

微流控纸芯片的加工技术及其应用*

蒋 艳 马翠翠 胡贤巧 何巧红**

(浙江大学化学系 微分析系统研究所 杭州 310058)

摘 要 微流控纸芯片是一种新兴的微流控分析技术平台,具有成本低、加工简易、使用和携带方便等优点,在临床诊断、食品质量控制和环境监测等应用领域具有很大的应用前景,近年来,引起广大科学工作者极大的兴趣。本文着重介绍目前文献相继报道的各种纸芯片加工技术,包括紫外光刻、蜡印、等离子体处理、喷墨打印、喷墨溶剂刻蚀、绘图、柔印和激光光刻等技术。此外,还介绍了微流控纸芯片分析中的检测方法及其应用。

关键词 微流控纸芯片 微加工 检测技术 应用

中图分类号:O652.9 文献标识码: 文章编号: 1005-281X(2014)01-0167-11

Fabrication Techniques of Microfluidic Paper-Based Chips and Their Applications*

Jiang Yan Ma Cuicui Hu Xianqiao He Qiaohong**

(Institute of Microanalytical Systems, Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Microfluidic paper-based chip analysis is a burgeoning microfluidic technique. It possesses great potentials for application in clinical diagnosis, food quality control as well as environmental monitoring due to its attractive features such as low-cost, easy-to-fabricate, easy-to-use and portable. Its importance and utility are widely acknowledged and extensive research has been conducted in the past several years. This paper mainly aims to review the developed techniques for fabrication of microfluidic paper-based chips, including UV photolithography, wax printing, plasma treatment, ink printing, ink jet etching, plotting, screen printing, flexography printing and laser treatment, and so on. The detection methods for the microfluidic paper-based chip analysis and applications of microfluidic paper-based chips are also reviewed.

Key words microfluidic paper-based chips; fabrication; detection methods; applications

Contents

1 Introduction	3.2 Wax printing technique
2 Paper choices	3.3 Plasma treatment technique
3 Fabrication techniques of microfluidic paper-based chips	3.4 Ink printing technique
3.1 UV photolithography technique	3.5 Ink jet etching technique
	3.6 Plotting technique
	3.7 Screen printing and flexography printing

收稿: 2013 年 6 月, 收修改稿: 2013 年 10 月, 网络出版: 2013 年 12 月 25 日

* 国家自然科学基金项目(No. 20890020)和国家科学技术支撑项目(No. 2012BAI13B06)资助

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20890020) and the National Key Technology R&D Program of China (No. 2012BAI13B06)

** Corresponding author e-mail: heqh@zju.edu.cn

technique

3.8 Wax dipping technique

3.9 Laser treatment technique

3.10 Other techniques

4 Detection methods in microfluidic paper-based analytical devices

4.1 Colorimetric detection

4.2 Electrochemical detection

4.3 Chemiluminescence and electrochemiluminescence detection

5 Applications of microfluidic paper-based analytical devices

5.1 Clinical diagnosis

5.2 Food quality control

5.3 Environmental monitoring

6 Conclusion and perspective

1 引言

微流控纸芯片是近几年发展的一种新型微流控芯片。它用纸张作为基底代替硅、玻璃、高聚物等材料,通过各种加工技术,在纸上加工出具有一定结构的亲/疏水微细通道网络及相关分析器件,构建“纸上微型实验室”(lab-on-paper),也称微流控纸分析器件(microfluidic paper-based analytical devices, μ PADs)。自2007年 Whitesides 组^[1]首次提出 μ PADs 概念后,六年来微流控纸芯片分析技术得到了迅猛发展。

与传统的硅、玻璃、高聚物微流控芯片相比,微流控纸芯片具有如下优点:

(1) 成本更低。首先,相比之下,纸张来源更丰富,且其价格远低于硅、玻璃/石英、甚至高聚物等材料;其次,可通过简单的光刻^[1~3]、蜡印^[4~6]、喷墨打印^[7]、绘图^[8,9]等方式制作二维(2D)纸芯片,或通过简单的折纸^[10]或多层纸片叠加^[11]的方法制作三维(3D)纸芯片,因此纸芯片制作简便,其加工成本远低于传统微流控芯片。

(2) 分析系统更易微型化、便携化。滤纸本身具有很强的毛细管作用,经图案化疏水性处理即能引导溶液有序流动,因此无需外置的驱动泵;纸张薄(0.07~1 mm),质地轻,且可折叠,因此易于保存和运输。

(3) 生物兼容性好。滤纸的主要成分为纤维素,具有良好的生物兼容性,可以在其表面固定酶^[1]、蛋白质^[4,12]和 DNA^[13]等生物大分子。

(4) 检测背景低。纸张通常是白色,有利于在纸芯片上开展比色分析。

(5) 后处理简单,无污染。纸可燃,纸芯片使用完后,可以通过简单安全的燃烧方法进行处理,不会对环境造成污染。

因此,基于纸的微流控分析芯片可以作为一次性分析器件,应用于医学诊断、食品安全快速检测以及环境质量监控等领域^[14~16],尤其在发展中国家以及贫困偏远地区, μ PADs 具有很大的应用前景。

纸芯片制作是开展微流控纸芯片分析研究的基础,本文着重介绍近年来发展形成的微流控纸芯片加工技术,在此基础上,对微流控纸芯片中的检测方法及其应用研究作一简单的介绍。

2 纸张的选择

纸张资源丰富、种类繁多。滤纸因吸水性强、生物相容性好、廉价易得等特点,是目前微流控纸芯片中最常用的基底材料。针对不同的应用,可选择不同类型的滤纸或其他纸张。例如,用于全血分析的血细胞过滤时,因血细胞易变形,可以穿过孔径比其直径大或略小的滤纸,因此须选用空隙率低、孔径小且分布均匀的 Whatman 1 号层析纸^[17]。硝化纤维素对生物分子有较好的非特异性吸附,适合固定蛋白质^[4]和 DNA^[13]等生物分子。Lu 等^[4]采用硝基纤维素滤膜作为纸芯片的基底,用于生物大分子的快速分析检测。Al-Tamimi 等^[18]利用纸芯片检测人的血型实验中,选择吸墨纸、滤纸以及 Kleenex 纸巾三种不同的纸张,研究它们对凝聚血细胞的固定效果及对未凝聚血细胞的洗脱效果。研究发现,Kleenex 纸巾具有最佳效果。另外,本课题组用比色法检测亚硝酸根、葡萄糖等组分时发现,采用 Whatman 1 号滤纸与国产的新华定量滤纸作为基底,测定结果没有显著性差异。

