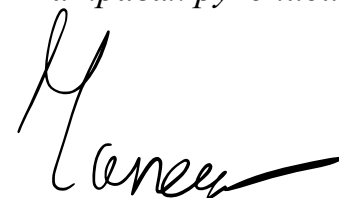


Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего  
образования  
«Южный федеральный университет»

*На правах рукописи*

**ЧАПЕК СЕРГЕЙ ВАЛЕНТИНОВИЧ**



**УСКОРЕННЫЙ СИНТЕЗ И *IN SITU* СПЕКТРАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА  
НОВЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ В МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВАХ,  
ПОЛУЧЕННЫХ АДДИТИВНЫМ МЕТОДОМ ПРОИЗВОДСТВА**

**2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы (физико-математические науки)**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
доктор физико-математических наук  
Гуда Александр Александрович

Ростов-на-Дону – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень используемых в тексте аббревиатур и сокращений .....	4
Введение.....	6
Глава 1. Обзор современного состояния проблемы .....	13
Глава 2. Методы аддитивного производства компонентов микрофлюидных систем и <i>in situ</i> структурной диагностики .....	18
2.1 УФ-видимая спектроскопия.....	22
2.2 Метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.....	25
Глава 3. Микрофлюидный синтез и <i>in situ</i> диагностика наночастиц серебра с использованием 3D печатных компонент .....	29
3.1 Методика аддитивного производства микрофлюидных систем.....	29
3.2 Исследование механических свойств 3D печатных компонент микрореакторов .....	47
3.3 Методика синтеза наночастиц серебра в микрофлюидных условиях с использованием 3D печатных компонент .....	59
Глава 4. Разработка, изготовление и апробация 3D печатных микрофлюидных устройств для <i>in situ</i> диагностики синтеза новых материалов .....	81
4.1 Методика синтеза органических соединений в МФУ и <i>in situ</i> диагностика кинетики методом УФ-видимой спектроскопии .....	81
4.2 <i>In situ</i> диагностика методом спектроскопии рентгеновского поглощения в режиме нахождение наночастиц палладия в микрофлюидных устройствах ...	89
Глава 5. Микрофлюидный синтез в капельном режиме микро- и наночастиц карбоната кальция и контроль продуктов реакции .....	101
Заключение .....	131

Список основных публикаций автора по теме исследования .....	133
Список литературы .....	136

## Перечень используемых в тексте аббревиатур и сокращений

МФУ – микрофлюидное устройство

АП – аддитивное производство

DLP (Digital Light Processing) – цифровая обработка света

СЛ – стереолитография

DLP-СЛ – цифровая стереолитография с обработкой светом

УФ-излучение – ультрафиолетовое излучение

SAXS (Small-Angle X-ray Scattering) – малоугловое рассеяние рентгеновских лучей

SANS (Small-Angle Neutron Scattering) – малоугловое рассеяние нейтронов

WAXS (Wide-Angle X-ray Scattering) – широкоугольное рассеяние рентгеновских лучей

XAS (X-ray Absorption Spectroscopy) – рентгеновская абсорбционная спектроскопия

ДРС – динамическое рассеяние света

ДРЛ – дифракция рентгеновских лучей

РЭМ – растровая электронная микроскопия

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) – протяжённая тонкая структура спектров поглощения рентгеновского излучения

XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) – структура спектра поглощения рентгеновского излучения в области края поглощения

LSPR (Localized Surface Plasmon Resonance) – локализованный поверхностный плазмонный резонанс

Микро-КТ – микро-компьютерная томография

ИПС – изопропиловый спирт

ДМФ – диметилформамид

ТЭА – триэтиламин

ТРИТЦ – тетраметилродамин

БСА – бычий сывороточный альбумин

НЧ – наночастица

МО – машинное обучение

IHS (Improved Hypercube Sampling) – улучшенный метод сэмпинга латинского гиперкуба

## Введение

**Актуальность работы.** Сложность масштабирования химических технологий, то есть переход от лабораторного синтеза материалов в малых объемах к широкомасштабному химическому производству, является одной из основных причин того, что между этими двумя фазами проходит зачастую 5-10 лет. Проблемы на этом этапе возникают из-за невозможности обеспечения условий реакций, идентичных лабораторным, возрастающая себестоимость, изменения в кинетике и термодинамике реакций при увеличении объёма, трудности в обеспечении равномерности смешения реагентов и контроля температуры. Однако, в сложных условиях настоящего времени (в условиях санкционного давления, разрывающего стратегически важные технологические цепочки в высокотехнологичном производстве в России) столь длительные сроки решения задач производства новых материалов недопустимы даже для обеспечения технологической независимости, не говоря уже об амбициозных задачах достижения технологического лидерства по ряду приоритетных для России направлений. Выполнение настоящей работы направлено на создание условий для разработки и внедрения отечественных технологий в сфере новых материалов и химии в рамках Национального проекта технологического лидерства «Новые материалы и химия». Научно значимый результат будет достигнут в первую очередь за счет внедрения развиваемой отечественной технологии ускоренной и ресурсоэффективной разработки новых материалов с использованием микрофлюидных процессов, который позволит осуществить его бесшовный трансфер в микротоннажное производство.

**Степень разработанности темы исследования.** Тема диссертации находится на стыке перспективных направлений – микрофлюидики, аддитивных технологий и функциональных наноматериалов, что делает её актуальной, однако комбинированное использование данных технологий в настоящее время изучено мало. В литературе мало внимания уделяется аттестации параметров микрофлюидных

устройств (МФУ), изготовленных методом аддитивного производства (АП), однако точные геометрические размеры каналов и неоднородности их поверхности играют важную роль в процессах смешивания и массопереноса в потоках жидкости. Недостаточно развито направление *in situ* диагностики химических реакций в МФУ, особенно рентгеновскими методами, что связано с необходимостью применения высокоинтенсивных сфокусированных пучков синхротронных источников. Наконец, особый интерес представляет собой понимание фундаментальных взаимосвязей между параметрами химической реакции и физическими свойствами получаемых материалов. Эту информацию можно получить только на основе комплексного исследования морфологии и свойств синтезированных объектов в сочетании с их *in situ* диагностикой на разных стадиях реакции.

Таким образом, в данной диссертационной работе рассматривается **актуальная проблема** физического материаловедения – одновременный контроль физико-химических условий реакционной смеси на малых пространственных масштабах (менее 0.1 мкм), с высоким временным разрешением (лучше 0.1 с), а также определение параметров локальной атомной структуры и распределения по размерам исследуемых веществ на разных стадиях реакции. **Объектом исследования** является методика прецизионного контроля физико-химических параметров реакций синтеза на наноразмерном масштабе в МФУ и *in situ* диагностики материалов на разных стадиях химической реакции. **Предметами исследования** являются компоненты микрофлюидных систем, полученные аддитивным способом производства, и адаптированные для проведения *in situ* диагностики; морфология и размеры наночастиц (НЧ) металлов, получаемых в микрофлюидных условиях; кинетика протекания реакций синтеза, полученная на основе данных спектроскопии и рентгеновского рассеяния.

Диссертация соответствует паспорту специальности 2.6.6 «Нанотехнологии и наноматериалы» (п. 1. Методы получения наноматериалов, композитных структур,

структур пониженной размерности, приборов и интегральных устройств на их основе; п. 2. Структурные, морфологические и механические свойства наноматериалов и композитных структур на их основе; п. 3. Атомно-молекулярное конструирование, самоорганизация, топологически-ориентированные, биомиметические, биофункционализированные, энергособирающие и адаптивные (самоприспосабливающиеся) наноструктуры и наноматериалы; п. 11. Диагностика наноматериалов и наноструктур; п. 12. Методы исследования наноматериалов и композитных структур).

**Цель работы:** разработка новых методов ресурсоэффективного производства новых материалов и *in situ* диагностики химических реакций в проточном микрофлюидном режиме.

**Задачи:**

- провести обзор современных методов синтеза наноматериалов в микрофлюидных системах;
- спроектировать МФУ с учетом требований к синтезу наноматериалов (геометрия каналов, смешивание реагентов, температурный контроль);
- определить погрешность и достигаемое пространственное разрешение изготовления 3D-печатных микрофлюидных реакторов технологией цифровой обработки света;
- подобрать реагенты и условия (температура, скорости потоков) для ускоренного синтеза ряда наноматериалов, в том числе композитных, на основе наночастиц металлов;
- разработать методику *in situ* диагностики в ультрафиолетово-видимой (УФ-видимой) области спектра в микрофлюидном реакторе и исследовать кинетику химических реакций в микрофлюидной системе с помощью этой методики;
- разработать методику *in situ* диагностики методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) в микрофлюидном реакторе;

- провести *ex situ* характеризацию синтезированных объектов для определения их физико-химических свойств.

Для решения поставленных задач в диссертационном исследовании использовались следующие **методы**: аддитивное изготовление микрофлюидных реакторов методом цифровой обработки светом (DLP), рентгеновская томография для диагностики геометрических размеров 3D-печатных изделий, растровая электронная микроскопия для анализа морфологии синтезированных образцов и шероховатости поверхности микрофлюидных каналов, малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (SAXS) и динамическое рассеяние света (ДРС) для анализа распределения НЧ по размерам непосредственно в растворе, УФ-видимая спектроскопия для исследования кинетики реакции синтеза, спектроскопия рентгеновского поглощения для диагностики процесса восстановления ионов металла в ходе формирования НЧ, сольвотермальные методы синтеза и коллоидный синтез НЧ.

**Научная новизна.** В работе разработан ряд новых 3D-печатных МФУ для *in situ* диагностики в области видимой и рентгеновской спектроскопии. На основе диагностики в ходе протекания реакций определены новые закономерности между параметрами синтеза и свойствами получаемых материалов. Получены патенты на методики диагностики материалов с использованием микрофлюидных ячеек. Получены данные об изменении механических свойств МФУ в ходе старения. Впервые приведены результаты скрининга НЧ серебра в ходе микрофлюидного синтеза методами УФ-видимой спектроскопии и SAXS, что позволило определить взаимосвязь условий синтеза, параметров плазмонного резонанса и размерами наночастиц.

**Практическая значимость.** Разработанные методы ускоренного синтеза в МФУ позволяют сократить время и ресурсы на оптимизацию условий получения новых функциональных наноматериалов, обеспечения высокой воспроизводимости, что важно для промышленного внедрения. В работе методами микрофлюидного

синтеза были получены новые материалы на основе наночастиц, в том числе композитные. Использование 3D-печати для создания МФУ позволило снизить стоимость и увеличить гибкость разработки, позволяя быстро адаптировать системы под новые задачи. Метод открывает возможности для создания персонализированных лабораторий-на-чипе для научных и промышленных применений. Данная диссертационная работа способствует переходу к цифровым и ресурсоэффективным технологиям в материаловедении, предлагая инструменты для быстрого прототипирования и коммерциализации наноматериалов.

В результате выполнения работы сформулированы следующие **положения, выносимые на защиту.**

Положение 1: Разработана модульная 3D-печатная микрофлюидная система и методика синтеза наночастиц серебра в сегментированном потоке под контролем *in situ* УФ-видимой спектроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния. Определена взаимосвязь между условиями синтеза и параметрами плазмонного резонанса синтезированных наночастиц. По данным SAXS получено бимодальное распределение наночастиц металла по размерам в растворе с размерами в диапазоне 3-7 нм и 17-30 нм.

Положение 2: Разработан способ спектрального контроля кинетики реакций органического и неорганического синтеза в 3D-печатных микрофлюидных реакторах с оптимальными геометриями для измерения спектров рентгеновского и УФ-видимого поглощения. При изучении восстановления ионов ацетата Pd(II) триэтиламинол дифференцированы процессы восстановления и осаждения металла в ходе движения реакционной смеси по каналу, при этом доля восстановленных атомов Pd(0) в растворе после завершения реакции составляла 0.56, а осаждённого палладия – 0.32 от общего начального количества металла при температуре 50 °С.

Положение 3: Разработана методика синтеза в капельном микрофлюидном режиме и *in situ* диагностики методом SAXS наночастиц CaCO<sub>3</sub> и композитного

материала на основе  $\text{CaCO}_3/\text{Ag}$ . Наночастицы серебра формируются на поверхности ватерита, а средний размер частиц композитного материала, синтезированных в чипе, составляет 650 нм, тогда как метод объемного синтеза позволил получить частицы с минимальным размером 900 нм. Полученные образцы характеризуются наличием пор размером от 3 до 40 нм, что подтверждает их эффективность для загрузки лекарственных препаратов антибактериальной терапии.

**Надёжность и достоверность.** Проведённое исследование сочетает лабораторные эксперименты и работу на синхротронных источниках, что в совокупности с количественной обработкой данных обеспечивает высокую точность и воспроизводимость данных. Надёжность результатов подтверждается следующими факторами:

- МФУ изготовлены методом аддитивного производства, что гарантирует точность и повторяемость геометрии каналов и минимизирует погрешности, связанные с ручным изготовлением;
- ключевые эксперименты проводились на разных установках, в том числе мега-класса, и комплиментарными методами, что подтверждает согласованность результатов (например, размер НЧ серебра оценивался методами SAXS и электронной микроскопии);
- сопоставление полученных данных с литературными источниками в рамках похожих классов объектов и реакций;
- результаты работы опубликованы в рецензируемых журналах, входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science уровня Q1, Q2, что подтверждает их научную значимость на мировом уровне и достоверность.

**Публикации.** По теме диссертации автором опубликовано 12 работ, из которых 7 научных статей в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science

и Scopus, одна глава в книге, 4 тезиса докладов в материалах международных конференций.

**Личный вклад автора** заключается в постановке задач исследований и выборе методов их решения. Автор самостоятельно разработал технологическую цепочку для создания МФУ методом 3D-печати и проводил все экспериментальные работы по изготовлению, тестированию и усовершенствованию МФУ. Автор внес определяющий вклад в эксперименты по созданию МФУ из фотополимерной смолы для *in situ* диагностики процесса синтеза наноматериалов, планировал, принимал участие в проведении и обработке данных экспериментов получения наноматериалов, разработал устройство с интеграцией оптического волокна и провёл эксперименты по диагностике реакций органического синтеза с одновременным контролем конверсии методом УФ спектроскопии. Автором работы были реализованы функциональные прототипы МФУ как для лабораторных исследований, так и для применения на источниках синхротронного излучения. Автор активно участвовал в постановке экспериментов по проведению исследований на источниках синхротронного излучения, направленных на исследование процесса синтеза металлических наночастиц в проточном режиме, композитных материалов методом SAXS.

**Объём и структура работы.** Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, включая 51 рисунок, 12 таблиц и 102 ссылки на литературные источники.

## Глава 1. Обзор современного состояния проблемы

Наночастицы (НЧ) благородных металлов находят широкое применение в промышленности, включая катализ, фотонику, доставку лекарств, медицинскую визуализацию. Их уникальные оптические свойства интересны для поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния, фотоэлектричества, молекулярного обнаружения и фототермической терапии рака [1]. В типичной процедуре металлические НЧ растут в присутствии ионов металла, восстановителя и стабилизатора. Результат восстановления, зародышеобразования и роста зависит от многих параметров, включая температуру и концентрацию реагентов. Оператор может непреднамеренно вносить изменения в стандартные протоколы, изменяя время смешивания или скорость и порядок реагентов, которые влияют на результирующее распределение размеров частиц. Подход проектирования экспериментов может помочь определить роль каждого параметра синтеза в результирующих свойствах [2], в то время как алгоритмы машинного обучения (МО) предлагают более сложную альтернативу, которая способна находить сложные зависимости в многомерных данных и применять стратегии оптимизации [3]. Несколько примеров в литературе демонстрируют успешное применение моделей МО для поиска взаимосвязей между синтезом и свойствами материала. Донг и др. рассмотрели взаимосвязи между начальной концентрацией реагентов, интенсивностью ультразвука и средним размером Ag НЧ [4] с помощью алгоритма деревьев решений. Ли и др. применили подход, основанный на данных, для ускорения синтеза небольших золотых нанокластеров [5], в то время как Чжао и др. объединили интеллектуальный анализ литературных данных и роботизированную платформу для воспроизводимого скрининга синтеза коллоидных нанокристаллов [6]. Алгоритм глубокого обучения включил в рассмотрение все параметры синтеза и помог понять сложный синтез неорганических материалов. Валь и др. представили оптимизацию, основанную на МО, для синтеза мультиэлементных металлических НЧ с целевыми структурными

свойствами [7]. Пеллегрини и др. показали, что обученные модели можно применять для подхода обратного инжиниринга [8] для поиска оптимальных параметров синтеза для желаемой характеристики  $\text{TiO}_2$  НЧ.

Классические процедуры синтеза часто ограничиваются несколькими числами образцов из-за большого количества потребляемых реагентов, а также имеют сложные проблемы распараллеливания и воспроизводимости. Химия потоков и микрофлюидика, напротив, предоставляют уникальные возможности для точного контроля смешивания и теплопередачи в крошечных объемах реагентов [9]. Такой подход позволяет создавать настраиваемые и эффективные системы для синтеза наноматериалов. Микрофлюидный подход также предлагает мощную альтернативу пакетному синтезу с точки зрения аналитики онлайн-мониторинга и само-оптимизации [10]. Для этой цели микрофлюидная система должна быть связана с надежными и эффективными методами диагностики. Будучи чувствительной к эффекту локализованного поверхностного плазмонного резонанса НЧ благородных металлов, спектроскопия в ультрафиолетовом и видимом диапазоне (УФ-видимая спектроскопия) заслуживает особого внимания. Параметры спектра поглощения зависят как от размера, так и от формы НЧ, а длина волны плазмонного резонанса может варьироваться в видимом диапазоне от 400 нм до ближней инфракрасной области при 1100 нм [11]. Это делает оптическую спектроскопию идеальным методом для лабораторной характеристики НЧ. Нгуен и др. разработали микрофлюидную серийную центрифугу и использовали спектроскопию поглощения в УФ-видимом диапазоне для эффективного скрининга синтеза НЧ Au [12]. Янг и др. применили спектроскопию в УФ-видимом диапазоне для характеристики НЧ Ag, полученных в различных режимах с помощью их нового многоступенчатого микрофлюидного реактора со встроенными бесклапанными пьезоэлектрическими насосами [13]. Благодаря чувствительности и скорости оптической спектроскопии ее можно применять *in situ* для отслеживания роста НЧ благородных металлов в режиме

реального времени, особенно в сочетании с алгоритмами оптимизации на основе МО [14]. Мекки-Беррада разработал двухэтапную структуру для высокопроизводительной микрофлюидной платформы на основе машинного обучения для быстрого производства НЧ серебра с желаемым спектром поглощения в УФ-видимом диапазоне [15]. В этой работе объединили глубокую нейронную сеть для аппроксимации спектра как функции параметров синтеза и байесовскую оптимизацию для управления микрофлюидной системой. Существующие работы в литературе также рассматривают микрофлюидный синтез квантовых точек с помощью МО и перовскитов [16]. Методы, основанные на синхротронном рентгеновском рассеянии, являются еще одним семейством методов, которые позволяют *in situ* характеризовать рост НЧ в микрофлюидном устройстве (МФУ). Радаевски и др. использовали одновременный сбор данных широко- и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (WAXS/SAXS) для исследования роста НЧ магнетита в капельном микрореакторе. Была использована двухэтапная техника обработки данных, где данные широкоугольного рассеяния рентгеновских лучей (WAXS) использовались для выбора кадров с каплями для дальнейшего анализа их кривых малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) [17]. Ланге и др. продемонстрировали, что с помощью прозрачного для рентгеновских лучей и малорассеивающего материала, такого как нестехиометрическая тиолен-эпоксидная смола, можно исследовать химические процессы прямо внутри МФУ. Примеры приложений включали исследование SAXS сегментированного потока золотых НЧ в каплях воды, экстракцию оксалата церия жидкость/жидкость в масляной фазе и исследование WAXS кристаллов оксалата церия, синтезированных в бинарном растворителе вода/пропандиол [18].

Современные методы производства МФУ включают микрообработку, горячее тиснение, травление и формование [19]. Однако эти процессы могут быть трудоёмкими, неточными, дорогими или трудными для создания сложных топологий

каналов. Более того, некоторые из них также требуют чистых помещений и других помещений для обеспечения безошибочных устройств, которые часто дороги в изготовлении и обслуживании. Именно здесь в игру вступает аддитивное производство (АП) с его доступностью и надежностью. Одной из самых надежных и универсальных технологий 3D-печати, которые можно использовать, является цифровая стереолитография с обработкой светом (DLP-СЛ). Преимущества использования 3D-печатных МФУ для синтеза продемонстрированы в недавних обзорах [20]. Гуда и др. использовали систему 3D-печатных МФУ для скрининга *in situ* синтеза НЧ Au с помощью УФ-излучения [21]. Ван дер Линден и др. продемонстрировали способность технологии DLP-СЛ производить сложные топологии 3D-микроканалов, которые в противном случае было бы трудно или почти невозможно достичь с помощью традиционных методов изготовления [22]. Простое, дешевое, но эффективное МФУ, изготовленное с использованием гибридной технологии 3D-печати, было представлено Брессаном и др. Устройство подходит для поточного синтеза НЧ Ag и Au [23]. Камарилло-Эскобедо и др. разработали 3D-печатное МФУ со встроенным спектрофотометром и беспроводным подключением и продемонстрировали его применение для анализа содержания фторида в грунтовых водах [24].

Одним из недостатков 3D-печатных систем является наличие неpassивированных функциональных групп на поверхности отвержденной смолы. Каналы 3D-печатного МФУ притягивают ионы металлов и создают дополнительные центры зародышеобразования и роста при синтезе. Синтез в каплях воды в масле помогает преодолеть эту проблему с затратами, необходимыми для синхронизации потока капель и спектральной характеристики, что часто может приводить к неприемлемому качеству данных. В этой работе продемонстрировано сочетание микрофлюидного подхода и диагностики *in situ*, применяемых для автоматизированного синтеза НЧ Ag в сегментированном потоке. Протяженные капли

представляют собой хороший компромисс для изолированного микрореактора с настраиваемой длиной, оптимальной для УФ-видимой и рентгеновской характеристики. Смешивание реагентов, объём капель и время регулируются в модульной системе, состоящей из 3D-печатных МФУ. Данные поглощения УФ-видимой области, собранные во время скрининга, позволили обучить модели МО и визуализировать оптимальные условия для синтеза НЧ с определенными свойствами. Этот подход можно легко адаптировать и масштабировать для различных реакций на основе микрофлюидики. Интеграция технологий микрофлюидики и искусственного интеллекта значительно ускорит разработку новых функциональных наноматериалов и значительно повысит эффективность исследований.

## **Глава 2. Методы аддитивного производства компонентов микрофлюидных систем и *in situ* структурной диагностики**

Концепция 3D-печати, также называемая АП, была разработана Чарльзом Халлом в 1983 году в процессе, известном как стереолитография (СЛ). АП представляет собой ряд технологий, которые позволяют производить объекты путем осаждения материала, а не вычитания, как это происходит во многих традиционных производственных технологиях, основывающихся на субтрактивном процессе, начинающемся с исходного материала [25]. Его популярность берет своё начало в способности производить компоненты геометрической сложности, которые в противном случае было бы трудно или невозможно создать с помощью традиционных производственных технологий. Это обеспечивает инновационность АП, распространяя его на множество отраслей применения в промышленности – от аэрокосмической, автомобильной, строительной до медицинской и пищевой [26].

Нельзя не отметить, что АП предлагает значительные усовершенствования производственных процессов, особенно в том, что касается воздействия на окружающую среду. Этот метод более эффективен при подаче материалов и позволяет создавать экологичные конструкции. Как правило, для АП требуется меньше энергии по сравнению с субтрактивными процессами [27].

В настоящее время существует ассортимент методов 3D-печати, начиная от хорошо зарекомендовавших себя методов, которые годами применяются в промышленных условиях, до более современных методов, разрабатываемых в исследовательских лабораториях, которые используются для более конкретных приложений. С помощью аддитивных технологий можно изготавливать детали различных размеров – от микро- до макромасштаба. Однако точность напечатанных деталей зависит от точности используемого метода и масштаба печати. Например, при 3D-печати в микромасштабе возникают проблемы с разрешением, качеством поверхности и соединением слоёв.

АП тесно связано с промышленным производством, которое производит 3D-объект путем размещения материала в слоях и управления компьютерной системой [28]. Из моделей, изначально созданных с помощью программы автоматизированного проектирования CAD (computer-aided design), путем добавления материала слой за слоем конечные компоненты часто производятся за один шаг без необходимости какой-либо дополнительной обработки. Исходный проект объекта преобразуется в файл .STL (Standard Tessellation Language или STereoLithography). Формат файла .STL, разработанный Чарльзом Халлом в компании 3D Systems, был принят в качестве золотого стандарта для передачи данных между программным обеспечением CAD и 3D-принтером. Файл .STL хранит информацию для каждой поверхности 3D-модели в виде триангулированных сечений, где координаты вершин определены в текстовом файле. Увеличивая количество треугольников, определяющих поверхность, в текстовом файле появляется больше точек данных для пространственного определения поверхности детали. Это увеличение вершин приводит к повышению разрешения печатного устройства. 3D-принтер интерпретирует цифровые координаты, полученные из файла STL, преобразуя файл в G-файл с помощью программного обеспечения-слайсера, имеющегося в 3D-принтере. G-файл делит 3D-файл .STL на последовательность двумерных (2D) горизонтальных поперечных сечений (25-100 мкм, в зависимости от технологии изготовления), что позволяет печатать 3D-объект, начиная с основания, последовательными слоями желаемого материала, по сути, создавая модель из серии 2D-слоев, полученных из исходного файла CAD. [29].

АП широко применяется во многих областях, включая фармацевтику и медицину [30]. Среди этих областей медицинское АП привело к особенно заметным улучшениям в области медицинских инструментов, протезов, имплантатов и т. д. благодаря таким преимуществам, как экономичность, возможность индивидуальной настройки и быстрое производство.

Технология DLP, которая используется с 1999 года, была изобретена в результате значительного ускорения процесса СЛ, при котором светочувствительная смола отверждается ультрафиолетовым излучением лазерного луча, при этом детали извлекаются индивидуально, по одному слою за раз. Сегодня эта доступная по цене, точная и высокоскоростная технология печати используется для всего – от создания прототипов до массового производства деталей конечного назначения, в том числе требующих высокой точности, отделки поверхности и функциональных требований [31].

В процессе DLP жидкие прекурсоры, в основном светочувствительные мономерные смолы или растворы, выборочно полимеризуются и преобразуются в затвердевшую структуру слой за слоем под воздействием излучения определенной длины волны. Разница DLP и стереолитографии (СЛ) заключается в том, что DLP использует проектор в качестве источника света и отверждает каждый слой сразу, а СЛ использует послойную печать с помощью лазерного луча. Таким образом, DLP обеспечивает гораздо более высокую скорость печати, в то время как СЛ позволяет добиться более высокого разрешения печати и качества поверхности. Однако разрыв в разрешении печати между DLP и СЛ быстро сокращается по мере совершенствования технологии DLP. Сегодня стратегия полимеризации на основе света, технология DLP, позволяет получать объекты с высоким разрешением в микрометровом масштабе [32].

АП на основе DLP-технологии стала ведущим методом производства сложных, персонализированных изделий с исключительной точностью и скоростью. Этот метод является ключевой технологией для повышения точности биопечати 3D-моделей органов. Этот подход открывает огромные перспективы для биомедицинских применений, где медицинские модели, напечатанные с помощью DLP-технологии, могут с высокой точностью воспроизводить реальные физиологические условия, что

крайне важно для точного позиционирования каркасов внутри тела и создания микроструктур тканей [33].

Для медицинского АП было разработано множество методов, таких как селективное лазерное спекание, моделирование методом осаждения из газовой фазы, электрогидродинамическая струйная печать и микрофлюидика [34]. В последнем поток жидкости в микромасштабе демонстрирует уникальные явления, которые могут быть использованы для изготовления устройств и компонентов, способных выполнять функции, полезные для биологических исследований. Благодаря точному структурному контролю, высокой производительности и удобству манипулирования компонентами, микрофлюидные технологии обладают рядом преимуществ в области медицинского АП и применяются в разработке лекарств, тканевой инженерии и создании органов на чипах.

Для *изготовления 3D-печатных устройств* использовался принтер Asiga UV MAX (Asiga, Австралия, Сидней) (рисунок 2.1, *слева*) при длине волны  $\lambda = 385$  нм и интенсивности света  $7.25$  МВт/см<sup>2</sup>.



**Рисунок 2.1** – Принтер Asiga UV MAX (*слева*) и камера Otofash G171 (*справа*)  
[35, 36]

Трехмерные модели были разработаны с использованием программного обеспечения Autodesk Netfabb (Autodesk Inc., Сан-Рафаэль, США). Компьютерные проекты были преобразованы в стандартные файлы языка тесселяции STL с помощью

программного обеспечения Asiga Composer (Asiga, Австралия, Сидней) для дальнейшего использования в процессе 3D-печати.

Основная отличительная особенность принтера – интеллектуальная система позиционирования SPS (Smart Positioning System), активно корректирующая положение платформы печати. 3D-принтер Asiga MAX UV оснащен радиометром, постоянно сообщающим управляющему компьютеру данные о точном положении платформы печати. Интеллектуальная матрица с УФ-светодиодами имеет возможность изменения светового потока в зависимости от положения платформы, для идеального времени экспозиции материала на каждом слое. Внутри корпуса принтера поддерживается необходимая температура для печати конкретным материалом.

В исследованиях использовалась коммерчески доступная смола (FunToDo Nano Clear, Алкмар, Нидерланды). Все 3D-печатные устройства были подвержены ультразвуковой очистке в изопропиловом спирте (ИПС) и продувкой сжатым воздухом, за которой следовала вторая ультразвуковая обработка в ИПС и окончательная сушка на воздухе. Наконец, 3D-печатные устройства были подвергнуты пост-отверждению короткими вспышками УФ-света в камере Otofash G171 (NK-Optik GmbH, Байербрунн, Германия) (**Ошибка! Источник ссылки не найден.** рисунок 2.1, справа).

## 2.1 УФ-видимая спектроскопия

УФ-видимая спектроскопия – широко используемый метод во многих областях науки, начиная от культивирования бактерий, идентификации лекарств и проверки чистоты и количественного определения нуклеиновых кислот и заканчивая контролем качества в производстве напитков и химическими исследованиями [37]. Это аналитический метод, который измеряет количество дискретных длин волн ультрафиолетового или видимого света, поглощаемых или пропускаемых образцом,

по сравнению с эталонным или пустым образцом. На это свойство влияет состав образца, что потенциально позволяет получить информацию о том, что содержится в образце и в какой концентрации.

Данный метод основан на принципе поглощения УФ и видимого света химическими соединениями, что приводит к образованию различных спектров, а спектры возникают из-за перехода электрона внутри молекулы из основного состояния в возбужденное состояние. Когда молекулы поглощают частоту УФ-излучения, электрон в этой молекуле переходит из основного уровня на более высокий энергетический уровень. УФ-видимый спектр поглощения зависит от молекулярной структуры. Молекулы содержат хромофор, который определяет, где и в каком количестве соединение будет поглощать свет в УФ и видимом спектрах.

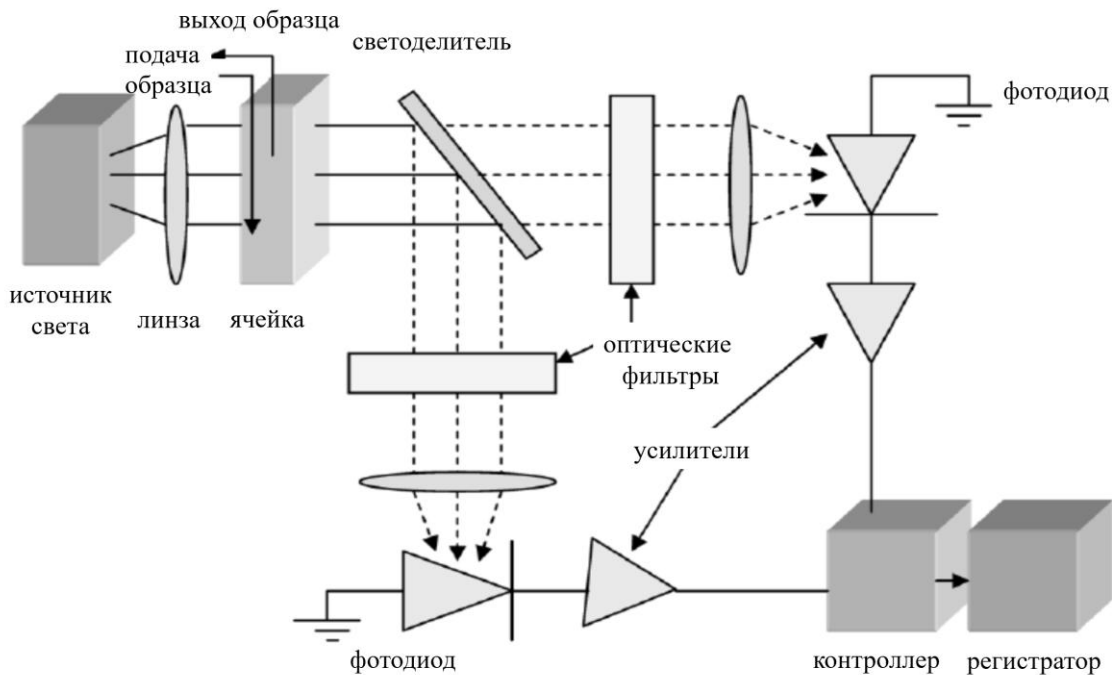
Спектроскопические измерения поглощения основаны на законе Бугера-Ламберта-Бера, определяющем ослабление параллельного монохроматического пучка света при распространении его в поглощающей среде [38]. Закон Бугера-Ламберта-Бера выражается следующей формулой:

$$I(l) = I_0 e^{-k_\lambda l}, \quad (1)$$

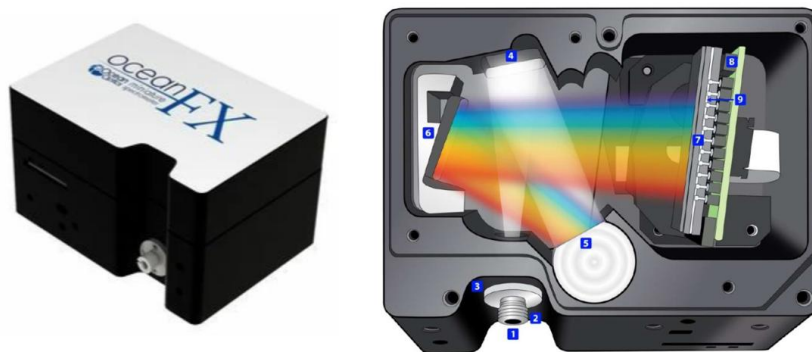
где  $I(l)$  – интенсивность света, прошедшего слой вещества толщиной  $l$ ,  $I_0$  – интенсивность света на входе в вещество,  $k_\lambda$  – показатель поглощения.

Структурная схема двухлучевого УФ-видимого анализатора представлена на рисунке 2.2 [39].

Спектры поглощения *in situ* в УФ-видимом диапазоне были получены с использованием оптоволоконного спектрометра OceanFX UV-Vis (Ocean Insight, Орландо, США) (рисунок 2.3) со временем интегрирования 35 мс и интервалом сбора данных 100 мс. В качестве источника света использовалась установка с дуговой лампой Хе.



**Рисунок 2.2** – Структурная схема двухлучевого УФ-видимого анализатора [40]



**Рисунок 2.3** – Оптоволоконный спектрометр OceanFX UV–Vis.

Общий вид прибора (слева) и его устройство (справа):

- 1 – волоконно-оптический разъем, 2 – сменная прорезь, 3 – поглощающий фильтр, 4 – коллимирующее зеркало, 5 – дифракционная решетка, 6 – фокусирующее зеркало, 7 – собирающая линза детектора, 8 – детектор, 9 – окно детектора [41]

Детектор спектрометра обладает высокой чувствительностью в УФ и ближней инфракрасной области спектра, обеспечивая отклик в диапазоне 200-1100 нм. Количество пикселей детектора – 2048. Оптическое разрешение составляет 0.80-1.33 нм, а

отношение сигнал/шум – 270:1. Время интегрирования до 1 с обеспечивает получение и обработку большего количества спектральных данных за меньшее время. Встроенный буфер хранит до 50 000 спектров и позволяет не пропустить ни одной точки во время кинетических измерений.

## **2.2 Метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей**

SAXS – рентгеновский дифракционный метод, позволяющий изучать структуры веществ, размеры которых значительно больше длины волны, и широко используемый для изучения надатомной структуры вещества [42]. Этот экспериментальный метод стал очень популярным в биологическом сообществе благодаря значительным достижениям, сделанным за последние несколько десятилетий, особенно в области сбора и анализа данных.

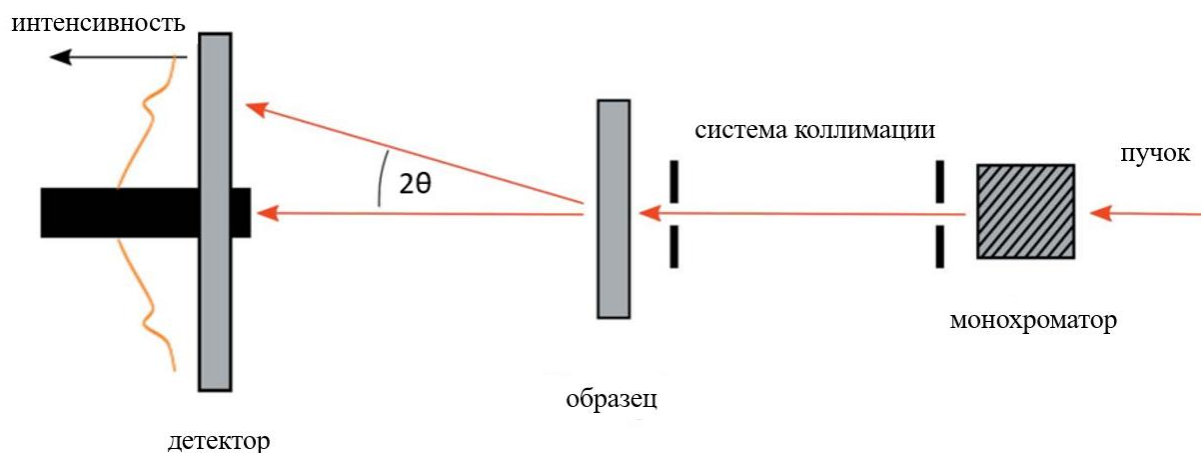
SAXS используется для исследования размеров, формы и динамики частиц и может быть применен к широкому кругу научных проблем. Он работает с широким спектром частиц, от очень маленьких, около нескольких нанометров, до структур очень большого размера, порядка микрометра. Он может быть использован для изучения смесей и эволюции формы в реакционных смесях, а также широко используется в биофизике и структурной биологии для подтверждения структур или их исследования, которые не поддаются другим методам исследования [43].

Открытие синхротронного излучения в 1947 году стало важным событием, оказавшим влияние на интерес научных групп к рентгеновским исследованиям. SAXS, особенно с использованием высокоинтенсивных синхротронных источников, является быстрым методом, а исследования с временным разрешением дают уникальную информацию о кинетике процессов и взаимодействиях. SAXS является одним из немногих методов, которые позволяют количественно характеризовать конформационную полидисперсность, в частности, полностью или частично неупорядоченных макромолекул. Достижения в области приборов SAXS за последние

годы позволили проводить высокопроизводительный структурный анализ образцов с увеличением скорости как сбора данных, так и характеристики образцов [44].

На синхротронах интенсивный рентгеновский пучок может вызвать радиационное повреждение образцов. Обычно это контролируется повторными короткими экспозициями одного и того же раствора образца во время измерения: сравнение полученных картин рассеяния быстро обнаруживает различия из-за радиационного повреждения. Различные средства далее используются для ограничения радиационного повреждения: течение образца во время сбора данных, ослабление пучка, а также специальные химические добавки к образцу.

Схема эксперимента SAXS состоит из источника рентгеновского излучения, из которого пучок проходит сквозь образец и после некоторого взаимодействия с ним попадает затем на детектор, регистрирующий угловую зависимость интенсивности излучения (рисунок 2.4) [45]. Для получения на детекторе качественной рентгенограммы, отражающей только свойства исследуемого объекта и пригодной к дальнейшему математическому анализу, необходимо соответствующим образом подготовить рентгеновский пучок с помощью дополнительных оптических элементов.



**Рисунок 2.1** – Схема эксперимента SAXS [46]

Целью малоуглового эксперимента является измерение интенсивности рассеяния  $I(s)$  при малых величинах модуля вектора рассеяния  $s = 4\pi \sin(\theta) / \lambda$ , существенно меньших, чем  $a^{-1}$ , где  $a$  – межатомное расстояние. Экспериментально определяется не амплитуда рассеяния  $A_0$ , а лишь поток рассеянной энергии или поток частиц, пропорциональный квадрату амплитуды рассеяния:

$$\frac{dW(s)}{d\Omega} = \frac{A_0^2}{r^2} I(s) \quad (2)$$

где  $\Omega$  – телесный угол. Главной задачей структурного анализа вещества является восстановление распределения рассеивающей плотности  $\varphi(r)$ , где  $r$  – вектор, соединяющий точку наблюдения с рассеивающим центром, по измеренной функции  $I(s)$ . Основным математическим аппаратом при этом служит теория фурье-преобразований.

Интеграл Фурье от интенсивности рассеяния дает свертку функции  $\varphi(r)$  с самой собой, инвертированной в начале координат. Эту функцию  $P(r)$  называют автокорреляционной функцией, а в задачах структурного анализа – функцией Паттерсона:

$$P(r) = \int I(q) \exp(-2\pi iqr) dq \quad (3)$$

Согласно приближению Гинье средний размер частицы отражается в радиусе инерции  $R_g$ :

$$I(s) = I(0) e^{-\frac{s^2 R_g^2}{3}} \quad (4)$$

где  $R_g$  – это момент инерции частицы, в котором в качестве весового коэффициента используется электронная плотность, а не масса. Радиус инерции напрямую связан с формой и размерами тела и является его важнейшей характеристикой. Условием его применимости является выражение  $sR_g \leq 1.3$ . Значение 1.3 соответствует допустимому уровню погрешности в 10%.

Из графика малоугловой кривой можно определять объем и молекулярный вес частицы [47], проведя аппроксимацию интенсивности кривой в малых углах к  $I(0)$ .

Зная функцию распределения по расстояниям  $p(r)$ , можно вычислить другие интегральные параметры, такие как интегральный радиус инерции, объем частицы, ее площадь поверхности и средний размер. Значение  $r$ , при котором  $p(r)$  обращается в нуль, и является экспериментально определяемым максимальным размером частицы, или  $D_{max}$ .

Анализируя широкоугловую часть кривой следует обратиться к асимптотике Порода. При  $s \rightarrow \infty$  справедливо:

$$I(s) = -\frac{8\pi}{s^4} \gamma'(0). \quad (5)$$

Инвариант Порода пропорционален полной энергии рассеяния и поэтому может служить характеристикой рассеивающей способности объекта

$$Q = \int_0^\infty s^2 I(s) ds. \quad (6)$$

В настоящей работе данные SAXS были получены на станции «БиоМУР» синхротронной установки НИЦ «Курчатовский институт» с использованием излучения 8.58 кэВ ( $\lambda = 1.445 \text{ \AA}$ ). Картины рассеяния были получены с помощью Pilatus-3x1M (Dectris AG, Баден-Детвилл, Швейцария). Чтобы избежать рассеяния воздуха, между образцом и детектором была установлена вакуумная камера длиной 2500 мм. Расстояние от образца до детектора и длина волны были откалиброваны с использованием стандарта бегената серебра. Картины SAXS были получены в диапазоне векторов рассеяния  $s = 0.0015$  до  $2.75 \text{ nm}^{-1}$

Полученные кривые рассеяния были радиально проинтегрированы с помощью программного обеспечения Fit2D, 1D-картины рассеяния были нормализованы по времени экспозиции и току накопительного кольца, затем был вычтен фоновый сигнал. Последующая обработка данных производилась с помощью ряда программ из пакета ATSAS.

## Глава 3. Микрофлюидный синтез и *in situ* диагностика наночастиц серебра с использованием 3D печатных компонент

### 3.1 Методика аддитивного производства микрофлюидных систем

Визуализация МФУ рассматривается для изучения морфологии поверхности микрофлюидных каналов и оценки качества технологии 3D-печати на основе DLP. Визуализация осуществляется методом рентгеновской микротомографии (микро-КТ) с использованием различных контрастных агентов на основе йода и методом растровой электронной микроскопии (РЭМ). Показано, что визуализация методом микро-КТ позволяет контролировать качество печати устройств относительно геометрических параметров моделей, заданных на этапе прототипирования устройств, а также визуализировать 3D-модель микрофлюидных каналов и морфологию поверхности. Пространственное разрешение РЭМ превышает размер пикселя печати и позволяет уточнить наличие локальных дефектов, вызванных неравномерным затвердеванием смолы при промывке образцов.

Микрофлюидика – это современная многопрофильная область исследований, которая возникла на стыке физики, химии, биологии, микрогидродинамики, микроэлектроники и материаловедения. В МФУ объемы и потоки жидкостей малы (в субмиллиметровом диапазоне), что позволяет контролировать рабочие объемы с точностью до пиколитров. Эти устройства могут использоваться в химии, медицине, фармацевтике, биологии и других областях исследований и технологий [48] МФУ могут использоваться для контролируемого смешивания компонентов химических реакций, а также разделения или обнаружения примесей. В зависимости от их функциональных особенностей МФУ могут использоваться как микрореакторы [49] лабораторные чипы и органы-на-чипе [50].

По мере развития аддитивных технологий традиционные подходы к изготовлению МФУ (микрофрезерование, микролитье, горячая штамповка и литье

под давлением), которые считались «золотым стандартом» в течение 30 лет, стали неактуальными. Упомянутые выше методы имеют некоторые недостатки, такие как трудоемкие и дорогостоящие процессы и сложность изменения конструкции. Более того, часто требуются «чистые помещения», что подразумевает соответствующие сложности производства [48].

3D-печать может кардинально изменить подходы к изготовлению МФУ. Следующие аддитивные технологии широко используются для прототипирования и производства МФУ: стереолитография (СЛ), DLP (разновидность стереолитографии), моделирование методом послойного наплавления и струйная 3D-печать. Однако, метод DLP в настоящее время является предпочтительным для 3D печати МФУ.

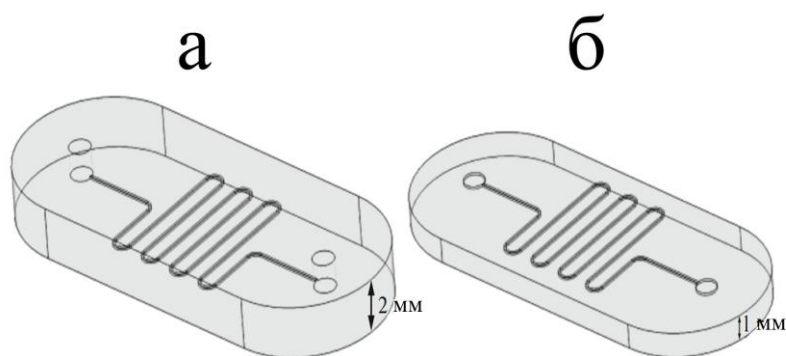
Чтобы уменьшить количество реагентов, увеличить удельную поверхность смешивания жидкостей и уменьшить инерцию нагрева, исследователи стремятся уменьшить диаметр каналов МФУ. В масштабе 10-100 мкм пространственное разрешение метода печати существенно влияет на геометрию каналов и шероховатость поверхности стенки, что, в свою очередь, влияет на гидродинамические характеристики потоков жидкости.

Обычный метод оптической микроскопии позволяет изучать планарную структуру каналов МФУ, тогда как визуализация внутреннего объема каналов и исследование морфологии внутренних стенок каналов затруднены. Проникающая способность рентгеновского излучения позволяет изучить трехмерную структуру микрофлюидных каналов с использованием соответствующего контрастного агента. Однако, несмотря на широкое применение рентгеновской микротомографии для изучения структуры микромасштабных объектов, включая микроканалы в различных геологических объектах [51], этот метод редко применяется для визуализации каналов МФУ. Так, рентгеновская томография была использована в [52] для изучения интерфейсов жидкость-жидкость и жидкость-газ в тонких капиллярных трубках (поперечное сечение в несколько миллиметров). Применяя томографию, 3D-печатные

МФУ с поперечным размером каналов  $\sim 400$  мкм были использованы для изучения процесса образования тромбов в кровеносных сосудах [53].

В данной работе проведена двух- и трехмерная визуализация МФУ с прямоугольными каналами поперечным сечением 125 и 500 мкм с помощью рентгеновской компьютерной томографии с различными контрастными агентами. Изучается морфология поверхности микрофлюидных каналов и оценивается качество 3D-печати МФУ. Полученные данные сравниваются с визуализацией РЭМ поверхности боковых стенок микрофлюидных каналов.

В качестве модели для изучения поверхностной морфологии микрофлюидных каналов был выбран меандровый микромиксер (рисунок 3.1, (а)), который является наиболее распространенной топологией МФУ.



**Рисунок 3.1** – 3D-модели МФУ в геометрии меандра на этапе прототипирования: (а) МФУ с закрытым каналом для КТ-визуализации и (б) МФУ с открытым каналом для РЭМ-визуализации

Было спроектировано и изготовлено МФУ с закрытым каналом для исследований методом микро-КТ; для исследования РЭМ были подготовлены МФУ с открытым каналом (рисунок 3.1, (б)).

3D-модель МФУ, состоящая из корпуса и канала квадратного сечения, была спроектирована с использованием системы автоматизированного проектирования Fusion 360 (Autodesk, США). В таблице 3.1 приведены основные параметры МФУ.

**Таблица 3.1** – Размеры корпуса и внутренних каналов МФУ указываются при создании 3D-модели устройства

Образец МФУ	X×Y×Z, мм	Размер поперечного сечения канала, мкм	Длина канала, мм	Объем канала, мл	Покрывающий слой
РЭМ	19×8×1	124	52	0.06	нет
Микро-КТ	19×8×2	124	52	0.06	да
Микро-КТ	24×8×2	500	52	0.24	да

В таблице 3.2 представлены основные параметры 3D-печати для обеих моделей МФУ.

**Таблица 3.2** – Параметры 3D-печати исследуемых МФУ

Образец МФУ	Высота слоя, мкм	Время экспозиции одного слоя, с	Время экспозиции двух слоев, с	Скорость отрыва платформы, мм/с	Интенсивность УФ-лампы, %	Время печати, мин
РЭМ	25	20	1	10	95	6
Микро-КТ	25	20	1	10	95	10
Микро-КТ	25	20	1	10	95	10

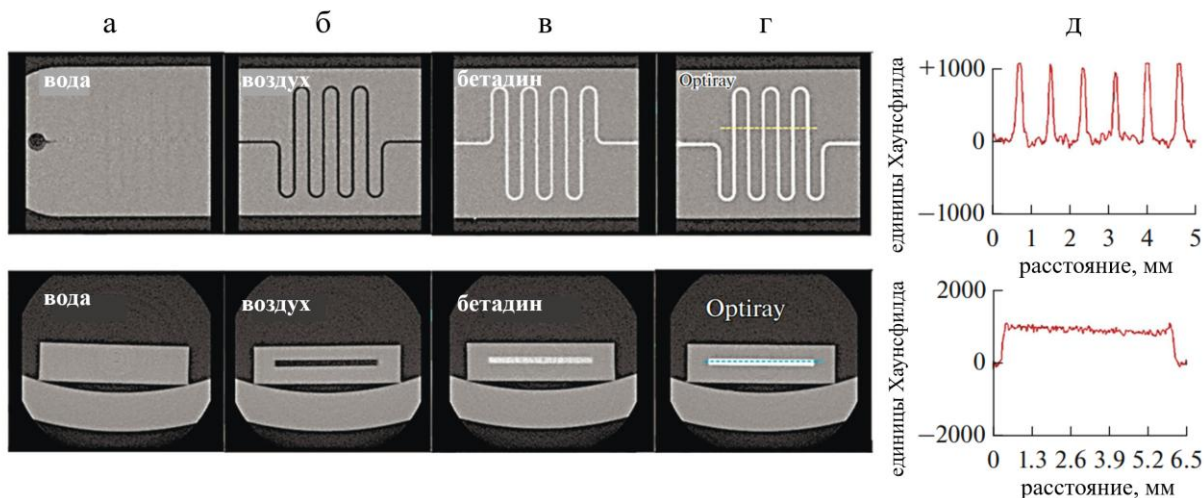
Следует отметить, что оптимальная скорость отделения платформы была найдена экспериментально. Она влияет на равномерность распределения незатвердевшей фотополимерной смолы внутри канала и качество верхней поверхности микрофлюидного канала. Получение МФУ производилось в соответствии с описанием в главе 2.

Микро-КТ МФУ проводилась с использованием аппарата Quantum GX microCT (Perkin Elmer, США) с напряжением рентгеновской трубки 90 кВ и силой тока 88 мкА. Сканирование проводилось в разных режимах с различным разрешением. При наилучшем разрешении размер вокселя составлял 20 мкм, вращение гантри – 360°

(изображение получалось в 427 проекциях), а время накопления данных – 14 мин для одного измерения. Для улучшения контрастности и качества визуализации границ, объема и морфологии поверхности микрофлюидных каналов использовались контрастные жидкости на основе йода: Betadine (фармацевтически доступен на 10% растворе йода) и Optiray (Mallinckrodt, Канада) с концентрацией йода 350 мг/мл (при заполнении каналов Optiray разбавлялся дистиллированной водой в соотношении 1:10). Optiray – контрастный агент на основе органически связанного йода, используемый для микро-КТ-визуализации живых организмов. Реконструкция 3D-изображений проводилась с помощью программного обеспечения RadiAnt путем анализа набора проекций, полученных при микро-КТ-визуализации.

Морфология стенок микрофлюидных каналов визуализировалась методом РЭМ с использованием микроскопа Teneo (FEI, США), предоставленного компанией ООО SMA. Для проведения измерений образцы наносились на углеродную ленту; на поверхность образца предварительно наносилось золото для нейтрализации электростатического заряда. Давление в рабочей камере микроскопа понижалось до значений  $10^{-3}$  Па в режиме высокого вакуума. Ускоряющее напряжение и ток электронного пучка составляли 10 кВ и 0.01 нА соответственно. Для получения изображений использовался детектор обратно рассеянных электронов ETD (детектор Эверхарта-Торнли).

МФУ визуализировались с помощью сканирующей микро-КТ с разрешением вокселей 20 мкм. Интересно, что каналы МФУ можно визуализировать даже без контрастного агента (рисунок 3.2, (б)) из-за существенной разницы в коэффициентах поглощения излучения  $\mu$  воздуха ( $-1000$  HU, единиц Хаунсфилда) и смолы, применяемой для 3D-печати ( $-6.4 \pm 7.1$ ).

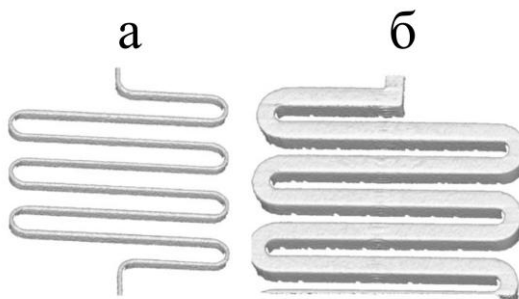


**Рисунок 3.2** – 2D-визуализация в виде сверху и сбоку для МФУ с поперечным сечением каналов, равным 124 мкм, заполненных: (а) дистиллированной водой, (б) воздухом, (в) бетадином, (г) Optiray; (д) распределение рентгеновской плотности вещества в МФУ, заполненном контрастным веществом на основе Optiray, для серии поперечных сечений (вдоль линии в верхней части рисунка 3.2 (г)) и продольного сечения канала (вдоль линии в нижней части рисунка 3.2 (г))

Далее канал МФУ заполнялся йодсодержащими растворами для достижения более четкой визуализации. На рисунке 3.2 (в, г) показаны результаты визуализации, полученные при заполнении МФУ бетадином (спиртовым раствором йода) и коммерческим контрастным веществом Optiray на основе органически связанного йода, используемым в качестве контраста в клинических исследованиях. На рисунке 3.2 (д) показано распределение рентгеновской плотности вещества при заполнении МФУ контрастом на основе Optiray по поперечному (верхняя часть) и продольному (нижняя часть) сечениям каналов. Приведенные данные позволяют оценить равномерность заполнения канала контрастным веществом и количественно определить геометрические параметры исследуемых МФУ. Таким образом, продольное сечение канала составляет около 6 мм, а усредненный характерный

размер поперечных сечений составляет  $\sim 110 \pm 20$  мкм, что соответствует заданным параметрам печати МФУ с заданным сечением каналов 124 мкм (таблица 3.2).

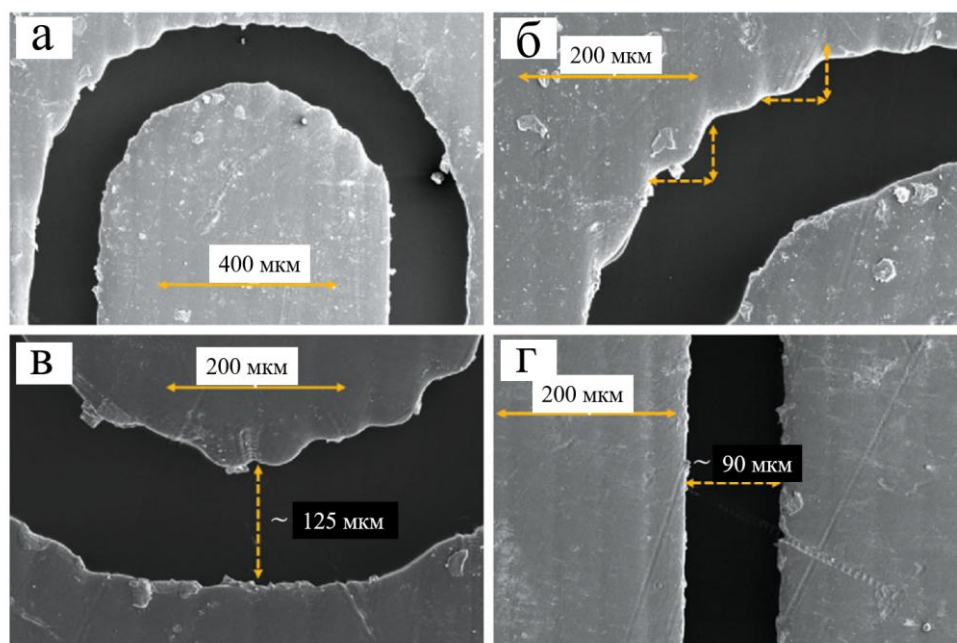
Далее была проведена 3D-реконструкция МФУ с сечением каналов 124 и 500 мкм, заполненных контрастным веществом Optiray (рисунок 3.3).



**Рисунок 3.3** – Результаты 3D-реконструкции МФУ с поперечным сечением 124 (а) и 500 (б) мкм, заполненных контрастным веществом Optiray. Размер вокселя составил 20 мкм для серии двумерных проекций, использованных для реконструкции

Видно, что результаты микро-КТ-визуализации и реконструкции 3D-изображений позволяют устанавливать особенности морфологии поверхности микрофлюидных каналов. Поверхность боковых стенок каналов сечением 500 мкм более абразивна по сравнению с вертикальными поверхностями, вероятно, из-за того, что разрешение печати по слою, образующему боковые стенки каналов, составляет  $25 \times 62$  мкм, а разрешение печати по слою, образующему горизонтальные плоскости, составляет  $62 \times 62$  мкм, т. е. более высокая абразивность обусловлена более мелким разрешением печати в горизонтальной плоскости.

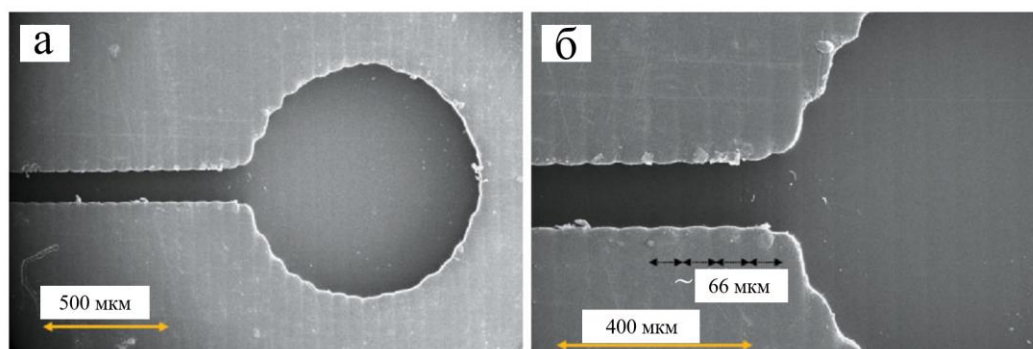
МФУ с размером поперечного сечения 124 мкм были изучены с помощью РЭМ. На рисунке 3.4 показаны различные структурные единицы исследуемого МФУ.



**Рисунок 3.4** – РЭМ-изображения боковых стенок канала для МФУ топологии меандра: (а) петля канала, увеличение 400×; (б, в) петля канала, увеличение 800×; (г) прямой участок канала

Как показано на рисунке 3.4 (б), размер поперечного сечения прямого канала часть и область петли варьируются от 90 до 125 мкм соответственно. Результаты визуализации демонстрируют различную степень неоднородности поверхности боковых стенок канала по внешнему и внутреннему радиусам изгиба. Стрелками на рисунке 3.4 (б) обозначены выступы с размером, близким к заданному размеру пикселя 62.4 мкм в плоскости XY.

Более и менее выраженные неоднородности на изгибах канала могут быть связаны с неравномерной промывкой (удалением остатков жидкой смолы из полости канала) и неравномерным затвердеванием смолы. Этот эффект отчетливо наблюдается при визуализации входного порта круглого МФУ (рисунок 3.5): боковая стенка с правой стороны отверстия кажется более плоской.



**Рисунок 3.5** – РЭМ-изображения входного порта МФУ с увеличениями 200× (а) и 400× (б). Темные сегменты обозначают слои печати по оси X. Средний размер пикселя по оси X составляет 66 мкм, что соответствует заданным параметрам печати (таблица 3.2)

Некоторые включения наблюдаются во внутренней части канала (рисунок 3.4 (а, в)). Эти включения могут быть объяснены как загрязнением МФУ с открытыми каналами, так и появлением центров кристаллизации при затвердевании смолы. Из визуализации входного порта (рисунок 3.5(б)) отчетливо видны неоднородности и микротрещины в боковой стенке канала; также наблюдается пикселизированный характер печати. Усредненный размер пикселя по оси X ~66 мкм был оценен с использованием изображения РЭМ при 400-кратном увеличении.

Следует отметить, что РЭМ позволяет проводить более подробный анализ и контроль качества печати МФУ, полученных с помощью технологии DLP 3D-печати. Однако эта методика ограничена тем, что МФУ закрытого типа необходимо разрезать, что неизбежно приведет к дополнительным деформациям и анализу морфологии стенок. Это сделает РЭМ-визуализацию более необъективной. Однако рентгеновская компьютерная томография применима для визуализации закрытых МФУ. Более того, при формировании стационарных потоков микро-КТ-диагностика может применяться для изучения процесса микрогидродинамики и для обеспечения трехмерной визуализации смешивания в микрофлюидных каналах.

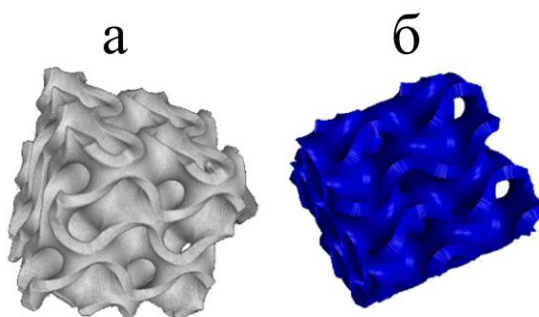
Таким образом была разработана методика визуализация МФУ, изготовленных методом DLP 3D-печати, при помощи рентгеновской микро-КТ-томографии и РЭМ. В первом случае структуру каналов можно визуализировать даже без контрастных агентов из-за достаточной контрастности границы раздела смола-воздух. Микро-КТ позволяет оценить размеры микрофлюидных каналов, такие как размеры продольных и поперечных сечений. Согласно 3D-реконструкции микро-КТ-изображений с разрешением 20 мкм, поверхность боковых стенок каналов более абразивная, что может быть связано с более тонким разрешением печати в вертикальном направлении (размер пикселя 25 мкм по оси Z), чем в горизонтальном (размер пикселя 62 мкм по осям X и Y). Пространственное разрешение изображений РЭМ позволяет получить подробную информацию о морфологии поверхности боковых стенок микрофлюидных каналов для МФУ с открытым каналом и наблюдать локальные артефакты печати, которые, вероятно, вызваны неравномерным отверждением смолы при промывке МФУ.

Для более детального изучения точности производства изделий методом DLP произведена съемка микро-КТ для оценки качества изготовления сложных трёхмерных деталей скаффолдов – пористых или волокнистых матриц, обеспечивающих механический каркас для клеток. Подход основан на сопоставлении и сравнении пространственного изображения для печати, с реальной геометрией изделия, полученной после аддитивного производства с помощью сканирования микро-КТ. С использованием данного подхода были протестированы шесть скаффолдов из фотополимерной смолы с различной толщиной стенок (0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3, 1.5 мм). Артефакты изготовления были изучены на виртуальных двумерных срезах внутренней структуры скаффолдов. Было отмечено и описано уменьшение отклонений толщины реальной геометрии от модели STL для скаффолдов с увеличением толщины стенок.

Микро-КТ-сканирование проводилось с использованием устройства Xradia Versa 520 (Carl Zeiss X-ray Microscopy, Inc., Плззнтон, США). Параметры микро-КТ-сканирования для всех образцов были следующими: напряжение рентгеновской трубки 30 кВ, мощность 1.5 В, размер пикселя 28.8 мкм, вращение образца на 360°, кадров на изображение 1, время экспозиции на каждом кадре 1 с. Фильтр рентгеновской трубки (воздух) не использовался (выбирался на основе наблюдаемых значений пропускания согласно рекомендациям Руководства пользователя Xradia Versa 520 A003030 Rev. В.). В процессе сканирования было получено 1601 проекций каждого образца. Реконструкция трехмерного изображения проводилась с автоматически настроенными значениями смещения центра, фильтра размытия по Гауссу 0.5. Параметры пучка использовались для коррекции артефактов на реконструированных изображениях в виде углублений и затененных областей между плотными объектами, вызванных более сильным поглощением рентгеновских фотонов в середине объекта, по сравнению с краями (связано с увеличением упрочнения пучка). Для каждого сканирования образец размещался на максимально близком расстоянии от источника рентгеновского излучения. Детектор панели использовался для получения изображений 1536 × 972 пикселей. Получение данных выполнялось с коэффициентом биннинга камеры = 2. Время экспозиции выбиралось для поддержания значений счетчика (интенсивности) 5000 ед. с выбранными параметрами источника. Во время каждой процедуры томографии получалось 10 контрольных (воздушных) рентгеновских изображений с равными временными интервалами между ними. Для реконструкции набора виртуальных срезов использовалось программное обеспечение Scout-and-Scan Reconstructor 12.0.8086.19558 (Carl Zeiss X-ray Microscopy, Inc., США).

Сопоставление пространственного изображения, импортированного из файлов .STL, с реальной геометрией скаффолда, полученной с помощью микро-КТ, с последующим сравнением значений толщины их стенок проводилось с помощью

программного обеспечения VGSTUDIO Max 3.5 (Volume Graphics, Гейдельберг, Германия). Для определения поверхности скаффолда инструмент «Определение поверхности», алгоритм: Advanced (classic), начальный счетчик находился по гистограмме. Для сопоставления изображений использовался инструмент «Лучшая регистрация fit». В качестве примера на рисунке 3.6 показаны 3D-рендеринг скаффолда с толщиной стенки 0.9 мм и его STL-модель.

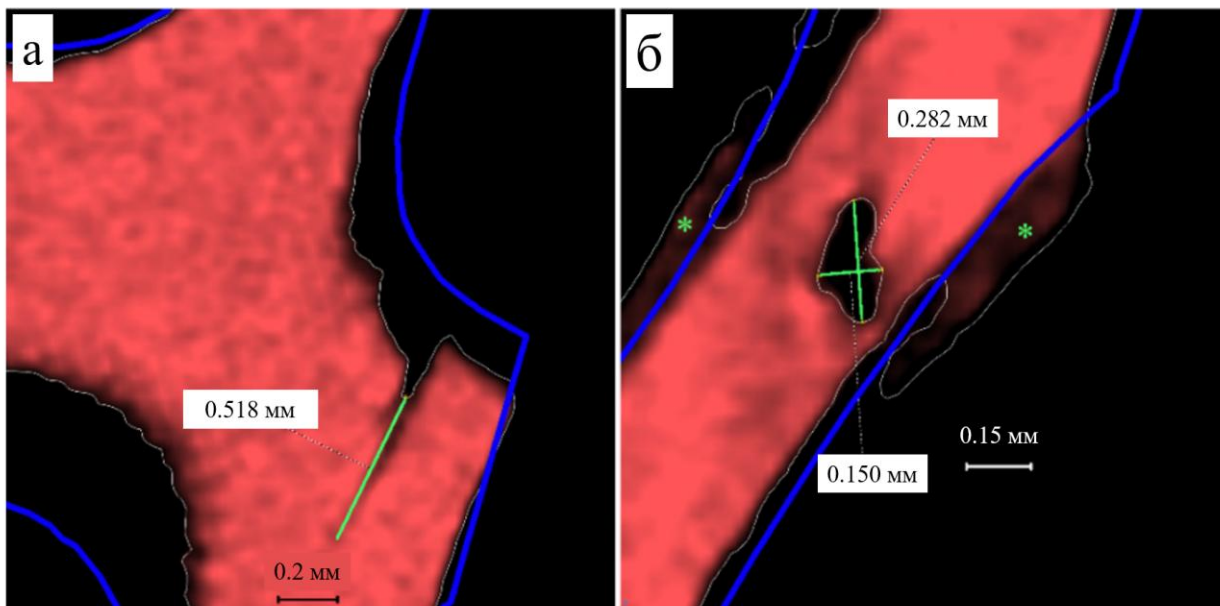


**Рисунок 3.6** – 3D-рендеринг каркаса с толщиной стенки 0.9 мм (а) и его STL-модель (б)

Разница в толщине стенок скаффолда измерялась на STL модели и микро-КТ в 7 точках на каждом образце: 6 точек соответствуют центральному положению на каждой грани куба в непосредственной близости от внешней поверхности скаффолда, одна точка соответствует центру куба. Для этой цели использовался инструмент «Расстояние». Кроме того, наблюдались артефакты печати. В случае, если артефакт демонстрировал сферическую форму, его диаметр измерялся в непосредственной близости от центра симметрии.

Сопоставление пространственного изображения, импортированного из файла STL, с реальной геометрией скаффолда, полученной с помощью микро-КТ, позволило рассчитать разницу между толщинами стенок каждой пары «модель .STL – реальная геометрия» и изложить некоторые наблюдения относительно артефактов печати. Для скаффолда с толщиной стенки 0.5 мм (Рисунок ) наблюдались следующие особенности: артефакты внутренней структуры (сколы толщиной до 15.4 %,

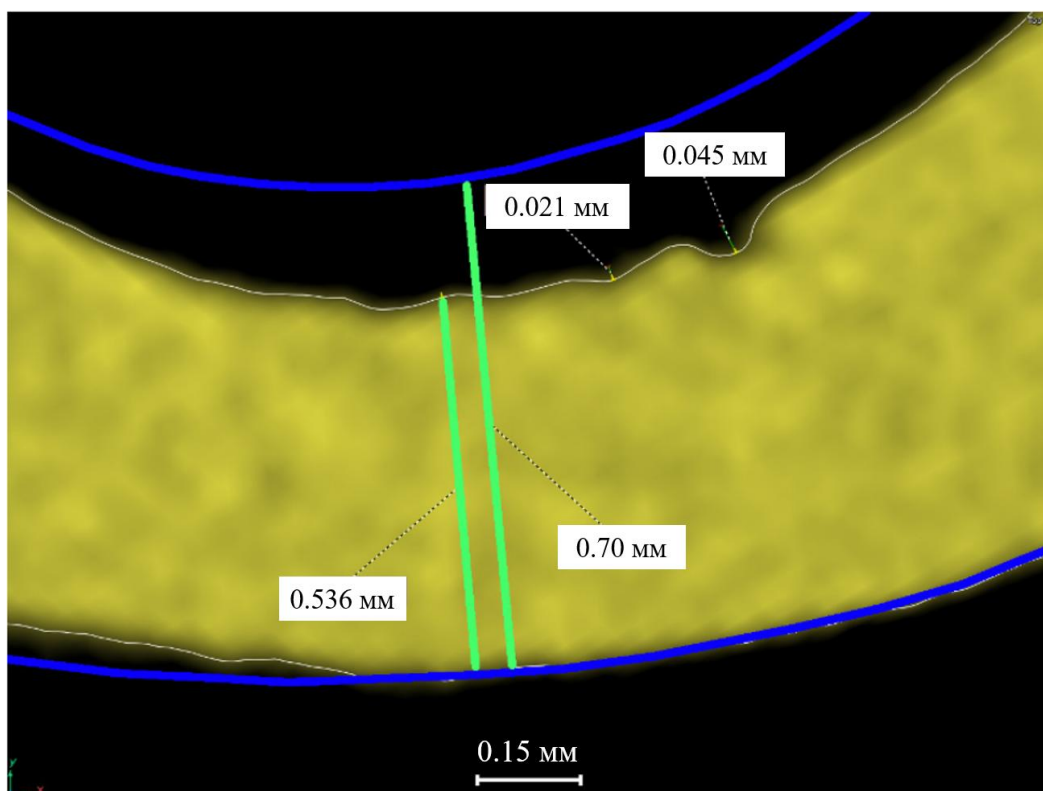
единичная пора неправильной формы размерами  $0.282 \times 0.150$  мм, наложение материала, трещины глубиной до 0.518 мм).



**Рисунок 3.7** – Артефакты скаффолда с толщиной стенки 0.5 мм: (а) трещина; (б) единичная пора и наложение материала (отмечено \*). Сплошная синяя линия – границы согласно модели STL, белая линия – определенная поверхность сканированного скаффолда

Для скаффолда с толщиной стенки 0.7 мм (Рисунок ) также были обнаружены артефакты внутренней структуры толщиной до 7.7 %. Было отмечено общее увеличение волнистости поверхности.

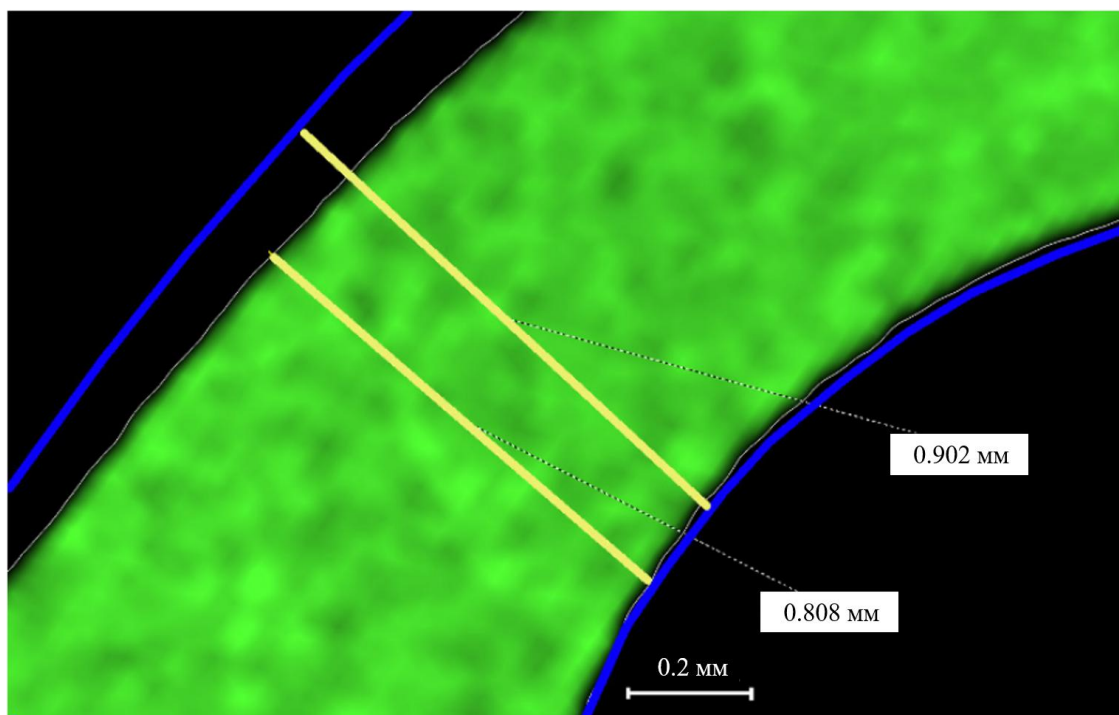
Для скаффолда с толщиной стенки 0.9 мм наблюдалось общее уменьшение значений толщины стенки по сравнению с моделью STL (Таблица 3.3 – Отклонения размеров реальной геометрии от модели STL для скаффолдов с толщиной стенки 0.5, 0.7 и 0.9 мм) (Рисунок 2). Артефакты в виде выступов диаметром 0.274 мм и 0.373 мм найдены на 3D-рендеринге и затем измерены на 2D-проекциях. Для этого образца также характерно перекрытие материалов.



**Рисунок 3.8** – Артефакты скаффолда с толщиной стенки 0,7 мм. Сплошная синяя линия – границы согласно модели STL, белая линия – определенная поверхность сканированного скаффолда

**Таблица 3.3** – Отклонения размеров реальной геометрии от модели STL для скаффолдов с толщиной стенки 0.5, 0.7 и 0.9 мм

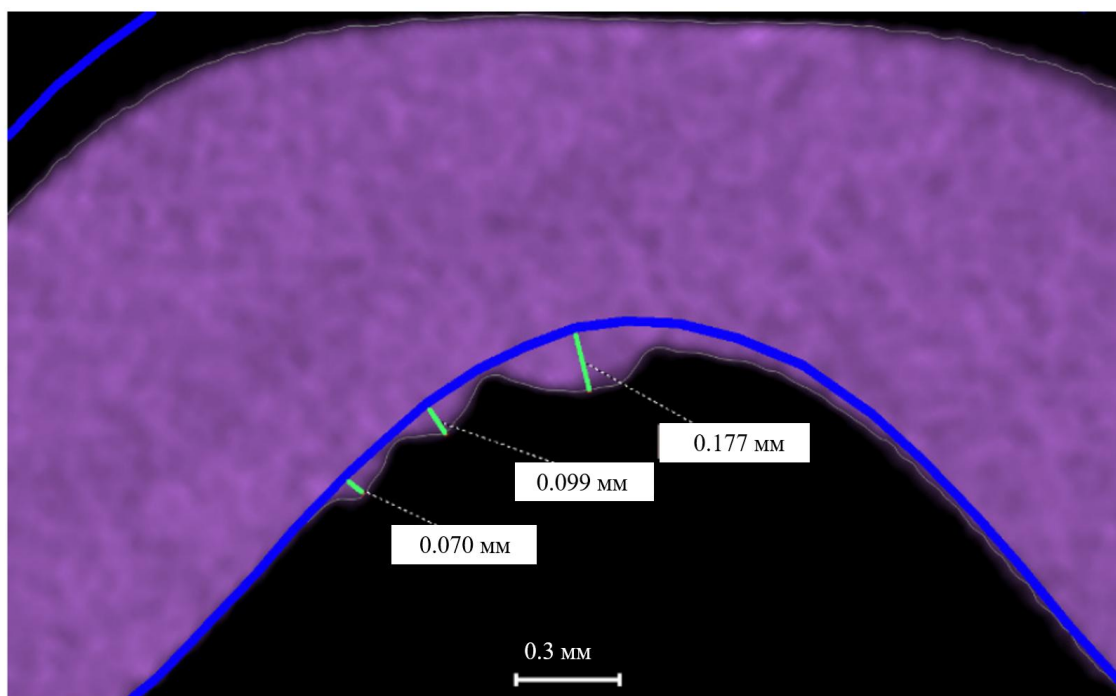
Толщина стенки 0.5 мм		Толщина стенки 0.7 мм		Толщина стенки 0.9 мм	
Грань куба 1	33.06 %	Грань куба 1	20.13 %	Грань куба 1	10.25 %
Грань куба 2	32.66 %	Грань куба 2	12.35 %	Грань куба 2	14.22 %
Грань куба 3	32.52 %	Грань куба 3	20.23 %	Грань куба 3	10.37 %
Грань куба 4	0.7 %	Грань куба 4	24.79 %	Грань куба 4	10.69 %
Грань куба 5	6.7 %	Грань куба 5	12.55 %	Грань куба 5	3.23 %
Грань куба 6	2.74 %	Грань куба 6	9.22 %	Грань куба 6	5.2 %
Центр куба	31.78 %	Центр куба	13.49 %	Центр куба	11.27 %
Среднее	20.02 %	Среднее	16.11 %	Среднее	9.32 %



**Рисунок 2.9** – Артефакты скаффолда с толщиной стенки 0.9 мм. Сплошная синяя линия – границы согласно модели STL, белая линия – определенная поверхность сканированного скаффолда

Для скаффолда с толщиной стенки 1.1 мм (рисунок 3.10) были изучены многочисленные участки, где фактическая толщина была на удивление выше (Таблица , грани куба 1, 4).

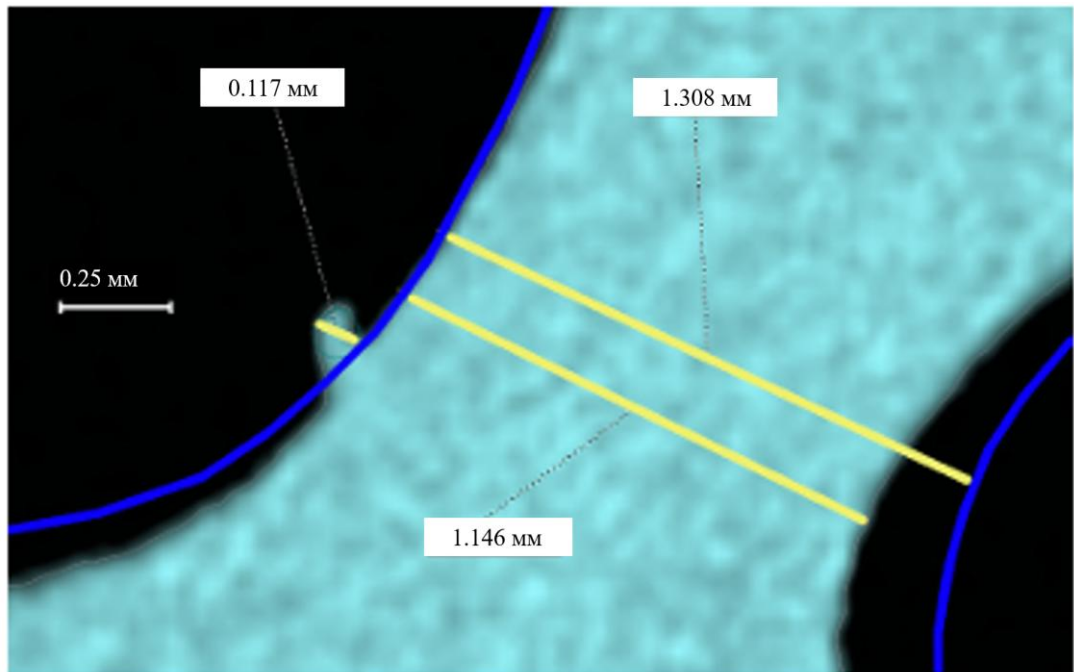
Иногда такие участки были объединены с перекрытием материалов. Были представлены артефакты в виде бугорков высотой до 0.177 мм. Для скаффолда с толщиной стенки 1.3 мм (рисунок 3.11) был обнаружен один артефакт в виде бугорка высотой 0.117 мм. В образце также были выявлены некоторые участки, где фактическая толщина была выше запланированной в модели STL (Таблица , грань куба 6).



**Рисунок 3.10** – Артефакты скаффолда с толщиной стенки 1.1 мм. Сплошная синяя линия – границы согласно модели STL, белая линия – определенная поверхность сканированного скаффолда

**Таблица 3.4** – Отклонения толщины реальной геометрии от модели STL для скаффолдов с толщиной стенки 1.1, 1.3 и 1.5 мм

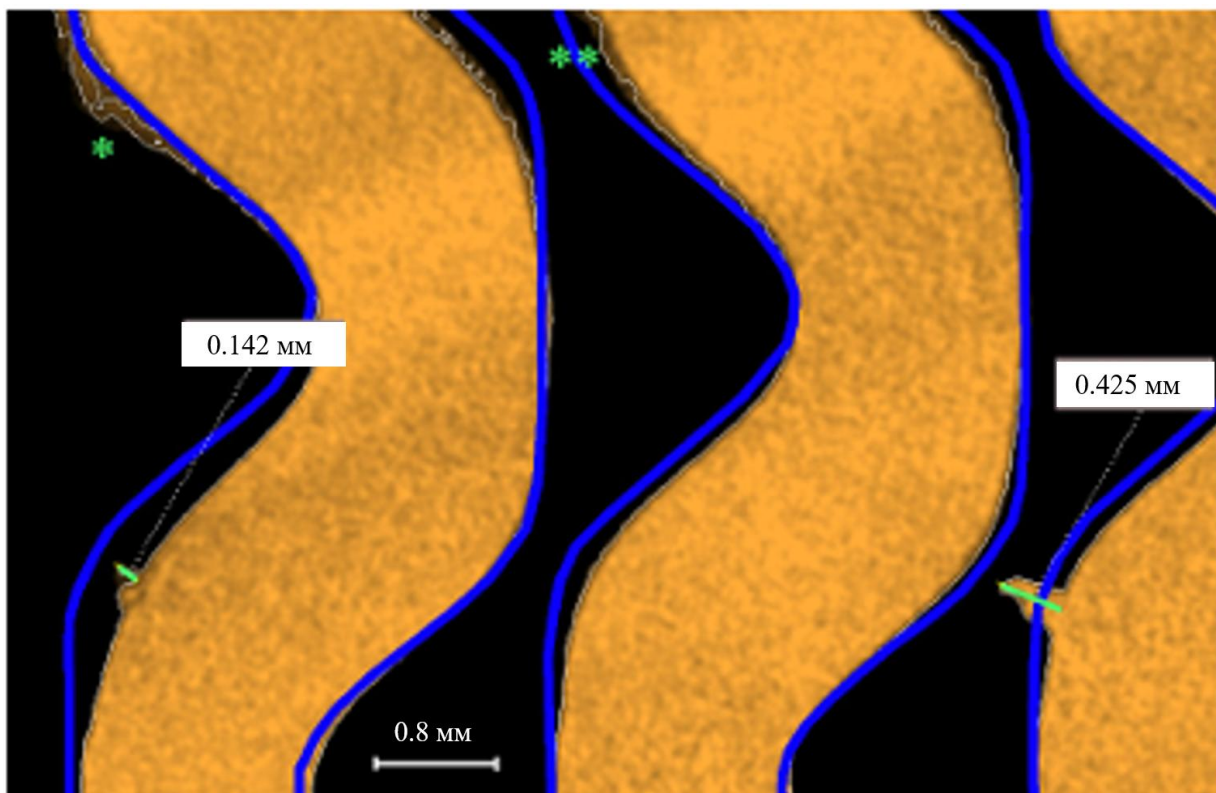
Толщина стенки 1.1 мм		Толщина стенки 1.3 мм		Толщина стенки 1.5 мм	
Грань куба 1	6.36 %	Грань куба 1	11.28 %	Грань куба 1	0.14 %
Грань куба 2	6.25 %	Грань куба 2	0.3 %	Грань куба 2	4.43 %
Грань куба 3	10.71 %	Грань куба 3	11.03 %	Грань куба 3	2.86 %
Грань куба 4	10.22 %	Грань куба 4	7.31 %	Грань куба 4	1.44 %
Грань куба 5	9.38 %	Грань куба 5	12.11 %	Грань куба 5	10.47 %
Грань куба 6	10.05 %	Грань куба 6	5.88 %	Грань куба 6	11.32 %
Центр куба	8.51 %	Центр куба	11.05 %	Центр куба	2.67 %
Среднее	8.78 %	Среднее	8.42 %	Среднее	4.76 %



**Рисунок 3.11** – Артефакты скаффолда с толщиной стенки 1.3 мм. Сплошная синяя линия – границы согласно модели STL, белая линия – определенная поверхность сканированного скаффолда

Для скаффолда с толщиной стенки 1.5 мм (рисунок 3.12) был обнаружен парный артефакт в виде шишек (с острыми краями) до 0.43 мм.

Было обнаружено незначительное увеличение толщины на некоторых участках (Таблица , рисунок 3.12, грань куба 4, центр куба), волнистость поверхности и один артефакт внутренней структуры диаметром 0.09 мм.



**Рисунок 3.12** – Артефакты скаффолда с толщиной стенки 1.3 мм. Сплошная синяя линия – границы согласно модели STL, белая линия – определенная поверхность сканированного скаффолда

Измерения отклонений толщины реальной геометрии от моделей STL для каждого исследованного образца приведены в Таблица 3.4 и 3.5. Анализ результатов показывает, что отклонения толщины реальной геометрии от модели STL для скаффолдов уменьшаются с увеличением толщины стенки: с 20.02% для толщины стенки 0.5 мм до 4.76% для толщины стенки 1.5 мм. Это явление предположительно может быть вызвано усадкой материала фотополимерной смолы. Более того, образец с толщиной стенки 0.5 мм продемонстрировал наибольшее количество и разнообразие артефактов внутренней структуры. Особенно следует отметить появление трещин, поскольку кончики трещин могут служить местами концентрации напряжений, поэтому такие области подвержены разрушению. В связи с этим добавление

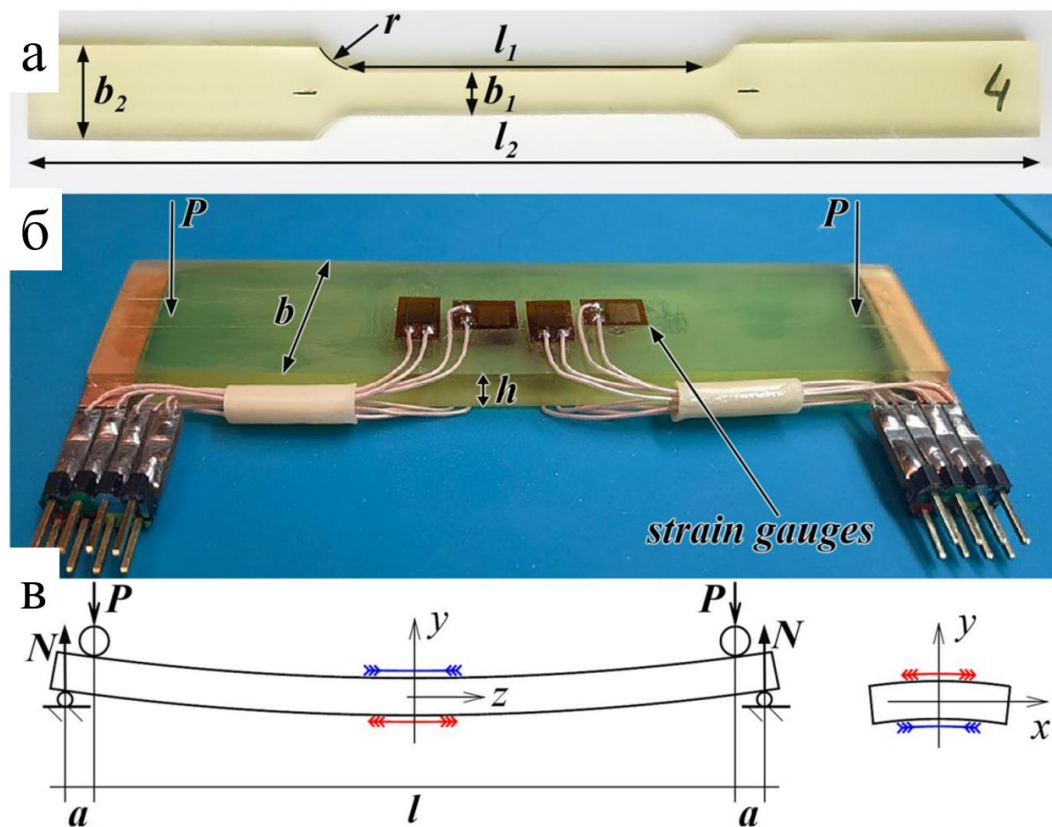
гидроксиапатита в состав скаффолдов может быть рассмотрено в будущем для предотвращения разрушения при циклической нагрузке скаффолдов.

### **3.2 Исследование механических свойств 3D печатных компонент микрореакторов**

Элементы микрофлюидных систем, созданные с помощью 3D-печати, обладают многочисленными преимуществами, такими как быстрое изготовление, низкая стоимость и возможность создания сложных топологий 3D-каналов. Их параметры и производительность можно быстро настроить, отредактировав модель, загруженную в принтер. Однако механические свойства полимеров, используемых для печати, часто плохо документированы и могут значительно меняться со временем из-за эффектов старения, релаксации или ползучести, что приводит к неожиданному поведению устройств, напечатанных на 3D-принтере. Для решения этой проблемы была проведена полная механическая характеристика образцов, изготовленных с помощью 3D-печати, включая испытания на релаксацию напряжений и ползучесть, через различные промежутки времени после печати. Определенные свойства материала позволили смоделировать механические и гидродинамические характеристики 3D-печатного МФУ, которые демонстрируются на примере полностью напечатанного обратного клапана, специально разработанного для использования в микрофлюидных системах. Этот подход позволяет легко количественно оценить оптимальный производственный цикл и срок службы 3D-печатных МФУ.

Пластины для механических испытаний и обратные клапаны были разработаны и изготовлены в соответствии с описанием в главе 2. Механические испытания проводились с использованием точного универсального испытательного прибора Shimadzu Autograph AGS-X (Shimadzu Corporation, Япония): одноосное растяжение до разрушения, эксперименты по одноосной ползучести и релаксации, а

также чистый изгиб. Испытания на одноосное растяжение проводились в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ 11,262-2017 [54], который является модификацией международного стандарта ISO 527-2:2012 [55]. Скорость перемещения траверсы испытательной машины была фиксирована на уровне 5 мм/мин. Все механические испытания проводились при окружающей атмосфере и комнатной температуре. Форма образцов для испытаний на напряжение-деформацию показана на рисунке 3.13 (а).



**Рисунок 3.13** – Образцы, напечатанные на 3D-принтере для механических испытаний: (а) испытание на растяжение под напряжением, (б) испытание на изгиб в 4 точках (для измерения коэффициента Пуассона). (в) Деформации в образце при испытании на изгиб в 4 точках ( $N$  – сила реакции опоры)

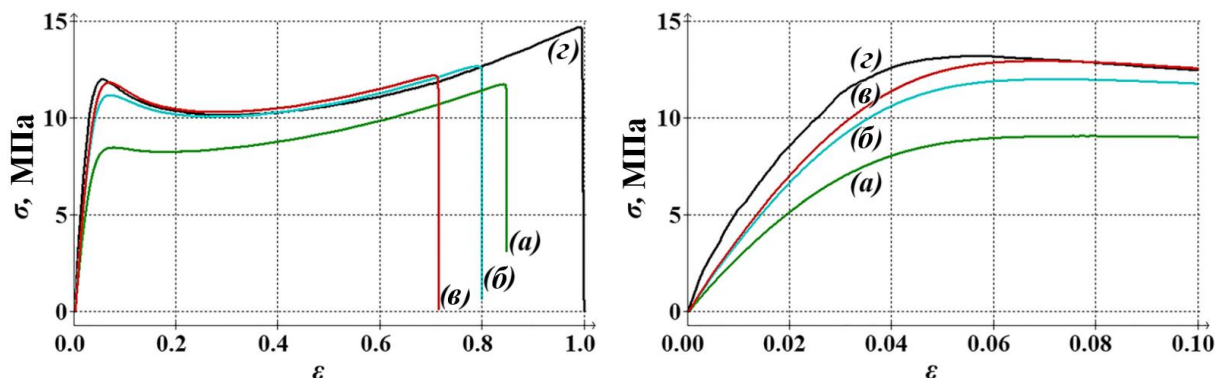
Такая форма соответствует образцу типа 5 из ГОСТ 11,262-2017). Размеры образца составляли  $r = 6$  мм,  $l_1 = 40$  мм,  $l_2 = 80$  мм,  $b_1 = 5$  мм и  $b_2 = 11$  мм. Толщина образца составляла  $h = 3$  мм. В экспериментах на ползучесть прикладывали

постоянную растягивающую нагрузку  $F_c = 36.8$  Н и измеряли продольную деформацию образца с течением времени (4 ч). Деформация измерялась с помощью контактного экстензометра Shimadzu SG-25-50. В экспериментах по релаксации напряжений сначала прикладывалась нагрузка 36 Н, а затем фиксировалась траверса, измеряя изменение силы растяжения со временем (4 ч). Для определения коэффициента Пуассона был проведен эксперимент по чистому изгибу. Образец для этого эксперимента (блок с размерами  $l = 95$  мм,  $b = 20$  мм и  $h = 5$  мм) показан на рисунке 3.13 (б). Во время измерений верхняя часть образца сжималась в продольном направлении и удлинялась в поперечном направлении, в то время как нижняя часть демонстрировала противоположное поведение (рисунок 3.13 (в)). Продольные и поперечные деформации измерялись с помощью 8 тензодатчиков (4 датчика на верхней стороне образца и 4 датчика на нижней стороне). Датчики были соединены в два моста Уитстона. Коэффициент Пуассона определялся как отношение напряжений на мостах, когда они были выведены из равновесия из-за деформаций датчика. Нагрузка  $P$  была приложена на расстоянии  $a = 5$  мм от опорных штифтов. Постепенно увеличивая  $P$  и перемещая траверсу до достижения  $P = 43$  Н (что давало максимальное напряжение 2,4 МПа), траверса была зафиксирована в течение 300 с. После этого нагрузка была снята.

Было проведено несколько экспериментов для определения механических свойств и рабочей области для деформаций и напряжений материала. Сначала был проведен эксперимент по одноосному растяжению до разрушения и определен диапазон напряжений, который соответствовал малым деформациям. В этом диапазоне можно было использовать линейную теорию вязкой упругости [56]. Затем, применяя малые деформации, были проведены эксперименты по одноосной ползучести и релаксации напряжений, чтобы получить функцию податливости. Наконец, был определен коэффициент Пуассона из чистого эксперимента по изгибу. Функции податливости и коэффициент Пуассона полностью описывают

механические характеристики линейного вязкоупругого изотропного материала. Эти характеристики использовались для численных расчетов в среде COMSOL Multiphysics (COMSOL Inc., Швеция, версия 6.1) с модулями «Механика твердого тела» и «Ламинарный поток».

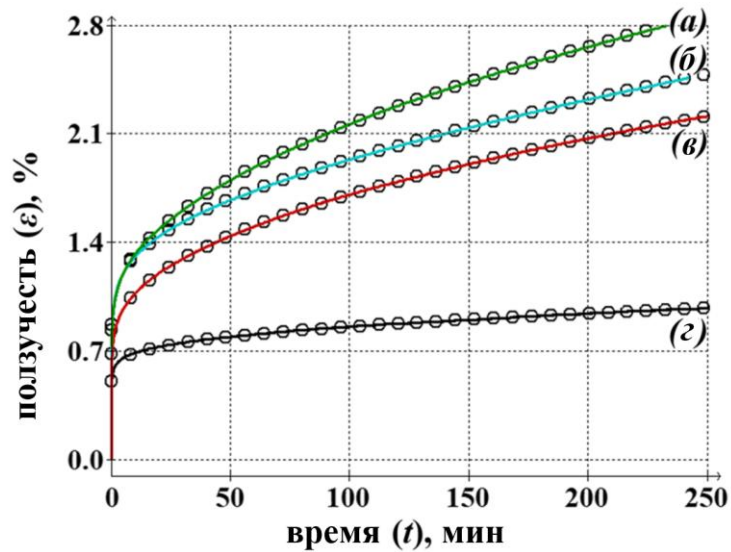
Измеренный предел прочности на растяжение изготовленных образцов составляет 12–15 МПа (рисунок 3.14, левая панель), что соответствует техническому описанию материала ( $12.4 \pm 4.5$  МПа) [57].



**Рисунок 3.14** – Кривые напряжение-деформация для образцов, напечатанных на 3D-принтере, состаренных в течение (а) 0 дней, (б) 7 дней, (в) 15 дней, (г) 72 дней

Для практического применения рекомендуемое максимальное напряжение не должно превышать  $\sim 1/3$  предела текучести. Это соответствует значению  $\sigma_{max} \sim 3\text{-}4$  МПа, применяемому в следующих экспериментах и расчетах. Из линейной упругой области (рисунок 3.14, правая панель) можно увидеть, что модуль Юнга материала увеличивается со старением. Из наклона кривой напряжение-деформация ( $\varepsilon < 0.01$ ) его можно оценить как от 290 МПа для свежего образца до 530 МПа для образца, состаренного в течение 72 дней.

На рисунке 3.15 показано поведение ползучести исследуемых образцов.



**Рисунок 3.15** – Испытания на ползучесть для 3D-печатных образцов, состаренных в течение (а) 0 дней, (б) 7 дней, (в) 15 дней, (г) 72 дня. Сплошные линии представляют экспериментальные данные; кривые соответствия, основанные на коэффициентах из Таблицы 5, даны как открытые кружки

Результаты анализируются с точки зрения податливости ползучести  $J = \frac{\varepsilon(t)}{\sigma_0}$ , где  $\sigma_0 = \frac{F_c}{hb_1} = 2.4$  МПа. Податливость ползучести моделировалась с использованием ряда Прони [58]:

$$J = J_0 + J_1 \left(1 - e^{-\frac{t}{\lambda_1}}\right) + J_2 \left(1 - e^{-\frac{t}{\lambda_2}}\right) + J_3 \left(1 - e^{-\frac{t}{\lambda_3}}\right). \quad (7)$$

Коэффициенты ряда Прони  $J_i$  и времена запаздывания  $\lambda_i$  рассчитывались с использованием метода наименьших квадратов. Результаты представлены в таблице 3.5.

Старение значительно снижает податливость ползучести в соответствии с увеличением модуля Юнга, как обсуждалось выше. Кроме того, состаренные образцы демонстрируют гораздо меньшее изменение своих механических свойств при длительной нагрузке (его можно оценить как отношение  $J_\infty/J_0$ ).

**Таблица 3.5.** Коэффициенты ряда Прони  $J_i$  и времена запаздывания  $\lambda_i$

Образец	Время старения	$J_0$ , ГПа <sup>-1</sup>	$J_1$ , ГПа <sup>-1</sup>	$J_2$ , ГПа <sup>-1</sup>	$J_3$ , ГПа <sup>-1</sup>	$J_\infty$ , ГПа <sup>-1</sup>	$\lambda_1$ , с	$\lambda_2$ , с	$\lambda_3$ , с
1	0	3.48	1.32	1.53	11.00	17.33	139	1706	21.069
2	7 дней	3.63	1.16	1.24	9.57	15.59	124	1287	24.903
3	15 дней	2.85	1.00	1.18	7.42	12.45	134	1444	18.014
4	72 дня	2.11	0.54	0.43	1.83	4.91	88	1245	19.048

Ключевым свойством, необходимым для моделирования поведения устройств, является модуль Юнга материала. Из рисунка 3.14 видно, что при старении образца его модуль Юнга значительно увеличивается. Более того, напряжение в образце может быстро релаксировать, если приложить постоянную деформацию. Этот эффект описывается модулем релаксации напряжения  $G(t)$ . Этот модуль можно вывести из податливости ползучести с помощью преобразования Лапласа:

$$L\{G(t)\} \uparrow L\{J(t)\} = s(2)^{-2}, \quad (8)$$

где  $s$  – параметр частотной области. Модуль релаксации напряжений ищем в виде ряда Прони:

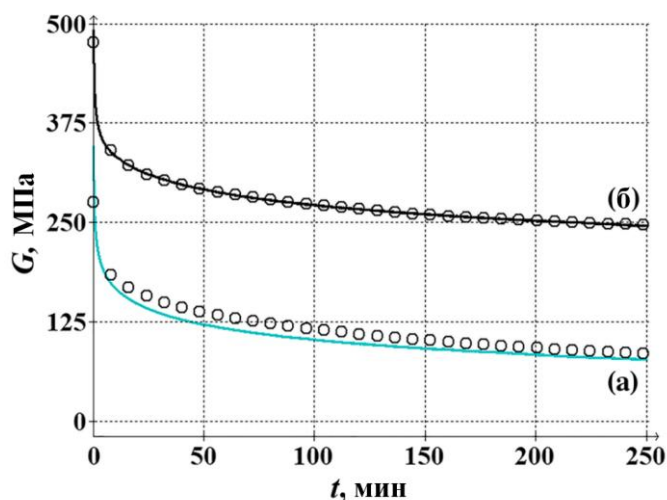
$$G = G_\infty + G_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + G_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + G_3 e^{-\frac{t}{\tau_3}}. \quad (9)$$

Решая уравнение (8), находим все коэффициенты для модуля релаксации. Результаты обобщены в таблице 3.6.

**Таблица 3.6** – Коэффициенты ряда Прони  $G_i$  и времена запаздывания  $\tau_i$  для модуля релаксации

Образец	Время старения	$G_0$ , МПа	$G_1$ , МПа	$G_2$ , МПа	$G_3$ , МПа	$G_\infty$ , МПа	$\tau_1$ , с	$\tau_2$ , с	$\tau_3$ , с
1	0	287.5	84.0	58.7	87.1	57.7	100	1254	8023
2	7 дней	275.8	70.5	46.0	95.2	64.2	93	1011	9816
3	15 дней	350.6	97.2	68.1	105.0	80.3	98	1081	7532
4	72 дня	474.1	99.3	54.8	116.5	203.6	66	1067	12.038

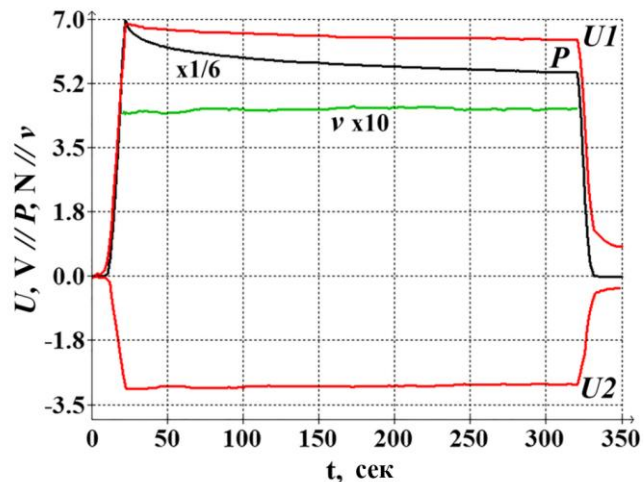
Для проверки модели были проведены дополнительные экспериментальные исследования релаксации для образцов 2 и 4. Сравнение эксперимента и расчета податливости ползучести (рисунок 3.16) показывает хорошее соответствие данных, особенно для образца 4.



**Рисунок 3.16** – Испытания на релаксацию напряжения для 3D-печатных образцов, состаренных в течение (а) 7 дней и (б) 72 дней. Сплошные линии представляют экспериментальные данные; кривые, основанные на коэффициентах из таблицы 3.6 (рассчитанных по ползучести) показаны в виде открытых кружков

Таким образом, механические исследования 3D-печатных образцов можно ограничить испытаниями на ползучесть (реализация таких экспериментов намного проще, чем испытания на релаксацию). Из податливости ползучести можно определить модуль релаксации, который используется в качестве ключевого параметра для моделирования механического поведения устройств (в виде модуля Юнга). Подводя итог, можно сделать вывод, что модуль Юнга нашего материала варьируется от  $\sim 50$  МПа (длительная эксплуатация свежееотпечатанного устройства ( $G_{\infty}$  для образца 1)) до  $\sim 500$  МПа (кратковременный отклик материала, подвергавшегося длительному воздействию ( $G_0$  для образца 4)).

Моделирование механического поведения любой системы требует знания плотности материала, модуля Юнга и коэффициента Пуассона. Последний рассчитывался как отношение поперечной и продольной деформаций (рисунок 3.17).

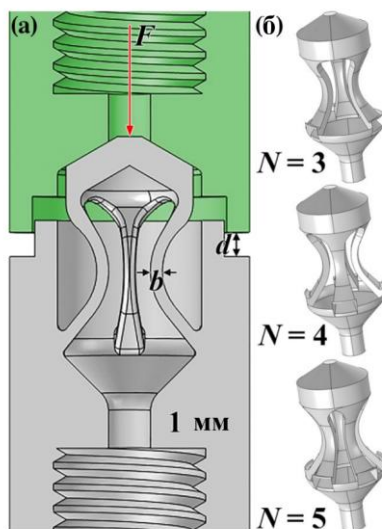


**Рисунок 3.17** – Результаты измерения коэффициента Пуассона: напряжения на мостах Уитсона, соответствующие продольным ( $U1$ ) и поперечным ( $U2$ ) деформациям, приложенная сила ( $P$ ) и коэффициент Пуассона ( $\nu$ )

Эксперимент проводился с постоянной (в течение 300 с) деформацией, поэтому можно увидеть постепенное уменьшение нагрузки  $P$  из-за релаксации. Однако эта релаксация не влияет на коэффициент Пуассона, и его значение составляет  $\nu = 0.455 \pm 0.011$ .

Важным вопросом практического использования 3D-печатных механических компонентов является изменение их свойств после контакта с химикатами, атмосферой и старением. Чтобы проиллюстрировать влияние старения материала на свойства 3D-печатного МФУ, был разработан полностью 3D-печатный обратный клапан, который состоит из двух частей – корпуса и колпачка. Каждая часть имеет стандартную резьбу NPT 1/8–24 для соединения клапана с микрофлюидной системой. Основной корпус клапана интегрирует заглушку, которая удерживается на месте и нагружается с помощью ряда элементов податливости (изгибов). В предварительно

собранном состоянии между корпусом клапана (серая часть на рисунке 3.18 (а)) и колпачком (зеленая часть на рисунке 3.18 (а)) имеется зазор ( $d$ ).

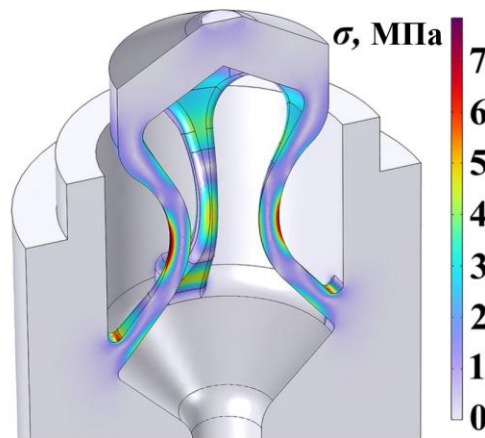


**Рисунок 3.18** – (а) Модель полностью 3D-печатного обратного клапана ( $b = 0.5$  мм,  $N = 4$ ). (б) Модели клапанов с разным количеством изгибов ( $N$ )

Когда клапан собран, две части прижимаются друг к другу до тех пор, пока зазор не закроется, что создает предварительную нагрузку на пробку клапана со смещением, равным  $d$ . Результирующая деформация в изгибах предотвращает обратный поток жидкости при низких потоках. Был спроектирован ряд клапанов с различными поперечными сечениями ( $b$ ) и количеством изгибов ( $N$ ) (рисунок 3.18 (б)) и рассчитано распределение напряжения по Мизесу и смещений под действием силы  $F = 1$  Н. Были использованы следующие свойства отвержденного материала эпоксидной смолы, полученные из вышеупомянутой характеристики: плотность  $\rho = 1100$  кг/м<sup>3</sup>, модуль Юнга  $E = 500$  МПа и коэффициент Пуассона  $\nu = 0.455$ . Результаты механических испытаний обобщены в таблице 3.7 и продемонстрированы на рисунке 3.19 для клапана с  $b = 0.5$  мм и  $N = 4$ .

**Таблица 3.7** – Максимальное напряжение ( $\sigma_{max}$ ) и смещение ( $\delta$ ) в обратном клапане при нагрузке 1 Н в зависимости от конструкции клапана (количество ( $n$ ) и толщина ( $b$ ) упругих элементов)

$n$	$b$ , мм	$\sigma_{max}$ , МПа	$\delta$ , мкм
3	0.6	9.5	121
	0.8	7.2	86
	1.15	4.9	58
4	0.5	8.4	111
	0.6	7.1	91
	0.8	5.4	65
5	1.15	3.7	44
	0.6	5.7	73
	0.8	4.8	52



**Рисунок 3.19** – Распределение напряжений по Мизесу в клапане (приложенная нагрузка  $F = 1$  Н)

Из кривых напряжение-деформация материала можно прийти к выводу, что максимально допустимое напряжение должно быть ниже  $\sim 4$  МПа, чтобы избежать любых эффектов текучести. Это подразумевает, что максимальная нагрузка  $F$  будет

составлять 0,4-1 Н в зависимости от конструкции клапана (механическая задача линейна, поэтому  $\sigma_{max} \sim F$ ). Используя этот диапазон для силы, можно оценить среднее давление на верхней стороне клапана. Клапан может выдерживать 15–40 кПа (поскольку площадь поверхности составляет  $2.54 \times 10^{-5} \text{ м}^2$ ). Соответствующее максимальное смещение слабо зависит от конструкции клапана (поскольку  $\delta/\sigma_{max} \sim \text{константа}$ ) и, как ожидается, составит около 50 мкм.

Чтобы учесть изменения свойств материала, был смоделирован клапан с  $b = 0.8 \text{ мм}$  и  $N = 3$ , предполагая разные значения модуля Юнга ( $E$ ) и коэффициента Пуассона ( $\nu$ ). Из таблицы 3.8 видно, что коэффициент Пуассона практически не влияет на поведение устройства, напряжение зависит только от силы нагрузки, а смещение обратно пропорционально модулю Юнга ( $\delta \sim 1/E$ ).

**Таблица 3.8** – Максимальное напряжение ( $\sigma_{max}$ ) и смещение ( $\delta$ ) в обратном клапане при нагрузке 1 Н в зависимости от параметров материала (Модуль Юнга и отношение Пуассона)

$E$ , ГПа	$\nu$	$\sigma_{max}$ , МПа	$\delta$ , мкм
0.5	0.35	7.1	88
	0.45	7.2	86
	0.49	7.2	85
0.1	0.45	7.2	432
0.5		7.2	86
1.0		7.2	43
1.5		7.2	29

Как показано выше, модуль Юнга исследуемого материала может изменяться от 500 до 50 МПа. Это означает, что максимальное смещение 50 мкм, полученное для материала с  $E = 500 \text{ МПа}$ , является нижней границей. Безопасное смещение клапана

может достигать 500 мкм для длительной эксплуатации свеженапечатанного устройства ( $E = 50$  МПа).

Таким образом, МФУ, производимые с помощью 3D-печати DLP-СЛ, становятся все более распространенными, поскольку они сочетают гибкость и универсальность аддитивных технологий производства с высокой точностью, присущей стереолитографии. Такие устройства могут иметь сложную топологию 3D-каналов и интегрировать различные активные элементы, такие как клапаны, регуляторы, сепараторы и микронасосы, что особенно важно в свете быстрого развития концепции «лаборатория на чипе». Рациональное проектирование таких сложных устройств требует хорошего понимания механических свойств используемых материалов (фотополимерных смол), которые непосредственно влияют на характеристики получаемых активных элементов. Это особенно критично в случае мелкосерийного производства МФУ, а также в случае их длительной эксплуатации, поскольку механические свойства смол могут изменяться из-за старения или воздействия нагрузок. Таким образом, производительность старого или использованного устройства может значительно отличаться от производительности нового устройства из той же партии. Поскольку часто бывает сложно напрямую измерить механические свойства миниатюрных элементов внутри МФУ, был предложен подход, который объединяет исследования свойств материалов на основе стандартизированных образцов с последующей оценкой МФУ с помощью механических расчетов и вычислительной гидродинамики с использованием анализа конечных элементов. Было изучено механическое поведение и старение образцов, полученных с помощью 3D-печати DLP-СЛ из коммерческого фотополимера. Испытания на ползучесть, проведенные на состаренных образцах, выявили значительную изменчивость их механических свойств. Определены экспериментальные значения функции податливости ползучести и рассчитали модуль упругости релаксации напряжений для времен в диапазоне 10-14000 с. Модуль

упругости может изменяться из-за старения и релаксации от 50 МПа (длительная эксплуатация свеженапечатанного образца) до 500 МПа (кратковременный отклик материала, выдержанного в течение длительного времени). Чтобы проиллюстрировать влияние старения материала на свойства 3D-печатного МФУ, был разработан полностью 3D-печатный обратный клапан. Были проанализированы механический и гидродинамический отклик для серии клапанов с небольшими изменениями в геометрии на основе свойств образцов материалов с разным возрастом. Анализ показывает, что клапан может безопасно работать при расходе жидкости в несколько мкл/с, создаваемом падением давления в несколько десятков кПа. Например, свеженапечатанный клапан с тремя элементами податливости (сечение 0.8 мм) и предварительно собранным зазором 10 мкм может выдерживать расход 10 мкл/с при падении давления 16 кПа. После нескольких часов работы требуемый перепад давления снизится до 6 кПа из-за эффекта релаксации напряжений. Для клапана, выдержанного в течение 72 дней, соответствующие значения будут 26 и 12 кПа соответственно. Таким образом, изменение механических свойств из-за старения или релаксации может существенно повлиять на производительность МФУ. Предложенный подход может быть расширен для рационального проектирования сложных 3D-печатных МФУ с интегрированными активными элементами, включая оценку их оптимального производства и жизненного цикла, а также безопасных условий эксплуатации.

### **3.3 Методика синтеза наночастиц серебра в микрофлюидных условиях с использованием 3D печатных компонент**

Для точной настройки свойств материала требуется множество проб и ошибок в процессе синтеза. Металлические НЧ после образования проходят несколько этапов восстановления, кластеризации, агрегации и роста. Таким образом, конечные свойства коллоидного раствора зависят от концентрации реагентов, внешней

температуры, протокола синтеза и квалификации исследователя, определяющей воспроизводимость и качество. Автоматизированные проточные системы преодолевают трудности, присущие традиционным периодическим методам. Микрофлюидные системы представляют собой хорошую альтернативу для сбора данных с высокой производительностью. Последние достижения в области 3D-печати сделали сложные топологии в МФУ более дешёвыми и легко настраиваемыми. Однако каналы отверждённой фотополимерной смолы притягивают ионы металлов при синтезе и создают центры кристаллизации. В работе представлена 3D-печатная система для синтеза НЧ благородных металлов в слитках. Чередующиеся потоки масляной и водной реакционных смесей предотвращают осаждение металла на стенках каналов. Удлиненные капли удобны для оптической и рентгеновской диагностики с использованием традиционных методов. В данной работе демонстрируется система, использующая синтез НЧ Ag для настройки частоты плазмонного резонанса с помощью МО.

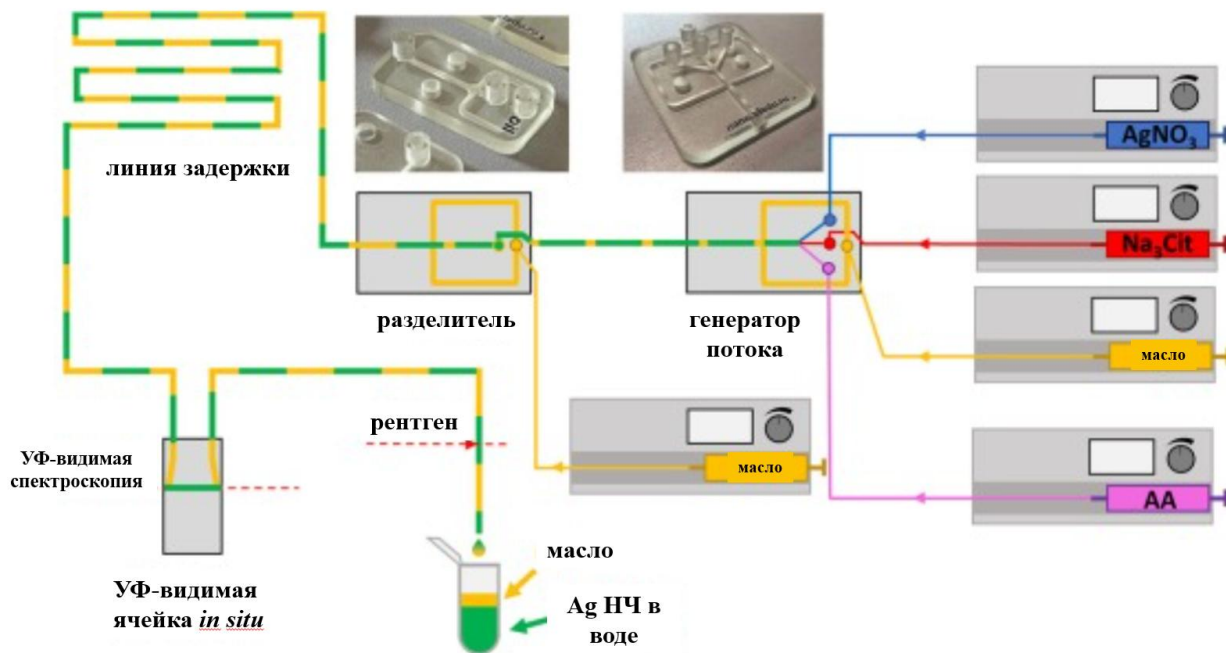
Все МФУ были спроектированы и изготовлены в соответствии с описанием в главе 2. Для точного контроля потока реагентов и несущей фазы использовался набор шприцевых насосов Wingflow Qmix-HZ 90 (Wingflow AG, Фрик, Швейцария) со шприцами из боросиликатного стекла. Для соединения отдельных частей микрофлюидной системы использовались стандартные 1/4"-28 UNF безфланцевые соединители из политетрафторэтилена (ПТФЭ) и трубка из ПФА (внутренний диаметр 1/32"). Для линии задержки использовалась инфузионная трубка из ПВХ медицинского назначения (внутренний диаметр 1.5 мм).

В качестве компонентов реакционной смеси использовались водные растворы нитрата серебра  $\text{AgNO}_3$ , тринатрийцитрата ( $\text{Na}_3\text{Cit}$ )  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  и l-аскорбиновой кислоты (AA)  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , приготовленные из коммерческих порошков (Sigma Aldrich) в концентрациях 2 мМ, 6 мМ и 12 мМ соответственно, которые подавались на входы 1-3 генератора порций. Система шприцевых насосов, осуществляющая дозирование

компонентов реакционной смеси, управлялась с ПК. Алгоритм управления подразделял пространство параметров реакции на набор экспериментальных точек в соответствии с усовершенствованным методом распределенной выборки гиперкуба (IHS), который является передовой методикой выборки, позволяющей получать хорошо распределенные наборы выборок с равномерным и полным покрытием многомерного пространства параметров с использованием относительно небольшого количества выборок [59]. Затем алгоритм управления осуществлял автоматический переход между этими точками и собирал данные спектроскопии в соответствии с заданной программой.

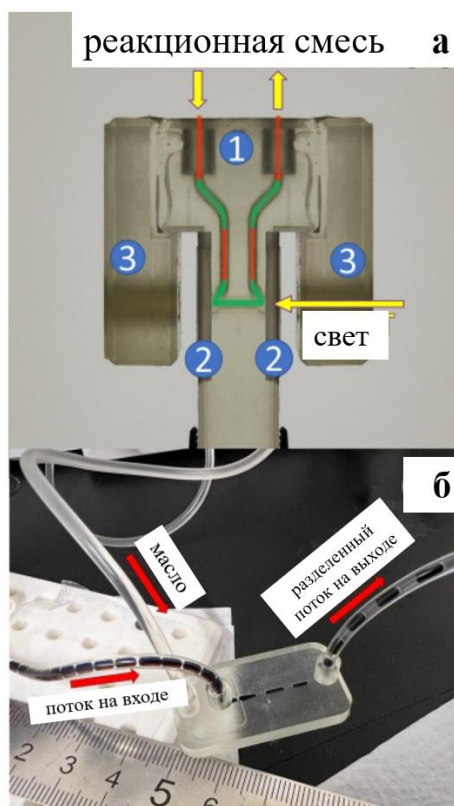
Спектры поглощения *in situ* УФ-видимого диапазона были получены в соответствии с описанием в главе 2. Данные SAXS были получены на линии пучка синхротронной станции «БиоМУР» НИЦ «Курчатовский институт», как это описано в главе 2. Изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) были получены на просвечивающем электронном микроскопе Tecnai G2 Spirit TWIN (FEI, Нидерланды) с использованием ускоряющего напряжения 80 кВ и медных сеток в качестве опор для образцов. Для анализа распределения размеров частиц изображения обрабатывались в программном обеспечении ImageJ (версия 1.54d, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, США). Для каждого образца было проанализировано более 300 частиц для достижения лучшей статистики, а среднее значение между минимальным и максимальным диаметром Ферета считалось размером частицы [60].

Разработанная система включает в себя комбинацию МФУ, состоящую из МФУ-генератора пузырьков, МФУ-разделителя пузырьков, линии задержки и проточного МФУ для выбранного метода определения характеристик (рисунок 3.20).



**Рисунок 3.20** – Экспериментальная установка, состоящая из набора шприцевых насосов, чипа генератора сегментированного потока, чипа-разделителя, линии задержки, УФ-видимая камера *in situ* и пробоотборник

В типичной установке реагенты подаются на входы генератора капель, а на другой вход подается несущая фаза. Генератор формирует поток капель реакционной смеси в несущей фазе, где каждая капля действует как отдельный химический микрореактор. Размер и частоту можно регулировать, изменяя скорость и соотношение потоков реагентов и несущей фазы. Поток капель в несущей фазе подается с выхода генератора на вход разделителя. Фаза-носитель дополнительно подаётся отдельным шприцевым насосом в разделитель, который добавляется между каплями в структурированном потоке, тем самым увеличивая расстояние между ними (рисунок 3.21 (a)).



**Рисунок 3.21** – (а) Вид проточного МФУ для *in situ* УФ-видимой спектроскопии, состоящей из корпуса МФУ (1), кварцевых окон (2) и держателей оптических волокон (3). Красный и зеленый цвета представляют соответственно масляную и водную фазы в сегментированном потоке через МФУ. (б) Промежуточное МФУ в работе, увеличивающее расстояние между отдельными каплями в сегментированном потоке модельного раствора красителя

Поток капель с выхода разделителя затем поступает в линию задержки, которая позволяет регулировать время реакции. Линия задержки соединена со специально разработанным МФУ *in situ*, подходящим для выбранного метода диагностики.

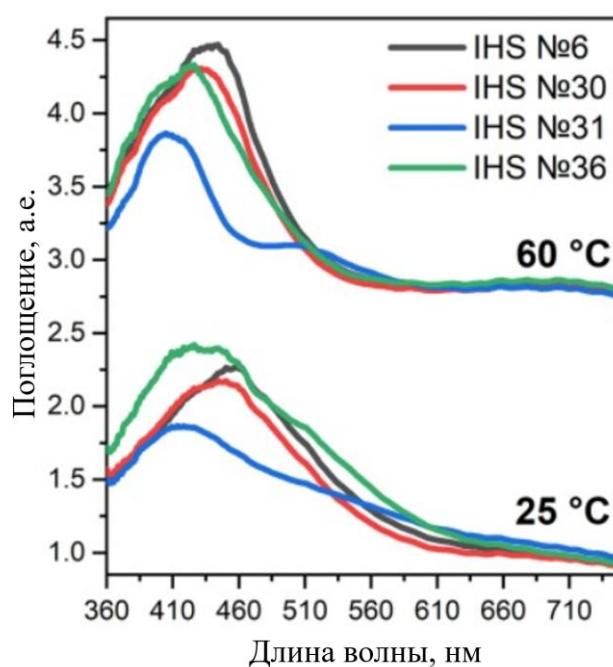
На рисунке 3.21 (б) показано УФ-видимое проточное МФУ *in situ*. Его корпус (1) имеет U-образный капиллярный канал толщиной 600 мкм, концы прямого участка которого закрыты 1-миллиметровыми кварцевыми стеклами (2). Два оптических волокна от УФ-видимого спектрометра подведены к стеклам и

закреплены в специальных держателях (3). Такая установка позволяет измерять оптические спектры поглощения растворов в пробах по мере их движения через МФУ. Размер водяных капель (зелёные на рисунке 3.21 (а)) регулируется таким образом, чтобы они могли полностью заполнить прямую часть капилляра в МФУ.

Мы провели автоматизированный скрининг параметров синтеза для точной настройки эффекта локализованного поверхностного плазмонного резонанса (LSPR) НЧ Ag. Скорость подачи отдельных реагентов – нитрата серебра и цитрата натрия – варьировалась в диапазоне от 0.75 до 3.375 мл/ч, а скорость подачи L-аскорбиновой кислоты в каждой точке эксперимента регулировалась таким образом, чтобы общая скорость подачи реагентов во время синтеза составляла 7.5 мл/ч. Вазелиновое масло подавалось на четвёртый вход генератора капель в качестве несущей фазы со скоростью 4 мл/ч, а также подавалось в разделитель с помощью дополнительного насоса со скоростью 8 мл/ч. Исходя из наблюдаемой длины струи 4–4.5 мм в трубке с известным внутренним диаметром 1.5 мм, можно оценить объём водной фазы, в которой синтезировались НЧ, как 7–8 мкл. Реакция изучалась при температурах 25 и 60 °С в течение 7 минут. Температура 25 °С соответствует нормальным условиям окружающей среды, однако термостат всё равно использовался, чтобы избежать колебаний температуры, так как микрофлюидные системы могут быть очень чувствительны к ним. Для синтеза при повышенной температуре была выбрана температура 60 °С, так как это самая высокая температура, при которой не происходит кипения в водной фазе. При более высокой температуре в осадках водной фазы начинают активно образовываться пузырьки пара, что нарушает поток осадка и *in situ* измерения в ультрафиолетовом диапазоне. Между прокладкой и кюветой *in situ* была помещена спиральная капиллярная трубка, погруженная в термостат (водяную баню), которая действовала как линия задержки. IHS сгенерировала 47 наборов значений расхода, и для каждого набора система автоматически создавала микрокапли с соответствующим расходом реагентов в течение 1 минуты и

непрерывно собирала спектры поглощения в УФ- и видимом диапазонах. Поскольку для прохождения капель через линию задержки требуется 7 минут, к тому времени, когда первая партия капель достигает кюветы, в линии задержки находятся ещё шесть партий с другими параметрами. Для фильтрации данных, полученных только для масла и границ масло-капля, а также для последующего сопоставления спектров, полученных для отдельных капель, с параметрами синтеза в этих каплях, было использовано специальное программное обеспечение. Учитывая, что каждая комбинация потоков тестировалась при двух разных температурах, использованная схема позволила протестировать и охарактеризовать 100 наборов условий синтеза менее чем за 2 часа.

На рисунке 3.22 показано несколько спектров, полученных при различных соотношениях потоков реагентов и при разных температурах реакции.



**Рисунок 3.22** – Характерные спектры поглощения в УФ-видимой области, полученные для различных комбинаций потоков реагентов в случае синтеза, проведенного при 25 °C и 60 °C

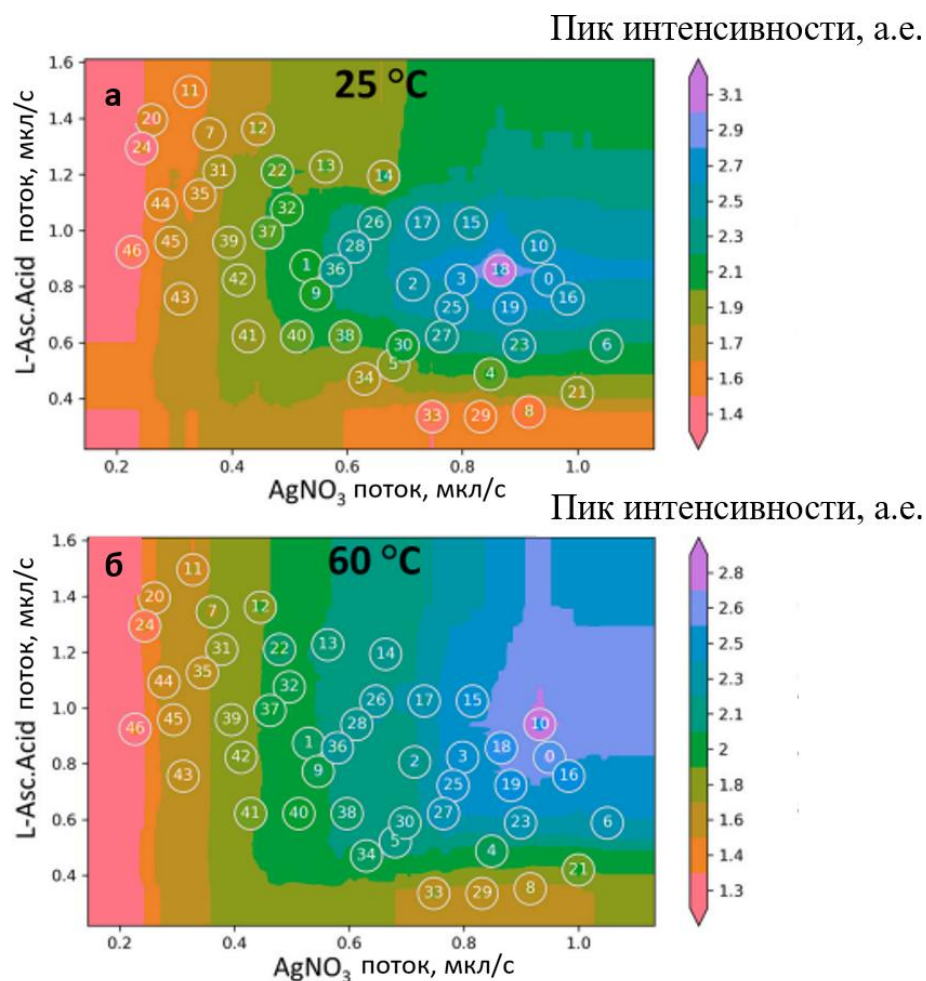
На спектрах отчетливо видны различия в положении и интенсивности пиков плазмонного резонанса, указывающие на различия в распределении по размерам и концентрации НЧ серебра, полученных в ходе синтеза. В то же время пики плазмонного резонанса в случае синтеза при более высокой температуре имеют в целом меньшую ширину, что указывает на более узкое распределение НЧ по размерам и меньшую полидисперсность.

Интенсивность плазмонного резонанса зависит от концентрации образующихся НЧ Ag в растворе и дисперсии их размеров. Первая пропорциональна потоку предшественника Ag. Аскорбиновая кислота необходима для восстановления ионов Ag, и на рисунке 3.23 наблюдается оптимальная область в центре карты, где интенсивность достигает максимума.

При более низких значениях аскорбиновой кислоты интенсивность уменьшается из-за присутствия невосстановленных ионов. В то время как при более высоких значениях потока аскорбиновой кислоты полученные частицы могут осаждаться и, по-видимому, иметь большую полидисперсность. Известно, что процесс образования НЧ благородных металлов сильно зависит от значения pH реакционной смеси [61]. Общая кислотность реакционной смеси и быстрое введение избыточного количества аскорбиновой кислоты усиливают агрегацию мелких НЧ [62]. Этот процесс еще больше усугубляется относительно большим объемом микрореакторов-капель и их медленным движением, что также способствует росту более крупных НЧ Ag. Низкий уровень pH также приводит к дисбалансу между процессами зародышеобразования и роста, что затрудняет получение стабильных сферических монодисперсных НЧ [63].

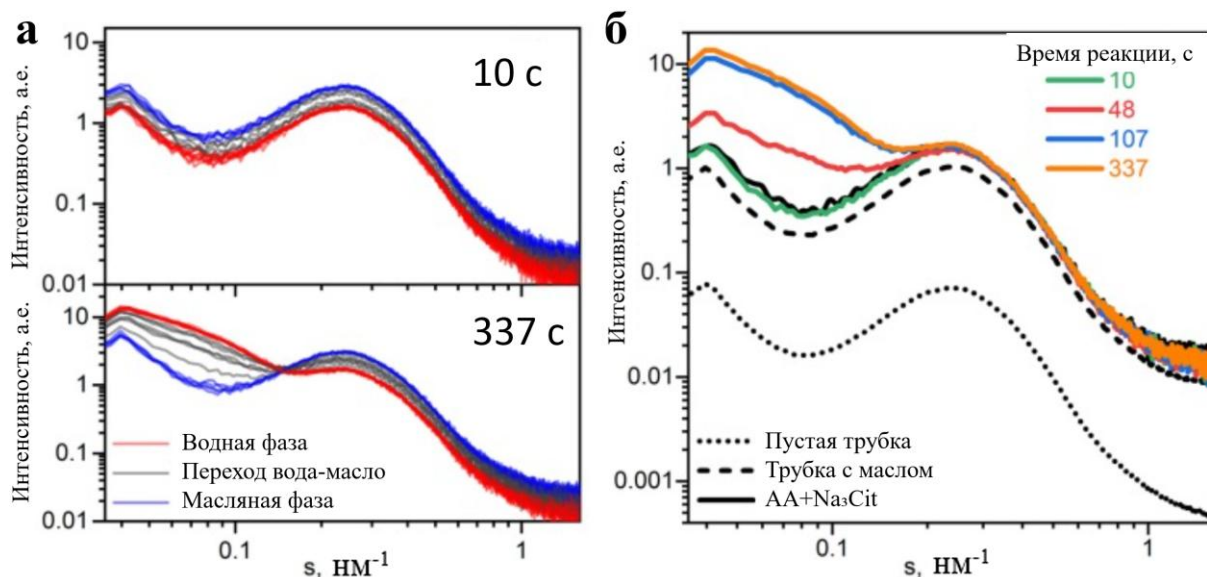
Длинные сегменты с достаточным расстоянием между ними делают микрофлюидную систему применимой для обычных спектроскопических исследований в лабораторных условиях и с синхротронными источниками. Был применен *in situ* синхротрон SAXS для изучения зависимости роста Ag НЧ от

времени. Для этого после разделительного МФУ была добавлена трубка из перфторалкоксиалкана с внутренним диаметром 1 мм. Сигнал SAXS измерялся в этой трубке перпендикулярно потоку, и, изменяя расстояние от разделителя до точки измерения, можно варьировать время от начала реакции до определения характеристик продукта. Скорость потока для всех реагентов была установлена на уровне 4 мл/ч, а скорость потока вазелинового масла — на уровне 2.5 мл/ч как для генератора капель, так и для разделителя.



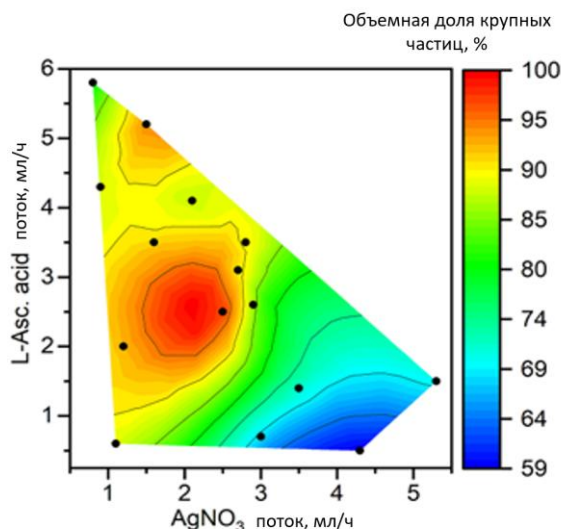
**Рисунок 3.23** – интенсивность пика LSPR в спектрах УФ-видимой области спектра наночастиц серебра в зависимости от скоростей потока  $\text{AgNO}_3$  и l-аскорбиновой кислоты для синтеза при 25 °C (а) и 60 °C (б). Каждая белая точка является результатом отдельного синтеза. Цвет фона карты представляет собой результаты прогнозирования алгоритма МО, обученного на экспериментальных точках данных

Картины SAXS измерялись непрерывно от снарядного течения в трубке. Затем среди всех измеренных картин были выбраны кривые рассеяния, полученные от капель водной фазы, содержащих Ag НЧ (красные кривые на рисунке 3.24), нормализованы по току накопительного кольца, усреднены и вычтен фон. Полученные кривые показаны на Р



**Рисунок 3.24** – (а) Кривые SAXS, измеренные от переменного потока воды в масле с временем сбора данных 1 с в течение 1 мин. Время потока от МФУ генератора до точки сбора данных 10 и 337 с (указано на панели графика) соответствует длине линии задержки 8 и 278 см соответственно; (б) Усредненные кривые SAXS от капель с Ag НЧ, измеренные с различной длиной линии задержки реакции

Полученное распределение по размерам является бимодальным. Затем для них был определен средний размер частиц в модели двухкомпонентных полидисперсных сферических частиц (таблица 3.9).



**Рисунок 3.25** – Цветовая карта, отображающая объемную долю Фазы 1 с крупными НЧ серебра (Ag НЧ) в зависимости от соотношения потоков нитрата серебра и аскорбиновой кислоты, полученная на основе данных SAXS. Черные точки обозначают точки, сгенерированные алгоритмом IHS в эксперименте SAXS

**Таблица 3.9** – Средний радиус, полидисперсность и объемные доли сферических компонентов («фаз») НЧ серебра (Ag НЧ), полученные из данных SAXS для различных времен синтеза

Длина трубки, см	Время смешивания, с	Средний радиус НЧ, нм (полидисперсность, нм)		Объемная доля, %	
		Фаза 1	Фаза 2	Фаза 1	Фаза 2
8	10	-	-	-	-
40	48	20.0 (7.9)	6.1 (2.1)	17	83
88	107	22.5 (7.3)	6.8 (1.8)	47	53
278	337	23.1 (6.5)	7.2 (2.1)	59	41

В результате при длине трубки 8 см (время реакции ~ 10 с) Ag НЧ не наблюдались, но при увеличении длины трубки до 40 см (время реакции ~ 48 с)

наблюдается значительное количество частиц Ag со средним радиусом около 6 нм и меньшее количество более крупных частиц с радиусом 20 нм. При дальнейшем увеличении длины трубки доля более крупных частиц (обозначенных как «Фаза 1» в таблице 3.9) увеличивается, и их средний размер также увеличивается. Обнаружено, что результирующее распределение размеров не меняется кардинально при длине трубки более 1 м, что соответствует времени реакции  $\sim 120$  с. Таким образом, приблизительно 2 мин достаточно для начальных быстрых стадий зародышеобразования и роста, а дальнейшее старение и агломерация происходят медленно после этого. По сравнению с примерно 7–15 мин (и дольше) синтеза Ag НЧ путем восстановления l-аскорбиновой кислоты демонстрируется эффективность микрофлюидного подхода и его положительное влияние на кинетику реакции.

Распределение размеров полученных НЧ было дополнительно изучено с помощью подхода IHS и данных SAXS для определения влияния различных скоростей потока реагентов на рост Ag НЧ и результирующих концентраций фаз. Было выбрано 15 комбинаций (таблица 3.10) скоростей потоков, как описано в SI.

Результирующие картины рассеяния были аппроксимированы с помощью модели двухкомпонентных полидисперсных сферических частиц для получения данных о среднем радиусе частиц и степени полидисперсности. Качество подгонки было хорошим. Было обнаружено, что для всех измеренных комбинаций потоков присутствовали два размера частиц Ag - более крупные частицы («Фаза 1») со средним радиусом от 16.6 до 30 нм и более мелкие частицы («Фаза 2») со средним радиусом от 3.2 до 6 нм. В то же время концентрация «Фазы 1» была заметно выше (от 70 до 98%).

**Таблица 3.10** – Комбинации потоков реагентов, сгенерированные алгоритмом IHS, а также средние радиусы, полидисперсности и объемные доли НЧ серебра (Ag НЧ), полученные из данных SAXS

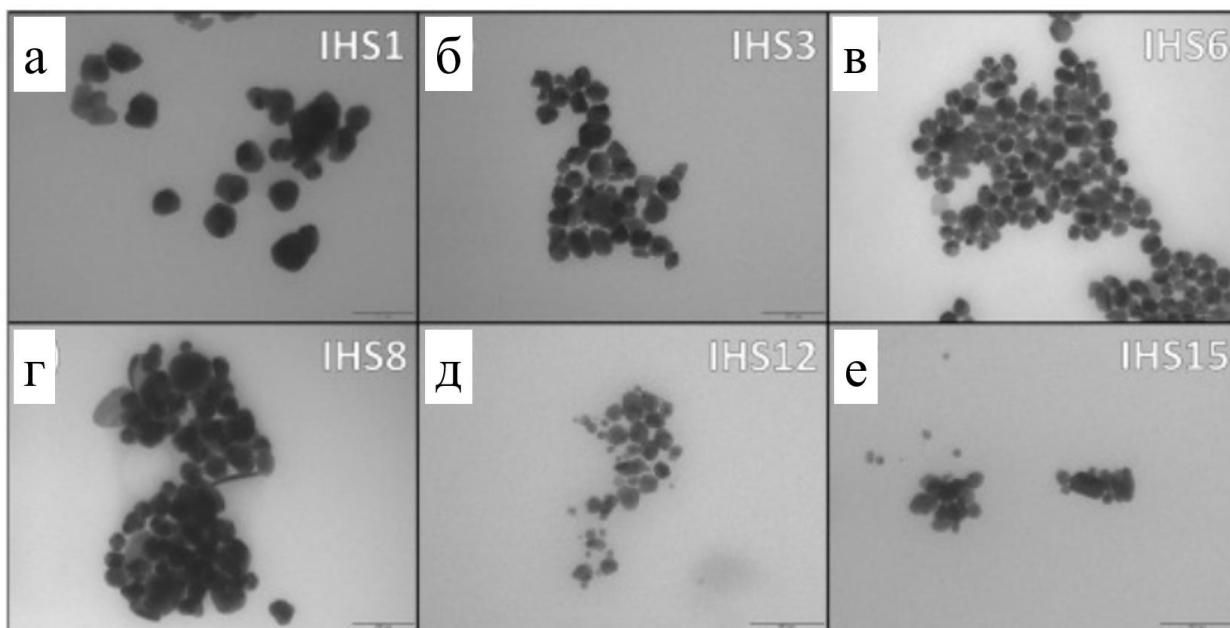
№	Скорость потока, мл/ч			Средний радиус НЧ, нм (полидисперсность, нм)		Объемная доля, %	
	AgNO <sub>3</sub>	Na <sub>3</sub> Cit	AA	Фаза 1	Фаза 2	Фаза 1	Фаза 2
IHS1	2.5	2.5	2.5	25.1 (9.4)	5.9(0.5)	70	30
IHS2	2.7	1.7	3.1	19.6 (5.0)	6.0 (0.5)	92	8
IHS3	5.3	4.3	1.5	23.7(10.0)	4.1 (1.4)	88	12
IHS4	1.2	5.8	2	20.4 (5.7)	5.9(0.5)	91	6
IHS5	1.1	2.4	0.6	19.4 (6.6)	3.9(0.9)	88	12
IHS6	1.6	2.3	3.5	16.6 (4.2)	5.9(0.5)	80	20
IHS7	0.9	0.9	4.3	17.8 (5.1)	5.8 (0.5)	94	9
IHS8	0.8	0.8	5.8	30.0 (6.3)	5.7 (0.5)	87	13
IHS9	1.5	1.3	5.2	26.1 (10.0)	6.3 (0.8)	90	10
IHS10	2.1	1.2	4.1	23.6 (7.2)	5.7 (0.5)	70	32
IHS11	2.8	3.8	3.5	25.4 (7.8)	5.7 (0.5)	92	16
IHS12	3	2	0.7	20.2 (7.0)	3.2 (1.1)	88	28
IHS13	2.9	2.6	2.6	21.4 (6.5)	5.7 (0.5)	91	41
IHS14	3.5	2.7	1.4	17.9 (8.0)	3.4 (0.5)	88	30
IHS15	4.3	2.5	0.5	21.7 (10.0)	3.7 (1.2)	80	8

Среди всех протестированных соотношений наибольший размер частиц более грубой «Фазы 1» (средний радиус 30 нм) был достигнут в случае IHS 8 с соотношением потоков AgNO<sub>3</sub>:Na<sub>3</sub>Cit:AA 0.8:0.9:5.8 мл/ч, то есть со значительным избытком аскорбиновой кислоты, действующей как восстановитель. Между тем, как следует из Р, для близких к стехиометрическим соотношениям Ag:AA (с небольшим

избытком восстановителя) в основном образуются Ag НЧ с высокой долей более крупных частиц. Когда предшественник серебра  $\text{AgNO}_3$  был в избытке (IHS 3, IHS 15) по сравнению с восстановителем (AA), доля более тонкой «Фазы 2» увеличивалась. Эти результаты хорошо коррелируют с моделями, обученными на данных *in situ* УФ-видимого диапазона. Низкие концентрации  $\text{AgNO}_3$  со сбалансированными концентрациями восстанавливающих и стабилизирующих агентов, как прогнозируется, приведут к самой низкой длине волны LSPR, что означает самые маленькие НЧ, в соответствии с наблюдениями SAXS. В то же время наибольшая длина волны LSPR, а следовательно, и размер наночастиц, прогнозируются для комбинаций потоков, близких к стехиометрическим, или с небольшим избытком аскорбиновой кислоты, аналогично результатам SAXS. Эти наблюдения также согласуются с литературными данными, как описано в предыдущем разделе.

Для дальнейшей проверки размера и распределения НЧ была проведена серия измерений с помощью ПЭМ. Из эксперимента SAXS было выбрано 6 точек (IHS 1, 3, 6, 8, 12 и 15 из таблицы 3.10). Для этих комбинаций потоков синтез был повторен в той же микрофлюидной системе с использованием ручного управления потоком. В конце линии задержки образец собирали в сосуд. Там водная фаза, содержащая НЧ Ag, естественным образом отделялась от масла. Затем с помощью микропипетки капли водной фазы были нанесены на Cu-сетки для ПЭМ и оставлены сохнуть на ночь.

На рисунке 3.26 показаны изображения, полученные с помощью ПЭМ для синтезированных НЧ.

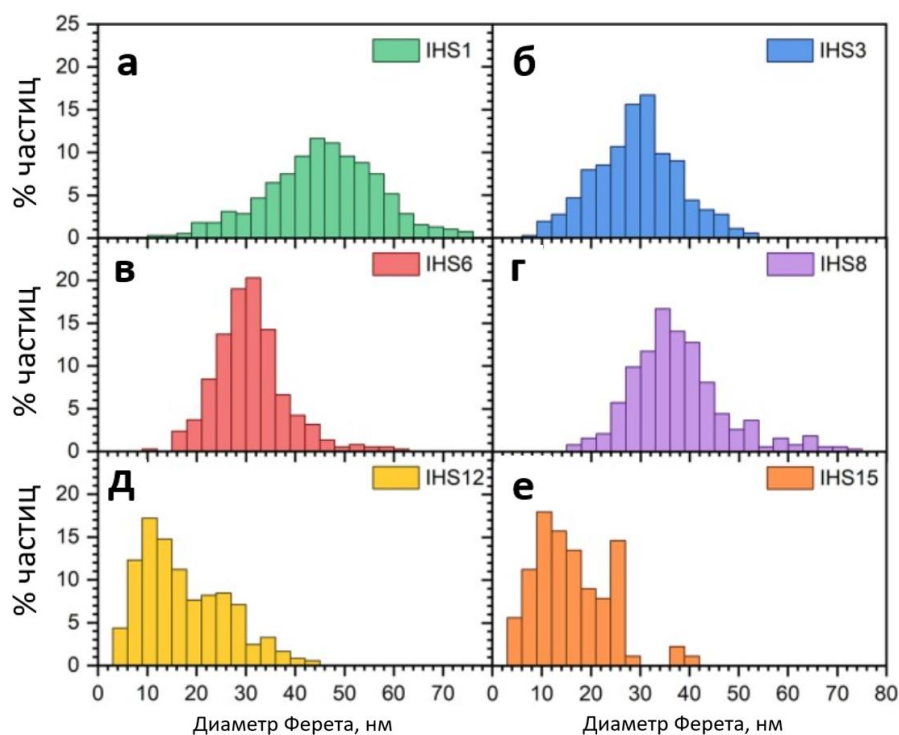


**Рисунок 3.26** – Изображения, полученные с помощью просвечивающего электронного микроскопа, НЧ серебра, синтезированных в микрофлюидных каплях с выбранными комбинациями потоков из таблицы 3.10

Изображения показывают существенную разницу как в размере, так и в форме НЧ в зависимости от потоков реагентов. Несмотря на то, что средние распределения диаметров Ферета, показанные на рисунке 3.27, в целом демонстрируют более высокий размер частиц, чем предполагалось с помощью SAXS, общая тенденция имеет разумное согласие с результатами синхротронной диагностики.

Например, образцы, синтезированные при недостатке восстановителя (в частности, IHS12 и IHS15), демонстрируют широкое и несколько бимодальное распределение размеров (рисунок 3.27 (а-е)), аналогичное SAXS, где для этих образцов наблюдалась значительная концентрация мелких частиц и высокая полидисперсность. Эти образцы также имели самую низкую концентрацию НЧ, что наблюдается как в ПЭМ, так и в низкой интенсивности LSPR в спектрах УФ-видимого диапазона для НЧ, синтезированных при схожих соотношениях потоков  $\text{AgNO}_3$ :AA. Напротив, синтез с избытком аскорбиновой кислоты приводит к образованию более крупных частиц, что особенно заметно для образца IHS8 (рисунок 3.27 (г)), где

наблюдались некоторые из самых крупных частиц, достигающих 60–70 нм. Форма частиц также сильно зависит от условий синтеза. В базовом образце IHS1 (рисунок 3.26) с потоками реагентов, сбалансированными в соотношении 1:1:1, частицы близки к сферическим с несколько неправильной формой и имеют самое гладкое и широкое распределение размеров. Образец IHS6, имеющий самое узкое распределение, в основном состоит из полиэдрических или пирамидальных частиц с четко определенной формой, с включениями некоторых плоских частиц в форме блина. Образец IHS8 (рисунок 3.26 (г)) содержит еще больше этих плоских частиц с некоторыми довольно крупными (до 70 нм) хлопьями Ag. Однако несферические полидисперсные НЧ в некоторой степени ожидаемы, поскольку синтез проводился при субоптимальных значениях pH.



**Рисунок 3.27** – Средние распределения диаметра Ферета, полученные из изображений НЧ Ag, синтезированных в микрофлюидных каплях с выбранными комбинациями потоков из таблицы 3.10, полученных с помощью просвечивающего электронного микроскопа

Основной причиной общей разницы в распределении НЧ по размерам, полученном с помощью SAXS и ПЭМ, вероятно, является тот факт, что фактическое время синтеза для этих двух методов непреднамеренно отличалось. Для эксперимента SAXS измерения проводились на свежесинтезированных НЧ после определенного времени пребывания в микрофлюидной системе. Принимая во внимание, что в случае ПЭМ-визуализации НЧ сначала собирали порциями без какой-либо дополнительной стабилизации и выдерживали таким образом около 10 мин до отделения от масла. Затем капли объемом в несколько микролитров помещали на медные сетки для испарения в течение ночи, что фактически увеличивало время синтеза до нескольких часов и давало НЧ больше времени для роста и агломерации.

Оптимизация синтеза НЧ в микрофлюидных системах сталкивается с несколькими проблемами. Во-первых, это подходящая топология для зон смешивания и реакции МФУ. Во-вторых, это диагностика продукта *in situ*. Применение 3D-печати к системам производства МФУ предлагает хорошую альтернативу стеклянным, полидиметилсилоксановым (ПДМС) и поли(метилметакрилатным) (ПММА) МФУ. Это позволяет быстро и эффективно оптимизировать топологию МФУ для различных задач. Например, становится возможным быстро получать генераторы капель с различным количеством входов для реагентов, производить высокоэффективные микромиксеры с топологией каналов, точно настроенной для определенных свойств смеси. Недорогие 3D-печатные МФУ идеально подходят для лабораторного применения, поскольку их можно настроить для конкретного эксперимента, использовать один раз и выбросить, избегая риска отказа из-за деградации МФУ или перекрестного загрязнения реагентов. Однако, если требуется более длительное использование, технология идеально подходит для экономически эффективного прототипирования и оптимизации микрофлюидных систем. Оптимизированный 3D-дизайн затем может быть масштабирован для производства и изготовлен с использованием более эффективных технологий серийного производства и из более

стойких материалов для продления рабочего цикла. Такой подход позволяет исключить дорогостоящие ошибки на ранних этапах прототипирования с использованием традиционных производственных технологий.

Поверхностные свойства микроканалов, такие как их шероховатость, гидрофобное/гидрофильное поведение, электростатический заряд, играют важную роль в процессах химии потока. Поскольку многие распространенные полимерные материалы, используемые для изготовления МФУ, такие как ПММА или ПДМС, являются естественно гидрофобными, существует широкий спектр методов, позволяющих сделать их поверхность гидрофильной и улучшить адгезию и биосовместимость, такие как плазменная и лазерная обработка, химическое травление, дополнительные полимерные покрытия и т. д. Однако в случае микрофлюидики, напечатанной на 3D-принтере, ситуация совершенно противоположная. Большинство УФ-отверждаемых смол, используемых для SL/DLP, содержат гидрофильные или, скорее, амфифильные компоненты. Последнее приводит к так называемому явлению «гистерезиса угла контакта», когда поверхность канала со временем меняет свой гидрофильный/липофильный характер в зависимости от жидкости, находящейся в контакте с ней. При длительном контакте с водой поверхность смолы динамически перестраивается, обнажая гидрофильные группы, обеспечивая стабильное смачивание 3D-печатных каналов [64]. Это особенно критично для водного синтеза НЧ, поскольку притяжение ионов металла к шероховатой гидрофильной поверхности 3D-печатных каналов, усугубленное электростатическим взаимодействием, создает нежелательные центры зародышеобразования на стенках канала. Во время непрерывного поточного синтеза в водной фазе каналы полностью покрываются слоем металла. До сих пор сообщалось о нескольких попытках смягчить этот эффект. Они включают в себя постпечатную обработку каналов различными гидрофобными мономерами, поверхностно-активными веществами, коммерческими противотуманными и водоотталкивающими

агентами. Некоторые авторы пытаются модифицировать коммерческие смолы для 3D-печати и даже разрабатывать новые составы, оптимизированные для печати МФУ [65]. В этой работе применяется простой подход, чтобы использовать то же явление «гистерезиса угла контакта», которое в противном случае вредно для производительности МФУ. После печати, очистки и сушки все МФУ были заполнены тем же вазелиновым маслом, которое используется в качестве несущей фазы, и оставлены на ночь. Длительный контакт с маслом обнажает олеофильную группу на поверхности канала и обеспечивает стабильное смачивание, создавая тонкую, но стойкую масляную пленку. Этот защитный слой предотвращает рост и осаждение НЧ на стенках канала. Синтез капель обеспечивает лучший контроль реакции и дополнительно предотвращает загрязнение каналов и трубок продуктами реакции, поскольку их поверхность непрерывно промывается маслом, а защитный слой обновляется, что обеспечивает длительную стабильную и точную работу микрофлюидной системы. Масло также предотвращает загрязнение кварцевых окон кюветы для УФ-видимой спектроскопии и нежелательное фоновое накопление, что очень полезно для характеристики *in situ*. Другая важная функция сегментированного потока заключается в обеспечении смешивания реагентов в водной фазе по мере ее прохождения через систему. Первоначальное смешивание происходит в МФУ генератора капель и в нескольких прямых угловых поворотах и переходах диаметра канала на пути к МФУ разделителя [66]. Однако большая часть действия смешивания возникает из-за природы сегментированного потока в линии задержки. В капилляре водная фаза движется в масле в так называемом режиме течения Тейлора [67]. В этом режиме трение жидкости о капилляры и жидкости о жидкость, а также относительное движение создают циркуляционные потоки и вихри внутри водяных капель, обеспечивая быстрое и надежное перемешивание.

Комбинация генератора капель с разделителем обеспечивает большую гибкость в регулировке размера капель, скорости и расстояния между ними.

Характеристика *in situ* с помощью методов УФ-видимой спектроскопии и спектроскопии в ближней инфракрасной области в работающих системах микрореакторов капле может быть сложной с точки зрения фокусировки, синхронизации, фильтрации сигнала и шумоподавления [68]. Гибкость системы генератор + разделитель позволяет пользователю идеально настраивать сегментированные характеристики потока для достижения желаемого объема реакции, интенсивности смешивания и времени пребывания для различных химических процессов. Она также позволяет адаптировать систему для выбранной диагностической методики, что в противном случае является сложной задачей создания надлежащей настройки для измерений. Использование кюветы, напечатанной на 3D-принтере, позволяет легко оптимизировать ее геометрию и оптический путь для различных условий течения капле, концентраций растворов и настроек спектрометрии. В этой работе сочетание оптимизированной кюветы и достаточного объема капли позволило нам собрать высококачественные спектральные данные из отдельных капле. Кроме того, разделительное МФУ обеспечивает длительную стабильность потока капле без слияния, что важно для длительного времени синтеза, особенно при повышенных температурах. Оно позволило многочисленным сериям капле с различными концентрациями реагентов надежно сосуществовать в линии задержки в экспериментальной установке. Таким образом, была устранена необходимость ждать несколько минут окончания реакции с одним набором параметров, прежде чем переходить к следующему, что значительно увеличило скорость скрининга. Все вышеупомянутые преимущества вполне жизнеспособны в случае синхротронных исследований *in situ* синтеза в микрореакторе капле с использованием обычных методов, основанных на поглощении и рассеянии рентгеновских лучей. Поскольку большинство каналов пучка оснащены установками для квазистационарного режима, наличие непрерывной фазы в режиме потока капле вызовет проблемы синхронизации, дополнительный

фон и потерю качества сигнала [69]. Однако работа в сегментированном потоке с длинными каплями обеспечивает достаточно времени для измерений в режиме непрерывного сбора данных для легкой диагностики синхротрона и даже позволяет просто измерять рассеяние и поглощение в каплях непосредственно через трубку ПТФЭ или фторированного этилен-пропилена (ФЭП) без необходимости использования МФУ *in situ*.

Эффективная оптимизация микрофлюидного синтеза требует диагностики *in situ* и обработки данных в режиме онлайн. В данной работе демонстрируется простая и универсальная система на основе микрофлюидных компонентов, напечатанных на 3D-принтере. Технология DLP 3D-печати позволяет легко изготавливать МФУ, адаптированные к конкретным потребностям, таким как смешивание, генерация и размещение сегментов вода-в-масле, *in situ* диагностики методами УФ-видимой спектроскопии и SAXS. Пропитывание маслом 3D-печатных МФУ улучшает гидрофобность поверхности канала, а использование сегментированного потока дополнительно предотвращает рост НЧ на стенках канала и окнах кюветы. Использование достаточно длинных сегментов реакционного раствора и оптимизированного оптического пути в кювете позволяет получать высококачественные данные оптической спектроскопии *in situ* за одно измерение, что позволяет тестировать десятки комбинаций параметров синтеза в час. Для синхротронных исследований он позволяет получать данные *in situ* непосредственно через трубку FER в квазистационарном режиме без необходимости использования микрофокусного луча и синхронизации.

Предлагаемая система в сочетании с программным обеспечением для автоматического управления экспериментом и алгоритмом отбора проб на основе IHS позволяет быстро и эффективно проводить скрининг параметров микрофлюидной реакции. В данной работе продемонстрировано применение этого подхода для изучения взаимосвязей между оптическими свойствами НЧ Ag, распределением по

размерам и параметрами реакции. Используя *in situ* спектроскопию поглощения УФ-видимого диапазона и SAXS, можно быстро провести скрининг влияния условий синтеза на свойства поверхностного плазмонного резонанса, время роста, размер и полидисперсность НЧ Ag. Можно сделать вывод, что в данной установке наиболее монодисперсные НЧ с самым сильным пиком LSPR, смещенным в красную область, должны быть получены с почти стехиометрическим соотношением аскорбиновой кислоты и нитрата серебра с небольшим избытком AA, что было дополнительно подтверждено измерениями SAXS. Подход, основанный на 3D-печатных МФУ, оптимизированных для традиционной спектроскопической характеристики *in situ*, значительно увеличит пропускную способность диагностики материалов в лабораториях и синхротронах и ускорит разработку новых функциональных наноматериалов.

## Глава 4. Разработка, изготовление и апробация 3D печатных микрофлюидных устройств для *in situ* диагностики синтеза новых материалов

### 4.1 Методика синтеза органических соединений в МФУ и *in situ* диагностика кинетики методом УФ-видимой спектроскопии

Берберин – это природный алкалоид с широким спектром биологической активности. Производные берберина с пониженной структурной стабильностью особенно перспективны для применения в фармакологии. Однако синтез дизамещённых берберинов представляет собой сложную задачу. Была продемонстрирована возможность получения 13-замещённых ацетонильных и дигидробербериновых производных типов **2a–3a** (рисунок 4.1) путем их взаимодействия с соответствующими хлоронитроарилaminaми (включая NBF-Cl) [70]. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса показала, что эти соединения глубокого зеленого цвета подвергаются внутримолекулярному переносу заряда, что отражается в резонансных структурах **2b–3b** (рисунок 4.1). Согласно квантово-химическим расчётам, перенос заряда от фрагмента берберина к нитроарильному фрагменту составил  $0,30e$  для дигидроберберина **2a** и  $0,27e$  для 8-ацетонил-дигидроберберина **3a**.

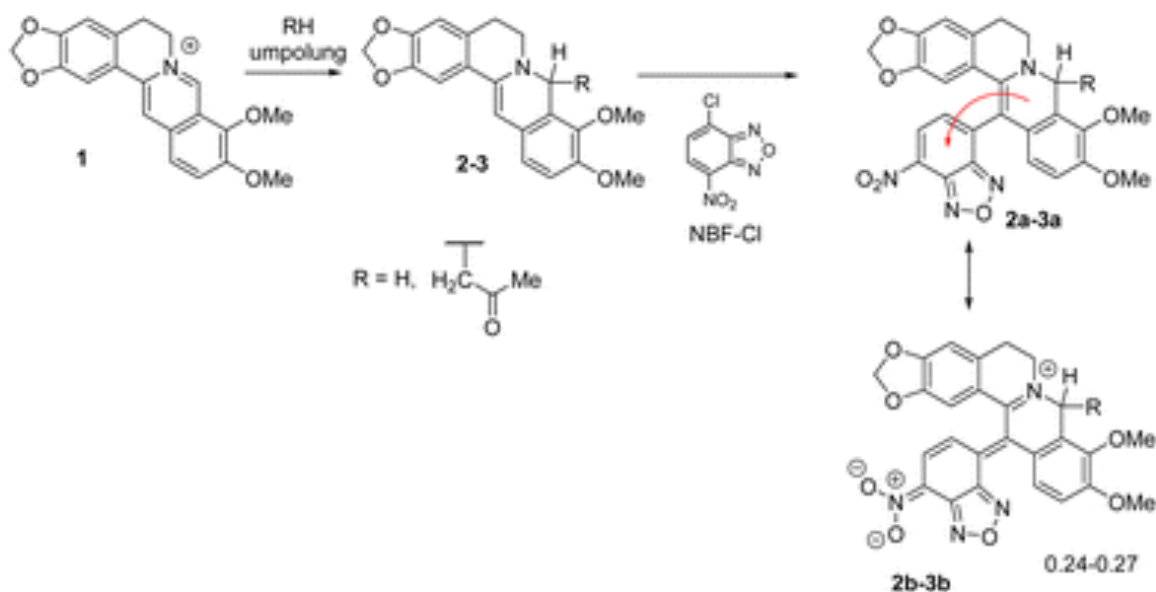


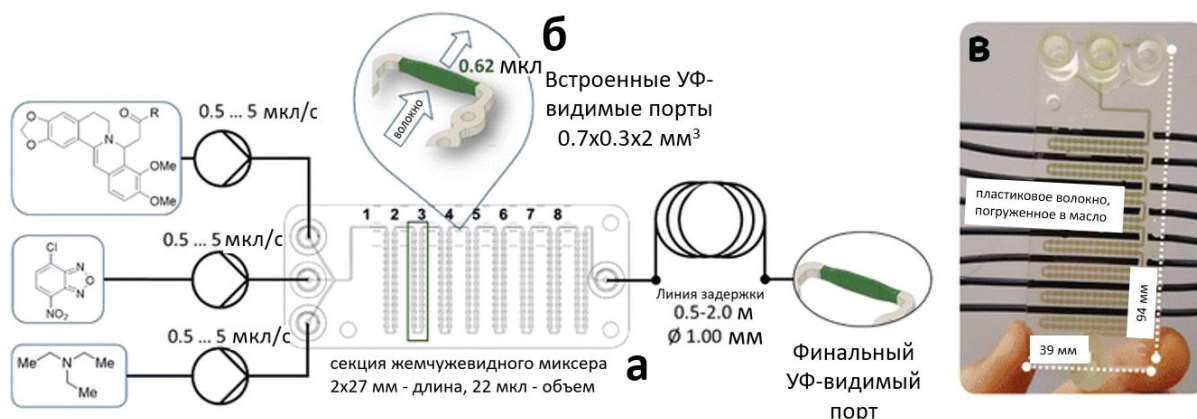
Рисунок 4.1 – Цвиттерионные дизамещённые производные берберина

Избыточная электронная плотность на фрагменте NBF в сочетании с известной склонностью 8,13-дигидроберберинов к окислению указывает на антиоксидантные свойства таких соединений [71]. Однако их стабильному и воспроизводимому синтезу препятствовали две основные проблемы. Во-первых, наши предыдущие исследования показали, что выход и чистота образующихся продуктов сильно зависят от порядка и скорости добавления реагентов в реакционную смесь, а также от эффективности их смешивания. Таким образом, ключевой проблемой может быть затруднённый массоперенос реагентов в реакционной массе, что приводит к значительному увеличению количества побочных продуктов реакции. Во-вторых, из-за интенсивной окраски продуктов реакции сложно определить оптимальное время реакции. Как реагенты, так и продукты реакции быстро разрушаются на обычных хроматографических пластинах. Неоптимальное время реакции может привести к гидролизу и окислению как реагентов, так и продуктов реакции.

В работе были оптимизированы условия для микрофлюидного синтеза 8,13-дизамещённых производных берберина. Микрофлюидный реактор включал в себя пассивный жемчужный смеситель для стехиометрического сочетания реагентов, а также диагностические порты для подключения оптических волокон. Прозрачная поверхность чипа позволяла наблюдать за кинетикой реакции по резким изменениям цвета, а количественный анализ проводился на основе УФ-видимых спектров, измеренных на разных расстояниях от точки смешивания.

Сочетание микрофлюидных технологий с ранее разработанными периодическими методами синтеза 8,13-дизамещённых производных берберина позволило количественно исследовать кинетику арилирования и значительно повысить выход целевых продуктов. Эти результаты могут быть использованы для синтеза различных 8,13-дизамещённых производных берберина. Общая архитектура жемчужного смесителя была дополнительно расширена за счет портов для оптического волокна, как показано на рисунке 4.2. Прозрачная отвержденная смола

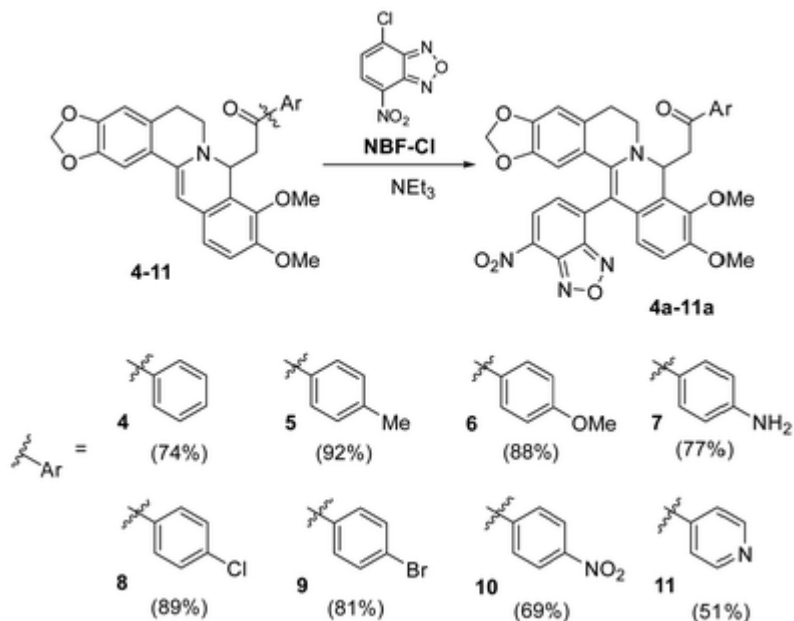
позволяла напрямую регистрировать спектры через стенки МФУ без прямого контакта волокна с реакционной средой. Кроме того, полностью напечатанная УФ-ячейка позволила рационально оптимизировать оптический путь и уменьшить объем передающих ячеек до 0.62 мкл для онлайн-спектрального мониторинга. Подробные сведения о геометрических параметрах интегрированных проточных ячеек приведены на рисунке 4.2.



**Рисунок 4.2** – Схема реакционной установки. (А) Схема 3D-печатной микросхемы-перламутрового смесителя размером  $94 \times 39 \times 4.5$  мм со встроенными портами с поперечным сечением  $0,7 \times 2$  мм<sup>2</sup> и оптическим проходом 0.2 мм для УФ-видимого контроля. (В) Схема УФ-видимой проточной ячейки, встроенной в перламутровый смеситель. Высота окна для пропускания света составляет 850 мкм, а оптический путь — 200 мкм. (С) Фотография МФУ с установленными оптическими волокнами внутри портов 1–8

В качестве основного фармакофорного фрагмента для синтеза новых 8,13-дизамещенных берберинов было выбрано нитробензофуразанильное кольцо. На рисунке 4.3 представлена схема, которая показывает два этапа реакции для получения продуктов **4a–11a**, включающих нуклеофильное присоединение ацетофенона с образованием промежуточных соединений **4–11** и последующее электрофильное замещение водорода в положении С-13 фармакофорным фрагментом с образованием **4a–11a**. Первая фаза реакции проводилась по ранее разработанной

методике без изменений, а вторая фаза процесса была ключевым этапом этого исследования [72]. Стоит отметить, что до нашего исследования для модификации берберина использовались только 8-ацетонильные, 8-алкильные и 8-аллильные дигидроберберины (рисунок 4.1). Использование фенацилов повышает стабильность и возможность выделения как активированных промежуточных соединений **4–11**, так и целевых продуктов **4a–11a** (рисунок 4.3).



**Рисунок 4.3** – Общая схема синтеза производных **4a–11a**

Для синтеза в колбе взвешенное количество восстановленной формы берберина (ДНВ) (1 ммоль) растворили в 15 мл диметилформаида (ДМФ) при перемешивании. К этому раствору добавили 1 ммоль триэтиламина (ТЭА). Отдельно 1 ммоль хлорнитробензофуразана (NBF-Cl) растворили в 15 мл охлаждённого ДМФ и медленно добавили к раствору активированной формы берберина (ДНВ) при постоянном перемешивании. Реакционную смесь перемешивали в темноте в течение 2 часов. Затем смесь выливали в 250 мл охлаждённой дистиллированной воды (при добавлении раствора в воду происходит значительный нагрев до 50 °С). Полученный осадок фильтровали через воронку Бюхнера, промывали 2 порциями охлаждённой воды, а затем 2 порциями горячей воды (90 °С). Сухой остаток подвергли

хроматографии ( $R_f = 0.7$ ) на  $\text{SiO}_2$  с использованием в качестве элюента смеси бензола и тетрахлорэтилена (1 : 1). Очищенный продукт затем перекристаллизовали из смеси тетрахлорэтилена и октана (в соотношении 1 : 2). Выход продуктов составил от 38% до 72%.

Микрофлюидный синтез осуществляется путём приготовления трёх растворов в шприцах следующим образом:

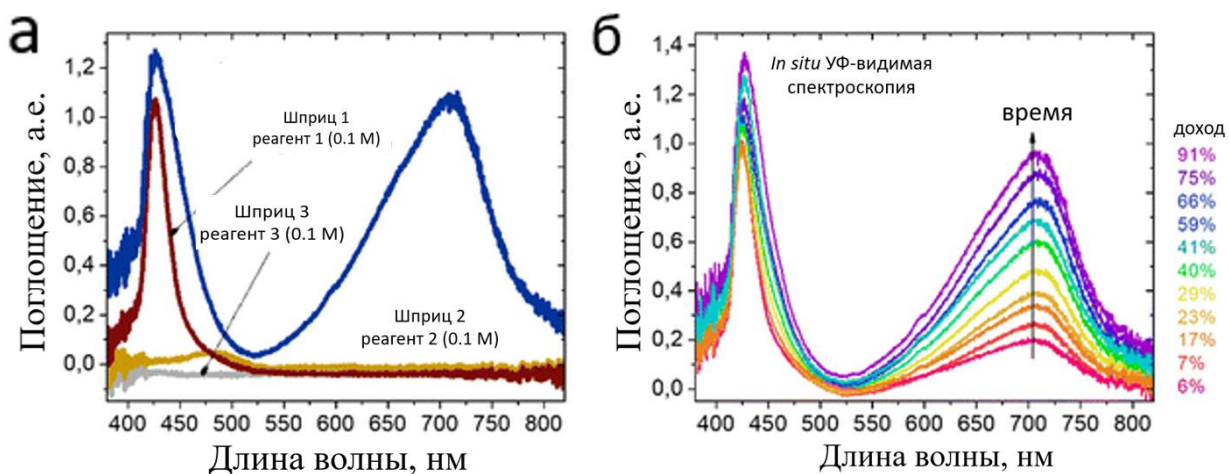
- Шприц № 1: раствор, содержащий 1 ммоль 8-замещенного дигидроберберина (ДНВ) в 10 мл ДМФ.
- Шприц № 2: раствор, содержащий 1 ммоль 4-хлор-7-нитробензофуразана (NBF-Cl) в 10 мл ДМФ.
- Шприц № 3: раствор, содержащий 1 ммоль ТЭА в 10 мл ДМФ.

Микрофлюидная установка состоит из *pearl*-миксера (от англ. *pearl* – жемчужина, букв. жемчужный миксер) (с квадратным сечением канала  $0.45 \times 0.45 \text{ м}^2$  и диаметром круглых препятствий 0.6 мм) с 3 портами для введения реагентов и линией задержки (2-метровая коммерчески доступная трубка из полифенилентерефталата с сечением  $0.79 \text{ мм}^2$ ). Микрофлюидный реактор работал при комнатной температуре  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ . Каждый из реагентов подавался со скоростью 1 мкл в секунду, в результате чего общее время пребывания реакционной смеси в реакторе составляло 11 минут. Массовый выход продукта реакции составлял примерно  $20\text{--}24 \text{ мг с}^{-1}$  (без учёта примесей, в зависимости от молекулярной массы синтезированного продукта). Полученный раствор дополнительно выдерживался в закрытом сосуде в течение 20 минут непосредственно перед очисткой.

Для выделения целевых продуктов реакционную смесь выливают в 250 мл охлаждённой дистиллированной воды. Полученный осадок фильтруют через воронку Бюхнера, промывают двумя порциями охлаждённой воды и двумя порциями горячей воды ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ), каждая порция составляет 50 мл. Сухой остаток перекристаллизовывают

из смеси тетрахлорэтилена и октана (в соотношении 1 : 2). Выход продуктов составляет от 69% до 92%.

Начальные стадии реакции регистрировались в портах 1–8 (рисунок 4.2), а для более длительной реакции после чипа устанавливалась линия задержки длиной от 0.5 до 2 метров. Эта линия задержки позволяла увеличить время реакции до 10 минут перед записью спектра. Использование УФ-видимой спектроскопии было предпочтительным из-за резкого изменения цвета реакционной смеси в течение первых секунд после смешивания. Как показано на рисунке 4.4 (а), сами реагенты почти прозрачны в диапазоне 550–850 нм.



**Рисунок 4.4** – УФ-видимый мониторинг процесса синтеза производного **5a**.

(а) Спектры чистых растворов реагентов и продукта **5a**. (б) Изменения оптического поглощения во время синтеза, измеренные в МФУ с различными временными задержками после момента смешивания реагентов

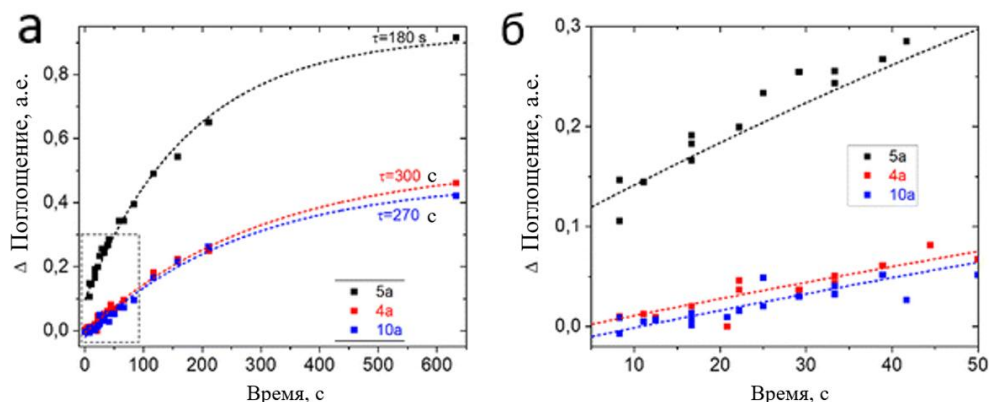
Поэтому оптимальной характеристикой для обнаружения продукта является поглощение при 720 нм. Замещенный берберин обладает высокой оптической плотностью, что потребовало использования короткой длины оптического пути для измерений. Оптимальная ширина канала 200 мкм была выбрана в точке регистрации спектра в канале с 3D-печатью, что позволило регистрировать сигналы как от

реагентов, так и от продуктов для ряда исследуемых соединений в диапазоне значений оптической плотности  $A = 0,5 \dots 1,5$ .

Исследования кинетики реакции проводились для трёх дизаменщённых берберинов: **4a**, **5a** и **10a**, поскольку эти структуры содержат как донорные, так и акцепторные заместители в р-положении ацетилфенонового заместителя. Для каждого соединения был получен ряд спектров из портов 1-8 (рисунок 4.2) и удалённого порта 9 после линии задержки. Перед каждым новым синтезом чип очищали, а ячейки УФ-видимости промывали чистым раствором ДМФ (в 50 раз превышающим объём чипа), чтобы удалить следы продукта и реагентов с поверхности канала. Время реакции оценивали по известной скорости потока и объёму капилляров между портами. В качестве внешней линии задержки для достижения более длительного времени реакции в режиме потока использовалась тефлоновая трубка длиной 0.5, 1.0, 1.5 и 2.0 м и внутренним диаметром 1.0 мм. Изменение времени реакции достигалось за счёт изменения скорости подачи реагента в диапазоне 0.5-5 мкл с<sup>-1</sup>. Использование линии задержки вместо дальнейшего снижения скорости потока обеспечивало хорошее перемешивание внутри жемчужного смесителя. Такой подход позволил нам добиться диапазона временных задержек от 0.5 до 600 с. Результаты исследования кинетики образования продукта представлены на рисунке 4.5.

Исследование кинетики показало, что время достижения равновесия в системе превышает 10 минут. Присутствие донорной группы в арильном заместителе дигидроберберина (**4**) должно способствовать предпочтительному процессу электрофильного замещения в положении С-13. Эта гипотеза подтверждена экспериментально, и самая высокая скорость реакции наблюдалась для соединения **5a**, в то время как соединения **4a** и **10a** демонстрировали аналогичные значения постоянной времени. Более низкая скорость реакции в производных **4a** и **10a** может быть объяснена наличием электроноакцепторных

фрагментов в метилфенилкетоновой группе, но для количественного объяснения необходимы дальнейшие исследования.



**Рисунок 4.5** – Изменения оптической плотности реакционных смесей при 720 нм во время синтеза производных **4a**, **5a** и **10a**, полученные при различных временных задержках с момента смешивания реагентов в МФУ. Пунктирными линиями показана подгонка данных с помощью экспоненциальной функции вида  $y = y_0 + A \cdot \exp(-t/\tau)$ . Временная задержка регулировалась с помощью шприцевых насосов и длины линии задержки. Во всех экспериментах число Рейнольдса изменялось в диапазоне  $Re = 0.07 \dots 0.35$

Наличие основания в реакционной среде играет решающую роль в синтезе производных берберина. Предыдущие исследования показали, что добавление основания в реакционную смесь является необходимым условием для повышения выхода чистых соединений при выделении и кристаллизации [69]. Чтобы изучить влияние ТЭА на процесс реакции, было проведено скрининговое исследование, при котором варьировалась скорость подачи реагентов и ТЭА на входе в смеситель. Фиксировалось время реакции при фиксации общей скорости потока на уровне 4 мкл/с, что привело к снижению скорости потока производного берберина (**5a**) с NBF-Cl при одновременном увеличении скорости потока ТЭА. Интенсивность пика при 720 нм была выбрана в качестве показателя выхода продукта **5a** (аналогично рисунку 4.5). Были рассмотрены только короткие периоды реакции,

когда линейная зависимость концентрации продукта **5a** от времени соответствует только прямому процессу.

Таким образом в работе использование микрофлюидных систем позволило получить ранее недоступные продукты реакции и проводить онлайн-мониторинг реакции. Полученные хинон-иминовые соединения имели яркую окраску и сильное поглощение в видимой области спектра, что потребовало использования короткого оптического пути длиной 0.2 мм, встроенного непосредственно в МФУ. Реакция начинается сразу после контакта реагентов с линейным увеличением концентрации продукта в течение первых секунд реакции и впоследствии следует экспоненциальной асимптоте. Было обнаружено, что добавление ТЭА, которое было необходимо при синтезе в колбе, не оказывало существенного влияния на скорость реакции и его роль заключалась в стабилизации продукта реакции во время экстракции. Время, необходимое для полного превращения реагентов, составляло порядка 10 минут.

#### **4.2 *In situ* диагностика методом спектроскопии рентгеновского поглощения в режиме нахождение наночастиц палладия в микрофлюидных устройствах**

Методика измерения спектров рентгеновского поглощения в режиме *in situ* внутри микрофлюидных устройств проиллюстрирована на примере мониторинга зародышеобразования наночастиц палладия из ацетата Pd(II). Применение диагностики непосредственно через микрофлюидный канал позволило значительно улучшить качество данных и осуществлять мониторинг *in situ* ранних стадий формирования наночастиц палладия. Временная эволюция фракций Pd(II) и Pd(0) отслеживалась на основе регистрации спектров в семи последовательных каналах и количественный анализ проводился с помощью метода линейной комбинации реперных спектров фольги Pd и ацетата палладия.

Анализ процессов внутри микрочипа в реальном времени позволяет оптимизировать параметры процесса быстрым и экономичным способом [73].

Например, можно достичь желаемого размера, формы и состава коллоидных наночастиц, варьируя параметры синтеза. Аналитические методы исследования, применяемые для онлайн-мониторинга процессов внутри или непосредственно после микрочипа, варьируются от лабораторных (оптическая микроскопия, УФ-видимая спектроскопия [74], Рамановская спектроскопия [75], до реализуемых на установках Мега-класса (SAXS [76], дифракция рентгеновских лучей (ДРЛ) [77], рентгеновская абсорбционная спектроскопия (XAS)) [78]. Выбор метода зависит от типа исследуемых материалов. Например, для золотых наночастиц, демонстрирующих характерный плазмонный резонанс, УФ-видимая спектроскопия является мощным инструментом, в то время как для палладиевых наночастиц она становится менее информативной, делая использование рентгеновских методов более предпочтительным.

Есть несколько примеров использования микрофлюидных систем, связанных с XAS, которые были направлены на исследование временной эволюции каталитических систем посредством измерений с пространственным разрешением. Группа Грюнвальдта отслеживала образование золотых наночастиц путем постепенного уменьшения белой линии в спектрах рентгеновского поглощения Au L<sub>3</sub>-края структуры спектра поглощения рентгеновского излучения в области края поглощения (XANES), что указывает на процесс восстановления [79]. Изменение степени окисления железа во время реакции хлорида железа (II) с NaOH отслеживалось с помощью Fe K-края XANES на синхротроне SOLEIL. Ранние этапы формирования нанокристаллов CdSe отслеживались с помощью Se K-края [80]. Группа из Института Пауля Шеррера и Швейцарской высшей технической школы Цюриха изучала осаждение карбоната кальция в микрофлюидной системе на основе капель с помощью спектроскопии рентгеновского поглощения за K-краем кальция [81]. Из-за малых размеров капилляра чипов качество спектров падает с уменьшением оптического пути рентгеновского луча через образец, что вынуждало использовать

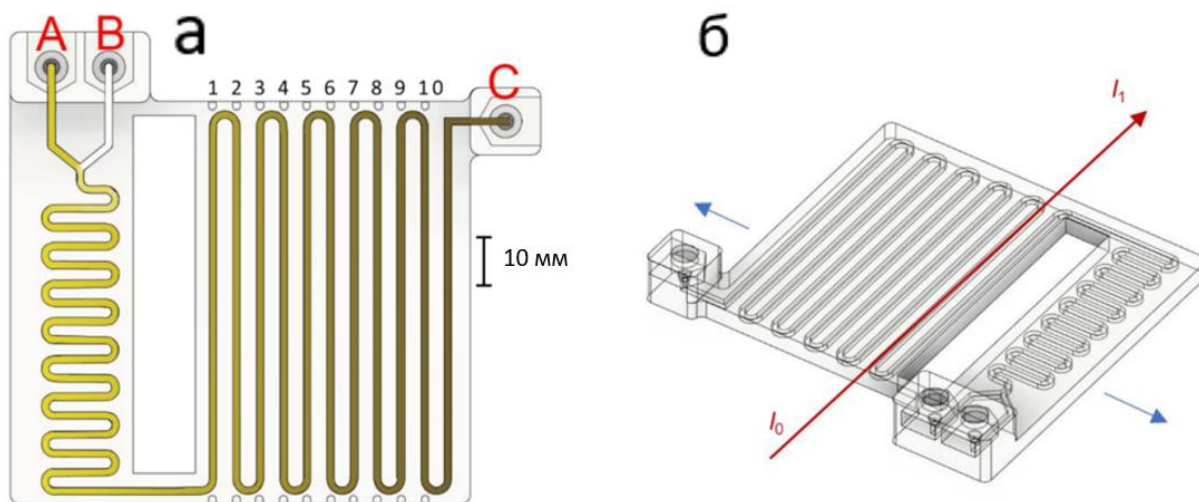
режим флуоресценции (в отличие от режима пропускания) в приведенных выше примерах. Поэтому приходится тратить значительное время для получения данных тонкой структуры рентгеновских спектров поглощения (EXAFS) достаточного качества или ограничивать анализ данных областью XANES. Преимущество высоких энергий рентгеновского излучения, таких как за К-краем палладия, заключается в большей гибкости в проектировании ячеек для измерений *in situ* из-за большой глубины проникновения рентгеновских фотонов. В частности, для таких энергий были предложены ячейки для высоких давлений и температур [82].

В настоящей работе была разработана система на основе чипа с каналами миллиметрового размера для синтеза наночастиц палладия. Ключевой особенностью системы является сбор высококачественных данных XAS в геометрии пропускания путем выравнивания микроканалов с рентгеновским пучком. Устройство было успешно испытано путем мониторинга восстановления ацетата Pd(II) до Pd(0), с образованием небольших нанокластеров палладия.

Чип был разработан с использованием Fusion 360 (Autodesk, Mill Valley, CA, USA) с общей внешней длиной 112 мм, глубиной 100 мм и высотой 5.5 мм и состоял из двух зон (рисунок 4.6): смешивания и реакции, двух входов (А и В) и одного выхода (С).

Общий объем зоны смешивания составлял 0.75 мл. Зона реакции состояла из 10 прямых капилляров (называемых каналом № 1, каналом № 2 и т. д.) длиной 80 мм и поперечным сечением  $1.5 \times 1.5$  мм<sup>2</sup>. Для уменьшения поглощения рентгеновского пучка стенками с внешних сторон стенок в направлении каналов были сделаны небольшие цилиндрические углубления (рисунок 4.6 (а)). Для контроля температуры два силиконовых нагревателя были прикреплены к зоне реакции с верхней и нижней сторон и покрыты теплоизоляцией 3М (3 M, Сент-Пол, Миннесота, США). Разработанный чип был экспортирован в стандартный цифровой файл языка тесселяции (.stl). Этот файл был импортирован в Ultimaker Cura 4.13.1 (Ultimaker B.V.,

Утрехт, Нидерланды). Файл .stl был нарезан на файлы формата gcode для печати методом послойного наплавления (FDM) с высотой слоя 100 мкм и шириной линии стенки 350 мкм. Зоны смешивания и реакции были напечатаны как единое целое. 3D-принтер Ultimaker, работающий на технологии послойного изготовления нитей (FFF), использовался для 3D-печати микрофлюидного устройства с нитью из полиэтилентерефталата (ПЭТФ) (REC3D, Москва, Россия). Эта нить была экструдирована через сопло из нержавеющей стали диаметром 400 мкм на стеклянную печатную платформу, нагретую до 60 °С. Параметры производства приведены в таблице 4.1.



**Рисунок 4.6** – (а) Вид сверху на микрочип и (б) изометрическая проекция с направлением пучка в канале № 2 (красная стрелка), обнаруженным ионизационными камерами до ( $I_0$ ) и после ( $I_1$ ) чипа, а также направлением движения чипа во время измерения (синие стрелки)

**Таблица 4.1** – Настройки, используемые для 3D-печати МФУ

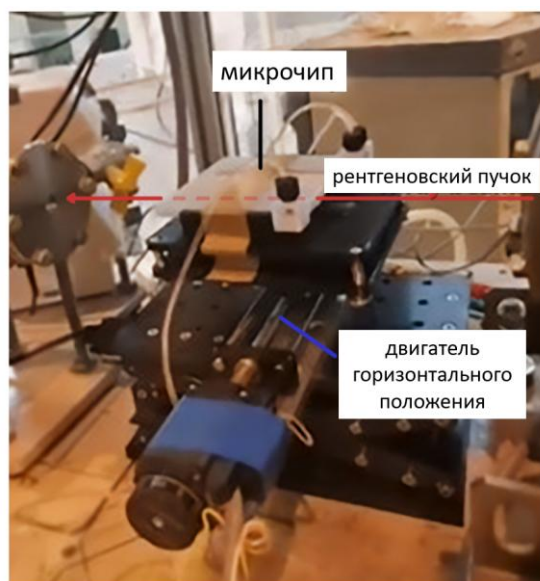
высота слоя, мкм	ширина экструзии, мкм	температура печати, °С	ширина линии заполнения, мкм	количество внешних стенок модели	верхние финишные слои	плотность заполнения, %
100	350	245	420	5	4	50

В качестве прекурсора палладия использовался ацетат Pd(II) (Sigma Aldrich). 20 мг ацетата Pd растворяли в 10 мл толуола (LenReactive) и загружали в один из шприцев (канал А). Раствор 132 мкл триэтиламина (LenReactive) добавляли к 10 мл толуола и загружали во второй шприц (канал В). Затем реагенты дозировали во входные отверстия А и В чипа. Подключение осуществлялось через трубки ПТФЭ, соединенные с чипом с помощью фитингов высокоэффективной жидкостной хроматографии и соединений Luer-lock со шприцами. Скорости потока для каналов А и В были установлены на 3 и 1 мл/ч соответственно. Реакционную зону чипа предварительно нагревали до 50 °С и поддерживали при этой температуре во время процедуры синтеза.

Данные спектроскопии рентгеновского поглощения Pd К-края собирались на станции структурного материаловедения (СТМ) синхротронного источника НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия). Энергия излучения выбиралась с помощью монохроматора с каналом Si(220), работающего в пошаговом режиме. Монохроматор был настроен для уменьшения вклада высших гармоник. Оценочный поток фотонов составлял  $10^7$  фотонов/с/мм<sup>2</sup>. Спектры собирались в диапазоне 24.1–25.2 эВ ( $k_{max} \sim 15 \text{ \AA}^{-1}$ ) с шагом 10 эВ в области предкрая и 1 эВ в области XANES. В области EXAFS был выбран постоянный шаг в  $k$ -пространстве  $0.05 \text{ \AA}^{-1}$ . Время измерения одного спектра составляло около 10 мин. Образец ацетата Pd(II) измерялся одновременно с исследуемым образцом с использованием третьей ионизационной камеры для калибровки энергии. Фольга Pd(0) измерялась в качестве эталонного образца. Профиль пучка был приблизительно  $0.7 \times 0.7 \text{ мм}^2$ , контролировался рентгеновской камерой. Длинные каналы микрочипа были ориентированы параллельно пучку и выровнены так, чтобы пучок мог проходить через центральную часть микроканала, не задевая его краев. Расчет полного поглощения и оценка скачка выполнялись с использованием таблиц Хенке для длины затухания поглощения рентгеновских лучей. В частности, 80 мл толуола привели к

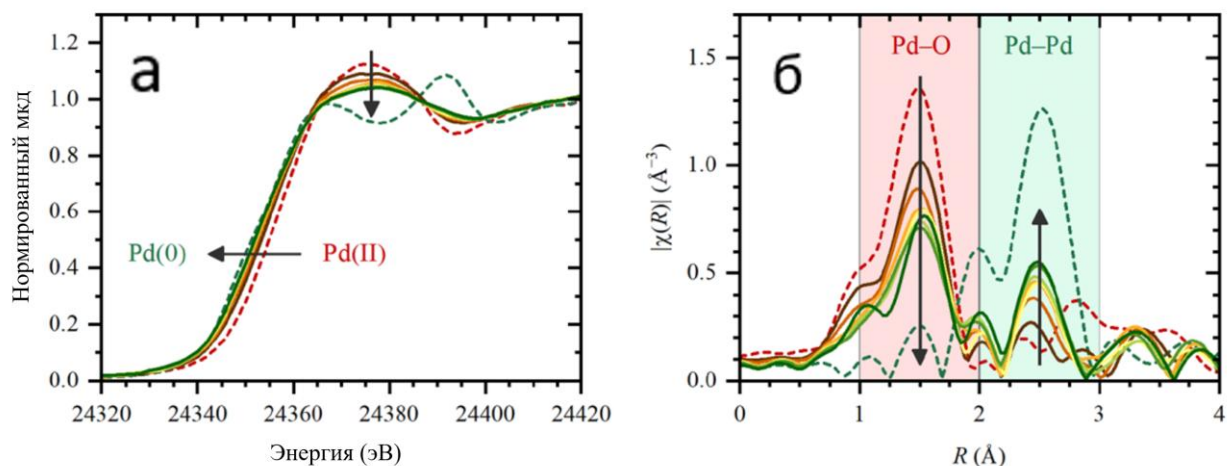
общему поглощению 0.66. Поглощение как передней, так и задней стенками составляет приблизительно 0.02, а ацетат Pd(II) должен был иметь общее поглощение 0.5 с краевым скачком 0.42, что согласуется с экспериментально наблюдаемым. Моторизованный стол образца управлялся дистанционно для исследования образца в различных микроканалах во время синтеза. Все данные XAS обрабатывались и анализировались в программном обеспечении Demeter [83].

МФУ было установлено на автоматизированном столике образца с микроканалами, ориентированными параллельно рентгеновскому пучку как показано на рисунке 4.7.



**Рисунок 4.7** – Фотография микрочипа, установленного на автоматизированном столике образца на линии пучка СТМ

Пропускание рентгеновских лучей по всей длине микроканала позволило оптимизировать скачок края в спектрах XAS за счет увеличения оптического пути. Оптимизированная длина микроканалов позволила получить высококачественные данные в областях XANES и EXAFS (рисунок 4.8).

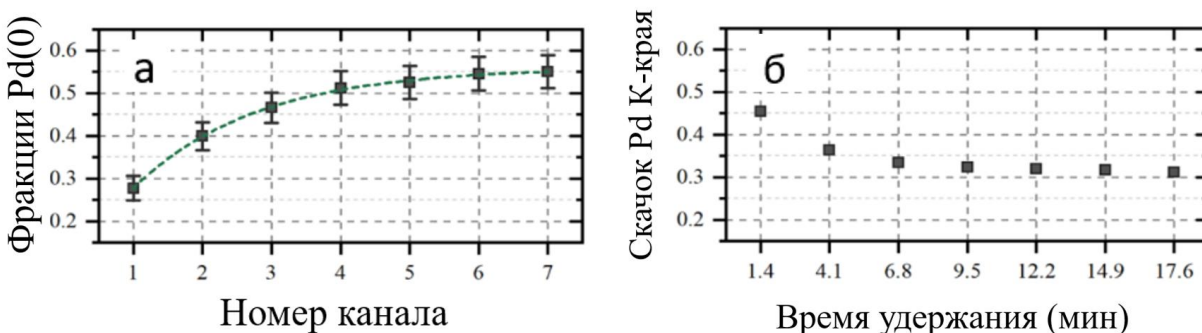


**Рисунок 4.8** – Эволюция данных XANES (а) и FT-EXAFS (б), собранных *in situ* в разных каналах микрочипа (сплошные линии, от коричневого до зеленого).

Пунктирные красные и зеленые линии соответствуют эталонному ацетату палладия (II) и палладиевой фольге соответственно. Спектр FT-EXAFS фольги Pd в части (б) масштабирован на 0.5 для наглядности

Данные собирались в семи последовательных каналах, каждый из которых представлял определенную стадию в процессе формирования наночастиц палладия. В данных XANES (рисунок 4.8 (а)) наблюдался четкий переход от Pd(II) к Pd(0), что указывало на восстановление прекурсора ацетата палладия. В то же время данные FT-EXAFS показали увеличение вклада Pd-Pd (светло-зеленая область на рисунке 4.8 (б)), что свидетельствовало о том, что центры Pd(0), образованные в микрочипе, представлены именно наночастицами палладия. Из-за небольшого размера частиц интенсивность вклада Pd-Pd в данных FT-EXAFS (которая пропорциональна среднему координационному числу) значительно ниже по сравнению с металлическим палладием.

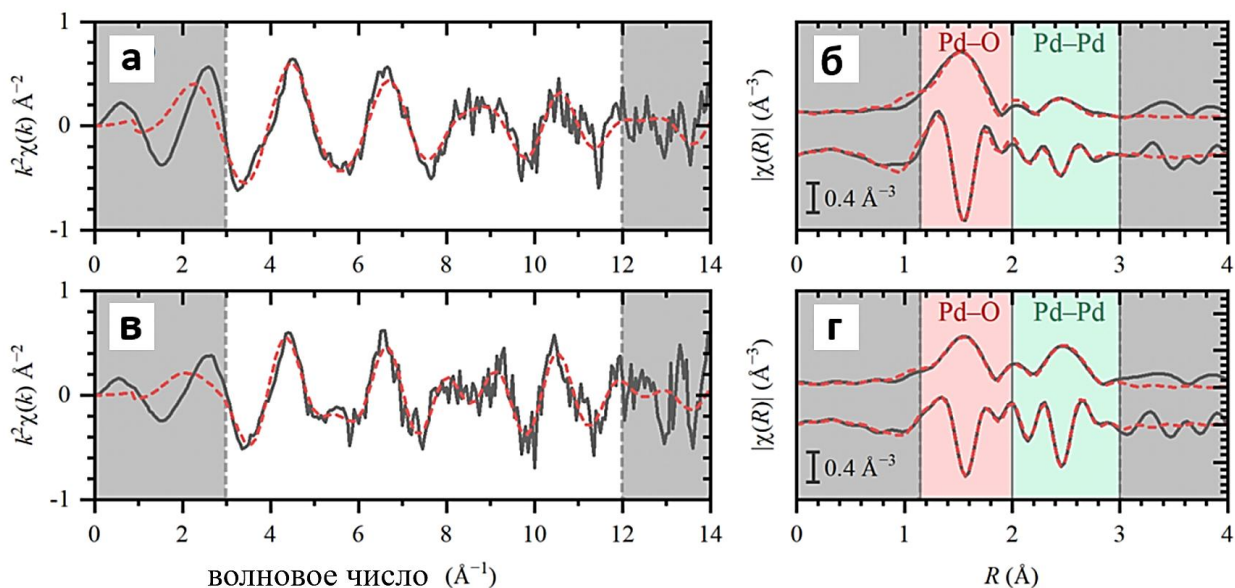
Подгонка методом линейной комбинации компонент использовалась для количественной оценки количества Pd(0) и Pd(II) в каждом канале (рисунок 4.9 (а)).



**Рисунок 4.9** – (а) Эволюция фракции Pd(0) (черные квадраты) по первым семи каналам микрочипа, полученная путем подгонки экспериментальных данных XANES по референтным спектрам ацетата палладия (II) и палладиевой фольги. Зеленая пунктирная линия соответствует экспоненциальной подгонке данных. (б) Изменения в скачке края в данных XAS, которые пропорциональны общей концентрации палладия в канале

В седьмом канале концентрация Pd(0) близка к значению насыщения 0.56, полученному путем подгонки концентраций Pd(0) экспоненциальной функцией (зеленая пунктирная линия на рисунке 4.9 (а)). Однако фактическое количество частиц Pd(0), полученное таким методом, может быть значительно занижено, поскольку ожидается, что фактическое состояние малых наночастиц палладия будет иметь сильный вклад от взаимодействия поверхностных атомов с растворителем и покрывающим агентом и может отличаться от палладиевой фольги, используемой в качестве эталона для анализа методом линейных комбинаций. Примечательно, что, несмотря на разницу в форме спектра, положение края поглощения, которое указывает на степень окисления, очень близко к положению палладиевой фольги. Также исследовалось изменение абсолютного значения скачка края, пропорционального общей концентрации палладия в каждом канале. Наблюдалось уменьшение примерно на 32% от первого к седьмому каналу (рисунок 4.9 (б)), что было связано с осаждением частиц на стенках микроканалов. Концентрация Pd, рассчитанная на основе скачка края, уменьшается с 7.5 до 5.5 мкмоль/мл. Учитывая

объем ячейки и скорость потока, было также рассчитано время реакции (ось абсцисс на рисунке 4.7 (б)). Количественный анализ EXAFS (рисунок 4.10 и таблица 4.2) дополнительно подтвердил образование связей Pd–Pd  $2.75 \pm 0.02 \text{ \AA}$ , как в металлической палладиевой фольге.



**Рисунок 4.10** – Экспериментальные (сплошной черной) и подобранные (пунктирный красный) данные EXAFS в  $k$ -пространстве (а, в), и величины и мнимые части в  $R$ -пространстве (б, г) для каналов № 1 (а, б) и № 7 (в, г). Серый фон показывает области, исключенные из подгонки

**Таблица 4.2** – Межатомные расстояния ( $R$ ), координационные числа ( $N$ ), параметры Дебая-Уоллера ( $\sigma^2$ ), сдвиг нулевой энергии ( $\Delta E_0$ ) и относительные доли ( $\alpha$ ) для вклада Pd-O и Pd-Pd, полученные из анализа EXAFS для данных, собранных на канале № 7

Пара	$R, \text{ \AA}$	$N$	$\sigma^2$	$\Delta E_0$	$\alpha$
Pd-O	$2.01 \pm 0.01$	$4^a$	$0.001 \pm 0.001$	$2.9 \pm 0.8$	$0.41 \pm 0.04$
Pd-Pd	$2.75 \pm 0.02$	$3.6 \pm 0.5$	$0.006 \pm 0.001$	$-3.0 \pm 0.8$	$0.59^b$

<sup>a</sup> фиксированный, <sup>b</sup> фиксированный к  $1 - \alpha_{\text{Pd-Pd}}$

В то же время сильный сигнал Pd–X (X=C, N, O) присутствует на расстоянии  $2.01 \pm 0.01 \text{ \AA}$ . Для извлечения размера частиц на основе средних координационных чисел Pd–Pd, была применена следующая модель. Координационное число Pd–X (Pd–O) было зафиксировано на 4, как в прекурсоре палладия, а вклад Pd–O был умножен на  $S_0^2 \cdot 4 \cdot \alpha$ , где  $\alpha$  – оставшаяся доля прекурсора Pd, а  $S_0^2$  – коэффициент уменьшения амплитуды, зафиксированный на 0.8, как определено для эталонной палладиевой фольги. Вклад Pd–Pd был умножен на  $S_0^2 \cdot N_{Pd-Pd} \cdot (1 - \alpha)$ , где  $N_{Pd-Pd}$  – среднее координационное число. Полученное  $N_{Pd-Pd} = 3.6$  соответствует размеру частиц 0.5 нм в предположении идеальных сферических частиц с ГЦК-структурой (с первым координационным числом оболочки 12):

$$N_{Pd-Pd} = 12 \left[ 1 - \frac{3 R_{Pd-Pd}}{2 D} + \frac{1}{2} \left( \frac{R_{Pd-Pd}}{D} \right)^3 \right] \quad (10)$$

где  $N_{Pd-Pd}$  — расстояние первой оболочки Pd–Pd, а  $D$  — средний размер частиц. Однако, если частицы имеют дефекты или отклоняются от ГЦК-решетки, такое определение будет занижать реальный размер частиц.

Предложенная методология позволила получить *in situ* данные XAS высокого качества для низкоконцентрированной системы во время формирования наночастиц палладия в растворе. В частности, был получен скачок края почти 0.5, что всего в два раза ниже оптимального, обычно получаемого для *ex situ* (твердых) образцов. Это позволило нам использовать данные EXAFS до  $k \sim 12 \text{ \AA}^{-1}$  для спектров, собранных *in situ*, с временем получения всего 10 мин на синхротронном источнике второго поколения. Качество сигнала в k-пространстве можно легко оценить из рисунка 4.10 (а), что имеет решающее значение для анализа EXAFS. Для сравнения, в других *in situ* ячейках аналогичное качество данных было достигнуто для гораздо более высококонцентрированных систем с использованием значительно более продвинутого синхротронного источника (и примерно на 5 порядков более высокого потока фотонов).

Следует также отметить, что межатомное расстояние Pd-Pd, полученное для сформированных палладиевых кластеров, аналогично таковому для объемной палладиевой фольги. Хотя сокращение расстояний металл-металл можно ожидать для палладиевых наночастиц, этот результат согласуется с предыдущими исследованиями нанесенных частиц Pd с размерами от 1 до 10 нм на различных носителях [84]. Удлинение расстояний Pd-Pd может быть вызвано присутствием атомов Н или С, легко образующих гидриды палладия [85] и карбиды [86] и расширяющих решетку. Аналогичное объяснение было представлено Чапиной и ее коллегами, которые пришли к выводу, что атомы Н или С могут возникать в результате каталитического разложения органических соединений, присутствующих во время синтеза [87].

В то же время общий объем образца, использованного во время эксперимента, составлял около нескольких миллилитров, а общее количество прекурсора Pd, израсходованного за весь эксперимент, составило менее 20 мг (для сравнения, это даже меньше, чем требуется для гранулы размером 13 мм для стандартного измерения *ex situ* XAS ацетата Pd(II)). Следует также отметить, что благодаря низкой цене и развитой технологии 3D печати такие микрочипы можно легко настроить и оптимизировать для любой конкретной жидкой системы в зависимости от общего поглощения самого растворителя, концентрации металла и т. д. Кроме того, следует отметить, что такая геометрия выгодна по сравнению с перпендикулярной при измерении XAS в режиме флуоресценции, что также обусловлено тем, что в последнем случае рентгеновский луч может вызывать дополнительные процессы (например, фотовосстановление, зародышеобразование и радиационное повреждение) на интерфейсе чип/жидкость, которые внесут значительный вклад в собираемый сигнал PAC, тогда как в представленной геометрии, даже если это так, его вклад в общий спектр, усредненный по всему каналу, незначителен. Наконец, тот факт, что рост кластеров Pd наблюдается по всем семи каналам, а снижение концентрации Pd незначительно, начиная уже со второго канала (рисунка 4.8 (б)),

позволяет предположить, что наблюдаемая эволюция не затронута (по крайней мере, значительно) эффектами повреждения пучка.

Элементы с краями поглощения в жестком рентгеновском диапазоне, такие как Pd, являются, очевидно, выгодными системами для таких экспериментов, поскольку поглощение органическим растворителем при этих энергиях очень низкое. Для K-краев 3d-металлов и выступов 5d-металлов оптимизация длины микроканала будет сильно ограничена поглощением растворителя. Даже для высоких энергий следует также учитывать и тщательно выбирать растворитель. Например, ДМСО на K-крае Pd поглощает примерно в 6 раз сильнее, чем вода, и примерно в 20 раз сильнее, чем толуол. Дополнительная синхронизация сбора рентгеновских данных в режиме пропускания, в отличие от флуоресценции, где это менее важно, со скоростью потока должна быть сделана в случае использования сегментированного потока.

Наконец, следует отметить, что хорошее качество спектра EXAFS достигается за счет временного разрешения, которое снижается из-за усреднения сигнала по длине канала. С одной стороны, эта проблема может быть решена путем увеличения потока реагентов или уменьшения толщины микроканалов. Например, уменьшение диаметра канала ниже 1 мм, как в большинстве современных микрофлюидных устройств, все еще будет достаточным для измерения XAS на современных синхротронных пучках, оптика которых может обеспечивать фокусировку пучка вплоть до диапазона 100 мкм. Однако следует учитывать, что как скорость потока, так и геометрия канала могут влиять на реакцию, изменяя схему смешивания. С другой стороны, поток фотонов на большинстве современных каналов EXAFS на 3-5 порядков выше, чем используемый в текущей работе, что позволит получать высококачественные данные из гораздо более коротких каналов, улучшая временное разрешение (например, уменьшение длины канала до 10 мм все равно даст разумный скачок края около 0.05).

## Глава 5. Микрофлюидный синтез в капельном режиме микро- и наночастиц карбоната кальция и контроль продуктов реакции

Микрофлюидные технологии открывают новые возможности для синтеза микро- и наночастиц карбоната кальция ( $\text{CaCO}_3$ ) с контролируемыми размерами, пористостью и функциональными свойствами [88, 89]. В данной работе представлены результаты капельного микрофлюидного синтеза частиц  $\text{CaCO}_3$  и их гибридных форм с серебром ( $\text{CaCO}_3@Ag$ ), предназначенных для применения в доставке лекарств и антибактериальной терапии. Использование 3D-печатных микрофлюидных устройств позволило добиться высокой однородности частиц, уменьшения их среднего размера до 100 нм (для  $\text{CaCO}_3$ ) и 650 нм (для  $\text{CaCO}_3@Ag$ ), а также увеличения пористости, что подтверждено методами SAXS и РЭМ. Показано, что частицы, синтезированные в микрофлюидном чипе, обладают повышенной загрузочной способностью (16 мас.% для  $\text{CaCO}_3$  и 11 мас.% для  $\text{CaCO}_3@Ag$ ) по сравнению с традиционными методами. Гибридные частицы  $\text{CaCO}_3@Ag$  демонстрируют выраженную антибактериальную активность против *Escherichia coli*, ингибируя рост бактерий при концентрации 12–15 частиц на клетку. Полученные результаты подчеркивают перспективность микрофлюидного подхода для создания высокоэффективных носителей лекарств и тераностических систем с заданными свойствами.

Современная фармакология и биомедицина стоят перед сложной задачей разработки эффективных систем доставки лекарственных средств, способных обеспечить контролируемое высвобождение активных веществ, минимальные побочные эффекты и направленное действие на патологические очаги [90, 91]. Особый интерес в этом контексте представляют микро- и наночастицы карбоната кальция ( $\text{CaCO}_3$ ), которые благодаря своей уникальной структуре и свойствам открывают новые возможности для создания инновационных лекарственных форм. Карбонат кальция привлекает внимание исследователей благодаря ряду ключевых

преимуществ: исключительной биосовместимости, высокой пористости, способности к биодegradации и простоте функционализации поверхности [92]. Эти характеристики делают его идеальным кандидатом для разработки систем доставки широкого спектра терапевтических агентов – от низкомолекулярных лекарственных веществ до белков и нуклеиновых кислот.

Однако традиционные методы синтеза частиц  $\text{CaCO}_3$ , такие как осаждение в объемной фазе или механическое измельчение, имеют существенные ограничения. Основные проблемы включают широкое распределение частиц по размерам, низкую воспроизводимость процесса, трудности контроля морфологии и ограниченные возможности масштабирования. Кроме того, при классических подходах сложно добиться точного управления пористой структурой частиц, что непосредственно влияет на их загрузочную способность и кинетику высвобождения лекарств. Эти ограничения стимулируют поиск новых, более совершенных методов синтеза, позволяющих получать частицы с заданными характеристиками.

В последнее десятилетие микрофлюидные технологии совершили настоящую революцию в области синтеза функциональных микро- и наноматериалов [93]. Принципиальное отличие микрофлюидного подхода заключается в проведении химических реакций в строго контролируемых условиях микроканалов, где ключевые параметры процесса (скорость потока, время смешивания, температура) могут регулироваться с высокой точностью. Капельный микрофлюидный синтез, в частности, позволяет создавать идеально однородные микрокапли, которые выполняют роль миниатюрных реакторов. Такая организация процесса обеспечивает ряд уникальных преимуществ:

1. *Прецизионный контроль размеров частиц.* Ограниченный объем микрокапель позволяет точно регулировать количество реагентов, участвующих в образовании каждой частицы, что обеспечивает узкое распределение по размерам;

2. *Управление морфологией и структурой.* Вариация параметров микрофлюидной системы (геометрия каналов, скорость потоков, состав фаз) дает возможность контролировать форму частиц и их внутреннюю архитектуру, включая пористость и распределение пор по размерам;
3. *Высокая воспроизводимость.* Стандартизированные условия в микрофлюидных чипах обеспечивают минимальные отклонения между партиями синтезированных частиц;
4. *Возможности масштабирования.* Параллелизация микрофлюидных систем позволяет увеличивать производительность без потери контроля над качеством частиц;
5. *Интеграция с методами анализа.* Микрофлюидные платформы могут быть оснащены системами *in situ* мониторинга, что значительно ускоряет процесс оптимизации синтеза.

Особую ценность микрофлюидные технологии представляют для синтеза сложных гибридных систем, таких как частицы  $\text{CaCO}_3$  с металлическими наночастицами. В частности, комбинация карбоната кальция с наночастицами серебра ( $\text{CaCO}_3@Ag$ ) объединяет преимущества обоих компонентов: высокую загрузочную способность  $\text{CaCO}_3$  и выраженные антибактериальные свойства серебра. Такие гибридные системы перспективны для создания препаратов двойного действия, сочетающих доставку лекарств и антимикробную терапию.

Важнейшим аспектом разработки микрофлюидных методов синтеза является комплексная характеристика получаемых частиц. В этом отношении методы рассеяния излучения, такие как SAXS и ДРС, предоставляют уникальную информацию о структуре и свойствах частиц. SAXS позволяет исследовать наноразмерную организацию материала, включая распределение пор по размерам и их пространственное расположение, в то время как динамическое рассеяние света (ДРС) дает точные данные о гидродинамических размерах частиц и их агрегационной

стабильности. Сочетание этих методов с РЭМ обеспечивает всестороннюю характеристику синтезированных материалов.

В представленной работе детально исследуются возможности капельного микрофлюидного синтеза для получения микро- и наночастиц  $\text{CaCO}_3$  и их гибридных форм с серебром. Особое внимание уделяется взаимосвязи между параметрами микрофлюидной системы (геометрия чипа, скорости потоков, состав реагентов) и свойствами получаемых частиц (размер, пористость, кристаллическая структура). Экспериментальные результаты демонстрируют значительные преимущества микрофлюидного подхода по сравнению с традиционными методами синтеза, включая возможность точного контроля размеров частиц в диапазоне от 100 до 1000 нм, создание заданной пористой структуры и высокую воспроизводимость процесса.

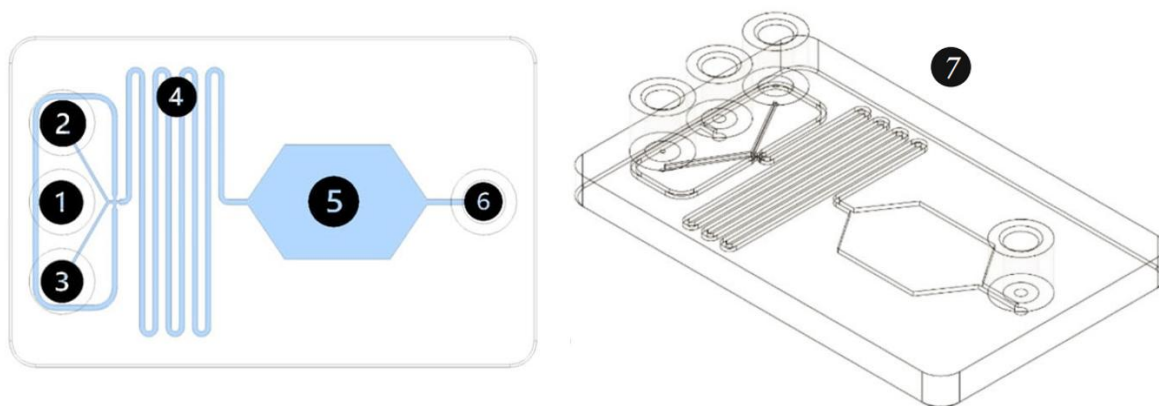
Отдельный раздел работы посвящен исследованию функциональных характеристик синтезированных частиц, в частности их загрузочной способности по отношению к модельным лекарственным веществам и антибактериальной активности гибридных систем  $\text{CaCO}_3@Ag$ . Полученные результаты имеют важное значение для разработки новых поколений систем доставки лекарств, сочетающих высокую эффективность, контролируемое высвобождение и дополнительные терапевтические функции.

Перспективы развития микрофлюидных технологий в области синтеза функциональных материалов связаны с дальнейшей миниатюризацией и автоматизацией процессов, разработкой «умных» чипов с обратной связью, а также интеграцией с методами машинного обучения для оптимизации параметров синтеза. Представленные в данной работе результаты вносят существенный вклад в это направление исследований, демонстрируя огромный потенциал микрофлюидных подходов для создания инновационных материалов медицинского назначения.

Хлорид кальция ( $\text{CaCl}_2$ ), карбонат натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), касторовое масло, этиленгликоль, бычий сывороточный альбумин (БСА, 66 кДа), нитрат серебра

( $\text{AgNO}_3$ ), тетраметилродамин (ТРИТЦ), ИПС, гексан, этанол, минимальная питательная среда Дульбекко (DMEM), бычья сыворотка (FBS), аламар синий и кальцеин-АМ были приобретены в Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Минимальная питательная среда (MEM), пенициллин, стрептомицин, трипсин и трипановый синий, а также 5% раствор глюкозы ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) были приобретены в Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс, США). В экспериментах использовалась деионизированная вода с удельным сопротивлением выше  $18.2 \text{ МОм}\cdot\text{см}^{-1}$ , полученная с помощью трехступенчатой системы очистки Milli-Q Plus 185.

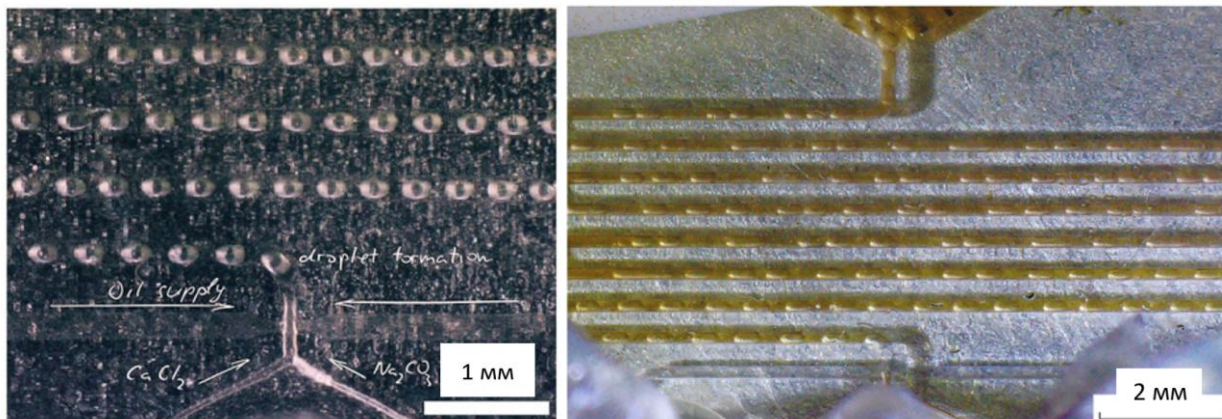
Топология МФУ была разработана с помощью системы автоматизированного проектирования Fusion 360 (Autodesk, Сан-Франциско, Калифорния, США). Конструкция с тремя входами (рисунок 5.1) была выбрана для формирования капель в касторовом масле (вход 1) из смеси двух реагентов (входы 2–3). Поперечное сечение канала составляло  $200 \text{ мкм} \times 200 \text{ мкм}$  перед отверстием для фокусировки потока и  $400 \text{ мкм} \times 200 \text{ мкм}$  в зоне реакции. Для контроля формы и размера капель использовалась камера для хранения капель.



**Рисунок 5.1** – Топология МФУ на основе капель:

- 1 – вход для транспортной фазы, 2 – реагент 1, 3 – реагент 2, 4 – зона реакции,  
5 – камера хранения капель, 6 – выход, 7 – общий вид

МФУ было напечатано с помощью технологии DLP, реализованной в соответствии с описанием в главе 2. Для изучения синтеза карбоната кальция в отдельных каплях были проведены эксперименты с МФУ (рисунок 5.2).



**Рисунок 5.2** – Микрофотография плоскости МФУ во время образования капель раствора  $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{CO}_3$  в касторовом масле (слева) с добавлением 0.1 М  $\text{AgNO}_3$  и избыточного количества  $\text{NH}_4\text{OH}$ , с последующей промывкой в 5% растворе глюкозы ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) (справа)

Для кристаллизации карбоната кальция небольшие количества эквимольных 1 М растворов хлорида кальция и карбоната натрия подавались через два входа МФУ со скоростью потока 0.3 мл/ч. Растворы солей смешивались в двух экспериментальных режимах: (i) индивидуальное использование в виде чистых растворов и (ii) совместное использование с добавленным 0.1 М  $\text{AgNO}_3$  и избыточным количеством  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Капли формировались с помощью системы фокусировки потока воды касторовым маслом со скоростью потока 0.5 мл/ч. Затем сформированные частицы совместно с  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{OH}$  обрабатывались 5% раствором глюкозы с одновременным нагревом всего МФУ до 40 °С. Продукты реакции собирали на выходе МФУ, быстро переносили в пробирку Эппендорфа объемом 2 мл и подвергали нескольким циклам промывки в гексане и этаноле. Сухие порошки частиц были получены после промывки в этаноле и сушки на воздухе.

Кроме того, были проведены контрольные эксперименты, в которых карбонат кальция осаждался в объемной фазе. Контрольный образец  $\text{CaCO}_3$  был сформирован с использованием метода, подробно изученного в [94]. Для этого был применен модифицированный протокол, подразумевающий синтез сферических микрочастиц  $\text{CaCO}_3$  с пористой структурой. А именно, 0.5 мл 0.5 М раствора  $\text{CaCl}_2$  и 0.5 мл 0.5 М раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  вводили в вязкую среду (многоатомный спирт), содержащую 4 мл этиленгликоля, помещенную в лабораторный стеклянный сосуд объемом 25 мл. Затем смесь перемешивали с помощью стандартного магнитного якоря длиной 1 см на магнитной мешалке со скоростью вращения 500 об/мин. После 2-часового перемешивания полученную суспензию разделяли центрифугированием и дважды промывали водой и спиртом.

В качестве контрольного образца синтезировали  $\text{CaCO}_3$  с помощью традиционных методов, используемых во многих исследованиях. Для этого сферические микрочастицы  $\text{CaCO}_3$  с пористой структурой были синтезированы по методике, разработанной Володкиным и др. [85]. Вкратце, раствор 0.5 М  $\text{CaCl}_2$  (0.5 мл) и раствор 0.5 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.5 мл) были добавлены в вязкую среду, состоящую из 4 мл этиленгликоля, в лабораторный стакан объёмом 25 мл и перемешаны с помощью стандартной магнитной мешалки длиной 1 см. Перемешивание этой смеси осуществлялось со скоростью 500 оборотов в минуту. Перемешивание прекратили через 2 часа, чтобы дать частицам осесть. Полученную суспензию затем разделили с помощью центрифугирования и двух промывок водой.

Для синтеза модельного конъюгата раствор ТРИТЦ (1 мг) осторожно растворяли в 5 мл этанола. Полученный таким образом раствор ТРИТЦ добавляли к раствору БСА (20 мл, 4 мг/мл, карбонатно-бикарбонатный буфер, pH 8.5), и смесь непрерывно перемешивали в течение 12 ч при 4°C. Затем раствор ТРИТЦ–БСА подвергали диализу против деионизированной воды в течение четырех дней для удаления остаточных агентов. Загрузка микрочастиц  $\text{CaCO}_3$  осуществлялась путем

замораживания суспензии в присутствии целевого соединения по методике, описанной в [95]. Для этого к 10 мг частиц  $\text{CaCO}_3$  добавляли 2 мл раствора ТРИТЦ–БСА, и смесь помещали в микроцентрифужную пробирку и инкубировали в морозильной камере при температуре  $-17^\circ\text{C}$  в течение 2 ч, при медленном перемешивании. Затем образцы размораживали при комнатной температуре, тщательно промывали и высушивали в сушильном шкафу. Цикл замораживания/размораживания повторяли три раза. Загрузка также производилась методом соосаждения; в этом случае инкапсулированный материал вводился во время синтеза частиц карбоната кальция. Эта техника загрузки была реализована либо в МФУ, либо в объемной фазе.

Антимикробную активность частиц  $\text{CaCO}_3@Ag$  в отношении штамма *Escherichia coli* оценивали с использованием модифицированного метода определения минимальной ингибирующей концентрации. Для обеспечения статистической значимости эксперименты повторяли трижды. Штамм *Escherichia coli*, использованный в нашем исследовании, был выращен и предоставлен НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии (Саратов, Россия). В каждом эксперименте 300 мл суспензий, содержащих микроорганизмы в концентрации  $3 \times 10^5$  клеток/мл, смешивали с суспензиями, имеющими различную концентрацию: от 1 до 15 исследуемых частиц на бактериальную клетку. Смесь инкубировали в течение 60 мин. После инкубации каждую светообработанную суспензию (объемом 100 мл) высевали на поверхность питательной среды (агар), полученной из 20 мл стерильной 1,5% агаризованной среды, застывшей в чашках Петри. Затем чашки Петри инкубировали при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 ч для обеспечения роста отдельных бактериальных колоний на поверхности твердой среды. Исходную концентрацию клеток в суспензиях корректировали для исключения непрерывного роста. Для отрицательного контроля использовали образцы бактерий, культивированные в тех же условиях, без добавления суспензии исследуемых частиц. В качестве альтернативы

для проверки результатов антибактериальную активность гибридных частиц ватерита с серебряными оболочками измеряли стандартным методом минимальной ингибирующей концентрации.

Осадки, собранные и промытые в ходе наборов экспериментов, были исследованы с помощью ряда методов. Размер, форму и морфологию поверхности частиц анализировали на растровом электронном микроскопе Jeol 7401F (JEOL, Akishima, Япония). Для этого водную суспензию частиц карбоната кальция наносили на кремниевую пластину и высушивали. РЭМ-изображения были получены с использованием нижнего детектора вторичных электронов при ускоряющем напряжении 1 кВ в режиме мягкого луча при рабочем расстоянии 8–9 мм.

Использовался конфокальный рамановский микроскоп (Renishaw inVia, Нью-Миллс, Великобритания) с лазером 532 нм и мощностью, регулируемой с помощью фильтров нейтральной оптической плотности. Для определения концентрации модельного соединения в образцах были проведены спектроскопические измерения с использованием микропланшетного ридера Infinite 200 PRO (Tecan, Швейцария). Интенсивность флуоресценции определялась количественно и сравнивалась с ранее построенной калибровочной линией для определения концентрации модельного красителя. Содержание частиц (в массовых процентах) рассчитывалось как массовое отношение включенного материала к частицам. Гидродинамический размер частиц в водной суспензии и их распределение по размерам в суспензии определялось путём усреднения данных по 10 образцам с помощью прибора ZetasizerNano-ZS (Malvern, Великобритания).

Рентгенограммы были получены с помощью Rigaku Miniflex 600 (Bruker, Этлингген, Германия) с использованием источника излучения  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ , 40 кВ, 15 мА). Данные были собраны в диапазоне сканирования  $2\theta$  от 11 до 70° с шагом 0,02°  $2\theta$ . Фазовый состав был определён по рентгенограммам после идентификации фаз с помощью анализа Ритвельда.

Измерения методом SAXS проводились на автоматическом дифрактометре АМУР-К (НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия). Этот дифрактометр оснащен коллимационной системой Кратки и одноосным позиционно-чувствительным газовым детектором ОД-3М. Измерения проводились на фиксированной длине волны  $\lambda = 0.1542$  нм, что обеспечивало диапазон передачи импульса от 0.11 до 10.0 нм<sup>-1</sup>. Исследуемые образцы CaCO<sub>3</sub> в виде порошка были измерены в специально разработанной кювете толщиной 1 мм с окнами из майлара (толщиной 15 мкм), которая помещалась в вакуумную камеру. Расстояние образец-детектор составляло 700 мм, а время экспозиции составляло 10 мин. Коллимационные искажения корректировались по стандартным методикам, а сигнал рассеивания от пустой кюветы вычитался из интенсивности рассеяния образца с помощью программы PRIMUS из пакета ATSAS.

Для расчёта распределения пор по размерам в предположении их сферической формы был использован ряд подходов:

(а) Прямой поиск распределения пор по размерам методом наименьших квадратов с использованием непрямого преобразования Фурье с регуляризацией решения по Тихонову (программа GNOM [96] из пакета ATSAS);

(б) Прямой поиск распределения частиц по размерам в виде гистограммы произвольной формы (программа VOLDIS);

(с) Параметрическое моделирование распределения пор, состоящее из суперпозиции гладких аналитических функций распределения Шульца (программа MIXTURE из пакета ATSAS). Для поиска положений и полуширин таких функций и их относительных вкладов используется нелинейная минимизация.

У каждого из алгоритмов есть свои преимущества и недостатки, и только их совместное использование позволяет получить надёжные решения. В частности, распределения, полученные с помощью программы GNOM, могут демонстрировать значительные колебания из-за эффектов завершения при преобразовании Фурье. В

программе VOLDIS колебания могут возникать из-за того, что увеличение вклада рассеяния от частиц одного радиуса компенсируется уменьшением вклада от частиц с близкими радиусами при незначительных изменениях сигнала рассеяния. Программа MIXTURE лишена этого недостатка, но для успешного поиска требуются начальные значения параметров частичных распределений, достаточно близкие к глобальному решению. Поэтому распределения, полученные с помощью программ GNOM и VOLDIS, использовались в качестве значимых начальных приближений для программы MIXTURE.

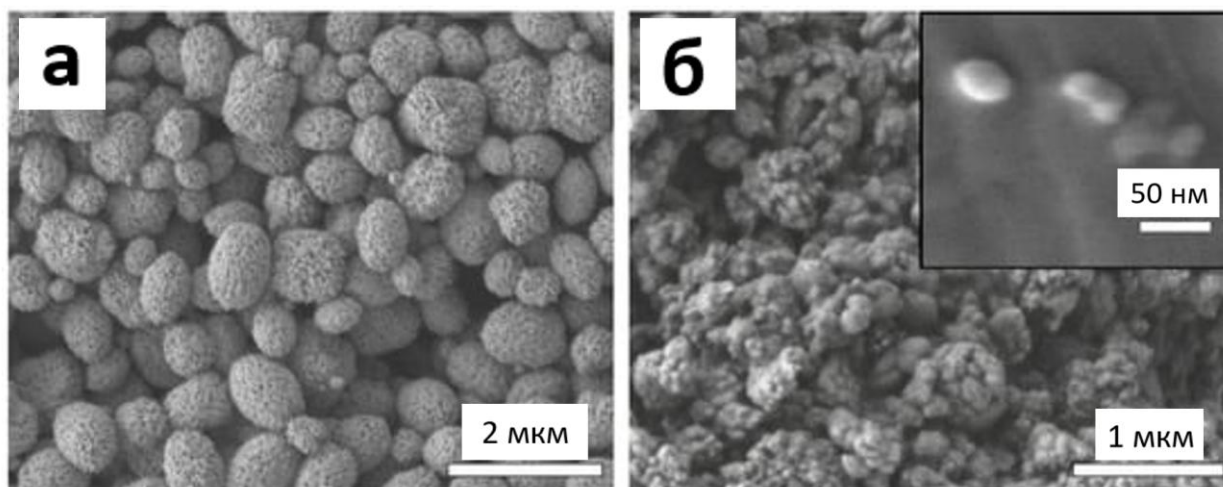
Клетки нормальных дермальных фибробластов человека (NHDF) были тщательно посеяны в 96-луночную культуральную чашку Петри с плотностью 104 клеток на лунку. Каждая лунка в культуральной чашке Петри была тщательно заполнена 100 мкл минимальной питательной среды (MEM) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% пенициллина-стрептомицина. Затем планшеты тщательно инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере с содержанием 5% углекислого газа (CO<sub>2</sub>). Через 24 часа после первоначального посева в питательную среду добавляли различные дозы частиц карбоната кальция, после чего планшеты инкубировали в течение ночи. Чтобы снизить оптическую плотность, питательную среду для культивирования клеток впоследствии заменяли фосфатно-солевым буфером. На заключительном этапе в каждую лунку систематически добавляли по 10 мкл флуоресцентного красителя Alamar blue (10% V/V) для облегчения обнаружения жизнеспособных клеток с последующей дополнительной 24-часовой инкубацией. Интенсивность флуоресценции образцов при длине волны возбуждения 560 нм и длине волны испускания 590 нм была точно измерена с помощью спектроскопии. Данные, полученные при культивировании клеток без каких-либо частиц, но с соответствующим объёмом воды, добавленным в каждый образец, были приняты за базовый уровень со 100%-ной жизнеспособностью.

Оптимизация параметров синтеза микрофлюидных частиц проводилась с помощью теоретических расчётов и экспериментальной настройки. Грубые теоретические расчёты использовались для оценки размера капель, необходимого для синтеза частиц субмикронного размера в условиях ограниченного количества ресурсов. Кроме того, экспериментальная настройка параметров проводилась из-за нескольких неизвестных факторов, таких как количество эмбрионов в одной капле. Таким образом, основное внимание в процессе оптимизации уделялось определению соотношения между общим расходом хлорида кальция, карбоната натрия и касторового масла, так как оно определяет размер капель. В то же время общий расход реакционной смеси и масла не имеет большого значения в рамках данного исследования, поскольку он влияет только на скорость синтеза частиц. Тем не менее, при отсутствии стабилизаторов поверхностно-активных веществ важно ограничить этот расход из-за низкой стабильности капель. Следовательно, экспериментальным путём определено оптимальное соотношение скоростей водорастворимых компонентов и масла в диапазоне 1.3–1.5. Высокая скорость растворения водорастворимых компонентов (а также высокая концентрация соли) приводила к образованию более крупных частиц, достигающих даже микронного размера, в то время как более низкая скорость растворения водорастворимых компонентов приводила к образованию агломерированной массы, которая не распадалась на отдельные частицы при промывке маслом. В конечном итоге, выбранные параметры синтеза оказались достаточными для получения нано- и субмикронных частиц карбоната кальция, что позволило успешно достичь цели, поставленной в этом исследовании. Однако важно отметить, что эти параметры могут быть не единственно верными.

В качестве контроля в этом исследовании были выбраны субмикронные частицы карбоната кальция в соответствии с модифицированной версией одного из наиболее часто используемых протоколов синтеза частиц карбоната кальция [96]. В

качестве среды для замедления реакции между хлоридом кальция и карбонатом натрия использовался многоатомный спирт. Карбонат кальция, полученный по этому протоколу, использовался в качестве контроля (из-за сложности получения стандартизированных данных о пористости и полиморфном составе карбоната кальция). Впоследствии характеристики частиц, полученных в МФУ, сравнивались с характеристиками контрольных образцов для оценки их свойств.

Полученные частицы были собраны, тщательно промыты и проанализированы. На изображениях, представленных на рисунке 5.3, показана РЭМ карбонатных частиц, полученных с помощью МФУ, а также характерные изображения РЭМ частиц ватерита, синтезированных в этиленгликоле.

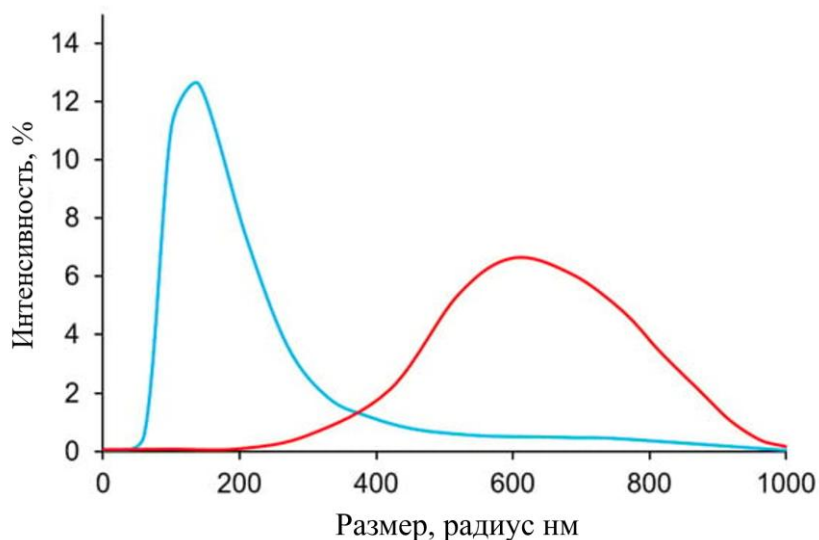


**Рисунок 5.3** – РЭМ-изображения частиц  $\text{CaCO}_3$ , синтезированных в объёмных условиях с использованием этиленгликоля (а), и частиц  $\text{CaCO}_3$ , синтезированных с помощью капельного метода в МФУ (б)

Частицы карбоната кальция, синтезированные в объёмных условиях путём добавления этиленгликоля в растворы солей, имеют типичную форму, почти сферическую, с развитой поверхностью, что хорошо видно на вставке на рисунке 5.3.

Известно, что такие частицы являются поликристаллическими и состоят из отдельных наноразмерных зёрен. Синтез с использованием микрофлюидной технологии позволил получить наноразмерные сферические и слегка вытянутые

частицы карбоната кальция (рисунок 5.3 (б)). Незначительная агломерация НЧ может быть связана с тем, что при синтезе не используются синтетические низкомолекулярные поверхностно-активные вещества, чтобы не влиять на биосовместимость частиц и обеспечить их низкую токсичность. Результаты как РЭМ, так и ДРС (рисунок 5.4) показывают, что средний размер частиц, синтезированных в МФУ, составляет примерно 100 нм, однако они демонстрируют заметную степень агрегации.



**Рисунок 5.4** – Результаты ДРС-анализа распределения по размерам частиц  $\text{CaCO}_3$ , синтезированных в объемных условиях с использованием этиленгликоля (красная линия), и частиц  $\text{CaCO}_3$ , синтезированных с помощью капельного подхода в МФУ (синяя линия)

С другой стороны, минимальный размер, достижимый при объёмном синтезе, составляет не менее 350 нм, а пик приходится на 600 нм. Примечательно, что ДРС не выявляет наличие крупных агрегатов (более 800 нм) в суспензии, синтезированной с помощью МФУ. Вероятно, ультразвуковая обработка перед измерением эффективно разрушает эти агрегаты, и агрегация в относительно стабильной суспензии происходит снова только в течение часа, когда суспензия выпадает в осадок. Однако при высушивании для проведения РЭМ-измерений увеличение концентрации частиц

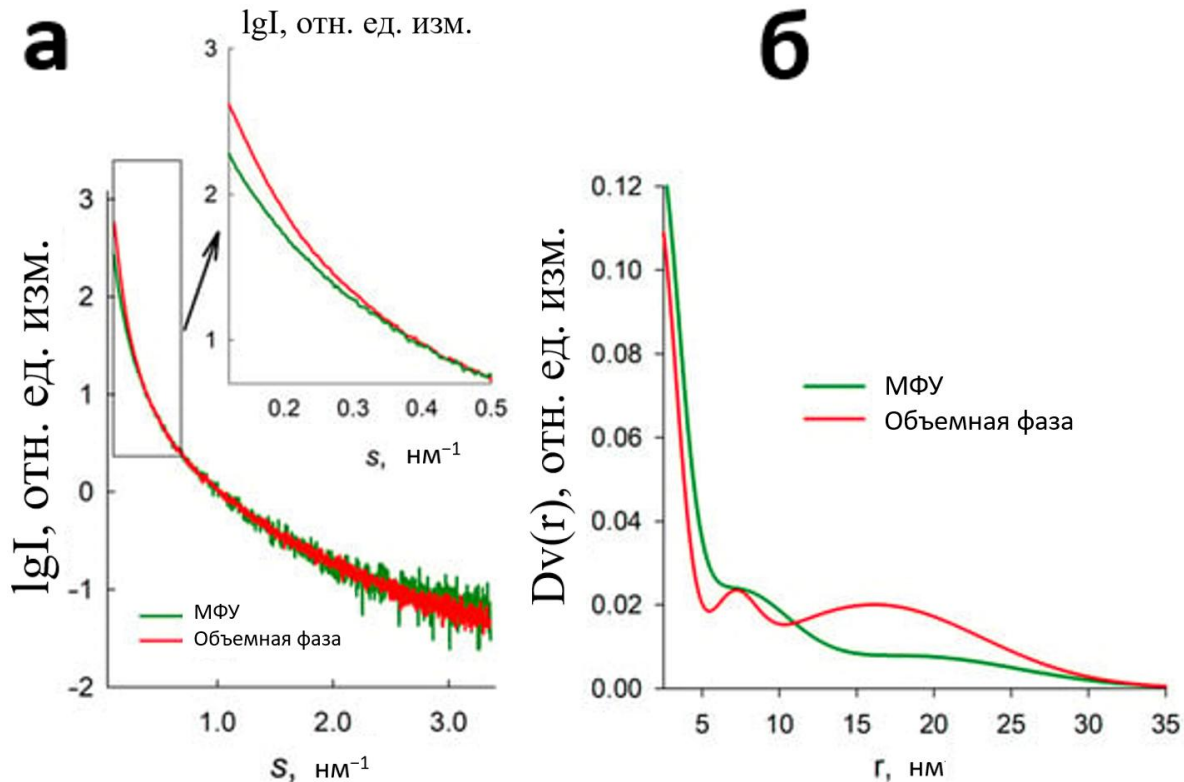
приводит к их повторной агрегации. Тем не менее, самые мелкие частицы размером 20 нм также не обнаруживаются при измерениях методом динамического светорассеяния и, по-видимому, присутствуют в виде агрегатов.

Количественное определение полиморфов карбоната кальция с помощью рентгеноструктурного анализа является сложной задачей из-за отсутствия достоверной структурной модели для расшифровки дифракционной картины ватерита. Кристаллическая структура ватерита не давала покоя учёным почти сто лет, и было предложено несколько структурных моделей [97]. Ряд пиков, наблюдаемых на полученных дифрактограммах, наиболее точно объясняется гексагональной кристаллической структурой  $R\bar{3}m$  с параметрами элементарной ячейки  $a = b = 4.13 \text{ \AA}$  и  $c = 8.49 \text{ \AA}$ , как указано Камхи [98]. В этой кристаллической структуре карбонатные группы случайным образом распределены по трём направлениям. Полиморф кальцита относится к тригональной  $R\bar{3}c$  пространственной группе  $3c$ , где  $\text{Ca}^{2+}$  связан с шестью эквивалентными атомами  $\text{O}^{2-}$ , образуя октаэдры  $\text{CaO}_6$ , соединённые по углам. Количественный фазовый анализ был проведён с помощью полнопрофильного анализа методом Ритвельда с использованием представленных кристаллических структур. Результаты порошковой рентгеновской дифракции показывают, что микрофлюидный синтез позволяет получить почти однофазный состав НЧ, содержащий в основном ватерит (96.5%) и небольшую долю кальцита (3.5%). Субмикронные частицы, полученные в результате объёмного синтеза, содержат сравнительно меньше ватерита: 87.3% ватерита и 12.7% кальцита.

Кроме того, полиморфный состав полученных образцов был оценён с помощью рамановской спектроскопии. Впоследствии для подтверждения этих полиморфных составов была использована рамановская микроскопия отдельных частиц и картирование на площади  $100 \text{ мкм}^2$ . Кальцит был идентифицирован по наличию характерных пиков при  $711 \text{ см}^{-1}$  и  $1085 \text{ см}^{-1}$ , а ватерит — по характерному дублетному пику при  $1088 \text{ см}^{-1}$ . Интересно, что, согласно результатам рамановской

спектроскопии, в образцах, синтезированных с помощью МФУ, доля кальцита была значительно ниже, а преобладала фракция ватерита. Однако рентгеноструктурный анализ выявил примерно 12% кальцита в образцах, полученных с помощью МФУ, в то время как в контрольном образце его доля составила всего 3%. С одной стороны, эта разница близка к погрешности и вариативности образцов, но поскольку рамановская микроскопия в основном изучает поверхность, а рентгеновская дифрактометрия имеет большую глубину проникновения, это может отражать различия в структуре полученных частиц.

Полученные образцы были проанализированы с помощью метода SAXS (рисунок 5.5).



**Рисунок 5.5** – Экспериментальные кривые SAXS (а) и функции распределения пор по размерам  $Dv(r)$  при условии сферической формы пустот (б) для  $\text{CaCO}_3$  в объёмной фазе и синтезированного в МФУ

В объёмной фазе субмикронные частицы ватерита демонстрировали распределение радиусов пор в диапазоне от 3 до 33 нм. Интересно, что частицы ватерита, синтезированные в МФУ, имели значительно меньшую относительную долю пор с радиусами от 12 до 30 нм по сравнению с объёмной фазой (Рисунок (б)). Это соответствует наблюдаемому более резкому снижению интенсивности рассеяния в объёмной фазе при очень малых углах ( $s < 0.5 \text{ нм}^{-1}$ ) по сравнению с синтезированными в МФУ (рисунок 5.5 (а), вставка). Сравнение двух функций распределения пор по размерам на рисунке 5.5 (б) позволяет сделать вывод, что, несмотря на разницу в размерах частиц, образующихся в объёмной фазе и в МФУ, они оба имеют поры наноразмера, о чём свидетельствует положение пика в диапазоне 5 – 10 нм. Однако пористость частиц ватерита, осаждённых в массе и синтезированных с помощью микрофлюидики, различается в диапазоне 12-23 нм: частицы ватерита, синтезированные с помощью микрофлюидики, практически не имеют пор в этом диапазоне, в отличие от другого образца. Эти результаты свидетельствуют о том, что синтез с помощью микрофлюидики влияет на структурные характеристики и пористость получаемых частиц ватерита.

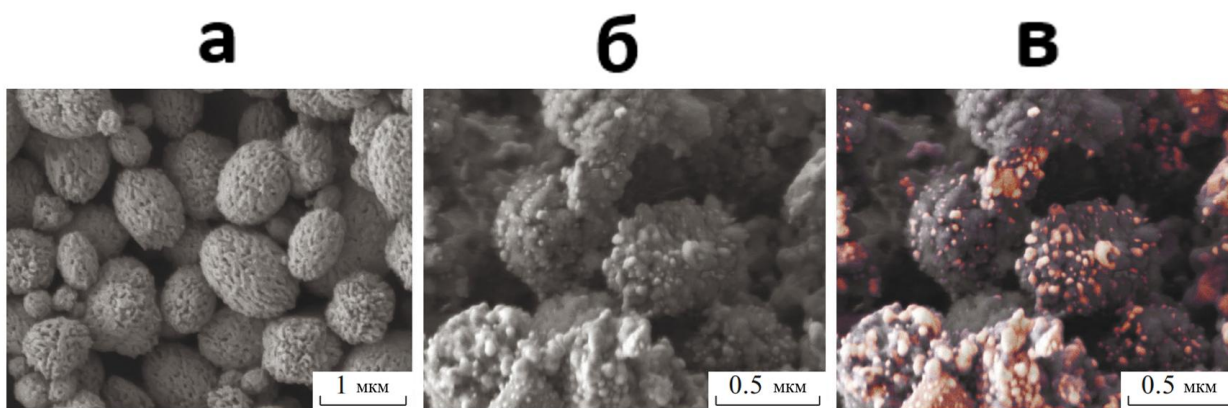
Принимая во внимание наблюдаемое изменение размера пор карбоната кальция, полученного с помощью МФУ, можно сделать вывод, что объединение нескольких ядер в значительной степени способствует этому явлению. Когда частицы вступают в контакт друг с другом, их поверхности, вероятно, сливаются из-за межфазных сил, тем самым образуя взаимосвязанную сеть пустот внутри структуры. Этот механизм роста, основанный на агрегации, впоследствии смещает распределение размеров пор по сравнению с теми, которые получаются в результате процессов образования частиц из отдельных ядер. Важно отметить, что сигнал SAXS наблюдается при любых колебаниях электронной плотности в образце, и, согласно принципу Бабина [99], интенсивность и форма кривой интенсивности не зависят от знака контраста. Таким образом, невозможно отличить рассеяние от пор (которые

имеют отрицательный контраст по отношению к средней плотности) от рассеяния от матричной (частичной) структуры (с положительным контрастом). В нашем случае предполагается, что поры имеют более компактную форму и более высокий контраст, поэтому можно предположить, что форма кривой интенсивности в основном обусловлена рассеянием от системы пор.

Склеивание нескольких ядер во время формирования частиц увеличивает как размер, так и сложность карбонатных структур кальция, что приводит к увеличению размера пор. Объединение нескольких частиц приводит к образованию более крупных и взаимосвязанных внутренних пустот в конечном продукте. Следовательно, эта сложная сеть взаимосвязанных пор обеспечивает заметные преимущества для различных областей применения, такие как улучшенный массоперенос, увеличенная площадь поверхности и улучшенная доставка лекарств.

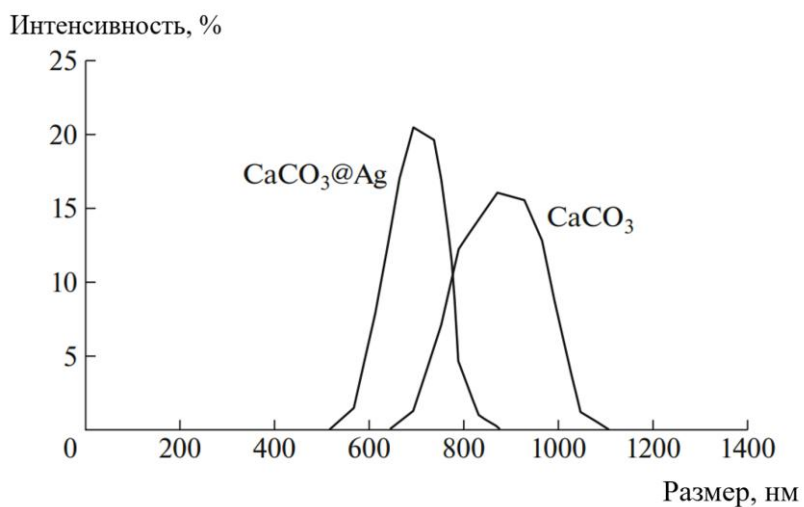
Механизм адгезии играет важнейшую роль в формировании частиц карбоната кальция, поскольку он способствует столкновению и последующему связыванию многочисленных ядер. Широко известно, что образование карбоната кальция происходит путём агрегации ионов и кластеров, что приводит к появлению первичных частиц. Склонность этих частиц к сцеплению друг с другом на стадиях роста в первую очередь определяется межмолекулярными силами и локальными минимумами энергии.

РЭМ-изображения на рисунке 5.6 визуализируют карбонатные частицы, полученные в ходе микрофлюидного синтеза и синтеза в колбе большого объема с использованием этиленгликоля.



**Рисунок 5.6** – РЭМ-изображения (а) частиц  $\text{CaCO}_3$ , синтезированных в объемной фазе с использованием этиленгликоля, и (б, в) гибридных частиц  $\text{CaCO}_3@Ag$ , синтезированных капельным методом с использованием МФУ в стандартном режиме (б) и в сочетании с режимом обратно рассеянных электронов (в)

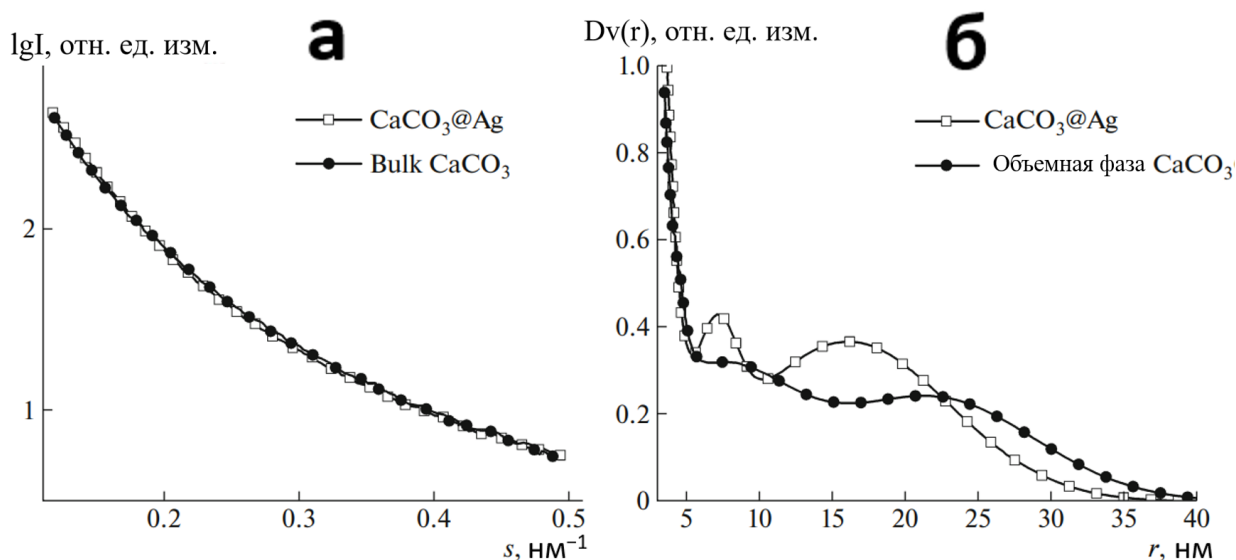
Данные РЭМ и ДРС (рисунок 5.7) показывают, что средний размер частиц, синтезированных в чипе, составляет  $\sim 650$  нм, тогда как метод объемного синтеза позволил получить частицы с минимальным размером  $\sim 900$  нм.



**Рисунок 5.7** – Данные ДРС по распределению частиц  $\text{CaCO}_3$ , синтезированных в объемной фазе с использованием этиленгликоля и гибридных частиц  $\text{CaCO}_3@Ag$ , синтезированных капельным методом с использованием МФУ

Кроме того, РЭМ-изображения наглядно демонстрируют изменение морфологии частиц после восстановления серебра. Было проведено дополнительное РЭМ-исследование образца в режиме обратнорассеянных электронов, чтобы обнаружить наличие тяжелых элементов (в частности, серебра) на поверхности частиц карбоната кальция. На рисунке 5.6 (в) представлено объединенное РЭМ-изображение, где яркие области соответствуют областям, демонстрирующим контрастные характеристики в режиме обратнорассеянных электронов.

Согласно [100], включение серебряных и золотых НЧ приводит к эффективному усилению сигнала рамановского рассеяния. Таким образом, с помощью рамановской спектроскопии можно детектировать вещества, присутствующие в среде в сверхмалых концентрациях. Сочетание терапевтического (антибактериального) свойства Ag НЧ с возможностью их применения в диагностических целях (детектирование очень малых количеств различных химических агентов) открывает перспективы для создания многофункционального носителя для терагностики. Использование системы ядро–оболочка с Ag НЧ в оболочке позволит как усилить ингибирующее действие на микроорганизмы, так и повысить эффективность диагностики за счет большей площади взаимодействия с микроорганизмами и анализируемой средой. Полученные образцы были проанализированы методом SAXS (рисунок 5.8).



**Рисунок 5.8** – (а) Экспериментальные кривые SAXS и (б) функции распределения  $Dv(r)$  для частиц  $\text{CaCO}_3$ , синтезированных в объемной фазе и в МФУ с образованием Ag НЧ

Исходя из предположения о сферической форме пор, субмикронные частицы ватерита, синтезированные в объемных условиях, продемонстрировали распределение радиусов пор в диапазоне от 3 до 40 нм. Для этих частиц характерно наличие пор размером как в несколько нанометров, так и в несколько десятков нанометров, с максимальным радиусом в диапазоне 15–25 нм. Интерпретация данных SAXS на образце  $\text{CaCO}_3@Ag$  неоднозначна из-за наличия неоднородностей рассеивания двух типов: пор и самих наночастиц Ag. Интенсивность и форма кривой рассеяния не зависят от знака контраста, в соответствии с принципом Бабинне. Таким образом, трудно различить рассеяние от пор (имеющих отрицательный контраст относительно плотности матрицы) и от НЧ (имеющих положительный контраст). Образование и рост НЧ в малом объеме в присутствии карбоната кальция может приводить к разным результатам.  $\text{CaCO}_3$  может играть роль матрицы для роста НЧ Ag, тем самым увеличивая интенсивность рассеяния в диапазоне размеров, соответствующих порам. Однако, судя по кривой распределения  $Dv(r)$  на рисунке 5.8

(б) можно сделать вывод, что имел место другой механизм. Вероятно, увеличение хвоста функции распределения по размерам в диапазоне радиусов от 25 до 40 нм обусловлено образованием агрегатов серебра на поверхности частиц  $\text{CaCO}_3$ . Вклад НЧ Ag в этой части кривой увеличивается, поскольку они имеют тенденцию к осаждению на неровностях поверхности частиц  $\text{CaCO}_3$ . В диапазоне размеров от 5 до 25 нм распределение становится более равномерным, поскольку изолированные пики при 7.5 и 16 нм сглаживаются. Это может быть связано с включением Ag НЧ в новообразованные поры  $\text{CaCO}_3$ . Напротив, кривая распределения для  $\text{CaCO}_3@Ag$  более плавная, без каких-либо выраженных пиков, как в случае, когда Ag НЧ растут в присутствии наноструктурированной поверхности. Реакция серебряного зеркала (2) приводит к образованию полидисперсных Ag НЧ с относительно равномерным распределением по размерам, что согласуется с данными РЭМ (рисунок 5.6). В [101] показано, что формирование оболочки из НЧ на поверхности частиц карбоната кальция методом замораживания растворителя не влияет на их полиморфный состав и не вызывает перекристаллизации частиц ватерита и увеличения содержания фазы кальцита. Благодаря данному обстоятельству сохраняется пористость частиц, что благоприятствует их нагрузочной способности.

Для оценки способности загрузки лекарств использовался двухэтапный процесс. Сначала частицы ватерита подвергались процедуре нагружения, в ходе которой они подвергались воздействию раствора конъюгата БСА-ТРИТЦ. Затем частицы отделялись от раствора с помощью центрифугирования, и полученный надосадочный раствор собирался для оценки. Далее оценивалось высвобождение красителя из растворённых частиц. Частицы растворялись, и высвободившийся краситель анализировался спектрофлуориметрическим методом.

Анализ экспериментальных данных выявил значительные различия в нагрузочной способности частиц ватерита, синтезированных в МФУ, и частиц, осаждённых в массе. Было установлено, что нагрузочная способность частиц,

синтезированных в МФУ и в колбе, составляет примерно 16 и 9 масс.% соответственно. Различия в загрузочной способности, вероятно, обусловлены более развитой поверхностью и повышенной пористостью в результате синтеза с использованием микрофлюидики. БСА естественным образом склонен к димеризации, что увеличивает его гидродинамический размер, а иммобилизация БСА на ватерите, полученном с помощью микрофлюидики, обеспечивает его существование в основном в неповрежденной форме благодаря подходящему размеру пор. БСА, загруженный в частицы ватерита, полученные в результате объемного синтеза, вероятно, частично находится в нативной форме, а частично — в виде димеров, и это невозможно контролировать. Эти результаты подчёркивают преимущества использования МФУ для синтеза частиц, особенно при стремлении к более высокой производительности.

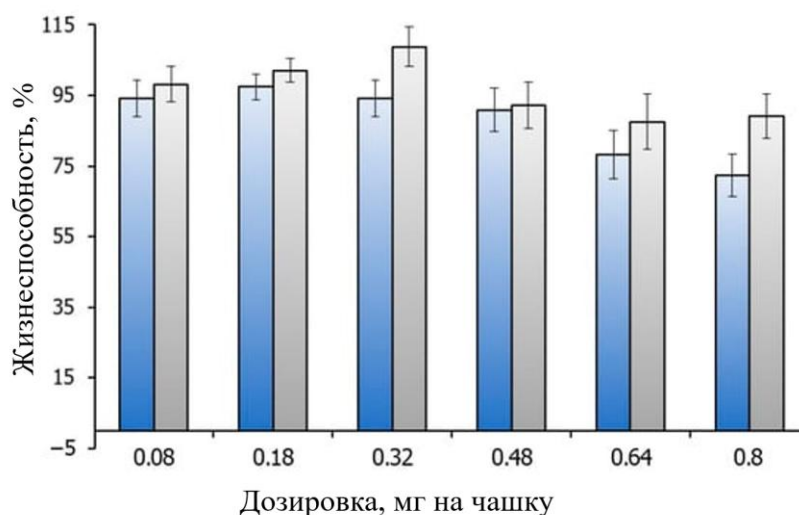
Для композитных материалов с наночастицами серебра анализ экспериментальных данных выявил существенные различия в загрузочной способности гибридных частиц ватерита ( $\text{CaCO}_3@Ag$ ), синтезированных в микрофлюидном чипе, и частиц контрольной группы, полученных методом объемного синтеза. В частности, частицы ватерита, синтезированные с помощью микрофлюидного устройства, продемонстрировали загрузочную способность ~11 мас. %, тогда как объемные частицы ватерита имели загрузочную способность всего 9 мас. %. Эта разница в способности загрузки, вероятно, связана с тем, что частицы, полученные с помощью микрофлюидного устройства, имеют большую площадь поверхности, повышенную пористость и меньший размер. Эти характеристики способствуют усилению взаимодействия и абсорбции для конъюгата ТРИТЦ–БСА. Эти результаты указывают на преимущества микрофлюидного устройства для синтеза частиц с высокой загрузочной способностью.

Ещё одним важным аспектом, который следует учитывать при изучении синтезированных субмикронных частиц ватерита, является их потенциальная

цитотоксичность, особенно при использовании в биомедицинских целях. Поскольку частицы были синтезированы в каплях касторового масла, возникли опасения, что остатки масла на поверхности частиц могут способствовать повышению цитотоксичности. Поэтому необходимо провести оценку их цитотоксического воздействия *in vitro*. Чтобы решить эту проблему, была проведена оценка цитотоксичности на монослоях фибробластов мыши, используя в качестве объекта анализа частицы ватерита, синтезированные в МФУ, и ватерит, синтезированный в больших количествах, в качестве контроля для сравнения. Клетки подвергались воздействию различных концентраций этих частиц, и их цитотоксическое воздействие изучалось с помощью стандартного теста на жизнеспособность для оценки жизнеспособности клеток.

Результаты показывают, что цитотоксичность синтезированных с помощью микрофлюидики частиц ватерита немного превышала цитотоксичность, наблюдаемую в контрольной группе (рисунок 5.9).

Однако важно отметить, что усиление токсического воздействия наблюдалось только при высокой дозировке более 0.8 мг на пластину. При меньшей дозировке цитотоксическое воздействие остаётся незначительным. Этот результат оказался ценным для оптимизации процесса синтеза и минимизации потенциальных цитотоксических эффектов, связанных с остаточным содержанием масла. Понимание профиля цитотоксичности этих частиц имеет решающее значение для их безопасного применения в биомедицине, где клеточные взаимодействия имеют первостепенное значение.



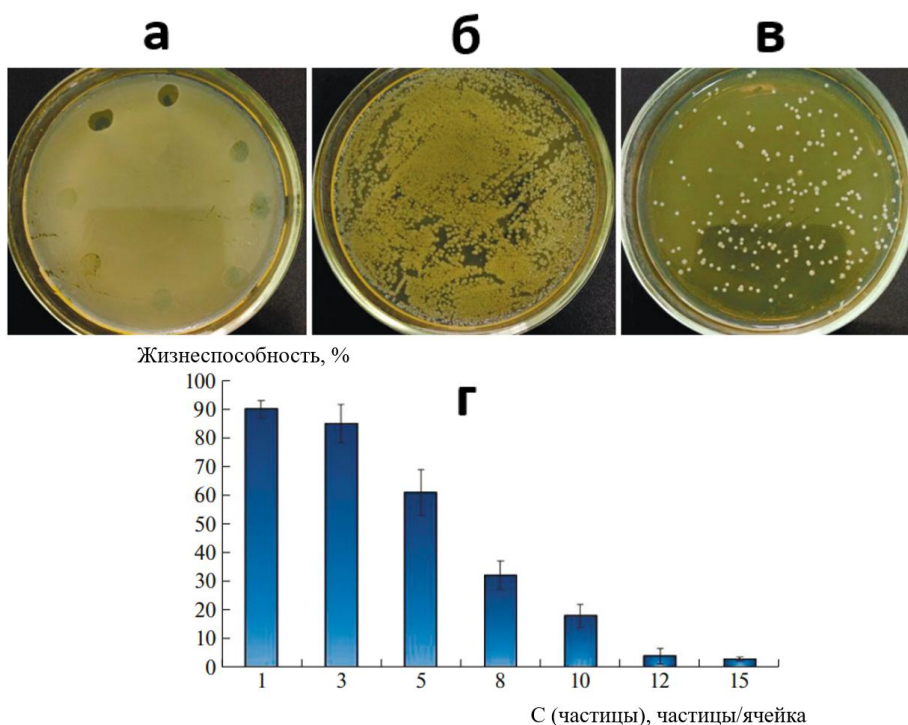
**Рисунок 5.9** – Профиль жизнеспособности фибробластов мыши после добавления контрольной дозы частиц  $\text{CaCO}_3$ , осаждённых при массовом синтезе (серые столбцы), и после добавления дозы  $\text{CaCO}_3$ , синтезированного с помощью капельного подхода в МФУ (синие столбцы)

Интересно, что результаты указывают на заметное повышение жизнеспособности клеток при введении средних доз карбоната кальция в клеточную среду. Соответствующий эффект ранее был продемонстрирован авторами [102]. Это наблюдаемое явление потенциально может быть связано с ключевой ролью кальция в метаболических процессах в клетках. Напротив, при более высоких концентрациях возникает цитотоксический эффект, который, скорее всего, обусловлен механическим повреждением клеточных мембран. Наличие функциональных групп масла на поверхности синтезированных частиц способствует усиленному взаимодействию с клеточными мембранами и повышенной интернализации в клетки, что при высоких концентрациях приводит к усилению цитотоксического эффекта.

Гибридные частицы  $\text{CaCO}_3@Ag$  в свою очередь обладали антибактериальной активностью, несмотря на вероятное менее эффективное взаимодействие  $Ag$  НЧ по сравнению с высокодисперсными суспензиями. Ионы серебра могут проникать через клеточные мембраны, что приводит к нарушению основных функций клеточных

компонентов, включая белки и нуклеиновые кислоты. Это нарушение подавляет важнейшие клеточные процессы и препятствует росту бактерий, что в конечном итоге приводит к их уничтожению. Кроме того, специфические физико-химические свойства Ag НЧ в значительной степени способствуют их антибактериальной активности.

Результаты, полученные методом минимальной ингибирующей концентрации, показали, что суспензия гибридных частиц ватерита с концентрацией, превышающей 15 частиц на бактериальную клетку, полностью подавляет рост бактерий (рисунок 5.10 (а)).



**Рисунок 5.10** – Антибактериальная активность гибридных частиц ватерита  $\text{CaCO}_3@Ag$  по (а) стандартному методу минимальной ингибирующей концентрации и (б–г) модифицированному методу: (б) контроль, (в) частицы с концентрацией 10 частиц на клетку и (г) жизнеспособность бактериальных клеток в зависимости от количества гибридных частиц  $\text{CaCO}_3@Ag$ , добавленных в культуральную среду

Кроме того, был применен модифицированный метод оценки, суть которого заключается в инкубации суспензии бактерий и частиц с последующим нанесением инкубированной суспензии на поверхность питательной среды (агар) и анализом количества колоний. Концентрация бактериальной суспензии подбиралась тщательно, чтобы исключить сплошной рост (рисунок 5.10 (б, в)). Таким образом, среднее количество колоний в отсутствие частиц  $\text{CaCO}_3@Ag$  принималось за соответствующее 100% выживаемости. График на рисунке 5.10 (г) иллюстрирует зависимость выживаемости бактерий от концентрации частиц. Оценка, проведенная на основе этого графика, позволила определить минимальную ингибирующую концентрацию, которая находится в диапазоне 12–15 частиц на клетку. Эти результаты согласуются с данными, полученными с помощью стандартного подхода, который обычно используется в подобных исследованиях.

Микрофлюидный синтез карбоната кальция позволяет лучше контролировать условия синтеза, так как он максимизирует соотношение площади поверхности к объёму и обеспечивает точный контроль расхода реагентов. Кроме того, он открывает возможности для масштабирования процесса синтеза. Это исследование и обширная научная литература свидетельствуют о возможности синтеза примерно 8 мг субмикронного карбоната кальция за раз, при этом время реакции составляет от полутора до двух с половиной часов, после чего следует длительная промывка растворителем. Напротив, использование МФУ позволяет синтезировать карбонат кальция со скоростью от 20 до 80 мг в час. Тем не менее, этот метод сталкивается с определенными проблемами, такими как повышенная агрегация частиц при уменьшении их среднего размера, как наблюдалось в данном исследовании. Высокая склонность к агрегации, наблюдаемая в частицах, синтезированных в МФУ, может возникать из-за избытка свободной энергии внутри системы и слияния капель в процессе синтеза. Чтобы решить эти проблемы, в масло можно добавить поверхностно-активные вещества, которые помогут стабилизировать капли, а в

суспензию частиц можно добавить дополнительный полимер, который зарядит поверхность частиц и предотвратит их слипание. Однако важно учитывать потенциальные последствия, связанные с использованием поверхностно-активных веществ и дополнительных полимерных слоёв. Поверхностно-активные вещества, такие как span80, эффективно стабилизируют капли, снижая межфазное натяжение и предотвращая слипание. Тем не менее, они также могут повышать уровень токсичности при наличии на поверхности частиц. Эти поверхностно-активные вещества, обычно амфифильные по своей природе, могут взаимодействовать с окружающей клеточной средой и потенциально вызывать побочные эффекты. Поэтому при выборе поверхностно-активных веществ необходимо тщательно их изучать, чтобы убедиться в их пригодности для биомедицинских целей. В качестве альтернативы на поверхность частиц можно нанести дополнительный слой полимера, чтобы повысить стабильность и избежать агрегации. Этот слой может способствовать зарядке поверхности и отталкиванию частиц друг от друга. Однако добавление дополнительного полимерного слоя может препятствовать последующей загрузке целевых веществ на частицы. Следовательно, становится необходимым оптимизировать процесс загрузки, чтобы устранить любые нежелательные сбои, вызванные этим дополнительным полимерным слоем. Хотя использование поверхностно-активных веществ и дополнительных полимерных слоев предлагает ценные стратегии для решения проблем агрегации и стабильности в процессе синтеза частиц, их реализация требует тщательного изучения и оптимизации. Потенциальная токсичность поверхностно-активных веществ требует тщательного подбора подходящих поверхностно-активных веществ с минимальным негативным воздействием. Аналогичным образом следует учитывать влияние дополнительного полимерного слоя на процесс загрузки вещества, что приводит к необходимости проводить процесс загрузки до нанесения дополнительного полимерного слоя. Дальнейшие исследования должны быть направлены на совершенствование этих

стратегий для достижения идеальной стабильности частиц без ущерба для их биосовместимости или возможностей загрузки.

Таким образом в настоящем исследовании представлен подход к синтезу частиц карбоната кальция в форме ватерита с помощью МФУ с T-образной системой подачи масла. Анализ с помощью РЭМ, ДРС, рамановской спектроскопии и рентгеноструктурного анализа показал, что частицы, полученные с помощью МФУ, имеют меньший размер (со средним гидродинамическим диаметром от 600 нм до в среднем 100 нм) при сохранении доли кальцита на низком уровне (в диапазоне 3–13%). Кроме того, высокая скорость синтеза частиц, достигаемая с помощью МФУ, обеспечивает такие преимущества, как масштабируемость и воспроизводимость. Наши результаты показывают, что полученные частицы демонстрируют заметное увеличение вместимости примерно на 16 массовых процентов. Такую повышенную эффективность загрузки можно объяснить двумя факторами: во-первых, меньший размер частиц позволяет вместить в них большее количество материала. Во-вторых, одновременное развитие поверхности частиц позволяет увеличить площадь поверхности, что способствует повышению эффективности загрузки. Кроме того, SAXS наблюдал основную долю размеров пор в диапазоне 5-10 нм для частиц, осажденных в ограниченных микрообъемах и в объеме. Поскольку частицы ватерита, осажденные в микрообъемах, не имеют пор большего размера, в отличие от другого образца, можно утверждать, что среди иммобилизованных молекул отсутствуют димеры белка. Эти результаты в совокупности подчеркивают потенциал полученных частиц служить высокоэффективными носителями для различных применений, подчеркивая важность размера и характеристик поверхности для повышения грузоподъемности. Исследования *in vitro* показали незначительное повышение цитотоксичности этих частиц. В ходе исследований *in vitro* с использованием монослоев фибробластов мыши было обнаружено, что цитотоксичность частиц ватерита, синтезированных в МФУ, немного превышала контрольный показатель и

становилась токсичной только при дозах, превышающих 0.8 мг на пластину. Эти результаты подчёркивают важность тщательной оптимизации и проверки методов синтеза частиц для минимизации потенциальных цитотоксических эффектов и обеспечения безопасного применения таких частиц в биомедицине.

Представлен новый подход к синтезу гибридных частиц карбоната кальция, модифицированных Ag НЧ с помощью микрофлюидного устройства. Синтезированные частицы были охарактеризованы методами РЭМ и ДРС, которые показали успешное формирование этих частиц; их различие в морфологии; и наличие Ag НЧ, распределенных по поверхности ватерита. Эти результаты демонстрируют принципиальную возможность формирования гибридных функциональных субмикронных частиц  $\text{CaCO}_3@Ag$  при кристаллизации в микрообъемах и открывают новые возможности для управления параметрами таких систем. Дополнительными преимуществами разработанного подхода являются масштабируемость и воспроизводимость синтеза. Результаты показали, что частицы, синтезированные в микрообъемах, демонстрируют значительное увеличение грузочной способности: около 11 мас. % против 9 мас. % для контрольного образца. Анализ данных SAXS выявил значительную долю пор с размерами от 3 до 40 нм в полученных частицах, что указывает на их потенциал как высокоэффективных носителей для различных применений, особенно в антибактериальной терапии. Гибридные частицы  $\text{CaCO}_3@Ag$ , синтезированные с использованием микрофлюидного устройства, проявили высокую активность против грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* с ингибирующей концентрацией 12–15 частиц на клетку. Эти результаты важны для приложений доставки лекарств и открывают возможности для дальнейших исследований в области биомедицинских нанотехнологий.

## Заключение

В диссертационной работе представлены результаты как конструирования микрофлюидных устройств для синтеза функциональных материалов, так и исследования их физико-химических свойств в режиме *in situ*, а также потенциальных применений в биомедицине. Полученные результаты демонстрируют значительный потенциал микрофлюидных систем как инструмента для прецизионного управления процессами синтеза и анализа широким набором лабораторных и синхротронных методик, что открывает новые возможности в разработке материалов с заданными свойствами.

Количественное исследование трёхмерной структуры микрофлюидных чипов, изготовленных методом DLP, позволило установить ключевые закономерности влияния параметров 3D-печати на морфологию и функциональные характеристики устройств. Комбинация методов микро-КТ и РЭМ выявила зависимость шероховатости поверхности от пространственного разрешения печати, что особенно важно при проектировании сложных микрофлюидных систем с интегрированными активными элементами. Изучение механических свойств фотополимерных материалов показало существенное влияние старения на величину модуля Юнга и другие механические параметры, что необходимо учитывать при долгосрочной эксплуатации устройств. Разработанный подход, сочетающий экспериментальные данные с численным моделированием, обеспечивает надёжную основу для прогнозирования рабочих характеристик микрофлюидных систем.

Разработана методика количественного анализа процесса восстановления ионов палладия в ходе синтеза наночастиц в микрофлюидном реакторе. Оптимальная конфигурация микрореактора позволила достичь значения скачка поглощения 0.5 на крае палладия и зарегистрировать осцилляции до  $k = 12 \text{ \AA}^{-1}$  за время порядка 10 минут на синхротронном источнике второго поколения. Дифференцированы процессы восстановления и осаждения металла в ходе движения реакционной смеси

по каналу. Определена доля восстановленных атомов Pd(0) в растворе после завершения реакции равная 0.56, и доля осаждённого палладия на стенки микрореактора, равная 0.32 от общего начального количества металла. Модификация оптической длины каналов *in situ* диагностики позволила проводить исследование кинетики реакций также методом УФ-видимой спектроскопии без изменения топологии устройства. Этим способом была осуществлена диагностика кинетики процесса синтеза новых дизаменщённых производных берберина.

Микрофлюидный синтез частиц карбоната кальция в метастабильной фазе ватерита позволил получить материалы с уникальными характеристиками, включая контролируемый размер частиц, развитую поверхность и высокую нагрузочную способность. Низкая цитотоксичность этих частиц подтверждает их потенциал для применения в качестве носителей для доставки лекарств. Создание гибридных частиц  $\text{CaCO}_3@Ag$  с выраженной антибактериальной активностью против *Escherichia coli* демонстрирует возможность разработки новых функциональных материалов для антимикробной терапии.

Полученные результаты имеют важное значение для дальнейшего развития микрофлюидных технологий. Перспективными направлениями являются оптимизация механических свойств 3D-печатных устройств, разработка новых гибридных материалов для комбинированной терапии и внедрение методов машинного обучения для анализа данных *in situ*. Результаты работы вносят существенный вклад в развитие современных методов синтеза и анализа функциональных материалов, создавая основу для их практического применения в биомедицине, катализе и материаловедении. Проведенные исследования открывают новые возможности для создания следующего поколения микрофлюидных систем с улучшенными характеристиками и расширенным функционалом.

## Список основных публикаций автора по теме исследования

### Статьи в научных изданиях, входящих в Scopus, Web of Science, RSCI

A1. Study of the Surface Morphology of Microfluidic-Chip Channels via X-Ray Tomography and Scanning Electron Microscopy / **S. V. Chapek**, I. A. Pankin, D. V. Khodakova, A. A. Guda, A. S. Goncharova, A. V. Soldatov // Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. – 2023. – Vol. 17, №. 2. – P. 392-396. – DOI 10.1134/s1027451023020039. K2

A2. Aging behavior of fully 3D printed microfluidic devices / P. Shvets, V. Shapovalov, D. Azarov, A. Kolesnikov, P. Prokopovich, A. Popov, **S. Chapek**, A. Guda, M. Leshchinsky, A. Soldatov, A. Goikhman // The International Journal of Advanced Manufacturing Technology. – 2024. – Vol. 134, №. 1-2. – P. 569-578. – DOI 10.1007/s00170-024-14149-8. K1.

A3. 3D-printed microfluidic system for the *in-situ* diagnostics and screening of nanoparticles synthesis parameters / V. V. Shapovalov, **S. V. Chapek**, A. A. Tereshchenko, A. N. Bulgakov, A. P. Bagliy, V. V. Volkov, P. V. Konarev, M. A. Soldatov, S. A. Soldatov, A. A. Guda, A. V. Soldatov // Micro and Nano Engineering. – 2023. – Vol. 20. – Art. No 100224. – DOI 10.1016/j.mne.2023.100224. K1

A4. High-Quality *In Situ* X-ray Absorption Spectroscopy Monitoring of the Palladium Nucleation inside the 3D Printed Microfluidic Chip / A. V. Dobrovolskaya, **S. V. Chapek**, O. A. Usoltsev, E. Naranov, D. N. Gorbunov, A. L. Trigub, A. L. Maximov, A. V. Soldatov, A. L. Bugaev // Journal of Physical Chemistry C. – 2023. – Vol. 127, №. 42. – P. 20727-20733. – DOI 10.1021/acs.jpcc.3c03266. K1

A5. Optimal synthesis conditions for NBF-modified 8,13-dihydroberberine derivatives / A. D. Zagrebaev, V. V. Butova, A. A. Guda, **S. V. Chapek**, O. N. Burov, S. V. Kurbatov, E. Yu. Vinyukova, M. E. Neganova, Yu. R. Aleksandrova, N. S. Nikolaeva, O. P. Demidov, A. V. Soldatov // New Journal of Chemistry. – 2024. – Vol. 48, №. 1. – P. 268-280. – DOI 10.1039/d3nj04562e. K1.

A6. Microfluidic-Assisted Synthesis of Hybrid Carbonate Calcium Microparticles Modified by Silver Nanoparticles / A. V. Ermakov, **S. V. Chapek**, E. V. Lengert, P. V. Konarev, V. V. Volkov, M. A. Soldatov, D. B. Trushina // *Crystallography Reports*. – 2024. – Vol. 69, №. 4. – P. 569-576. – DOI 10.1134/S1063774524600546. K2

A7. Microfluidically assisted synthesis of calcium carbonate submicron particles with improved loading properties / A. V. Ermakov, **S. V. Chapek**, E. V. Lengert, P. V. Konarev, V. V. Volkov, V. V. Artemov, M. A. Soldatov, D. B. Trushina // *Micromachines*. – 2024. – Vol. 15, №. 1. – Art. No 16. – DOI 10.3390/mi15010016. K1

### Монографии

A8. Manufacturing Quality Evaluation of Photopolymer Resin 3D-Printed Scaffolds Using Microtomography / E. V. Sadyrin, A. L. Nikolaev, **S. V. Chapek**, D. V. Nazarenko, S. M. Aizikovich, Yun-Che Wang // *Sixty Shades of Generalized Continua : Dedicated to the 60th Birthday of Prof. Victor A. Eremeyev* / Altenbach, H., Berezovski, A., dell'Isola, F., Porubov, A. (eds). – Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2023. – Ch. 38. – P. 619-630. – (Advanced Structured Materials, Vol. 170). – ISBN 978-3-031-26185-5. – DOI 10.1007/978-3-031-26186-2\_38

### Публикации в сборниках трудов конференций

A9. Microfluidic systems for the *In Situ* X-ray spectral diagnostics and screening of synthesis parameters / Guda A., Shapovalov V., **Chapek S.**, Bulgakov A., Soldatov A. V. // *Synchrotron Radiation Techniques for Catalysts and Functional Materials : II International Conference, October 23-27, 2023 Novosibirsk, Russia* : [Book of Abstracts]. – Novosibirsk : Boreskov institute of Catalysis SB RAS, 2023. – С. 56-57.

A10. Разработка системы ультразвуковой модуляции для микрофлюидной технологии ускоренного синтеза новых функциональных наноматериалов / А. Н. Рыбьянец, Н. А. Швецова, И. А. Швецов, С. В. Чапек, Е. И. Муханова // IV семинар "Современные нанотехнологии" (IWMN-2022), 24-27 августа 2022, Уральский

федеральный университет, Екатеринбург, Россия : сборник тезисов. – Екатеринбург : ФГАОУ ВО "УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина", 2022. – С. 111. – Режим доступа: [https://nanocenter.urfu.ru/sites/default/files/Abstract\\_book\\_IWMN-2022.pdf](https://nanocenter.urfu.ru/sites/default/files/Abstract_book_IWMN-2022.pdf) (дата обращения 02.06.2025)

A11. *In situ* рост наночастиц палладия внутри микрофлюидного чипа под контролем рентгеновской абсорбционной спектроскопии / Добровольская А. В., **Чапек С. В.**, Усольцев О. А., Наранов Е. Р., Горбунов Д. Н., Тригуб А. Л., Солдатов А. В., Бугаев А. Л. // Высокоточная диагностика функциональных материалов: лабораторные и синхротронные исследования : сборник тезисов II Всероссийской молодежной конференции (г. Воронеж, 12-17 сентября 2022 г.) / Воронежский государственный университет ; под общей редакцией доктора физико-математических наук, доцента С. Ю. Турищева. – Воронеж : Научная книга, 2022. – С. 117-119.

A12. Возможность микроволновой экстракции биологически активных веществ из исландского мха и ламинарии / Кузнецова П. Д., Булгаков А. Н., Волик К. К., **Чапек С. В.**, Муханова Е. А. // Новые материалы и технологии в условиях Арктики : материалы V Международной конференции с элементами научной школы, 14-18 июня 2022 г. / Министерство образования и науки Российской Федерации Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова ; [редакционная коллегия: А. А. Охлопкова и др.]. – Якутск : СВФУ, 2022. – С. 231-232.

## Список литературы

---

[1] Mousavi S. M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles toward bio and medical applications: review study //Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. – 2018. – Т. 46. – №. 3. – С. 855-872.

[2] Pretto T. et al. Design of experiments a powerful tool to improve the selectivity of copper antimony sulfide nanoparticles synthesis //CrystEngComm. – 2021. – Т. 23. – №. 2. – С. 397-403.

[3] Tao H. et al. Nanoparticle synthesis assisted by machine learning //Nature Reviews Materials. – 2021. – Т. 6. – №. 8. – С. 701-716.

[4] Dong B. et al. Synthesis of monodisperse spherical AgNPs by ultrasound-intensified Lee-Meisel method, and quick evaluation via machine learning //Ultrasonics Sonochemistry. – 2021. – Т. 73. – С. 105485.

[5] Li J. et al. Deep learning accelerated gold nanocluster synthesis //Advanced Intelligent Systems. – 2019. – Т. 1. – №. 3. – С. 1900029.

[6] Zhao H. et al. A robotic platform for the synthesis of colloidal nanocrystals //Nature Synthesis. – 2023. – Т. 2. – №. 6. – С. 505-514.

[7] W Wahl C. B. et al. Machine learning–accelerated design and synthesis of polyelemental heterostructures //Science Advances. – 2021. – Т. 7. – №. 52. – С. eabj5505.

[8] Pellegrino F. et al. Machine learning approach for elucidating and predicting the role of synthesis parameters on the shape and size of TiO<sub>2</sub> nanoparticles //Scientific Reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 18910.

[10] Whitesides G. M. The origins and the future of microfluidics //nature. – 2006. – Т. 442. – №. 7101. – С. 368-373.

[10] Sans V., Cronin L. Towards dial-a-molecule by integrating continuous flow, analytics and self-optimisation //Chemical Society Reviews. – 2016. – Т. 45. – №. 8. – С. 2032-2043.

---

[11] Le C. et al. Searching for high similarity of longitudinal local surface plasmon resonance in gold and silver nanobipyramids //Materials Today Communications. – 2022. – T. 30. – C. 103173.

[12] Nguyen H. V. et al. Serially diluting centrifugal microfluidics for high-throughput gold nanoparticle synthesis using an automated and portable workstation //Chemical Engineering Journal. – 2023. – T. 452. – C. 139044.

[13] Yang Z. et al. Controllable synthesis of silver nanoparticles using a multi-stage microfluidic reactor driven by two valveless piezoelectric pumps //Sensors and Actuators A: Physical. – 2022. – T. 346. – C. 113871.

[14] Chen M. et al. A dual-angle fiber dynamic light scattering system integrated with microfluidic chip for particle size measurement //Optics & Laser Technology. – 2022. – T. 150. – C. 107891.

[15] Mekki-Berrada F. et al. Two-step machine learning enables optimized nanoparticle synthesis //npj Computational Materials. – 2021. – T. 7. – №. 1. – C. 55.

[16] Li S. et al. Automated microfluidic screening of ligand interactions during the synthesis of cesium lead bromide nanocrystals //Molecular Systems Design & Engineering. – 2020. – T. 5. – №. 6. – C. 1118-1130.

[17] Radajewski D. et al. An innovative data processing method for studying nanoparticle formation in droplet microfluidics using X-rays scattering //Lab on a Chip. – 2021. – T. 21. – №. 22. – C. 4498-4506.

[18] Lange T., et al. OSTE+ for *in situ* SAXS analysis with droplet microfluidic devices // Lab Chip. 2020. Vol. 20, No. 16. P. 2990–3000.

[19] Ren K., Zhou J., Wu H. Materials for microfluidic chip fabrication //Accounts of chemical research. – 2013. – T. 46. – №. 11. – C. 2396-2406.

[20] Gonzalez G. et al. Current and emerging trends in polymeric 3D printed microfluidic devices //Additive Manufacturing. – 2022. – T. 55. – C. 102867.

---

[21] Guda A. A. et al. Machine learning analysis of reaction parameters in UV-mediated synthesis of gold nanoparticles //The Journal of Physical Chemistry C. – 2023. – T. 127. – №. 2. – C. 1097-1108.

[22] van der Linden P. J. E. M., Popov A. M., Pontoni D. Accurate and rapid 3D printing of microfluidic devices using wavelength selection on a DLP printer //Lab on a Chip. – 2020. – T. 20. – №. 22. – C. 4128-4140.

[23] Bressan L. P. et al. 3D-printed microfluidic device for the synthesis of silver and gold nanoparticles //Microchemical journal. – 2019. – T. 146. – C. 1083-1089.

[24] Camarillo-Escobedo R. M. et al. 3D printed opto-microfluidic autonomous analyzer for photometric applications //Sensors and Actuators A: Physical. – 2022. – T. 337. – C. 113425.

[25] Parthasarathy J., Starly B., Raman S. A design for the additive manufacture of functionally graded porous structures with tailored mechanical properties for biomedical applications //Journal of Manufacturing Processes. – 2011. – T. 13. – №. 2. – C. 160-170.

[26] Sheoran A. J. et al. Bio-medical applications of additive manufacturing: a review //Procedia Manufacturing. – 2020. – T. 51. – C. 663-670.

[27] Paris H. et al. Comparative environmental impacts of additive and subtractive manufacturing technologies //Cirp Annals. – 2016. – T. 65. – №. 1. – C. 29-32.

[28] Indrakumari R. et al. Digital twin technologies for automated vehicles in smart healthcare systems //Digital Twin for Smart Manufacturing. – Academic Press, 2023. – C. 161-184.

[29] Melchels F. P. W., Feijen J., Grijpma D. W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering //Biomaterials. – 2010. – T. 31. – №. 24. – C. 6121-6130.

[30] Norman J. et al. A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products //Advanced drug delivery reviews. – 2017. – T. 108. – C. 39-50.

---

[31] Gibson I. et al. Direct digital manufacturing //Additive manufacturing technologies: 3D printing, rapid prototyping, and direct digital manufacturing. – 2015. – С. 375-397.

[32] Castilho M. et al. Multitechnology biofabrication: a new approach for the manufacturing of functional tissue structures? //Trends in biotechnology. – 2020. – Т. 38. – №. 12. – С. 1316-1328.

[33] Jeong Y. G. et al. 3D digital light process bioprinting: Cutting-edge platforms for resolution of organ fabrication //Materials Today Bio. – 2024. – С. 101284.

[34] Miri A. K. et al. Microfluidics-enabled multimaterial maskless stereolithographic bioprinting //Advanced Materials. – 2018. – Т. 30. – №. 27. – С. 1800242.

[35] Tellier C. Asiga Max UV 3D Printer Review // 3D Tech Valley

[36] Ergometa Inc. Otofash G171: Flash-curing device for light-curing

[37] Ai A. UV-Vis Spectroscopy–Principle, Instrumentation, Applications, Advantages, and Limitation.

[38] Сивухин Д. В. Поглощение света и уширение спектральных линий //Общий курс физики. – 2005. – Т. 4. – С. 582-583.

[39] Kumar K. J. E. E. M. S. R., Gupta N. A short review on ultraviolet and visible spectroscopy.

[40] Kaur G., Singh H., Singh J. UV-vis spectrophotometry for environmental and industrial analysis //Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science. – Elsevier, 2021. – С. 49-68.

[41] Ocean Optics OCEAN FX-UV-VIS User Manual

[42] Свергун Д. И., Фейгин Л. А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. – Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1986. – С. 280.

[43] Seibt S., Ryan T. Microfluidics for time-resolved small-angle x-ray scattering //Advances in Microfluidics and Nanofluids. – IntechOpen, 2020.

---

[44] Round A. R. et al. Automated sample-changing robot for solution scattering experiments at the EMBL Hamburg SAXS station X33 //Applied Crystallography. – 2008. – T. 41. – №. 5. – C. 913-917.

[45] Gommès C. J., Jaksch S., Frielinghaus H. Small-angle scattering for beginners //Applied Crystallography. – 2021. – T. 54. – №. 6. – C. 1832-1843.

[46] Frielinghaus H., Pyckhout-Hintzen W. Neutron Scattering on Different States of Polymer–Clay Compounds: From Solution to Dry States //Clay-Polymer Nanocomposites. – Elsevier, 2017. – C. 327-361.

[47] Fischer H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale //Journal of applied crystallography. – 2010. – T. 43. – №. 1. – C. 101-109.

[48] Lai X. et al. Sticker microfluidics: a method for fabrication of customized monolithic microfluidics //ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2019. – T. 5. – №. 12. – C. 6801-6810.

[49] Hakke V. et al. Process intensification approach using microreactors for synthesizing nanomaterials—A critical review //Nanomaterials. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 98.

[50] Tymm C. et al. Scalable COVID-19 detection enabled by lab-on-chip biosensors //Cellular and molecular bioengineering. – 2020. – T. 13. – C. 313-329.

[51] M. Kumar, M. A. Knackstedt, T. J. Senden, A. P. Sheppard, and J. P. Middleton, *Petrophysics* 51, SPWLA2010-v51n5a4 (2010).

[52] Schuler J., Kockmann N. Micro-computed tomography for the investigation of stationary liquid–liquid and liquid–gas interfaces in capillaries //AIChE Journal. – 2020. – T. 66. – №. 4. – C. e16890.

[53] Costa P. F. et al. Mimicking arterial thrombosis in a 3D-printed microfluidic in vitro vascular model based on computed tomography angiography data //Lab on a Chip. – 2017. – T. 17. – №. 16. – C. 2785-2792.

---

[54] Interstate Council for Standardization, Metrology and Certification (2018) Plastics. Tensile test method (GOST 11262 – 2017). Standardinform, Moscow

[55] The British Standards Institution (2012) Plastics – determination of tensile properties – part 2: test conditions for moulding and extrusion plastics (ISO 527-2:2012). BSI Standards Limited, London

[56] Ferry J. D. Viscoelastic properties of polymers. – John Wiley & Sons, 1980.

[57] HARZ Labs (2021) Material Technical Data Sheet Industrial Flex 13. Version 1.2 / EN

[58] Soussou J. E., Moavenzadeh F., Gradowczyk M. H. Application of Prony series to linear viscoelasticity //Transactions of the Society of Rheology. – 1970. – T. 14. – №. 4. – C. 573-584.

[59] Beachkofski B., Grandhi R. Improved distributed hypercube sampling //43rd AIAA/ASME/ASCE/AHS/ASC Structures, Structural Dynamics, and Materials Conference. – 2002. – C. 1274.

[60] Merkus H. G., Merkus H. G. Particle size, size distributions and shape //Particle Size Measurements: Fundamentals, Practice, Quality. – 2009. – C. 13-42.

[61] Marciniak L. et al. The effect of pH on the size of silver nanoparticles obtained in the reduction reaction with citric and malic acids //Materials. – 2020. – T. 13. – №. 23. – C. 5444.

[62] Sondi I., Goia D. V., Matijević E. Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles //Journal of colloid and interface science. – 2003. – T. 260. – №. 1. – C. 75-81.

[63] Dong X. et al. Shape control of silver nanoparticles by stepwise citrate reduction //The Journal of Physical Chemistry C. – 2009. – T. 113. – №. 16. – C. 6573-6576.

[64] Tretinnikov O. N., Ikada Y. Dynamic wetting and contact angle hysteresis of polymer surfaces studied with the modified Wilhelmy balance method //Langmuir. – 1994. – T. 10. – №. 5. – C. 1606-1614.

---

[65] Warr C. A. et al. 3D-printed microfluidic droplet generator with hydrophilic and hydrophobic polymers //Micromachines. – 2021. – T. 12. – №. 1. – C. 91.

[66] Zhao S. et al. Three-dimensional simulation of mixing performance inside droplets in micro-channels by Lattice Boltzmann method //Chemical Engineering Journal. – 2012. – T. 207. – C. 267-277.

[67] Peng Z. et al. A review of microreactors based on slurry Taylor (segmented) flow //Chemical Engineering Science. – 2022. – T. 247. – C. 117040.

[68] Patabadige D. E. W. et al. Micro total analysis systems: fundamental advances and applications //Analytical chemistry. – 2016. – T. 88. – №. 1. – C. 320-338.

[69] Probst J. et al. *In situ* X-ray absorption spectroscopy and droplet-based microfluidics: an analysis of calcium carbonate precipitation //ACS Measurement Science Au. – 2021. – T. 1. – №. 1. – C. 27-34.

[70] Burov O. N. et al. Synthesis and structure of dihydroberberine nitroaryl derivatives–potential ligands for G-quadruplexes //Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2017. – T. 53. – C. 335-340.

[71] Wang J. et al. The synthesis and antistaphylococcal activity of 9, 13-disubstituted berberine derivatives //European journal of medicinal chemistry. – 2017. – T. 127. – C. 424-433.

[72] Terrier F. Rate and equilibrium studies in Jackson-Meisenheimer complexes //Chemical Reviews. – 1982. – T. 82. – №. 2. – C. 77-152.

[73] Solsona M. et al. Microfluidics and catalyst particles //Lab on a Chip. – 2019. – T. 19. – №. 21. – C. 3575-3601.

[74] Pena-Pereira F. et al. Advances in miniaturized UV-Vis spectrometric systems //TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2011. – T. 30. – №. 10. – C. 1637-1648.

[75] Chrimes A. F. et al. Microfluidics and Raman microscopy: current applications and future challenges //Chemical Society Reviews. – 2013. – T. 42. – №. 13. – C. 5880-5906.

---

[76] Chen X. et al. Insights into growth kinetics of colloidal gold nanoparticles: *In Situ* SAXS and UV–Vis evaluation //The Journal of Physical Chemistry C. – 2020. – T. 125. – №. 1. – C. 1087-1095.

[77] Levenstein M. A. et al. Droplet microfluidics xrd identifies effective nucleating agents for calcium carbonate //Advanced Functional Materials. – 2019. – T. 29. – №. 19. – C. 1808172.

[78] Chaussavoine I. et al. The microfluidic laboratory at Synchrotron SOLEIL //Synchrotron Radiation. – 2020. – T. 27. – №. 1. – C. 230-237.

[79] Hofmann G. et al. A microfluidic device for the investigation of rapid gold nanoparticle formation in continuous turbulent flow //Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2016. – T. 712. – №. 1. – C. 012072.

[80] Oyanagi H. et al. *In situ* XAFS experiments using a microfluidic cell: application to initial growth of CdSe nanocrystals //Synchrotron Radiation. – 2011. – T. 18. – №. 2. – C. 272-279.

[81] Probst, J.; Borca, C. N.; Newton, M. A.; van Bokhoven, J.; Huthwelker, T.; Stavrakis, S.; deMello, A. *In situ* X-ray absorption spectroscopy and droplet-based microfluidics: An analysis of calcium carbonate precipitation. ACS Meas. Sci. Au 2021, 1, 27–34.

[82] Janssens, K.; Bugaev, A. L.; Kozyr, E. G.; Lemmens, V.; Guda, A. A.; Usoltsev, O. A.; Smolders, S.; Soldatov, A. V.; De Vos, D. E. Evolution of the active species of homogeneous Ru hydrodeoxygenation catalysts in ionic liquids. Chem. Sci. 2022, 13, 10251–10259.

[83] Ravel B., Newville M. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT //Synchrotron Radiation. – 2005. – T. 12. – №. 4. – C. 537-541.

[84] Bugaev A. L. et al. Evolution of Pt and Pd species in functionalized UiO-67 metal-organic frameworks //Catalysis Today. – 2019. – T. 336. – C. 33-39.

---

[85] Bugaev A. L. et al. The role of hydrogen in formation of Pd XANES in Pd-nanoparticles //Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2013. – T. 430. – №. 1. – C. 012028.

[86] Bugaev A. L. et al. The role of palladium carbides in the catalytic hydrogenation of ethylene over supported palladium nanoparticles //Catalysis Today. – 2019. – T. 336. – C. 40-44.

[87] Ciapina E. G. et al. On the lattice dilation of palladium nanoparticles and a new methodology for the quantification of interstitials //Journal of Alloys and Compounds. – 2021. – T. 881. – C. 160628.

[88] Svenskaya Y. I. et al. Non-invasive transcutaneous influenza immunization using vaccine-loaded vaterite particles //Journal of Materials Chemistry B. – 2023. – T. 11. – №. 17. – C. 3860-3870.

[89] Ferreira A. M., Vikulina A. S., Volodkin D. CaCO<sub>3</sub> crystals as versatile carriers for controlled delivery of antimicrobials //Journal of Controlled Release. – 2020. – T. 328. – C. 470-489.

[90] Zhao P. et al. Recent advances of calcium carbonate nanoparticles for biomedical applications //Bioengineering. – 2022. – T. 9. – №. 11. – C. 691.

[91] Lengert E. V. et al. Influence of the new formulation based on silver alginate microcapsules loaded with tannic acid on the microcirculation of the experimental periodontitis in rats //Materials Science and Engineering: C. – 2021. – T. 126. – C. 112144.

[92] Maleki Dizaj S. et al. An update on calcium carbonate nanoparticles as cancer drug/gene delivery system //Expert opinion on drug delivery. – 2019. – T. 16. – №. 4. – C. 331-345.

[93] Ma Z. et al. Recent development of drug delivery systems through microfluidics: from synthesis to evaluation //Pharmaceutics. – 2022. – T. 14. – №. 2. – C. 434.

---

[94] Sukhorukov G. B. et al. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds //Journal of Materials Chemistry. – 2004. – T. 14. – №. 14. – C. 2073-2081.

[95] Novoselova M. V. et al. Multifunctional nanostructured drug delivery carriers for cancer therapy: Multimodal imaging and ultrasound-induced drug release //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2021. – T. 200. – C. 111576.

[96] Svergun D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria //Applied Crystallography. – 1992. – T. 25. – №. 4. – C. 495-503.

[97] Ševčík R. et al. Characterization of vaterite synthesized at various temperatures and stirring velocities without use of additives //Powder Technology. – 2015. – T. 284. – C. 265-271.

[98] Kamhi S. R. On the structure of vaterite  $\text{CaCO}_3$  //Acta Crystallographica. – 1963. – T. 16. – №. 8. – C. 770-772.

[99] Feigin L. A. et al. Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering. – New York : Plenum press, 1987. – T. 1. – C. 14-15.

[100] Tan P. et al. Silver nanoparticle in biosensor and bioimaging: Clinical perspectives //Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2021. – T. 68. – №. 6. – C. 1236-1242.

[101] Mikheev A. V. et al. Hybrid Core–Shell Microparticles Based on Vaterite Polymorphs Assembled via Freezing-Induced Loading //Crystal Growth & Design. – 2022. – T. 23. – №. 1. – C. 96-103.

[102] Saveleva, M.S.; Lengert, E.V.; Verkhovskii, R.A.; Abalymov, A.A.; Pavlov, A.M.; Ermakov, A.V.; Prikhozhdenko, E.S.; Shtykov, S.N.; Svenskaya, Y.I.  $\text{CaCO}_3$  -based carriers with prolonged release properties for antifungal drug delivery to hair follicles