповой платформе для биологических, биохимических, генетических исследований. При изготовлении микрочиповых устройств герметизация обычно является финальной стадией и представляет собой процесс получения неразъемного соединения пластин. В работе представлены технологии герметизации, разработанные для микрочиповых устройств из полиметилметакрилата (ПММА), предназначенных для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Рассмотрены особенности способов спекания, склеивания фотоотверждаемыми композициями и химической сварки растворителем. Показано, что химическая сварка может применяться для герметизации гибридных (ПММА—неорганическое стекло) устройств. Предложен и апробирован критерий оценки герметичности микрочипового устройства гравиметрическим методом.

Кл. сл.: полиметилметакрилат, микрочиповое устройство, герметизация, неразъемное соединение, склеивание, спекание, химическая сварка растворителем, гравиметрический метод, полимеразная цепная реакция

ВВЕДЕНИЕ

Относительно низкая стоимость полимерных материалов, способов формирования в них микро-размерных структур, а также физико-химические свойства определяют устойчивую тенденцию использования полимеров в качестве конструкционных материалов при создании микрочиповых устройств (микрочипов).

Герметизация микроразмерных структур, как правило, является финальной стадией изготовления устройств. Она производится для создания внутри микрочипа сети закрытых и связанных между собой микроструктур, пригодных для выполнения различных манипуляций с жидкой пробой и реагентами. Простейшая конструкция микрочипа представляет собой неразъемное соединение, по крайней мере, двух пластин, одна из которых имеет сеть соединенных между собой каналов (канализованная пластина), а другая является защитной и предназначена для их герметизации. Способы соединения пластин микрочипа зависят от применяемого материала и условий эксплуатации.

Среди листовых полимерных материалов в настоящее время востребованными являются органическое (акриловое) стекло, полиметилметакрилат (ПММА) и поликарбонат (ПК), обладающие подходящими оптическими, физико-химическими (устойчивость к термохимическому воздействию),

механическими (прочность, твердость, устойчивость к механическим нагрузкам) характеристиками. По литературным данным [1–3], эти материалы являются химически и биологически инертными, что обуславливает их применение при создании миниатюрных устройств для методов молекулярной диагностики и генетических исследований (например, электрофоретическое разделение, цитометрия, полимеразная цепная реакция).

В статье приводятся результаты технологических исследований по герметизации полимерных микрочиповых устройств из ПММА, предназначенных для методов молекулярной диагностики, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Подробно рассмотрены методы неразъемного соединения полимерных пластин, а именно — спекание, склеивание фотоотверждаемыми композициями и химическая сварка растворителем. Предложенные технологии герметизации для микрочиповых устройств обеспечивают эффективное проведение ПЦР.

МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Использованные материалы

В России имеется собственное производство сертифицированного ПММА (г. Дзержинск) [4–6],

что обуславливает его доступность для российских исследователей и низкую стоимость. Из ассортимента, предлагаемого ОАО "ДОС", были выбраны следующие марки ПММА.

– ТОСП® (ГОСТ 17622-72, ТУ 2216-271-05757593-2001) — классический пластифицированный полимер эфира метакриловой кислоты, изготовленный методом полимеризации в блоке. Температура размягчения (T_p) — не ниже 92 °С. Эта марка оргстекла выпускается уже длительное время, и его свойства достаточно хорошо изучены.

– ТОСН (ГОСТ 17622-72, ТУ 2216-271-05757593-2001) — непластифицированное блочное акриловое стекло с добавкой светостабилизатора. Материал имеет высокую стойкость к нагрузкам и термохимическому воздействию и не предполагает обработку методом формования. Температура размягчения (T_p) — не менее 110 °С.

– ACRYMA®72 (ТУ 2216-030-55856863-2004), представляющий собой экструзионный акриловый пластик. Материал пластичен и способен во время обработки выдерживать нагрузки. Температура размягчения (T_p) — 100÷105 °С.

Особенностью проведения ПЦР является многократное (от 25 до 50 циклов) циклическое нагревание и охлаждение от 55 до 95 °С. Поэтому материал для микрочипов выбирали на основании данных по температуре размягчения (T_p). Понижение T_p при добавлении пластификатора вызвано тем, что молекулы пластификатора экранируют полярные группы макромолекул полимера, что приводит к ослаблению межмолекулярного взаимодействия в системе. Чем больше добавлено пластификатора, тем сильнее снижается T_p [7]. Отсутствие пластификатора в ПММА ТОСН обуславливает более высокую стойкость данного материала к механическим нагрузкам и термохимическому воздействию по сравнению с марками ТОСП® и ACRYMA®72.

Следует также отметить, что на силу межмолекулярных взаимодействий в полимере влияют и особенности технологии его получения. В экструзионном оргстекле межмолекулярные связи являются более слабыми по сравнению с литым (блочным) оргстеклом. Вследствие этого можно ожидать, что ПММА ACRYMA®72 будет иметь наименьшую химическую устойчивость и лучшую способность к склеиванию по сравнению с марками ТОСП® и ТОСН.

В работе также использованы следующие материалы и реактивы: фотоотверждаемый клей ACRIFIX®1R 0192 и разбавитель ACRIFIX®TC 0030 (Evonik Industries, Германия); фотоотверждаемый клей Permabond UV630 (Permabond® Engineering Adhesives); стекло предметное (BioVitrum) размером 75×25 мм, толщиной 1 мм; стекла покровные (BioVitrum) размером 24×24 мм, толщи-

ной 170 мкм; метакриловая кислота (99.9 %); натрия гидроксид (Ч); фтористоводородная (плавиковая) кислота (ХЧ); краситель флуоресцеин (ЧДА).

Оборудование, использованное в работе

В воздушном термостате (низкотемпературная лабораторная электропечь SNOL 58/350) проводили операции отжига и сушки.

При помощи ртутной лампы ДРШ-250 проводили отверждение клеевых составов.

На аналитических весах TE 64 (Sartorius, Германия) с классом точности I (специальный), по ГОСТ 24104-2001, осуществляли взвешивание микрочипов при проведении испытаний на герметичность гравиметрическим методом и навесок для приготовления растворов.

На оптическом микроскопе (Leica, Германия) с цифровой камерой Pike (Allied Vision, Германия) получали изображения поперечных срезов клеевого и сварного (химическая сварка) неразъемных соединений.

На лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SL (Leica, Германия) изучали распределение флуоресценции раствора с красителем в реакционной камере.