此外,还有各种由纤维素和聚合物组成的离子交换纸和复合纸,为纸芯片的发展提供了多种可选择的基底材料。

3 微流控纸芯片的加工技术

目前,文献上主要采用紫外光刻^[1~3,10,11,19~30]、蜡印^[4~6,17,31~48]、等离子体处理^[49,50]、喷墨打印^[7,51]、喷墨溶剂刻蚀^[52,53]、绘图^[8,9]、丝网印刷^[39,54]、柔印^[55,56]、激光处理^[57]及融蜡浸透^[58,59]等技术,在滤纸的特定区域制造出疏水的隔离带(或隔离坝),形成具有亲疏水性的通道网络,制得二维

(2D)微流控纸芯片。在此基础上,利用多层滤纸的叠加^[11]或是折纸^[10]等方法制作三维(3D)微流控纸芯片。根据亲疏水图案化方式不同,2D 纸芯片的制作方法可分为两大类:一是两步法,即先采用物理沉积、物理堵塞或化学键合等途径使疏水性材料均匀修饰整片纸张,然后通过一定的技术使局部区域去疏水化;二是一步法,即直接在纸张的局部区域一次性进行疏水化(原亲水性纸片)或亲水化(原疏水性纸片)处理。前者主要有整个纸片疏水化后用紫外光刻、等离子体处理、喷墨溶剂刻蚀等技术局部去疏水化;后者主要以蜡印、喷墨打印、绘图、丝网印刷、柔印和激光刻蚀等技术实现区域疏水化或亲水化。

3.1 紫外光刻技术

首先通过物理吸附、物理沉积或化学键合等方式在滤纸上修饰光敏试剂(如光胶),然后在掩模的保护下,紫外光辐照特定区域,曝光区的光敏试剂发生光聚合或光降解,从而在滤纸上图案化亲/疏水通道网络。

SU-8 是一种常用的负光胶。Whitesides 小组^[1]将 SU-8 光胶均匀涂覆在滤纸上,然后在掩模的保护下进行紫外光刻,曝光区的光胶发生交联聚合,形成疏水“坝”。显影除掉未曝光的光胶,即形成亲水区域,从而在滤纸上形成了亲疏水通道网络,制得微流控纸芯片。为除净残留在纸基底中的光胶,他们在紫外光刻之后将整个纸片进一步用等离子体进行快速处理,提高了亲水通道的毛细作用。具体制作过程如图 1 所示。如此制得的纸芯片具有较高的图案分辨率,但所需 SU-8 光胶试剂价格昂贵。为降低制作成本,Whitesides 小组采用 SC(环化的聚异戊二烯衍生物)光胶^[21]或用 SU-8、三芳基硫六氟磷酸盐和丙二醇甲醚醋酸酯(PGMEA)自己配制的一种环氧负光胶^[23]。不论采用何种光胶,都需要在洁净实验室内进行,而且制作步骤繁琐。

Haller 等^[2]将化学气相沉积与紫外光处理技术相结合,制作纸芯片。首先通过化学气相沉积将过氧化二叔丁基(引发剂)和邻硝基苄基甲基丙烯酸酯(单体)沉积在多孔滤纸上,通过聚合反应形成具有光敏性质的聚邻硝基苄基甲基丙烯酸酯(PoNBMA),使整片滤纸由亲水变为疏水。疏水化滤纸在掩模的保护下,局部区域紫外光降解。曝光区的 PoNBMA 降解为聚甲基丙烯酸,可用 pH = 8 的缓冲溶液漂洗除去,从而制得具有亲疏性通道网络的纸芯片。

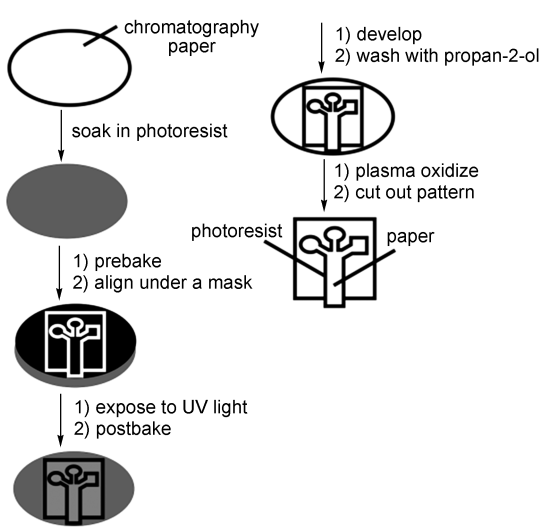


图 1 SU-8 光胶光刻技术制作纸芯片的流程^[1]

Fig.1 Procedure for UV photolithography fabrication of microfluidic paper-based chip with SU-8^[1]

硅烷化试剂价廉易得,种类繁多(含多种功能团),基于有机硅自组装单分子层(self-assembling monolayers, SAMs)的表面修饰技术在各研究领域得到了广泛应用,已成功用于硅片^[60]、玻璃^[61]等材料的表面改性。He 等^[3]报道了一种基于紫外光降解自组装硅烷化单分子层的纸芯片加工新方法。用十八烷基三氯硅烷(OTS)的正己烷溶液浸泡亲水性滤纸,通过 OTS 与滤纸纤维表面羟基间的缩合反应,在滤纸的纤维素表面自组装 OTS 单分子层,使滤纸由亲水变为强疏水(水的接触角约为 130°)。然后,在石英掩模的保护下,通过深紫外光(254、185 nm)及其在空气中诱导产生的臭氧(UV/O₃)选择性区域光降解,制得具有亲/疏水图案的微流控纸芯片,具体过程如图 2 所示。与前面几种紫外光刻方法相比,该方法操作简单易行(无需洁净实验室)、成本低,制得的纸芯片图案分辨率高、稳定性好,且保持了滤纸的柔韧性。

3.2 蜡印技术

Lin 小组^[4,5]以及 Whitesides 小组^[6]相继研发了用于纸芯片制作的蜡印技术。Lin 课题组^[4,5]提出了蜡笔手绘、蜡笔临摹打印图形以及蜡印三种方法在滤纸的特定区域图案化固体蜡,然后将滤纸放入高温炉(约 150 °C)加热,使蜡融化并渗透到滤纸中,形成疏水坝,制得具有毫米级亲水通道的纸芯片。Whitesides 小组^[6]也研发了类似的蜡印技术,并提出了滤纸中蜡融化速率的计算模型。该制作方法具有快速、成本低及操作简单等优点,可用于批量

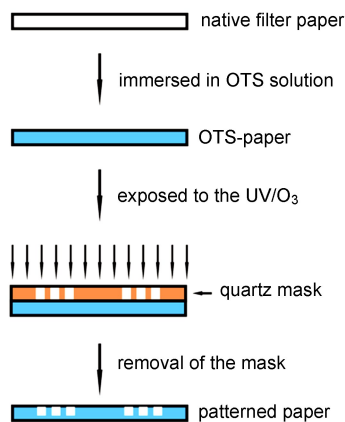


图2 基于紫外光降解自组装单分子层方法制备纸芯片的流程^[3]

Fig. 2 Schematic diagram for the fabrication of microfluidic paper-based device by OTS self-assembling and UV/O₃-patterning^[3]

制作对图案分辨率要求不是很高的纸芯片。

3.3 等离子体处理技术

烷基烯酮二聚体(AKD)是造纸工业中一种常用的合成施胶剂,能与纸张纤维素中的羟基反应,化学结合至纸纤维表面,使纸张疏水化。Shen等^[49,50]利用AKD处理亲水性滤纸,研究建立了等离子体技术制作纸芯片的方法。首先,用AKD溶液浸润滤纸,晾干后,将其在100℃下加热5 min,使反应完全,以确保滤纸高度疏水化;然后,将滤纸夹心于两个完全一致的镂空金属模具中,经等离子体处理,使暴露区域变成亲水,模具覆盖区域保持疏水,从而制得具有亲疏水图案的纸芯片。AKD是一种廉价的工业原料,因此利用AKD研制的微流控纸芯片成本低廉。但等离子体处理过程中,防止等离子体气氛从镂空区渗漏到覆盖区,是一个较为棘手的问题。

3.4 喷墨打印技术

2010年,Shen小组^[7]改进了等离子体处理技术,利用在纸基底上直接打印AKD溶液的方法制作纸芯片。其主要制作步骤为:采用喷墨打印机在滤纸局部区域打印AKD溶液,然后在100℃下加热8 min,通过缩合反应使AKD结合到滤纸纤维素表面,使之疏水化,而未喷墨的区域保持原滤纸的亲水性。与等离子体处理法相比较,该方法无需镂空的金属模具,操作简便,且可以实现快速批量生产。

3.5 喷墨溶剂刻蚀技术

Abe等^[52,53]研制了用喷墨溶剂刻蚀的方式制作纸芯片。具体制作过程如图3所示:(1)先将滤

纸在浓度为1.0%~1.8%聚苯乙烯的甲苯溶液中浸泡2 h,取出,待溶剂挥干后原亲水性滤纸变为疏水;(2)采用喷墨打印机在选定的区域多次打印甲苯溶剂(10~20次),逐步去除聚苯乙烯,从而在该区域形成亲水通道;(3)采用同一打印机在特定区域打印化学或生物试剂,用于后续的分析检测。这种制作纸芯片的方法,只需要一台打印仪器就可以在纸片上形成亲水性通道、固定化学或生物试剂。缺点是需多次打印,难以实现批量生产。

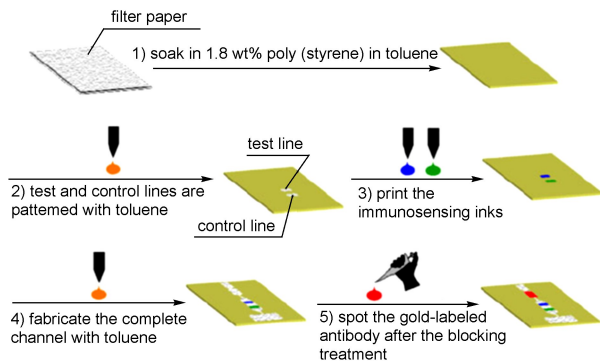


图3 喷墨溶剂刻蚀技术制备层析免疫色谱纸芯片的流程^[52]

Fig. 3 Fabrication process of the inkjet-printed microfluidic immunosensing strip^[52]

3.6 绘图技术

聚二甲基硅氧烷(PDMS)是传统微流控芯片的常用材料之一。2008年,Whitesides小组^[8]研制了用PDMS形成疏水坝制作纸芯片的方法。以正己烷稀释的PDMS溶液替代常规绘图仪笔中的墨水,通过电脑程序控制,用绘图仪在滤纸上描绘设计的图形,待PDMS固化后即在滤纸的特定区域形成疏水坝,其他区域保持原有的亲水性。这种方法制得的纸芯片柔韧性较好,且成本相对较低,但亲疏水通道的图案分辨率较低。

2012年,Li等^[9]报道了一种采用油性记号笔一步绘图制作纸芯片的方法。先将镂空的模具置于滤纸上方,用油性记号笔按照模具的图案临摹绘图,待溶剂挥干后即形成疏水区。这种制作方法快速简单、成本低、无需贵重仪器,无需专业人员操作,但是存在疏水区域不耐有机溶剂、图案分辨率低、难以制作复杂的图案等缺点。

3.7 丝网印刷和柔印技术

丝网印刷^[39,46,54]被广泛应用于印刷行业。Henry等^[54]利用丝网印刷技术制作纸芯片。先制作丝网印刷模具(印版),然后印刷固体蜡,加热后固

体蜡融化进入纸基底孔眼内,形成疏水坝,制得具有亲疏水通道的纸芯片。这种制作方法步骤简单,可批量生成,但图案分辨率较低。

柔印是一种采用柔性的网纹墨辊施印油墨的印刷方式。Oikkonen 等^[55]利用柔印技术研制了一种可用于葡萄糖分析的纸芯片。通过柔印将聚苯乙烯印刷到滤纸表面并渗透到滤纸孔内,从而形成阻碍液体流动的疏水坝,而未打印上聚苯乙烯的区域为亲水区,形成了具有亲/疏水通道网络的纸芯片。这种方法加工速度快、可批量加工,但制版工艺较复杂,且打印质量与纸张的光滑程度密切相关。

3.8 融蜡浸透技术

Laiwattanapaisai 等^[58,59]提出了一种融蜡浸透技术(wax dipping)制作纸芯片的方法。如图4所示,首先将滤纸平铺于载玻片上,将具有一定形状的铁模具置于滤纸上方,再在载玻片的背面放一块磁铁,组合成为“磁铁-载玻片-滤纸-铁模具”四层结构的装置;然后将该装置浸入120~130℃的液体蜡中,快速取出;液体蜡冷却凝固,卸下模具与载玻片,制得纸芯片。其中被模具掩盖的区域保持亲水性,其他区域因浸泡渗透固体蜡而成疏水性。这种制作方法无需复杂昂贵的仪器,但图案分辨率较低。

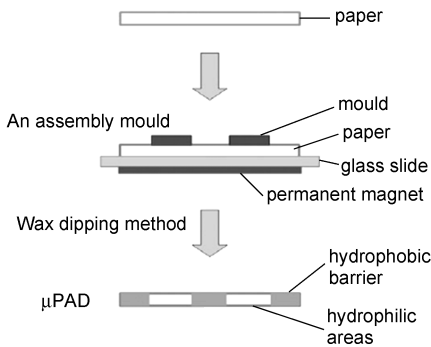


图4 融蜡浸透技术制备纸芯片的流程图^[58]
Fig. 4 Schematic diagram for fabrication process of the μ PAD using the wax dipping method^[58]

3.9 激光处理技术

2011年,Ziaie 小组^[57]报道了一种激光刻蚀制作纸芯片的新方法。在疏水性纸基底上通过CO₂激光刻蚀,加工出一定深度的亲水通道。但该通道亲水性不够强,液体无法在毛细管作用下自行流动,为此他们在激光刻蚀的亲水通道中再覆盖一层SiO₂纳米颗粒,成功实现液体在通道内的快速流动。该方法适合应用于采用任何疏水性纸张制作纸芯片,具有较高的图案分辨率,但需要昂贵的仪器设备。

3.10 其他加工技术

Zhang 等^[62]报道了一种图案转移技术制作微流控纸芯片的方法。先制得具有一定图形的镂空铜模具,然后在其表面涂覆一层石蜡;将滤纸平铺在模具上方,在铜模具背面用电烙铁加热使石蜡融化,这样模具中的石蜡即转移至滤纸的对应区域,制得具有亲疏水图案的纸芯片。

上述各种二维(2D)纸芯片制作方法的总结和比较如表1所示。

此外,经过两层或多层2D微流控纸芯片的叠加^[11,20,31,35,36]和手工折叠^[10,44,46]可以制作3D微流控纸芯片。Whitesides 小组^[11]利用打有孔眼并在孔眼内填充了纤维素粉的双面胶将两层2D纸芯片粘合在一起,首次制得3D纸芯片。Crooks 小组^[10]利用简单的手工折纸艺术,将具有亲水通道和样品池(或反应池)的2D纸芯片折叠,制得3D纸芯片。

4 微流控纸芯片分析中的检测方法

微流控纸芯片分析中主要有4种检测方法:比色检测、电化学检测、化学发光检测以及电化学发光检测。

4.1 比色检测

比色检测法是目前纸芯片分析研究中最常见的一种检测方法^[5~11,17,19,20,22,27,28,33~35,46,48,53,55,56,58,59,62,63]。通过显色反应,使待检测组分转化为有颜色的物质,利用颜色深度与待测组分浓度的相关性,进行定量或半定量分析。这种检测可以采用目测法即直接通过肉眼辨别,进行半定量分析;也可以采用数码相机或智能手机拍照、扫描仪扫描成图像,然后利用Photoshop、Image J等图像处理软件进行处理,将图像颜色转换为灰度值,根据灰度值与待测物浓度间的关系进行定量分析。

Martinez 等^[22]在纸芯片上利用比色检测法同时检测葡萄糖和蛋白质。用葡萄糖氧化酶催化氧化葡萄糖,生成过氧化氢,过氧化氢在辣根过氧化物酶的作用下将试剂中的碘离子氧化成碘单质,葡萄糖检测区域颜色由无色变为褐色。四溴酚蓝为酸碱指示剂,在不同的pH值下呈现不同的颜色,加入蛋白质样品后,检测区的酸度发生变化,四溴酚蓝由黄色变为蓝色,且随着蛋白质浓度增加,蓝色加深。

亚硝酸根是食品、环境、水质等检测的重要指标之一。纸芯片作为一种灵敏、准确、快速且高效的亚硝酸根传感器可用于现场快速分析。Klasner

表 1 二维微流控纸芯片制作方法的总结与比较

Table 1 Summary and comparison of techniques for fabricating 2D microfluidic paper-based chips

fabrication techniques	patterning agents	patterning principles	patterning approaches	advantages	disadvantages	ref
photolithography	SU-8	physical blocking of pores in paper	two-step fabrication	high resolution of hydrophilic-hydrophobic pattern	requires expensive equipment; fabrication process is tedious; devices are vulnerable to bending	1,10,11,19~30
	PoNBMA	physical deposition of reagent on fiber surface	two-step fabrication	high resolution of hydrophilic-hydrophobic pattern	requires expensive equipment; devices are vulnerable to bending	2
	OTS	chemical modification of fiber surface	two-step fabrication	high resolution of hydrophilic-hydrophobic pattern; patterning reagent with low cost; devices are flexible	requires expensive equipment	3
wax printing	wax	physical deposition of reagent on fiber surface	one-step fabrication	produces massive devices with simple and fast fabrication process; low-cost	requires expensive wax printers; low resolution of hydrophilic-hydrophobic pattern	4~6,17,31~48
plasma treatment	AKD	chemical modification of fiber surface	two-step fabrication	patterning agent with low cost; fabrication process is simple	requires different masks for creating different microfluidic patterns; substrate is easily to be overetched	49,50
ink jet printing	AKD	chemical modification of fiber surface	one-step fabrication	mass production with simple and fast fabrication process	requires expensive wax printers	7,51
ink jet etching	polystyrene	physical deposition of reagent on fiber surface	two-step fabrication	printing bio/chemical sensing reagents directly	creation of microfluidic channels requires 10~20 times of printing	52,53
plotting	PDMS	physical blocking of pores in paper	one-step fabrication	patterning agent with low cost; devices are flexible	deteriorated barrier definition	8
	ink marks	physical deposition of reagent on fiber surface	one-step fabrication	fabrication process is rather simple	difficult to fabricate complex patterns	9
screen printing	wax	physical deposition of reagent on fiber surface	one-step fabrication	produces massive devices with simple process	low resolution of hydrophilic-hydrophobic pattern; requires different printing screens for creating different patterns	39,54
flexography printing	polystyrene	physical deposition of reagent on fiber surface	one-step fabrication	produces massive devices with simple process	low resolution of hydrophilic-hydrophobic pattern; print quality depends on the smoothness of paper surface	55,56
wax dipping	wax	physical deposition of reagent on fiber surface	one-step fabrication	produces devices with simple process	low resolution of hydrophilic-hydrophobic pattern; requires different mental masks for creating different patterns	58,59
pattern transference	wax	physical deposition of reagent on fiber surface	one-step fabrication	requires no wax printer	low resolution of hydrophilic-hydrophobic pattern	62
laser treatment	hydrophobic paper	—	one-step fabrication	high resolution of hydrophilic-hydrophobic pattern	lateral flow of fluids is difficult; requires extra coating for liquid flow	57

等^[19]报道了利用纸芯片测定亚硝酸盐的新方法。利用磺胺与亚硝酸盐发生重氮化反应,再与 *N*-(1-萘基)乙二胺发生偶联反应生成红色产物,从而实现亚硝酸盐的快速比色检测。

Jokerst 等^[33]报道了一种用于食源性致病菌(大肠杆菌、沙门菌、单核细胞增生利斯特菌)监测的纸芯片。根据每种病菌产生的酶与底物发生颜色反应而定量检测。相应的显色反应及颜色变化分别为:

大肠杆菌产生的 β -半乳糖苷酶与氯酚红 β -半乳糖皮蕨 (CPRG) 反应,颜色由黄色变为红色;沙门菌产生的酯酶与 5-溴-6-氯-3-吡啶辛酯反应,颜色由无色变为紫色;单核细胞增生利斯特菌产生的磷脂酰肌醇磷酸酶 C (PI-PLC) 与 5-溴-4-氯-3-吡啶基-肌醇磷酸盐反应,颜色由无色变为蓝色。根据各检测区显色反应后颜色变化和灰度值,可间接定量测定各种食源性致病菌的含量。与传统医学检测方法相比较,该分析方法具有快速、简便且成本低等优点。

4.2 电化学检测

电化学检测^[25,26,29,37,39,41,43,45,48,54,64~67]具有灵敏度高、选择性好、易于集成化及微型化等优点,近年来被成功用于纸芯片分析中。其中,安培法是应用最多的一种,此外还有电位法、伏安法和电导法。

Ge 等^[41]提出并构建了一种基于可寻址电极阵列的安培检测型免疫传感器,用碳纳米管-胶体金标记的抗体实现了对癌症标志物的测定,并用于实际样品分析。该法以甲胎蛋白功能化单壁碳纳米管为传感器,以自组装的 4×6 电极阵列为电化学检测的工作电极,以丝网印刷打印的碳电极为对电极、Ag/AgCl 为参比电极。Arena 等^[64]研制了一种电导法检测乙醇的纸芯片分析系统。在釉纸上沉积导电碳纳米管制作电极,并在其上修饰一层分散有氧化铟锡 (ITO) 纳米颗粒的聚二甲基二烯丙基氯化铵 (PDDAC) 薄膜,带正电的 PDDAC 聚电解质与带负电的 ITO 纳米颗粒间的静电作用使得电极在室温下对乙醇有很好的感应性能。

4.3 化学发光与电化学发光检测

化学发光分析法具有背景低、灵敏度高、线性范围宽、设备简单和操作简便等特点。电化学发光法是将化学发光分析法与电化学手段相结合的一种新的分析技术。化学发光法^[47,57,68~70]和电化学发光法^[31,32,36,44,51]都被成功应用于纸芯片分析。

Yu 等^[68]研制了一种化学发光同时检测葡萄糖和尿酸的纸芯片分析系统。纸芯片包括样品进样区,两条生物活性酶通道(一条固定有葡萄糖氧化酶,一条固定有尿酸氧化酶)、化学发光区域。将滤纸夹心固定于两层胶带之间,上层胶带设计有镂空区域以方便进样。进样后,葡萄糖和尿酸分别与葡萄糖氧化酶和尿酸氧化酶反应生成过氧化氢,进而与罗丹宁衍生物产生化学发光反应。其化学发光的信号与分析物浓度成正比。Delaney 等^[51]建立了电化学发光纸芯片分析系统,用智能手机相机作为检测器,分别检测了 2-(二丁氨基)乙醇 (DBAE) 和烟

酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)。首先,将滤纸进行图案化处理,然后在亲水通道加入三联吡啶钉,干燥后,将其夹心于集成有丝网印刷电极的塑料板和带有微孔的透明高聚物板之间。施加一定的电压,三联吡啶钉与待检测物质 DBAE 和 NADH 发生电化学发光反应,用手机拍摄后进行数据分析。这种检测方法较比色检测法具有更低的检测限。

5 微流控纸芯片分析的应用

微流控纸芯片已被广泛应用于健康检测、环境监测和食品安全控制等不同的领域。

5.1 临床诊断

在疾病诊疗的过程中,早期诊断对于成功治疗疾病起着至关重要的作用。纸芯片为早期诊断治疗提供了一个分析平台。到目前为止,纸芯片已经用于尿液、唾液以及血液中多种分析物的检测,如葡萄糖^[5,6,8,10,11,17,19,20,22,53,55,56,58,62,70,71]、蛋白质^[5,6,10,11,17,20,22,27,34,35,53,55,58,59,62,72]、尿酸^[26,27,29,49,68,70]、乳酸^[26,48]、亚硝酸根^[7,19,20,49]、酮类^[19,20]、胆固醇^[6,48]、DNA^[45]等的分析检测。Ge 等^[47]通过简单的折纸研制了 3D 纸芯片,利用化学发光的方法测定了全血中的 4 种癌症标记物甲胎蛋白 (AFP),癌症抗原 153 (CA153),癌症抗原 199 (CA199) 以及癌胚抗原 (CEA)。Whitesides 等^[35]研制了一种自组装多功能纸芯片,经指尖刺血供给样品后,实现了全血中的碱性磷酸酶 (ALP) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 两种肝功能酶以及全血清蛋白的快速检测。

血型是人类血液的特征之一,血型分析在法医学上被广泛用于个体识别和亲子鉴定等,对侦查破案、揭露和证实犯罪有着十分重要的意义。Al-Tamimi 等^[18]研制和发展了一种新型纸芯片,可用于快速、高通量鉴定血型,1 min 内可以成功鉴定 100 个血样品,包括 8 种弱 AB 型血和 RhD 型血。

细菌感染对动物和人类的健康造成了很大的威胁,近年来细菌检测已经引起了越来越多的关注。Li 等^[73]研制了一种同时测定铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的免疫层析纸芯片传感器。该免疫层析纸芯片传感器以硝酸纤维素膜为基底,在特定区域固定有不同特异性抗体的阵列,每一阵列中包括样品垫、结合物释放垫、检测线、对照线和吸收垫 5 个区。该纸芯片对铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌检测范围为 500 ~ 5000 CFU·mL⁻¹。

此外,也有文献报道了 96、384 纸质孔板芯片

进行酶联免疫分析(ELISA)。Whitesides 小组^[12]利用 SU-8 光胶光刻的方法制作孔板型纸芯片,应用于免疫分析测定癌症标记物。白鹏小组^[63]用光刻法制作滤纸微孔板,并在其上负载修饰后的 SiO₂ 微球以提高其吸附蛋白质的能力,基于此建立了间接酶联免疫吸附法测定羊抗兔免疫球蛋白的方法。

5.2 食品质量控制

近年来,食品安全已成为全世界关注的热点。人们对食品安全检测技术提出了更高的要求,尤其需要发展快捷、准确且灵敏的检测方法。纸芯片传感器在食品安全检测领域正发挥着重要的作用^[3,33,43,48,64,74]。

Hossain 等^[74]研制了一种基于对乙酰胆碱酯酶生物活性抑制原理的侧向层析生物纸芯片,用于饮料和食品中农药残留的快速检测。他们用该纸芯片在 5 min 内定量检测了恶虫威、胺甲萘、对氧磷以及马拉硫磷 4 种农药,检测限分别为 1、10、1 和 10 nM。Nie 等^[48]通过喷墨打印以及丝网印刷法研制了三电极体系的纸芯片,并以市售的快速血糖仪作为检测器,快速定量检测水中的乙醇,其线性检测范围为 0.1 ~ 3 mM。He 等^[3]将研制的纸芯片用于血燕中 NO₂⁻ 的快速检测,检测结果与离子色谱法相一致。

5.3 环境监测

环境问题是当今国际社会的普遍问题。重金属

离子污染对人体健康及动植物的生长和生存都有很大危害。Apilux 等^[25]研制了一种检测重金属离子的微流控纸芯片,利用电化学和比色检测法相结合的二元检测技术,同时定量检测工业废水中金离子和铁离子含量。采用三电极体系,利用方波伏安法定量检测金离子;利用比色检测方法定量测定 Fe(Ⅲ) 的浓度。Hossain 等^[34]报道了一种用于同时定量检测废水中的多种重金属离子(Hg(Ⅱ)、Ag(Ⅰ)、Cu(Ⅱ)、Cd(Ⅱ)、Pb(Ⅱ)、Cr(Ⅵ)、Ni(Ⅱ))的层析纸芯片。采用树形结构,分别将疏氧吡啶锌、二乙基二硫代氨基甲酯钠、二苯碳酰二肼、丁二酮肟等固定于在树形顶端的检测区内,可分别与 Hg(Ⅱ)、Cu(Ⅱ)、Cr(Ⅵ)、Ni(Ⅱ) 反应产生不同的颜色,从而对不同的重金属离子进行定性和定量检测,10 min 内完成 7 种离子的同时检测,其中 Hg(Ⅱ)、Ag(Ⅰ)、Cu(Ⅱ)、Cd(Ⅱ)、Pb(Ⅱ)、Cr(Ⅵ)、Ni(Ⅱ) 的检测限分别为 0.001、0.002、0.020、0.020、0.140、0.150、0.230 ppm。此外,随着水体污染和富营养化程度的加剧,淡水湖泊发生水华的频率和规模也日益严重,微囊藻毒素(MCs)是国内外各种水体发生最普遍、最频繁、危害最大的一类水华蓝藻。Wang 等^[67]报道了一种基于竞争免疫分析的纸芯片,该纸芯片修饰有碳纳米管,采用电化学方法检测水中的微囊藻毒素,检测限为 0.6 ng·mL⁻¹。

表 2 列出了上述纸芯片的各种检测方法及其应用。

表 2 纸芯片的检测方法及应用

Table 2 Summary of detection methods and applications of microfluidic paper-based chips

detection methods	example analytes	applications	ref
colorimetric detection	glucose	health diagnostics	5, 6, 8, 10, 11, 17, 19, 20, 22, 53, 55, 56, 58, 62, 70, 71
	protein		5, 6, 10, 11, 17, 20, 22, 27, 34, 35, 53, 55, 58, 59, 62, 72
	nitrite		7, 19, 20, 49
	uric acid		27, 49
	ketones		19, 20
	cholesterol		6
	PSA		9
	AST, ALP, ALT		35, 36
	nerve and vesicant agents		28
	blood typing		18
	rabbit IgG, human anti-HIV-1, goat anti-rabbit IgG		12, 63
	nitrite	food quality testing	3
	foodborne pathogens (<i>E. coli</i> O157: H7, <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>L. monocytogenes</i>)		33
	pesticides(bendiocarb, carbaryl, paraoxon, malathion)		74
	heavy metals: Hg(Ⅱ), Ag(Ⅰ), Cd(Ⅱ), Pb(Ⅱ), Cr(Ⅵ), Ni(Ⅱ), Fe(Ⅲ), Cu(Ⅱ)	environmental monitoring	25, 34, 40, 54

续表 2

detection methods	example analytes	applications	ref
electrochemical detection	glucose	health diagnostics	26,48,54,65
	uric acid		26,29
	lactate		26,48
	cholesterol		48
	ascorbic acid		29
	tumor marker(CEA, CA125, CA199, CA153, AFP)	food quality testing	37,39,41
	DNA		45
	ethanol		48,64
	paracetamol, 4-aminophenol		43
	Au(III),Pb(II)	environmental monitoring	25,65
chemiluminescence detection	pH		66
	microcystin-LR		67
	glucose,uric acid	health diagnostics	68,70
	Fe (III) in blood		57
electrochemiluminescence detection	tumor markers(CA153, AFP, CEA, CA125, CA199)	health diagnostics	47,69
	tumor markers(AFP, CEA, CA125, CA199)		32, 36, 44, 47
	DBAE/NADH		51
	Pb(II), Hg(II)	environmental monitoring	31

6 总结与展望

综上所述,作为一种新颖的分析测试微器件,微流控纸芯片在过去 6 年中得到了迅速的发展,在纸芯片的加工、纸上微流体的操控、待测物的检测等方面,取得了一批突破性的成果,而纸芯片在疾病诊断、食品检测、环境检测等领域的初步应用成果,已经给人们展示出其巨大的发展前景。

然而,微流控纸芯片还处在发展的初期,现有的纸芯片加工技术、流体操控技术、检测技术还远远不能满足实际应用的需要,许多应用领域还有待开发,微流控纸芯片的发展还有很大的空间。为此,我们就今后微流控纸芯片的发展趋势和研究重点,提出以下几点粗浅的看法。

(1)微流控纸芯片的加工和修饰技术。目前,文献大多采用蜡、AKD、OTS、SU-8 光胶等疏水材料在纸片上形成疏水隔离带。前三种材料虽可以有效阻挡水溶液渗透进入疏水区域,但无法阻挡表面张力低的有机溶剂如甲醇、乙醇、乙腈等,因此在应用上受到一定的限制;SU-8 光胶能在一定程度上能阻挡有机溶剂渗透进入疏水区,但是其成本过高。所以,开发价廉物美和对有机溶剂也有一定阻挡作用的疏水材料,是今后的研究方向之一。特别要指出的是,蜡、SU-8 光胶均通过渗透而涂敷(物理结合)于纸纤维的表面,有一定的厚度且牢度有限,芯片不宜折叠。开发能与纸纤维化学键合、并且能通过一定手段实现纸上亲疏水性图案化的材料尤其值得关注。通过在表面修饰技术,进一步改善纸芯片分析化学进展, 2014, 26(1): 167 ~ 177

区域(通道和检测区)的性能,如提高其选择性结合力、降低非特异性吸附等,也是值得研究的一个课题。虽然目前已经报道的纸芯片加工技术和方法不少,但每一种都有其长处和局限性。从方法的简易性、普适性、经济性和是否适合批量生产看,蜡印技术、AKD 喷墨打印(打浆)技术是比较有前景的两种加工方法。如何提高这两种技术的图案化精度,以在纸上制备精细、复杂的通道网络结构,还有不少研究可做。最后,在纸芯片上设计加工分离、富集、反应、检测等多种功能单元,使纸芯片初具“全分析”功能,更是微流控分析工作者应该努力的方向。

(2)微流控纸芯片上的流体操控技术。纸芯片的特点之一是通过毛细作用驱动液体,因此无需任何外置驱动泵,但是这种驱动方式往往无法实现液流的有序操控。而复杂体系的多步预处理与反应、多组分同时检测等要求对液流进行操控。目前这方面的研究还很少,如何通过通道几何构型(亲水通道的粗细、长短等)的设计、经过修饰形成梯度亲疏水性、集成微阀等方式来实现纸芯片上液流的有序可控流动,今后还有很多研究工作需要开展。

(3)微流控纸芯片上的检测技术。虽然比色、电化学、化学发光等检测方法都已用于纸芯片,但发展不(或少)用配套设备的检测技术是推广普及纸芯片的关键。在这一点上,比色法无疑是最适合纸芯片、最容易被广大群众所接纳的一种检测方法。因此,挖掘改进传统的显色反应、开发适用于纸芯片的比色分析技术,提高检测灵敏度,是纸芯片检测技术研究的一个方向。电化学检测灵敏度高、选择性

好,外部设备易微型化,是微流控芯片理想的检测方法之一。但是,在纸芯片上集成微电极阵列并非易事,目前采用电化学检测的纸芯片分析技术还比较鲜见。因此研究纸芯片的电化学检测技术,会有不少工作可做。另外,随着智能手机的普及,利用手机成像,结合高速网络传输,有望实现借助纸芯片的远程诊断,在这一方面也有许多发展空间。

(4) 微流控纸芯片的应用。与商品化的试纸条相比,微流控纸芯片不仅可以对单一组分进行定量分析,还可以实现多组分同时分析,因此在今后的应用中,应注重建立多组分同时检测的纸芯片分析方法。同时,为充分发挥纸芯片易于普及到家用和现场使用的特点,研制针对农药残留、食品新鲜度、血糖检测等大众热点和简单易用的纸质芯片,必定会推动纸芯片的普及应用。

目前,纸微流控芯片还处于实验室的研究阶段,尚未见商品化产品。但相信随着加工技术和分析技术的不断完善和改进,纸芯片必将成为床边 (point-on-care, POC) 和现场快速检测的重要技术手段。

参 考 文 献

- [1] Martinez A W, Phillips S T, Butte M J, Whitesides G M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46: 1318.
- [2] Haller P D, Flowers C A, Gupta M. *Soft Matter*, 2011, 7: 2428.
- [3] He Q H, Ma C C, Hu X Q, Chen H W. *Anal. Chem.*, 2013, 85: 1327.
- [4] Lu Y, Shi W W, Qin J H, Lin B C. *Anal. Chem.*, 2010, 82: 329.
- [5] Lu Y, Shi W W, Jiang L, Qin J H, Lin B C. *Electrophoresis*, 2009, 30: 1497.
- [6] Carrilho E, Martinez A W, Whitesides G M. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 7091.
- [7] Li X, Tian J F, Garnier G, Shen W. *Colloid Surf. B: Biointerfaces*, 2010, 76: 564.
- [8] Bruzewicz D A, Reches M, Whitesides G M. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 3387.
- [9] Nie J F, Zhang Y, Lin L W, Zhou C B, Li S H, Zhang L M, Li J P. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 6331.
- [10] Liu H, Crooks R M. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133: 17564.
- [11] Martinez A W, Phillips S T, Whitesides G M. *PNAS*, 2008, 105: 19606.
- [12] Cheng C M, Martinez A W, Gong J L, Mace C R, Phillips S T, Carrilho E, Mirica K A, Whitesides G M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49: 4771.
- [13] Cretich M, Sadini V, Damin F, Pelliccia M, Sola L, Chiari M. *Anal. Biochem.*, 2010, 397: 84.
- [14] Li X, Ballerini D R, Shen W. *Biomicrofluidics*, 2012, 6: 011301.
- [15] Liana D D, Raguse B, Gooding J J, Chow E. *Sensors*, 2012, 12: 11505.
- [16] Ballerini D R, Li X, Shen W. *Microfluid. Nanofluid.*, 2012, 13: 769.
- [17] Yang X X, Forouzan O, Brown T P, Shevkoplyas S S. *Lab Chip*, 2012, 12: 274.
- [18] Al-Tamimi M, Shen W, Zeineddine R, Tran H, Garnier G. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 1661.
- [19] Klasner S A, Price A K, Hoeman K W, Wilson R S, Bell K J, Culbertson C T. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 397: 1821.
- [20] Martinez A W, Phillips S T, Nie Z H, Cheng C M, Carrilho E, Wiley B J, Whitesides G M. *Lab Chip*, 2010, 10: 2499.
- [21] Carrilho E, Phillips S T, Vella S J, Martinez A W, Whitesides G M. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 5990.
- [22] Martinez A W, Phillips S T, Carrilho E, Thomas S W, Sindi H, Whitesides G M. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 3699.
- [23] Martinez A W, Phillips S T, Wiley B J, Gupta M, Whitesides G M. *Lab Chip*, 2008, 8: 2146.
- [24] Rezk A R, Qi A S, Friend J R, Li W H, Yeo L Y. *Lab Chip*, 2012, 12: 773.
- [25] Apilux A, Dungchai W, Siangproh W, Praphairaksit N, Henry C S, Chailapakul O. *Anal. Chem.*, 2010, 82: 1727.
- [26] Dungchai W, Chailapakul O, Henry C S. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 5821.
- [27] Chen X, Chen J, Wang F B, Xiang X, Luo M, Ji X H, He Z K. *Biosens. Bioelectron.*, 2012, 35: 363.
- [28] Pardasani D, Tak V, Purohit A K, Dubey D K. *Analyst*, 2012, 137: 5648.
- [29] Carvalho R F, Kfoury M S, Piazzetta M H D, Gobbi A L, Kubota L T. *Anal. Chem.*, 2010, 82: 1162.
- [30] Martinez A W, Phillips S T, Carrilho E, Whitesides G M. *Anal. Chem.*, 2010, 82: 3.
- [31] Zhang M, Ge L, Ge S G, Yan M, Yu J H, Huang J D, Liu S. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 41: 544.
- [32] Ge L, Yan J X, Song X R, Yan M, Ge S G, Yu J H. *Biomaterials*, 2012, 33: 1024.
- [33] Jokerst J C, Adkins J A, Bisha B, Mentele M M, Goodridge L D, Henry C S. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 2900.
- [34] Hossain S M Z, Brennan J D. *Anal. Chem.*, 2011, 83: 8772.
- [35] Vella S J, Beattie P, Cademartiri R, Laromaine A, Martinez A W, Phillips S T, Mirica K A, Whitesides G M. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 2883.
- [36] Yan J X, Ge L, Song X R, Yan M, Ge S G, Yu J H. *Chem. Eur. J.*, 2012, 18: 4938.
- [37] Zang D J, Ge L, Yan M, Song X R, Yu J H. *Chem. Commun.*, 2012, 48: 4683.
- [38] Li W P, Ge S G, Wang S M, Yan M, Ge L, Yu J H. *Luminescence*, 2013, 28: 496.
- [39] Wang P P, Ge L, Yan M, Song X R, Ge S G, Yu J H. *Biosens. Bioelectron.*, 2012, 32: 238.
- [40] Mentele M M, Cunningham J, Koehler K, Volckens J, Henry C

S. Anal. Chem. , 2012, 84: 4474.

[41] Ge S G, Ge L, Yan M, Song X R, Yu J H, Huang J D. Chem. Commun. , 2012, 48: 9397.

[42] Zhong Z W, Wang Z P, Huang G X D. Microsyst. Technol. , 2012, 18: 649.

[43] Shiroma L Y, Santhiago M, Gobbi A L, Kubota L T. Anal. Chim. Acta, 2012, 725: 44.

[44] Wang S W, Ge L, Zhang Y, Song X R, Li N Q, Ge S G, Yu J H. Lab Chip, 2012, 12: 4489.

[45] Lu J J, Ge S G, Ge L, Yan M, Yu J H. Electrochim. Acta, 2012, 80: 334.

[46] Pollock N R, Rolland J P, Kumar S, Beattie P D, Jain S, Noubary F, Wong V L, Pohlmann R A, Ryan U S, Whitesides G M. Sci. Transl. Med. , 2012, 4: 1.

[47] Ge L, Wang S M, Song X R, Ge S G, Yu J H. