

УДК 535.8:543.420.62;543.422.5;543.432

Термолинзовое детектирование в микрофлюидных чипах

В. С. Дудко, А. П. Смирнова, М. А. Проскурнин, А. Хибара, Т. Китамори

ВАЛЕРИЯ СЕРГЕЕВНА ДУДКО — с 2006 г. по 2010 г. студентка Химического факультета Московского Государственного университета имени М.В. Ломоносова.

АДЕЛИНА ПЕТРОВНА СМИРНОВА — кандидат химических наук, исследователь факультета инженерной механики Токийского университета (*The University of Tokyo, Department of Mechanical Engineering, Fluids Engineering Laboratory*). Область научных интересов: термолинзовая микроскопия, химические микрочипы, микро- и нанофлюидика.

МИХАИЛ АЛЕКСЕЕВИЧ ПРОСКУРНИН — доктор химических наук, доцент кафедры аналитической химии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Область научных интересов: термооптические методы анализа.

АКИХИДЭ ХИБАРА (AKIHIDE HIBARA) — доктор инженерии, профессор, руководитель лаборатории факультета наук о материалах и окружающей среде Института промышленной науки Токийского университета (*Hibara Lab., Department of Materials and Environmental Science, Institute of Industrial Science, the University of Tokyo*). Область научных интересов: микрофлюидика, оптические методы детектирования, лазерная спектроскопия, поверхности раздела и химия поверхности, биохимический анализ.

ТАКЕХИКО КИТАМОРИ (TAKENIKO KITAMORI) — доктор инженерии, профессор, руководитель лаборатории, декан Высшей инженерной школы факультет прикладной химии Токийского университета (*Department of Applied Chemistry, The University of Tokyo*). Область научных интересов: микрофлюидные системы, нано- и супрахимия, термолинзовая микроскопия.

119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, ГСП-1, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, E-mail proskurnin@gmail.com

Введение

Одним из современных направлений развития аналитической химии является миниатюризация приборов и средств химического анализа в сочетании с интегрированием всех стадий анализа (пробоотбор, пробоподготовка, разделение, концентрирование, проведение аналитической реакции и измерение аналитического сигнала) в одном малом сверхкомпактном устройстве — химическом микрочипе с каналами линейных размеров 10 мкм—1 нм [1—10]. Для названия этих устройств используют термины «микрофлюидная система», «микроаналитическая система» (*micro-Total Analysis System, μ TAS*), «интегрированная система микроанализа» или «лаборатория-на-чипе» (*Lab-on-a-Chip*). В настоящее время с помощью этих устройств решают многие задачи аналитической химии, биохимии, синтетической химии и биотехнологии [1—10]. Применение миниатюризованных интегрированных систем в практике синтеза и

анализа позволяет снизить объем реагентов, растворителей и отходов до 0,1—1 мкл и сократить время анализа на порядки по сравнению с анализом традиционными аналитическими приборами [1, 4, 5]. Принципиальными особенностями микрофлюидных систем являются совершенно другие условия массопереноса, тепlopереноса и разделения в микроканалах [6, 9]. В ряде случаев в микрофлюидных системах интегрируется и детектор, хотя обычно на самом микрочипе имеется только зона детектирования (обычно оптического) и интерфейс с внешним детектором [11—13].

При переходе от классических аналитических методов к использованию микрофлюидной системы важнейшую роль играет выбор метода детектирования — малый объем и низкие определяемые концентрации предъявляют повышенные требования как к чувствительности, так и к аппаратным возможностям методов. Поскольку объем жидкости в микрофлюидной системе обычно составляет единицы—десятки нанолитров, требуются чувствительные методы, позволяющие обна-

ружить от одной до нескольких молекул определяемого вещества, при детектировании в микрочипах. Наиболее популярны для измерения аналитического отклика в микроканале оптические методы. Поскольку глубина канала в среднем составляет 1—100 мкм, длина оптического пути довольно мала и применение традиционных методов абсорбционной спектроскопии затруднительно. Даже если определяемое соединение имеет молярный коэффициент поглощения более 10^4 , эти методы при длинах оптического пути 10 мкм—1 мм позволяют детектировать лишь высокие концентрации. В связи с этим для определения следов веществ с помощью микрофлюидной системы наиболее часто используют лазерно-индуцированную флуоресценцию, однако ее применимость ограничена флуоресцирующими веществами и их производными. Предварительные реакции дериватизации часто сложны, так что необходим высокочувствительный и обладающий широкими возможностями метод оптического детектирования. Этим требованиям отвечает термооптическая спектроскопия [12, 14, 15] — многообещающий инструмент для детектирования в микрофлюидной системе.

Термооптическая спектроскопия. Термолинзовая спектрометрия и термолинзовая микроскопия

Метод лазерной термооптической (фототермической) спектроскопии относится к молекулярной абсорбционной спектроскопии, так что он позволяет исследовать широкий круг соединений.

В основе термооптической спектроскопии лежат фотоиндуцированные изменения теплового состояния образца в результате взаимодействия электромагнитного излучения с веществом [14]. Наиболее распространенный из термооптических эффектов термолинзовый, его можно охарактеризовать как термически индуцированное изменение показателя преломления [14—22]. На этом эффекте основан метод термолинзовой спектрометрии. При воздействии на поглощающую среду луча лазера (профиль интенсивности излучения подобен кривой Гаусса) в результате локального нагрева в ней устанавливается профиль температуры, при этом максимальный нагрев наблюдается в центре луча [20, 21]. Повышение температуры приводит к изменению показателя преломления, при этом распределение показателя преломления соответствует распределению энергии излучения. Таким образом, в среде образуется оптический элемент, аналогичный по своему действию рассеивающей линзе, который называется термолинзой (тепловой линзой) [20]. Результат действия термолинзы, как и любой оптической рассеивающей линзы, — изменение расходимости лазерных лучей, т.е. при образовании термолинзы наблюдатель, смотрящий на экран, стоящий на пути луча, зафиксирует увеличение его размеров [20] (рис. 1). При коаксиальном направлении лазерных лучей образуется сферическая линза.

В термолинзовой спектрометрии сигнал регистрируют как мощность лазерного излучения, прошедшего через диафрагму, помещенную на некотором расстоя-

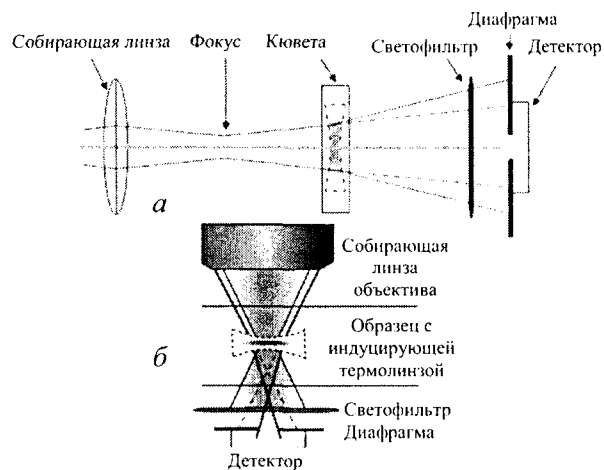


Рис. 1. Схема формирования термолинзового сигнала в кювете (а) и микрофлюидном микрочипе (б) [36]

нии после кюветы с образцом (см. рис. 1). Образующаяся линза дефокусирует лазерное излучение, и мощность в центре луча уменьшается [14].

В практике термолинзовой спектрометрии получили развитие двухлазерные оптические схемы, в которых мощный лазерный луч — индуцирующий — формирует термолинзу в анализируемой среде (и обеспечивает высокую чувствительность измерений), затем лазерное излучение отсекается светофильтром [20, 21]. Сигналом является изменение расходимости второго зондирующего луча от маломощного, но стабильного лазера, что обеспечивает высокую точность измерений. Помимо индуцирующего и зондирующего лазеров в схему измерения входят система фокусировки и сведения лучей, исследуемый объект (кювета с пробой, капилляр или поверхность), фотодетектор, система синхронизации и детектор опорного канала [14]. Система синхронизации, согласующая моменты начала образования термооптического элемента и начала измерения сигнала, как правило, состоит из электромеханического прерывателя (для модуляции луча индуцирующего лазера непрерывного действия), блока управления и фотодиода [20]. Назначение опорного сигнала — регистрация текущей мощности индуцирующего луча и нормирование сигнала для повышения точности измерений.

Термолинзовая спектрометрия позволяет работать с микроколичествами веществ в любых агрегатных состояниях, измерять оптические плотности до 10^{-8} и определять концентрации вещества на уровне 10^{-12} — 10^{-10} М [20, 21]. Чувствительность этого метода на 2—4 порядка превышает чувствительность спектрофотометрии [20]. Благодаря тому, что лазерный луч можно сфокусировать до размеров проточных капилляров, метод нашел активное применение для детектирования в микрофлюидной системе [23]. К достоинствам метода термолинзовой спектрометрии относится и относительная простота аппаратного оформления, что позволяет создавать компактные приборы [24] и использовать термолинзо-

вый спектрометр в качестве детектора в капиллярном электрофорезе [24—29] и ВЭЖХ [20, 22, 30].

Несмотря на все эти достоинства термолинзовой спектроскопии, она ограниченно применяется для работы с микрофлюидной системой [16, 31, 32]. В основном используют термолинзовую микроскопию, которая более сочетается с планарными микрофлюидными технологиями [14, 16]. Хотя способ формирования сигнала, теоретическая база и особенности инструментального оборудования для этих методов во многом совпадают, они не являются идентичными и каждый занимает свою нишу. Остановимся подробнее на особенностях термолинзовой микроскопии.

Метод разработан специально для измерения сигнала в микропространстве. Лазерное излучение перед прохождением через образец собирается и направляется посредством оптического микроскопа (рис. 2). Таким образом, микроскоп дополнительно введен в оптическую схему, характерную для термолинзового спектрометра. Принципиальным отличием этого метода является конфигурация лазерного луча в образце. Если в двухлучевой термолинзовой спектроскопии кювета с образцом располагается после фокуса (перетяжки) обоих лучей — индуцирующего и зондирующего — и под воздействием термолинзы луч зондирующего лазера расходится [33], то в термолинзовой микроскопии оба луча собираются линзой объектива и фокусируются в микропространстве канала (плоской кюветы). В отсутствие aberrаций объектива позиции фокусов лучей индуцирующего (точка развития термолинзы) и зондирующего лазеров совпадают (рис. 2А). В таком случае следует, что возникновение термолинзы не влияет на расхождение луча зондирующего лазера.

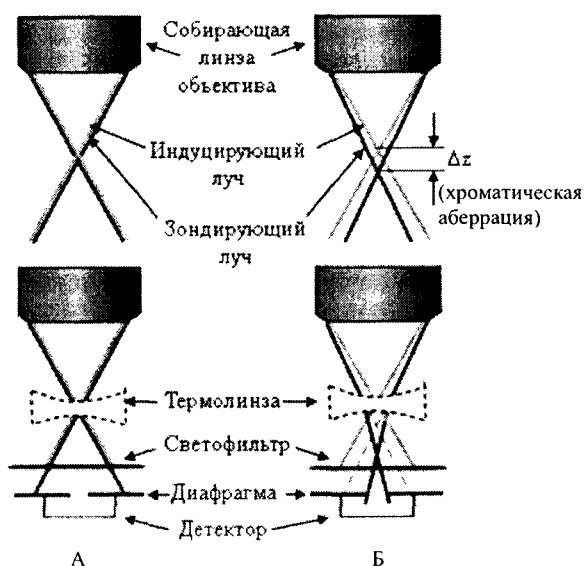


Рис. 2. Схема распространения лучей и зоны регистрации сигнала в термолинзовой микроскопии в отсутствие хроматической aberrации объектива (А) и в присутствии aberrации Δz (Б)

В объективах, предназначенных для наблюдения микрообъектов, хроматическая aberrация (Δz) полностью скомпенсирована, так что качество изображения не ухудшается. Поскольку коэффициент преломления индуцирующего лазерного луча больше, чем зондирующего, фокус индуцирующего луча располагается на 2 мкм впереди зондирующего. При такой конфигурации образующаяся термолинза «удлиняет» фокусное расстояние объектива, а луч зондирующего лазера претерпевает собирающий эффект (рис. 2Б) и результирующий сигнал увеличивается [34]. В настоящее время в термолинзовой микроскопии используют стандартные скомпенсированные объективы, а расстояние между фокусами лучей задается двухлинзовыми уширителями [35].

Таким образом, основные отличия термолинзовой микроскопии от термолинзовой спектроскопии можно сформулировать так: (1) расположение фокуса лазерных лучей в микроканале дает возможность легкой его фокусировки (по резкой картинке канала в объективе микроскопа); (2) уменьшение длины оптического пути на 2—3 порядка, приводящее к локальности термооптических эффектов; (3) уменьшение радиусов поперечного сечения лазерных лучей в образце, что позволяет проводить сканирование как в горизонтальном, так и в вертикальном направлениях; (4) собирающий эффект термолинзы за счет положения фокуса зондирующего луча за фокусом индуцирующего луча приводит к увеличению сигнала.

Оптическая схема термолинзового микроскопа

Схема термолинзового микроскопа представлена на рис. 3 [34]. Интенсивность луча индуцирующего лазера модулируется механическим прерывателем. Частота модуляции и изменение интенсивности индуцирующего луча с одинаковой периодичностью детектируются синхронным усилителем. Луч зондирующего лазера пропускается через апертуру и нейтральный светофильтр для ослабления мощности. Оба луча проходят через двухлинзовые уширители, использующиеся для точной настройки расстояния между перетяжками лучей в канале микрочипа, а также для настройки размера лучей в образце. При помощи дихроичных зеркал лучи собираются и коаксиально направляются через линзу объектива оптического микроскопа. Изображение образца можно наблюдать визуально или на мониторе компьютера через вторую линзу объектива. Образец (микрокювета или микрофлюидный чип) располагается на оптическом столике, положение которого можно варьировать по всем трем направлениям. После прохождения через образец и далее через собирающую линзу зондирующий луч отделяется от индуцирующего посредством узкополосных оптического и интерференционного фильтров. В конечном итоге, пройдя через диафрагму, несущий информацию зондирующий луч попадает на фотодиодный детектор, соединенный с синхронным усилителем. Сигнал, поступающий с усилителя, передается на плату аналого-цифрового преобразователя компьютера.

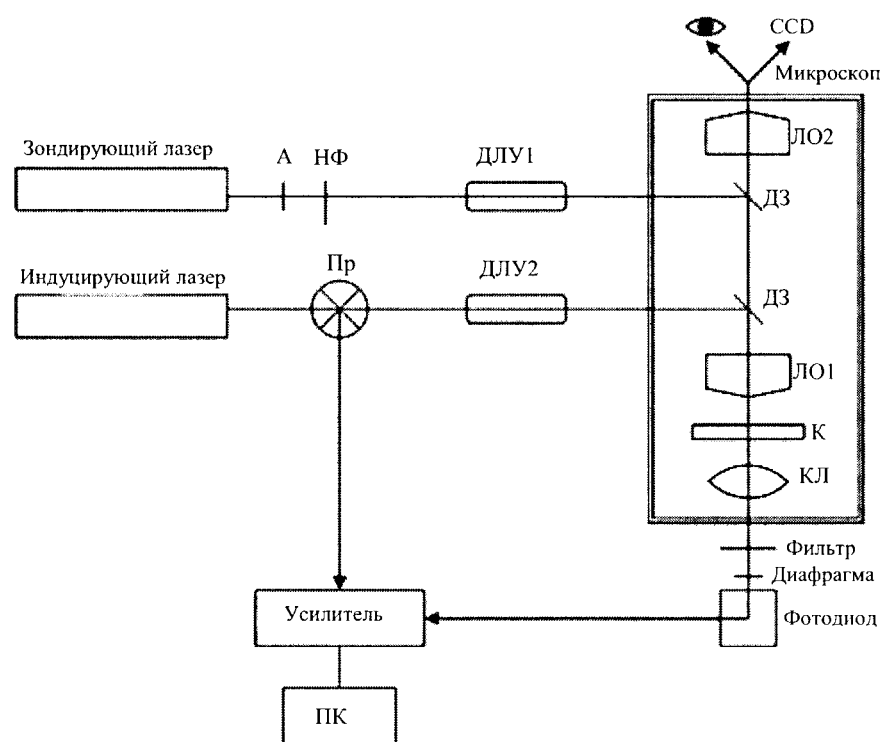


Рис. 3. Схема термолинзового микроскопа.

А — апертура, НФ — нейтральный светофильтр, Пр — прерыватель, У — усилитель, ДЛУ1 и ДЛУ2 — двулинзовые уширители, ДЗ — дихроичные зеркала, ЛО1 и ЛО2 — линзы объектива, К — образец, КЛ — собирающая линза, ПК — компьютер, CCD — монитор компьютера

ными методами анализа и с микрохроматографией [35]. Термолинзовую микроскопию используют как метод исследования реакций в микрофлюидной системе [40, 41], для анализа качества создаваемых микроканалов и микропотоков [42] и как метод детектирования в сочетании с различными методами разделения [43—46].

Современный уровень развития термолинзовой микроскопии можно охарактеризовать следующими основными направлениями применения ее в сочетании с интегрированными системами микроанализа: (1) аналитическая химия (иммуноферментные методы, капиллярный электрофорез, проточно-инжекционный анализ, экстракционные процессы, ферментативный катализ); (2) синтетическая химия (исследование процессов переноса через поверхность раздела жидкость—жидкость, изучение влияния тепловых, электрических и магнитных полей на реакции в микроканалах, полимеризация в микрочипах); (3) исследования в области биохимии клетки.

Настольный термолинзовый микроскоп

Реализация сочетания таких современных научно-технических достижений, какими являются интегрированные системы микроанализа и термооптическая спектроскопия, привела к созданию первого в мире серийно выпускаемого термооптического прибора — термолинзового микроскопа ITLM-10 (Institute of Microchemical Technology, Япония) [34], который специально предназначен для проведения количественного анализа с использованием микрофлюидных систем. Габариты прибора 650×280×550 мм, масса 2,5 кг. Этот настольный термолинзовый микроскоп обладает такими достоинствами, как повышенная чувствительность, широта применимости, а также удобство и портативность. Этот прибор начинает находить все более широкое применение как детектор для микрофлюидных аналитических систем [33, 35] и активно завоевывает рынок аналитических приборов в Японии, США и Европе.

Применение термолинзовой микроскопии

Метод термолинзовой микроскопии позволяет изучать реакции, протекающие в малых реакторах емкостью до 1 мкм³ при содержании реагентов на уровне нанogramмов, а также производить счет одиночных молекул [34—39]. Его можно сочетать с микропроточ-

Химико-аналитические задачи

Основными областями применения термолинзовой микроскопии в микрочиповом исполнении являются анализ объектов окружающей среды, клиническая диагностика, биохимический и клеточный анализ.

Одно из аналитических приложений — селективное количественное определение ионов калия и натрия [35, 40, 41]. Анализ осуществляется следующим образом. В микроканал вводится двухфазная система, в которой водная фаза содержит исследуемые ионы, а органическая фаза составлена из нескольких последовательно вводимых растворов ионофоров, селективно взаимодействующих с исследуемыми ионами и содержащих липофильный неселективный кислотно-основной индикатор. (В рассматриваемом случае реагентом на ионы калия является валиномицин, на ионы натрия — производные дибензо-16-крауна-5.) При взаимодействии ионофоров с исследуемыми ионами осуществляется экстракция последних в органическую фазу, что вызывает изменение светопоглощения индикатора, которое детектируется термолинзовым микроскопом [43].

Помимо высокой чувствительности определения, подобный метод характеризуется высокой экспрессностью, что выгодно отличает его от оптоволоконных детекторов (оптоволоконные сенсоры) [35]. Быстродействие рассматриваемого метода обусловлено малым временем

диффузии ионов в микроканалах и соответственно быстрым откликом детектора (общее время анализа 8 с [47]), тогда как из-за медленной диффузии ионов в мембране оптода отклик системы достаточно длительный. Кроме того, микровариант измерения позволяет резко сократить количества дорогостоящих реагентов. В частности, в случае определения калия и натрия минимальный объем вводимого органического раствора реагента равен 0,5 мкл, что позволяет определять субнанограммовые количества щелочных металлов. При термооптическом детектировании чувствительность определения натрия и калия повышается на порядок по сравнению с анализом в варианте оптодного детектора [4].

Термолинзовую микроскопию использовали для микропроточно-инжекционного определения L-аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот по реакции восстановления железа(III) в присутствии 1,10-фенантролина [47], а также L-адреналина и других катехоламинов по реакции окисления их периодатом натрия [48]. Предел обнаружения аскорбиновой кислоты $1 \cdot 10^{-7}$ М (абсолютное количество $3 \cdot 10^{-20}$ моль), что, как минимум, на полтора порядка ниже, чем при определении аскорбиновой кислоты методом капиллярного электрофореза с электрохимическим детектированием [41] и превосходит по чувствительности существующий фармакопейный метод [49]. Данную методику применяли для определения аскорбиновой кислоты в моче и в фармацевтических препаратах [50]. При определении катехоламинов достигнута чувствительность, равная $n \cdot 10^{-6}$ г/л, что позволяет использовать предлагаемый метод микропроточного анализа с термооптическим детектированием в клинической практике. Метод использован для определения L-адреналина, норадреналина, допамина и L-DOPA в препаратах для инъекций [48].

В последние годы проводятся работы по усовершенствованию самих аналитических методов и приборов. Можно выделить несколько основных подходов к развитию микрофлюидных систем, в частности, это модификация и модернизация микрочипов, усовершенствование методов детектирования. В рамках первого подхода модифицируют поверхность микрочипа, изменяют его форму, глубину каналов, проводят подбор материалов для изготовления микрочипа. В зависимости от поставленных задач применяют разные виды микрочипов. Для анализа веществ в основном используют микрочипы прямой и Y-образной формы. Если помимо определения необходимо провести разделение веществ, используют микрочипы более сложной геометрии.

Проводится разработка новых, все более сложных форм микрочипов с целью обеспечения возможности определения одновременно нескольких веществ [41]. В качестве примера можно привести микрочиповую систему, которая помимо многокомпонентного анализа способна выполнять до 20 микроопераций, в том числе смешивание, реакцию, экстракцию, детектирование и др. [35, 51]. Эта система представляет собой трехмерную сеть микроканалов, построенную из трех стеклянных микрочипов путем наложения их друг на друга с

последующим термическим связыванием. Такая система позволяет определять ионы Co^{2+} и Fe^{2+} одновременно в двух разных образцах растворов. Анализ состоит из пяти последовательных стадий: смешивание раствора образца с хелатообразующим реагентом; перемешивание и реакция (образование хелата); добавление второго реагента [экстрагент для Fe^{2+} и кислота для Co^{2+}]; экстракция Fe^{2+} или разложение и протонирование Co^{2+} ; определение методом термолинзовой микроскопии. Предел обнаружения $\text{Fe}^{2+} 8 \cdot 10^{-7}$ М, $\text{Co}^{2+} 2 \cdot 10^{-7}$ М.

Особый интерес представляет новый метод жидкость—жидкостной экстракции в микрочипах [46]. Экстракцию проводят в так называемом круговом микрочипе, в котором микроканалы с полусферическим профилем разной глубины имеют форму соединенных между собой концентрических окружностей (рис. 4). Одни каналы имеют гидрофобную поверхность, другие — гидрофильную, соответственно разделенные фазы удерживаются каждая в своем микроканале. В глубокий канал с гидрофильной поверхностью поступает водная фаза с экстрагируемым соединением, а в мелкий канал с гидрофобной поверхностью — органическая фаза. В качестве экстрагента, который сильно поглощает свет, обеспечивая таким образом высокую чувствительность термолинзовой микроскопии, использовали метиловый красный. Новая форма микроканалов позволяет снизить объемы пробы до уровня нанолитров.

В целом модифицирование химических микрочипов направлено на расширение их аналитических возможностей (качественный и количественный анализ, разделе-

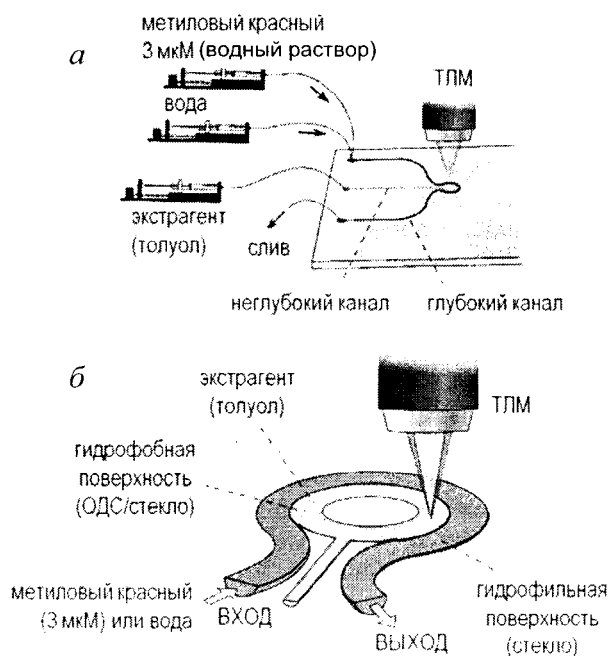


Рис. 4. Схема экспериментальной установки для жидкость—жидкостной экстракции:

а — с подсоединением микрошприцов к микрочипу; б — общий вид кругового микроканала. ТЛМ — термолинзовый микроскоп, ОДС — октадецилсилан

ние, экстракция и многие др.). На современном уровне развития микрофлюидных систем представляется реальной задача миниатюризации аналитических приборов, в том числе изготовление микрочипа с наноканалами.

Еще одно направление в развитии микрофлюидных систем — усовершенствование методов определения, в частности, создание новых комбинированных методов. Отметим, что современные исследования не ограничиваются использованием только термолинзового микроскопа в качестве детектора. За последнее время опубликовано много работ, посвященных созданию новых методов детектирования (в том числе на основе термолинзовой микроскопии) с целью улучшения характеристик метода и упрощения процесса анализа. И все же достоинства термолинзовой микроскопии позволяют выделить этот метод отдельно. Сочетание микрофлюидной системы с термооптическим детектированием существенно снижает пределы обнаружения веществ, повышает чувствительность и селективность определения по сравнению с другими методами детектирования. Как было отмечено выше, в настоящее время с помощью термолинзовой микроскопии стало возможным определять единичные частицы. В работе [52] авторам удалось разработать метод фиксации наночастиц золота на стенках микрофлюидного канала и последующего их количественного определения.

Среди новых возможностей термолинзовой микроскопии — измерение с ее помощью скоростей потока [53], сочетание с ВЭЖХ [54, 55] и капиллярным электрофорезом [40], расширение диапазона измерений в УФ область [56], сочетание с различными методами детектирования (например, флуоресцентными [40]). Примером таких работ служит создание нового метода детектирования на основе сочетания термолинзовой микроскопии и явления кругового дихроизма (зависимости коэффициента поглощения света от направления круговой поляризации) [57]. Была создана установка, позволяющая генерировать излучение с периодически меняющимся направлением круговой поляризации, что открыло возможность определять хиральные молекулы. Такой вариант термолинзовой микроскопии увеличивает чувствительность определения более, чем в 250 раз по сравнению с методом спектроскопии с эффектом кругового дихроизма. Более того, если сдвинуть длину волны индуцирующего луча из видимой области спектра в УФ область (что используется для нефлуоресцирующих, немеченых молекул [58]), то такое смещение не только улучшает характеристики метода, но и расширяет круг определяемых соединений [40].

Другие приложения термооптической спектроскопии

Среди биологических приложений термооптической спектроскопии в микрофлюидной системе можно выделить разработку микросистемы, включающей сканирующий термолинзовый микроскоп, для исследования клеточных структур [55]. Этот вариант исследования

процессов в клетке *in vivo* может быть применен к нефлуоресцирующим препаратам и не требует маркеров. Пространственное разрешение прибора до 1 мкм, декларируемое минимальное абсолютное количество определяемого соединения (цитохромов в митохондриях) 10^{-22} моль [59].

Хорошей иллюстрацией возможностей термолинзовой спектроскопии в сочетании с микрофлюидными чипами служит исследование молекулярного транспорта в трехфазной проточной системе вода—циклогексан—вода (толщина органической фазы в микроканале 64 мкм) [59]. Определены параметры распределения метилового красного в этих условиях [45]. Показано, что эксперименты подобного рода могут быть проведены только с использованием интегрированных систем микроанализа (органическая фаза в этих условиях проявляет свойства мембраны), при этом термолинзовая микроскопия позволяет работать с нефлуоресцирующими соединениями. Предложена модель молекулярного транспорта через жидкую органическую мембрану в условиях микропотоков, которая может найти применение в биохимических исследованиях [45].

Сочетание термооптической спектроскопии и интегральных систем микроанализа даст возможность проводить синтез соединений в микропотоке с детектированием образовавшихся продуктов в режиме реального времени [45]. Для этого используется двухфазная реакционная смесь, синтез осуществляется в условиях потока с образованием окрашенных продуктов реакции на границе раздела фаз, детектируются продукты, переходящие в органическую фазу. Методы сочетают высокую избирательность реакций с высокой чувствительностью детектирования. Такой метод предложено использовать для проведения реакций азосочетания [36] и алкилирования [39].

Заключение

Увлечение рекордной чувствительностью, достигаемой при термолинзовом детектировании в микрофлюидной системе, все больше уступает место изучению химических процессов, протекающих в новых условиях, и разработке новых методик. Учитывая темпы развития и совершенствования инструментальной базы термооптических методов, можно с уверенностью сказать, что термооптическая спектроскопия в ближайшем будущем будет играть еще более значимую роль в микроаналитической химии.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 09-03-92102-ЯФ_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bruin G.J.M. Electrophoresis, 2000, v. 21, № 18, p. 3931—3951.
2. Maims C., Hulme J., Fielden P.R., Goddard N.J. Sens. Actuators B: Chem., 2001, v. 77, № 3, p. 671—678.
3. Kutter J.P. Trend Anal. Chem., 2000, v. 19, № 6, p. 352—363.

4. Yi C.Q., Li C.W., Ji S.L., Yang M.S. *Anal. chim. acta*, 2006, v. 560, № 1-2, p. 1—23.
5. Min J.H., Baumann A. *J. Ind. Eng. Chem.*, 2003, v. 9, № 1, p. 1—8.
6. Mogensen K.B., Klank H., Kutter J.P. *Electrophoresis*, 2004, v. 25, № 21-22, p. 3498—3512.
7. Minteer S.D. *Microfluidic techniques: reviews and protocols*. Ed. D. Minteer Shelley. Totowa, N.J.: Humana Press, 2006, 247 p.
8. Tokeshi M., Kikutani Y., Hibara A., Sato K., Hisamoto H., Kitamori T. *Electrophoresis*, 2003, v. 24, № 21, p. 3583—3594.
9. Li P.C.H. *Microfluidic lab-on-a-chip for chemical and biological analysis and discovery*. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2006, 504 p.
10. Белецкий Б.Г., Комяк Н.И., Курочкин В.Е., Евстратов А.А., Суханов В.Л. *Научное приборостроение*, 2000, т. 10, № 2, с. 3—13.
11. Sanders G.H.W., Manz A. *Trend. Anal. Chem.*, 2000, v. 19, № 6, p. 364—378.
12. Shimizu H., Mawatari K., Kitamori T. *Anal. Chem.*, 2010, v. 82, № 17, p. 7479—7484.
13. Shimizu H., Mawatari K., Kitamori T. *Ibid.*, 2009, v. 81, № 23, p. 9802—9806.
14. Bialkowski S.E. *Photothermal spectroscopy methods for chemical analysis*. New York: Wiley-Interscience, 1996, 584 p.
15. Dovichi N.J., Harris J.M. *Anal. Chem.*, 1979, v. 51, № 6, p. 728—731.
16. Navas M.J., Jimenez A.M. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2003, v. 33, № 2, p. 77—88.
17. Dovichi N.J., Harris J.M. *Anal. Chem.*, 1981, v. 53, № 1, p. 106—109.
18. Leach R.A., Harris J.M. *Anal. chim. acta*, 1984, v. 164, p. 91—101.
19. Проскурянин М.А., Аброскин А.Г., Радущкевич Д.Ю. *Ж. аналит. химии*, 1999, т. 54, № 1, с. 91—97.
20. Проскурянин М.А., Кононец М.Ю. *Успехи химии*, 2004, т. 73, № 12, с. 1235—1268.
21. Snook R.D., Lowe R.D. *Analyst*, 1995, v. 120, № 8, p. 2051—2068.
22. Bendrysheva S.N., Proskurnin M.A., Pyell U., Faubel W. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, v. 385, № 8, p. 1492—1503.
23. Smirnova A., Proskurnin M.A., Bendrysheva S.N., Nedosekin D.A., Hibara A., Kitamori T. *Electrophoresis*, 2008, v. 29, № 13, p. 2741—2753.
24. Shen J., Snook R.D. *J. Appl. Phys.*, 1993, v. 73, № 10, p. 5286—5288.
25. Mandelis A. *Anal. Sci.*, 1990, v. 6, № 4, p. 491—503.
26. Martin-Biosca Y., Roze C., Ramis-Ramos G. *Israel J. Chem.*, 1998, v. 38, № 3, p. 169—174.
27. Shen J., Soroka A.J., Snook R.D. *J. Appl. Phys.*, 1995, v. 78, № 2, p. 700—708.
28. Shen J., Baesso M.L., Snook R.D. *Ibid.*, 1994, v. 75, № 8, p. 3738—3748.
29. Smirnova A., Shimura K., Hibara A., Proskurnin M.A., Kitamori T. *J. Sep. Sci.*, 2008, v. 31, № 5, p. 904—908.
30. Faubel W., Heissler S., Pyell U., Ragozina N. *Rev. Sci. Instrum.*, 2003, v. 74, № 1, p. 491—494.
31. Rosenzweig Z., Yeung E.S. *Appl. Spectrosc.*, 1993, v. 47, № 8, p. 1175—1179.
32. Logar J.K., Franko M. *Rev. Sci. Instrum.*, 2003, v. 74, № 1, p. 300—302.
33. Hiki S., Tokeshi M., Hibara A., Kitamori T. *Bunseki Kagaku*, 2003, v. 52, № 8, p. 569—574.
34. Proskurnin M.A., Slyadnev M.N., Tokeshi M., Kitamori T. *Anal. chim. acta*, 2003, v. 480, № 1, p. 79—95.
35. Kitamori T., Tokeshi M., Hibara A., Sato K. *Anal. Chem.*, 2004, v. 76, № 3, p. 52a—60a.
36. Ueno M., Hisamoto H., Kitamori T., Kobayashi S. *Chem. Commun.*, 2003, 8, p. 936—937.
37. Uchiyama K., Hibara A., Sato K., Hisamoto H., Tokeshi M., Kitamori T. *Electrophoresis*, 2003, v. 24, № 1-2, p. 179—184.
38. Tamaki E., Hibara A., Tokeshi M., Kitamori T. *J. Chromatogr. A*, 2003, v. 987, № 1-2, p. 197—204.
39. Smirnova A., Mawatari K., Hibara A., Proskurnin M.A., Kitamori T. *Anal. chim. acta*, 2006, v. 558, № 1-2, p. 69—74.
40. Hiki S., Mawatari K., Hibara A., Tokeshi M., Kitamori T. *Anal. Chem.*, 2006, v. 78, № 8, p. 2859—2863.
41. Sorouraddin H.M., Hibara A., Kitamori T. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, v. 371, № 2, p. 91—96.
42. Sato K., Tokeshi M., Kitamori T., Sawada T. *Anal. Sci.*, 1999, v. 15, № 7, p. 641—645.
43. Hisamoto H., Horiuchi T., Tokeshi M., Hibara A., Kitamori T. *Anal. Chem.*, 2001, v. 73, № 6, p. 1382—1386.
44. Hibara A., Nonaka M., Tokeshi M., Kitamori T. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, v. 125, № 49, p. 14954—14955.
45. Surmeian M., Slyadnev M.N., Hisamoto H., Hibara A., Uchiyama K., Kitamori T. *Anal. Chem.*, 2002, v. 74, № 9, p. 2014—2020.
46. Kikutani Y., Hisamoto H., Tokeshi M., Kitamori T. *Lab. Chip*, 2004, v. 4, № 4, p. 328—332.
47. Hisamoto H., Satoh S., Satoh K., Tsubuku M., Siswanta D., Shichi Y., Koike Y., Suzuki K. *Anal. chim. acta*, 1999, v. 396, № 2-3, p. 131—141.
48. Sorouraddin H.M., Hibara A., Proskurnin M.A., Kitamori T. *Anal. Sci.*, 2000, v. 16, № 10, p. 1033—1037.
49. Backofen U., Matysik F.M., Lunte C.E. *Anal. Chem.*, 2002, v. 74, № 16, p. 4054—4059.
50. *British Pharmacopeia*. London: HM Stationary Office, 1998; 47 and 901 p.
51. Smirnova A., Shimura K., Hibara A., Proskurnin M.A., Kitamori T. *Anal. Sci.*, 2007, v. 23, № 1, p. 103—107.
52. Kikutani Y., Mawatari K., Hibara A., Kitamori T. *Microchim. acta*, 2009, v. 164, № 3-4, p. 241—247.
53. Mawatari K., Tokeshi M., Kitamori T. *Anal. Sci.*, 2006, v. 22, № 5, p. 781—784.
54. Kikutani Y., Mawatari K., Katayama K., Tokeshi M., Fukuzawa T., Kitaok M., Kitamori T. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2008, v. 133, № 1, p. 91—96.
55. Mawatari K., Kubota S., Kitamori T. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, v. 391, № 7, p. 2521—2526.
56. Uchiyama K., Tokeshi M., Kikutani Y., Hattori A., Kitamori T. *Anal. Sci.*, 2005, v. 21, № 1, p. 49—52.
57. Yamauchi M., Tokeshi M., Yamaguchi J., Fukuzawa T., Hattori A., Hibara A., Kitamori T. *J. Chromatogr. A*, 2006, v. 1106, № 1—2, p. 89—93.
58. Yamauchi M., Mawatari K., Hibara A., Tokeshi M., Kitamori T. *Anal. Chem.*, 2006, v. 78, № 8, p. 2646—2650.
59. Tamaki E., Sato K., Tokeshi M., Sato K., Aihara M., Kitamori T. *Ibid.*, 2002, v. 74, № 7, p. 1560—1564.