Методы контроля герметизации

Качество герметизации проверяли гравиметрическим методом [8] и методом оптической микроскопии. В первом случае критерием герметичности является сохранение массы введенной в реакционную камеру жидкости после имитации условий проведения ПЦР (термоциклирования): предварительный прогрев до 95 °С в течение 5 мин; затем 40 циклов нагрева-охлаждения — 95 °С в течение 20 с, 60 °С в течение 60 с. Температурный режим обеспечивали при помощи амплификатора (термоциклера) (Swift MaxPro, ESCO, Сингапур). Для измерения массы микрочиповых устройств использовали аналитические весы. Предел допускаемой погрешности в измеряемом интервале взвешивания составлял ±0.5 мг. Известно, что оргстекло, как и другие материалы, при хранении адсорбирует своей поверхностью влагу из окружающей среды, при этом масса его увеличивается. Поэтому убыль массы микрочипового устройства после термоциклирования может быть обусловлена не только испарением жидкости из реакционной камеры, а также десорбцией влаги с его поверхности. Поправка на влагопоглощение материала микрочипа составляет 0.2 % от массы пустого устройства [8]. В результате экспериментальных исследований был принят критерий, что микрочиповое устройство считается герметичным и выдержавшим испытание, если убыль его массы

после термоциклирования по отношению к массе, введенной в реакционную камеру жидкости (с учетом поправки на влагопоглощение), — величина, обозначенная далее δ , не превышает 5 %.

Указанное значение получено следующим образом. На первом этапе для двух групп устройств — выдержавших и не выдержавших испытания на герметичность — строились две выборки значений δ ; для каждой из них были рассчитаны оценки математического ожидания и дисперсии. Полагали, что значения δ для обеих выборок удовлетворяли нормальному (гауссовому) закону распределения. Далее применили простейший пороговый алгоритм дискриминации: если измеренная величина δ не превосходила порогового значения P , то устройство считалось герметичным, иначе — нет. При использовании такого алгоритма были возможны два типа ошибок дискриминации: ошибка первого рода — признание негерметичного устройства герметичным по формальному признаку ($\delta \leq P$) с вероятностью α и ошибка второго рода — признание герметичного устройства негерметичным по формальному признаку ($\delta > P$) с вероятностью β . Пороговое значение P выбиралось по критерию минимизации суммарной вероятности ошибок ($\alpha + \beta$). В нашем случае это значение оказалось равным 4.85 %. Так как сумма ($\alpha + \beta$) имеет гладкий минимум, то из соображений удобства выбрали квазиоптимальное пороговое значение, округлив его до 5 %. При этом минимальная сумма ($\alpha + \beta$) составила около 5.2 %. Таким образом, применение нашего алгоритма дискриминации приведет к ошибке примерно в одном случае из выборки 19 устройств.

На лазерном сканирующем конфокальном микроскопе TCS SL оценивали герметичность, изучая распределение флуоресценции раствора с красителем (10^{-5} М флуоресцеин в боратном буфере, pH=9.18) на границе соединения реакционной камеры с герметизирующей пластиной. Критерием герметичности является отсутствие после термоциклирования следов распространения раствора красителя между пластинами микрочипового устройства.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Технология спекания

Для герметизации полимерных микрочиповых устройств широко применяются термическое связывание (или спекание), склеивание полимерными композициями, ламинирование, плазменная обработка, ультразвуковая сварка и др. [9]. В работе более подробно рассмотрены методы спекания, склеивания и химической сварки с помощью растворителей.

Для ПММА многообразие методов можно условно разделить на герметизацию при высоких, т. е. выше температуры стеклования (более 100 °C), и низких температурах (ПММА находится в стеклообразном состоянии). Процесс герметизации при повышенных температурах называется спеканием и заключается в нагревании и выдерживании соприкасающихся канализированной и защитной пластин при определенной температуре, называемой температурой спекания (T_C). Качество получаемого соединения будет зависеть от скорости нагревания, температуры и длительности нагревания, давления и тщательности подготовки поверхностей пластин. Природа спекания обусловлена характером теплового движения частиц [10, 11].

Ранее при разработке технологии спекания микрочипов из ПММА за T_C мы принимали самую низкую температуру, при которой образцы ПММА начинают деформироваться при выбранных давлении (2 кгс/см²) и времени спекания (100 мин). Для ПММА ТОСП® она составила 120 °C [12]. В данной работе при тех же условиях была измерена T_C для марки ACRYMA®72. Она также составила 120 °C. Нагревания до этой температуры было достаточно для получения неразъемного соеди-

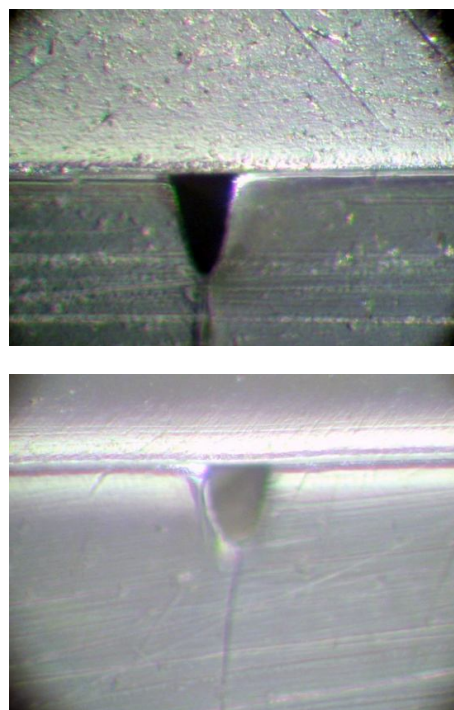


Рис. 1. Изображение сечения канала микрочипового устройства из ПММА ТОСП® после спекания при различных температурах.
а — 100 °C; б — 130 °C [12]

нения хорошего качества. При этом граница раздела между канализированной и защитной пластинами не исчезала, а оставалась достаточно заметной, что является характерным признаком данного соединения (рис. 1). По-видимому, "в этом случае происходит только перемещение небольших сегментов макромолекул, т. е. микроброуновское движение. Вероятность перехода всей макромолекулы через границу контакта чрезвычайно мала" [10].

Метод спекания был использован при изготовлении микрочиповых устройств (9 шт.) для проведения жидкостной ПЦР. Устройство состояло из трех пластин марки ACRYMA[®]72 размером 24×24×1 мм. В средней пластине сверлением было выполнено сквозное отверстие диаметром 8 мм, в верхней (защитной) — два отверстия диаметром 1.7 мм. Процесс спекания проводили при следующем режиме: температура — 120 °С; удельное давление — 2 кгс/см² и время спекания — 100 мин.

За время хранения микрочипов, изготовленных методом спекания, признаков старения или разрушения в области соединительного шва не наблюдается уже в течение трех лет.

Спекание полимерных материалов не требует такого высокого качества подготовки поверхности, как при спекании стекол, и является менее трудоемким. Достоинством метода является изготовление уже стерилизованных микроструктур, а также получение оптически прозрачного соединения. К недостаткам метода можно отнести получение неровного оплавленного дна реакционной камеры (по визуальным оценкам) за счет размягчения ПММА и диффузии на поверхность содержащегося в нем пластификатора. Существенным ограничением данной технологии является невозможность герметизации канализированных пластин со встроенными нетермостойкими функциональными элементами (например, содержащими химически "пришитый" акриламидный гель).

Технология склеивания

Одним из распространенных низкотемпературных способов соединения деталей является склеивание. Склеивание — это процесс получения неразъемного соединения деталей путем введения в технологический зазор между ними клеевой композиции, способной к отверждению. Прочность такого соединения обеспечивается за счет возникновения сил межмолекулярного взаимодействия или за счет образования химических связей между подложкой и клеем в процессе отверждения (адгезионная прочность), а также прочностью самого материала отвержденного клея (когезионная прочность) [10, 13]. Прочность клеевого соединения, как правило, не превышает 10–20 МПа

[14]. Характерным признаком клеевого соединения является наличие прослойки отвержденного клея, которая образует самостоятельную фазу.

При изготовлении микрочиповых устройств для проведения ПЦР в гелевой среде (ПЦР в геле) мы остановились на методе склеивания как наиболее технологичном и простом в реализации. Склеивание не требует применения высоких температур или давлений и является малочувствительным к присутствию на поверхности инородных частиц. При помощи специального оборудования (например, центрифуги) возможно формирование тонкой равномерной пленки клея заданной толщины. В зависимости от числа оборотов центрифуги и вязкости клеевого состава получают пленки толщиной до 1.5 мкм [15, 16]. Иногда перед склеиванием может потребоваться дополнительная обработка полимерных пластин, например снятие остаточных напряжений, очистка (обезжиривание), увеличение шероховатости поверхности (шлифовка) и пр. К недостаткам склеивания можно отнести возможность образования пустот и пузырей в области клеевого шва, а также риск засорения клеевым составом функциональных элементов микрочипового устройства.

В настоящее время известно большое количество разнообразных клеев для работы с полимерными материалами, которые производятся российскими и зарубежными компаниями. Однако требование отсутствия компонентов клея, влияющих на эффективность ПЦР, существенно ограничивает круг подходящих клеевых композиций. На основании анализа литературных данных [2, 3] и декларируемой производителем информации [17] для работы по герметизации микрочиповых устройств из ПММА был выбран однокомпонентный клей УФ-отверждения ACRIFIX[®] 1R 0192, представляющий собой прозрачный, вязкий раствор акрилового полимера. Фотоотверждение клея ACRIFIX[®] 1R 0192 происходит, по-видимому, по свободнорадикальному механизму. Под действием ультрафиолета присутствующие в клее фотоинициаторы распадаются на свободные радикалы. Далее основной компонент клея — молекулы с двойной связью C=C реагируют со свободными радикалами с образованием новых реакционно-способных радикалов. Реакция заканчивается образованием нейтральной макромолекулы полимера. Для уменьшения вязкости клеевого состава применяли разбавитель ACRIFIX[®] TC0030 того же производителя.

Проведенные исследования подтвердили предположение об отсутствии ингибирования ПЦР выбранными для склеивания материалами — клеем ACRIFIX[®] 1R 0192 и разбавителем ACRIFIX[®] TC0030 [8].

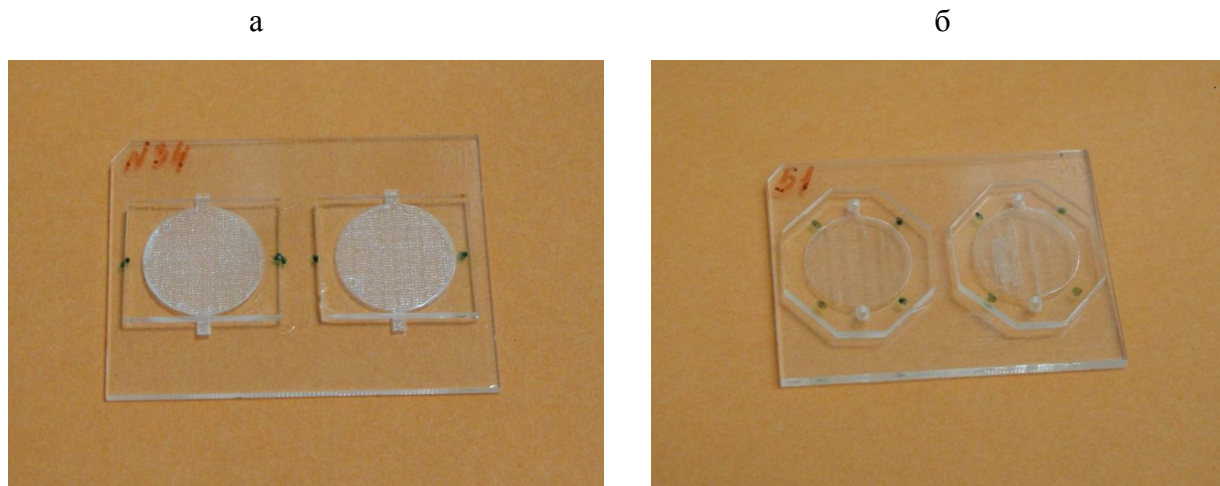


Рис. 2. Двухкамерные микрочиповые устройства для проведения ПЦР в геле с двумя вариантами исполнения защитных пластин (а) и (б). Пояснения см. в тексте

Методом склеивания были герметизированы пластины двухкамерного микрочипового устройства (рис. 2) для проведения ПЦР. Нижняя пластина микрочипов представляет собой пластину ПММА ТОСП® размером 32×24 мм и толщиной 1 мм с двумя реакционными камерами диаметром 10 мм и глубиной 200 мкм, изготовленными методом лазерной абляции. Верхние пластины — ПММА ACRYMA®72 толщиной 1 мм и размером 11×13 мм (рис. 2, а) или 14×16 мм с двумя отверстиями диаметром 1 мм (рис. 2, б).

Технология склеивания включала следующие основные операции.

1. Подготовка поверхности пластин устройства.

Верхние пластины промывали в мыльном растворе, затем в теплой дистиллированной воде и выдерживали при 80 °С в течение 1 ч в воздушном термостате (для сушки и для снятия внутренних напряжений). Нижние пластины промывали в дистиллированной воде и выдерживали в воздушном термостате при 80 °С в течение 2 ч.

2. Герметизация.

Верхнюю пластину помещали на нижнюю и в образовавшийся технологический зазор при помощи дозатора вводили клеевой раствор (при комнатной температуре). Затем отверждали клеевой раствор под действием УФ-излучения в течение 20 мин при помощи ртутной лампы ДРШ-250. Для удаления следов растворителя из зоны клеевого шва и "приработки" клеевого соединения герметизированные устройства выдерживались сутки при комнатной температуре.

При помощи данной технологии герметизации была изготовлена партия микрочиповых устройств

в количестве 140 шт., предназначенных для проведения ПЦР в геле. Реакционные камеры нижних пластин содержали слой высушенного акриламидного геля, химически (ковалентно) "пришитого" к поверхности ПММА по известной для стекла методике [18], адаптированной нами для полимерных микрочипов:

модификация поверхности [19] → силанизация → иммобилизация геля → стерилизация геля.

На стадии отверждения клеевого раствора под действием УФ-излучения гели в реакционных камерах накрывали масками.

Следует отметить, что при склеивании объем реакционной камеры увеличивается в соответствии с толщиной клеевого шва. Толщина полученного клеевого шва, измеренная с помощью микроскопа БИОЛАМ П-1, составила 40÷50 мкм при глубине реакционной камеры 200 мкм.

Использованный способ формирования клеевого слоя между канализированной и защитной пластинами позволяет обеспечить стерильные условия при герметизации микрочиповых устройств, содержащих в реакционных камерах акриламидный гель. К особенностям такого способа склеивания следует отнести необходимость подбора вязкости и вводимого объема клеевого раствора для того, чтобы он равномерно заполнил технологический зазор между пластинами за счет равновесия капиллярных сил и сил поверхностного натяжения, но не проникал в пространство реакционной камеры. Поэтому в ходе технологических работ по герметизации микрочипов мы выбрали клеевой раствор, состоящий из смеси клея ACRIFIX® 1R 0192 и разбавителя ACRIFIX® TC 0030,

взятых в соотношении 3 : 4 (по объему). Срок хранения клеевого раствора — одна неделя (при комнатной температуре).

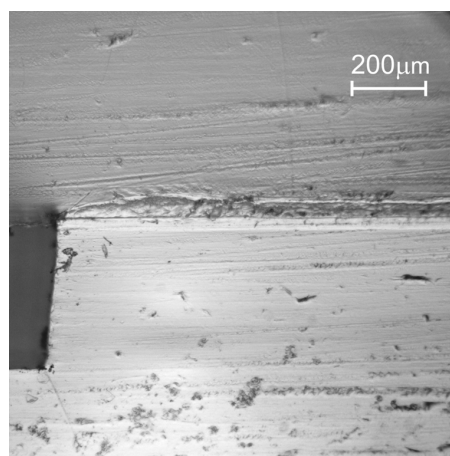
Режим термоциклирования при проведении ПЦР предполагает воздействие на клеевое соединение динамических нагрузок. Для таких условий принято полагать, что неразрушающими являются нагрузки, не превышающие 1–2 % от предельно допустимых [20]. Указанный производителем предел прочности на сдвиг для неотожженного клеевого соединения (клей ACRIFIX® 1R 0192/ПММА PLEXIGLAS®), составляет около 30 МПа [17]. Таким образом, можно принять, что при эксплуатации микрочипов допустимыми являются нагрузки, не превышающие 0.3 МПа (3 атм). При нагревании герметично заклеенных микрочипов (не заполненных жидкостью) от 20 до 95 °С происходит увеличение давления воздуха в реакционных камерах, которое, согласно расчету по уравнению состояния реальных газов, составляет 0.13 МПа (1.3 атм). Следовательно, расчетные эксплуатационные нагрузки не превышают допустимые, и можно ожидать, что предложенная технология герметизации пригодна для изготовления микрочипов из ПММА.

Следует иметь в виду, что микрочипы для ПЦР в геле в течение всего срока хранения (до одного года при температуре около +4 °С) и при проведении ПЦР находятся под воздействием воды и ее паров, что является дополнительным негативным фактором, влияющим на адгезионную прочность клеевого соединения. За время хранения микрочипов в холодильнике влага, содержащаяся в акриламидных гелях и в свободном пространстве реакционных камер над гелями, может конденсироваться в микропустотах и постепенно распространяться между слоем клея и пластинами микрочипа, образуя участки сплошной водной пленки [20]. Повышение температуры до 90–95 °С при проведении ПЦР помимо увеличения давления в реакционной камере может ускорить этот процесс, а также инициировать реакцию воды с функциональными группами в зоне клеевого шва, что в результате может привести к разгерметизации реакционных камер микрочипа и испарению ПЦР-смеси.

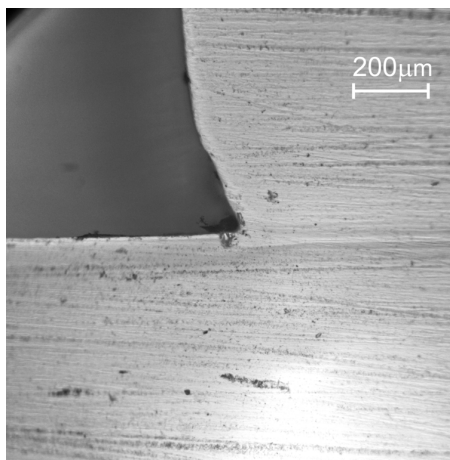
Десять микрочипов (из партии 140 шт.) были проверены на герметичность гравиметрическим методом после хранения в холодильнике от 2 недель до 4 месяцев. Убыль массы микрочипов после термоциклирования по отношению к массе введенной в реакционную камеру жидкости (с учетом поправки на влагопоглощение) не превысила 5 %, что свидетельствует о надежности клеевого соединения и пригодности разработанной технологии герметизации для изготовления микрочипов из ПММА.

Технология химической сварки растворителем

Существует разновидность способа получения неразъемного соединения полимерных материалов, которая по технологическим признакам напоминает склеивание, но отличается от него механизмом образования соединительного шва — это химическая сварка с помощью растворителей [10, 13]. Прочность такого сварного соединения достигается не только за счет действия межмолекулярных сил, но также за счет образования химических связей в зоне сварного шва. В отличие от спекания (рис. 1) и склеивания (рис. 3, а) в результате химической сварки наблюдается непрерывный структурный переход между соединяемыми материалами, т. е. межфазная граница раздела практически отсутствует (рис. 3, б).



а



б

Рис. 3. Поперечные срезы микрочипового устройства в области реакционной камеры.

а — при клеевом соединении; б — при сварном соединении (метод химической сварки метакриловой кислотой)

Для того чтобы реализовать метод химической сварки для герметизации микрочипов из ПММА в качестве растворителя была опробована метакриловая кислота $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$. Это соединение способно растворяться в поверхностном слое ПММА и делать его более пластичным, что должно приводить к понижению T_g и увеличению скорости диффузии макромолекул полимера. В то же время метакриловая кислота способна полимеризоваться и образовывать свои полимерные цепочки в зоне соединительного шва, что должно улучшать качество получаемого соединения.

Технологический процесс сварки метакриловой кислотой включал следующие основные операции.

1. Подготовка поверхности пластин устройства.

Полимерные пластины промывали в мыльном растворе, затем в теплой дистиллированной воде и высушивали при температуре 70–80 °С в воздушном термостате.

2. Герметизация.

Помещали одну пластину на другую и в образовавшийся технологический зазор вводили метакриловую кислоту (99,9 %), затем — выдерживание при температуре 60 °С в течение 1 ч. Для удаления следов метакриловой кислоты и "приработки" сварного соединения герметизированные микрочипы выдерживали сутки при комнатной температуре.

При помощи данной технологии герметизации была изготовлена партия трехслойных микрочиповых устройств (27 шт.) из ПММА ACRYMA®72, предназначенных для проведения жидкостной ПЦР. Устройство состояло из трех пластин марки ACRYMA®72 размером 24×24×1 мм. В средней пластине сверлением было выполнено сквозное отверстие диаметром 8 мм, в верхней (защитной) — два отверстия диаметром 1,7 мм.

Два микрочиповых устройства из этой партии были проверены на герметичность гравиметрическим методом и методом оптической микроскопии. Результаты испытаний свидетельствуют о том, что полученное по технологии химической сварки неразъемное соединение остается герметичным.

За время хранения микрочиповых устройств, изготовленных методом химической сварки, признаков старения или разрушения сварного шва не наблюдается уже в течение трех лет.

Метод химической сварки метакриловой кислотой подходит для соединения деталей из ПММА марки ACRYMA®72 с деталями из ПММА марок ТОСП® и ТОСН (пары

ACRYMA®72—ACRYMA®72;
ACRYMA®72—ТОСП®;
ACRYMA®72—ТОСН).

Следует отметить простоту реализации данной технологии, поскольку свойства метакриловой кислоты дают возможность точно, аккуратно и быстро (менее минуты) заполнить технологический зазор между пластинами и осуществить герметизацию без приложения избыточного давления. Достоинством также является получение оптически прозрачного соединения.

Однако применение метакриловой кислоты для изготовления микрочипов ПЦР требует проведения исследований по изучению ее влияния на эффективность ПЦР. В отличие от спекания при химической сварке необходимо введение дополнительных стадий для стерилизации внутреннего пространства реакционной камеры.

В состав метакриловой кислоты входит карбоксильная группа, содержащая "сильно поляризованные положительно водородный атом и углеродный атом, которые являются электрофильными центрами и неподеленные электронные пары двух кислородных атомов, которые являются нуклеофильными центрами" [21]. Поэтому можно предположить, что помимо способности растворяться в поверхностном слое ПММА и образовывать свои полимерные цепочки метакриловая кислота может взаимодействовать с поверхностными группами силикатного (неорганического) стекла, далее — стекла, за счет образования межмолекулярных, в частности водородных связей.

Технология склеивания ПММА с неорганическим стеклом

Основным ограничением использования полимерных материалов при изготовлении устройств для ПЦР является достаточно низкий коэффициент теплопроводности (до 0,25 Вт·м⁻¹·К⁻¹) [22] по сравнению со стеклами (до 1,3 Вт·м⁻¹·К⁻¹) [23]. Применение стекол позволяет обеспечить высокоэффективный теплообмен при проведении ПЦР. Поэтому изготовление микрочиповых устройств, сочетающих достоинства данных конструктивных материалов является актуальной задачей. В работе были проведены исследования по получению неразъемного соединения ПММА/стекло при помощи метакриловой кислоты с целью изготовления гибридных устройств.

Путем введения метакриловой кислоты в технологический зазор между деталями и последующего отжига были изготовлены две заготовки реакционных камер, дно которых было сделано из стекла, а стенки из ПММА. Стеклоянная пластина представляла собой предметное стекло (BioVitrum) размером 32×24×1 мм, полимерная — ПММА марки ACRYMA®72 размером 24×24×1 мм, в которой выполнено сквозное отверстие диаметром 8 мм. Для подготовки предметных стекол к склеиванию использовали хромовую смесь. В случае первой

заготовки в технологический зазор вводили метакриловую кислоту с добавкой 0.05 % $\text{HF}_{\text{конц}}$. Небольшое количество плавиковой кислоты было добавлено в метакриловую для разрыхления поверхностного слоя стекла и как следствие — увеличения площади и прочности соединения. Во втором случае стеклянную пластину обрабатывали метакриловой кислотой в течение 4 суток. Далее обе заготовки выдерживали при температуре 60 °С в течение часа.

После 2.5 месяцев хранения заготовок в холодильнике (при температуре 4–6 °С) и 4 месяцев — при комнатной температуре признаков нарушения контакта полимерной и стеклянной пластин не наблюдалось. Далее заготовки снова были помещены в холодильник и через 5 месяцев хранения были зафиксированы области расклеивания по периферии заготовок, составляющие около 20 % от площади "склейки" (соединяемой площади). Эти данные свидетельствуют о том, что метакриловая кислота взаимодействует как с приповерхностным слоем ПММА, так и с поверхностными группами стекла.

Вышеописанным способом было изготовлено несколько трехслойных гибридных микрочиповых устройств. В качестве нижней пластины использовано покровное стекло толщиной 170 мкм (BioVitrum), которое обрабатывали метакриловой кислотой в течение суток. В средней пластине (ПММА ACRYMA®72) сверлением было выполнено сквозное отверстие диаметром 8 мм, в верхней (ПММА ACRYMA®72) — два отверстия диаметром 1.7 мм. Один из микрочипов был проверен на герметичность гравиметрическим методом. Убыль его массы после термоциклирования по отношению к массе введенного в реакционную камеру раствора не превысила 5 %, что соответствует данному показателю для полимерных устройств и свидетельствует о герметичности полученного соединения ПММА/стекло.

Технологические исследования показали следующее.

1. В метакриловую кислоту желательно добавлять акриловый полимер, например клей ACRIFIX® 1R 0192. При этом повышается вязкость клеевого раствора и формируется клеевая прослойка между стеклом и ПММА, что позволяет герметизировать пластины, уже содержащие химически "пришитые" акриламидные гели. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании следующего клеевого состава: метакриловая кислота с добавкой 0.1 % $\text{HF}_{\text{конц}}$ и клея ACRIFIX® 1R 0192, взятые в объемном соотношении 3 : 4.

2. При изготовлении микрочиповых устройств для ПЦР желательно использовать защитные пластины толщиной около 170 мкм, поскольку более

толстые стекла (толщиной 400–450 мкм) трескаются, не выдерживая перепада температур при термоциклировании.

В результате для соединения ПММА со стеклом была предложена следующая технология склеивания.

1. Подготовка поверхности пластин устройства.

Стеклянные пластины обрабатывали в 0.5 М КОН в течение суток; затем промывали в теплой дистиллированной воде и высушивали в эксикаторе. Полимерные пластины промывали в дистиллированной воде и выдерживали при 80 °С в течение 2 ч в воздушном термостате (для сушки и снятия внутренних напряжений).

2. Герметизация.

Помещали одну пластину на другую и в образовавшийся технологический зазор вводили клеевой раствор (при комнатной температуре). Затем отверждали клеевой раствор под действием УФ-излучения в течение 60 мин при помощи ртутной лампы ДРШ-250. Далее — проводили отжиг при температуре 60 °С в течение 60 мин. Для удаления следов летучих веществ и "приработки" клеевого соединения герметизированные микрочипы выдерживали сутки при комнатной температуре.

В работе при помощи данной технологии были изготовлены шесть гибридных микрочиповых устройств, конструкция которых аналогична представленной на рис. 2, а. Поверхность полимерных пластин (ПММА ТОСП®) была обработана согласно описанной выше методике, адаптированной для химической "пришивки" акриламидного геля к поверхности ПММА (модификация поверхности → силанизация → иммобилизация геля → стерилизация геля). На стадии отверждения клеевого раствора под действием УФ-излучения гели в реакционных камерах накрывали защитными фильтрами. Верхние пластины размером 11×13 мм и толщиной 170 мкм были вырезаны стеклорезом из покровных стекол (BioVitrum).

Один из микрочипов был проверен на герметичность гравиметрическим методом. Убыль его массы после термоциклирования по отношению к массе введенного в реакционную камеру раствора не превысила 5 %. Проверка четырех устройств методом оптической микроскопии показала, что в процессе термоциклирования герметичность реакционных камер не нарушилась. Выдержавшие испытания микрочиповые устройства хранили при комнатной температуре. В этих условиях у двух из них признаков старения или разрушения клеевого соединения не наблюдается уже в течение двух лет.

Таким образом, с помощью метакриловой кислоты возможно получение неразъемного соединения ПММА/стекло, выдерживающего перепады

температур от 60 до 95 °С. Для повышения прочности соединения ПММА/стекло необходимо увеличивать количество межмолекулярных взаимодействий между поверхностными группами стекла и карбоксильной группой метакриловой кислоты. Поэтому вместо обработки поверхности стекла в щелочи можно рекомендовать обработку кислородной плазмой или раствором "пирания" (смесь 30 % раствора H_2O_2 и концентрированной H_2SO_4 в различных соотношениях).

Использование клея Permabond

В работе был также опробован еще один клей УФ-отверждения — Permabond UV630 (Permabond® Engineering Adhesives), представляющий собой многокомпонентную смесь различных полиакрилатов и полиметакрилатов. Это клей средней вязкости, имеющий адгезию к широкому кругу материалов — полимерам (в том числе к поликарбонату), стеклу и металлам. Сочетание таких свойств как прочность на сдвиг и эластичность делают его пригодным для склеивания материалов с различными коэффициентами теплового расширения. Диапазон рабочих температур составляет от –55 до 120 °С [24].

Исследования показали отсутствие ингибирования ПЦР данным клеевым составом [8]. Поэтому при помощи клея Permabond UV630, согласно описанным выше технологиям склеивания, были изготовлены два полимерных и шесть гибридных микроциповых устройств. Отверждали клей в течение 20 мин при помощи ртутной лампы ДРШ-250. Один полимерный микроцип выдержал испытания на герметичность гравиметрическим методом после хранения в холодильнике в течение трех месяцев. Остальные устройства хранили в холодильнике: полимерный микроцип — более года, гибридные микроципы — шесть месяцев. За это время признаков старения или разрушения клеевых соединений (ПММА ТОСП®) / (ПММА ACRYMA®72) и (ПММА ТОСП®) / стекло не появилось.

Таким образом, клей Permabond UV630 является подходящим и перспективным для герметизации структур в микроциповых устройствах, в том числе содержащих встроенные пористые функциональные элементы (например, иммобилизованный акриламидный гель). С его помощью возможно изготовление как полимерных, так и гибридных микроципов. Достоинством также является получение оптически прозрачного соединения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье рассмотрены способы неразъемного соединения пластин из ПММА при изготовлении

микроциповых устройств для проведения ПЦР: спекание, склеивание и химическая сварка растворителем. Реакционные камеры таких устройств оставались герметичными в условиях термоциклирования — циклического температурного режима проведения ПЦР. При длительном (от нескольких месяцев до 3 лет) хранении микроципов признаков старения или разрушения в области соединительного шва не наблюдалось.

Метод спекания был использован при изготовлении микроциповых устройств из ПММА марки ACRYMA®72 для проведения жидкостной ПЦР. На основе технологических исследований был выбран следующий режим: температура — 120 °С; удельное давление — 2 кгс/см² и время спекания — 100 мин.

Разработанная технология склеивания включала подготовку поверхности пластин микроципового устройства; введение клеевой смеси в технологический зазор между ними и отверждение клеевой смеси под действием УФ-излучения в течение 20 мин. Использовался клеевой раствор, состоящий из смеси клея ACRIFIX® 1R 0192 и разбавителя ACRIFIX® TC 0030, взятых в соотношении 3 : 4 (по объему). Методом склеивания была изготовлена партия микроциповых устройств в количестве 140 шт.

Для метода химической сварки в качестве растворителя была опробована метакриловая кислота. Этот метод подходит для соединения деталей из ПММА марки ACRYMA®72 с деталями из ПММА марок ТОСП® и ТОСН. Герметизацию пластин ПММА при изготовлении микроципов проводили при температуре 60 °С в течение 1 ч (без приложения избыточного давления). Рассмотрены возможности соединения пластин из ПММА и неорганического стекла и предложены технологии герметизации гибридных микроципов (ПММА/стекло).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nge P.N., Rogers C.I., Woolley A.T. Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications // *Chemical Reviews*. 2013. Vol. 113. P. 2550–2583. Doi: 10.1021/cr300337x.
2. Alrifaiy A., Lindahl O.A., Ramser K. Polymer-based microfluidic devices for pharmacy, biology and tissue engineering // *Polymers*. 2012. Vol. 4. P. 1349–1398. Doi: 10.3390/polym4031349.
3. Becker H., Gartner C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008. Vol. 390, no. 1. P. 89–111. Doi: 10.1007/s00216-007-1692-2.
4. Материалы: Стекло органическое листовое конструкционное [ЗАО ПКФ "Мегатакт". Дзержинск, 2005–2016]. URL: <http://megatakt.com/materialy.html> (дата

- обращения 01.02.2016).
5. ACRYMA® ХТ [Дилеры ОАО "ДОС". Нижний Новгород, 2005–2015]. URL: <http://www.acryma.ru> (дата обращения: 01.02.2016).
 6. Органическое стекло: Продукция [ФГУП НИИ полимеров. Дзержинск, 2014–2016]. URL: <http://www.nicpr.ru/ru/52/55/> (дата обращения 01.02.2016).
 7. Кулезнев В.Н., Шершнев В.А. Химия и физика полимеров: учеб. для хим.-технологических вузов. М.: Высш. шк., 1988. 312 с.
 8. Тупик А.Н. Разработка микрочиповых устройств для проведения полимеразной цепной реакции в гелевой среде. Дис. ... канд. техн. наук. СПб., 2015. 130 с.
 9. Tsao C.W., DeVoe D.L. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics // *Microfluid Nanofluid.* 2009. No. 6. P. 1–16. Doi: 10.1007/s10404-008-0361-x.
 10. Комаров Г.В. Способы соединения деталей из пластических масс. М.: Химия, 1979. 288 с.
 11. Когезия и адгезия горячего стекла / Под ред. К.С. Евстропьева. М.: Машиностроение, 1969. 175 с.
 12. Евстапов А.А., Курочкин В.Е., Лукашенко Т.А., Горный С.Г., Юдин К.В. Микрофлюидные чипы из полиметилметакрилата: метод лазерной абляции и термического связывания // *Научное приборостроение.* 2005. Т. 15, № 2. С. 72–81. URL: <http://213.170.69.26/mag/2005/full2/Art9.pdf>.
 13. Волков С.С. Сварка и склеивание полимерных материалов. М.: Химия, 2001. 376 с.
 14. Справочник технолога-оптика: Справочник. Изд. 2-е / Под ред. М.А. Окатова. СПб.: Политехника, 2004. 680 с.
 15. Букатин А.С. Разработка и исследование микрофлюидных устройств с металлическими микро и наноразмерными функциональными элементами для изучения клеток. Дис. ... канд. физ.-мат. наук. СПб., 2013. 144 с.
 16. Koschwanetz J.H., Carlson R.H., Meldrum D.R. Thin PDMS films using long spin times or tert-butyl alcohol as a solvent // *PLoS ONE.* 2009. Vol. 4, no. 2. e4572. URL: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004572> (дата обращения: 01.02.2016).
 17. Evonik Industries — Specialty Chemicals [Evonik Industries AG., Essen, Germany]. URL: <http://www.evonik.com> (дата обращения 01.02.2016).
 18. Hjerten S. High-performance electrophoresis: Elimination of electro end osmosis and solute adsorption // *Journal of Chromatography.* 1985. Vol. 347. P. 191–198. Doi: 10.1016/S0021-9673(01)95485-8.
 19. Рудницкая Г.Е., Лукашенко Т.А., Посмитная Я.С., Тупик А.Н., Евстапов А.А. Физико-химические методы модификации поверхности полиметилметакрилата для микрофлюидных чипов // *Научное приборостроение,* 2014. Т. 24, № 3. С. 22–31. URL: <http://213.170.69.26/mag/2014/full3/Art4.pdf>.
 20. Вильнав Ж.Ж. Клеевые соединения. М.: Техносфера, 2007. 384 с.
 21. Нейланд О.Я. Органическая химия: учеб. для хим. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1990. 751 с.
 22. Зверев В.А., Кривопустова Е.В., Точилина Т.В. Оптические материалы (Ч. 1): учеб. пособие для конструкторов опт. систем и приборов. СПб.: СПбГУ ИТМО, 2009. 244 с.
 23. Теплопроводность, теплоемкость, плотность и другие теплофизические свойства веществ и материалов [Thermalinfo.ru^{††} (2012–2016)]. URL: <http://thermalinfo.ru> (дата обращения: 01.02.2016).
 24. Permabond — клеи, герметики и эпоксидные смолы высшего качества. [Официальный дистрибьютор в России ЗАО "Permabond Rus", Москва, 2007–2011]. URL: <http://www.permabond.ru/> (дата обращения 01.02.2016).
- Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург** (Лукашенко Т.А., Тупик А.Н., Рудницкая Г.Е., Буляница А.Л., Цымбалов А.И., Евстапов А.А.)
- Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого** (Буляница А.Л.)
- Университет ИТМО, Санкт-Петербург** (Евстапов А.А.)
- Контакты: Лукашенко Татьяна Алексеевна, tanly@fromru.com
- Материал поступил в редакцию: 16.02.2016

THERMAL, ADHESIVE AND SOLVENT BONDING TECHNIQUES FOR POLYMER AND POLYMER-GLASS MICROCHIP DEVICE FABRICATION

T. A. Lukashenko¹, A. N. Tupik¹, G. E. Rudnitskaya¹, A. L. Bulyanitsa^{1,2},
A. I. Tsimbalov¹, A. A. Evstrapov^{1,3}

¹Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russia

²Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Russia

³ITMO University, Saint-Petersburg, Russia

The creation of analytical systems based on microchip foundation for biological, biochemical, genetic analysis is one of the modern analytical instrumentation development tendencies. Sealing is a process of the irreversible bonding formation. Usually it is a finish microchip fabrication stage. The article presents the sealing technologies, which are developing for polymethylmethacrylate (PMMA) microchip device, designed for polymerase chain reaction (PCR). Characteristic features techniques of thermal, adhesive (by the photo-polymerization optical compositions) and solvent bonding are discussed. It is shown, that solvent bonding may be applied for hybrid (PMMA-glass) microchip device irreversible sealing. Estimation criterion of the microchip device impermeability is proposed when testing by gravimetric method.

Keywords: polymethylmethacrylate, microchip device, irreversible sealing, irreversible bonding, adhesive bonding, thermal bonding, solvent bonding, gravimetric method, polymerase chain reaction

REFERENCES

1. Nge P.N., Rogers C.I., Woolley A.T. Advances in microfluidic materials, functions, integration, and applications. *Chemical Reviews*, 2013, vol. 113, pp. 2550–2583. Doi: 10.1021/cr300337x.
2. Alrifaiy A., Lindahl O.A., Ramser K. Polymer-based microfluidic devices for pharmacy, biology and tissue engineering. *Polymers*, 2012, vol. 4, pp. 1349–1398. Doi: 10.3390/polym4031349.
3. Becker H., Gartner C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, vol. 390, no. 1, pp. 89–111. Doi: 10.1007/s00216-007-1692-2.
4. Materialy: Steklo organicheskoe listovoe konstrukcionnoe [Materials: Glass organic sheet constructional]. ZAO PKF "Megatakt". URL: <http://megatakt.com/materialy.html> (accessed 01.02.2016) (In Russ.).
5. ACRYMA® XT. Dealers of OAO "DOS". URL: <http://www.acryma.ru> (accessed: 01.02.2016). (In Russ.).
6. Organicheskoe steklo: Produkcija [Organic glass: Production]. FGUP NII polimerov. URL: <http://www.nicp.ru/ru/52/55/> (accessed 01.02.2016). (In Russ.).
7. Kuleznev V.N., Shershnev V.A. Himiya i fizika polimerov: uchebnik dlya himiko-tehnologicheskikh vuzov [Chemistry and physics of polymers: the textbook for chemical and technological higher education institutions]. Moscow, Vyshaya shkola, 1988. 312 p. (In Russ.).
8. Tupik A.N. *Razrabotka mikrochipovykh ustroystv dlya provedeniya polimeraznoj cepnoj reakcii v gelevoj srede*. Diss. kand. techn. nauk [Development of microchip devices for carrying out polimerazny chain reaction in the gel environment. Cand. techn. sci. diss.]. Saint-Petersburg, 2015. 130 p. (In Russ.).
9. Tsao C.W., DeVoe D.L. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. *Microfluid Nanofluid*, 2009, no 6, pp. 1–16. Doi: 10.1007/s10404-008-0361-x.
10. Komarov G.V. *Sposoby soedineniya detalej iz plasticheskikh mass* [Ways of connection of details from plastics]. Moscow, Himiya Publ., 1979. 288 p. (In Russ.).
11. Evstrop'eva K.S., ed. *Kogeziya i adgeziya goryachego stekla* [Cohesion and adhesion of hot glass]. Moscow, Mashinostroenie Publ., 1969. 175 p. (In Russ.).
12. Evstrapov A.A., Kurochkin V.E., Lukashenko T.A., Gornyj S.G., Yudin K.V. [Microfluid chips from polymethyl methacrylate: method of a laser ablation and thermal binding]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2005, vol. 15, no. 2, pp. 72–81 (In Russ.).
13. Volkov S.S. *Svarka i skleivanie polimernykh materialov* [Welding and pasting of polymeric materials]. Moscow, Himiya Publ., 2001. 376 p. (In Russ.).
14. Okatova M.A., ed. *Spravochnik tekhnologa-optika* [Reference book of the technologist-optician. Second Edition.]. Saint-Petersburg, Politehnika Publ., 2004. 680 p. (In Russ.).
15. Bukatin A.S. *Razrabotka i issledovanie mikroflyuidnykh ustroystv s metallicheskimy mikro i nanorazmernymi funktsional'nymi ehlementami dlya izucheniya kletok*. Diss. kand. fiz.-mat. nauk [Development and research of microfluid devices with metal micro and nanotime-dimensional functional elements for studying of cages. Cand. phis.-math. sci. diss.]. Saint-Petersburg, 2013. 144 p. (In Russ.).
16. Koschwanez J.H., Carlson R.H., Meldrum D.R. Thin PDMS films using long spin times or tert-butyl alcohol as a solvent. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no 2, e4572. URL:

- <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004572> (accessed 01.02.2016).
17. Evonik Industries — Specialty Chemicals. Evonik Industries AG. URL: <http://www.evonik.com> (accessed 01.02.2016).
 18. Hjerten S. High-performance electrophoresis: Elimination of electro end osmosis and solute adsorption. *Journal of Chromatography*, 1985, vol. 347, pp. 191–198. Doi: 10.1016/S0021-9673(01)95485-8.
 19. Rudnitskaya G.E., Lukashenko T.A., Posmitnaya Ya.S., Tupik A.N., Evstrapov A.A. [Physical and chemical methods of modification of a surface of polymethyl methacrylate for microfluid chips]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2014, vol. 24, no. 3, pp. 22–31. URL: <http://213.170.69.26/mag/2014/full3/Art4.pdf> (In Russ.).
 20. Vil'nav Zh.Zh. *Kleevye soedineniya* [Glue joint]. Moscow, Tekhnosfera Publ., 2007. 384 p. (In Russ.).
 21. Nejland O.Ya. *Organicheskaya himiya: uchebnik dlya himiko-tehnologicheskikh vuzov* [Organic chemistry: the textbook for chemical and technological higher education institutions]. Moscow, Vyshaya shkola Publ., 1990, 751 p. (In Russ.).
 22. Zverev V.A., Krivopustova E.V., Tochilina T.V. *Opticheskie materialy (Ch. 1): uchebnoe posobie dlya konstruktorov opticheskikh sistem i priborov* [Optical materials (Part 1): manual for designers of optical systems and devices]. Saint-Petersburg, SPbGU ITMO, 2009, 244 p. (In Russ.).
 23. *Teploprovodnost', teploemkost', plotnost' i drugie teplofizicheskie svoystva veshchestv i materialov* [Heat conductivity, thermal capacity, density and other heatphysical properties of substances and materials]. Thermalinfo.ru^{Ti}. URL: <http://thermalinfo.ru> (accessed: 01.02.2016) (In Russ.).
 24. Permabond — klei, germetiki i ehпокsidnye smoly vysshego kachestva. [Permabond — glues, sealants and epoxies of the superior quality]. The official distributor in Russia ZAO "Permabond Rus". URL: <http://www.permabond.ru/> (accessed: 01.02.2016) (In Russ.).

Contacts: Lukashenko Tat'yana Alekseevna,
tanly@fromru.com

Article received in edition: 16.02.2016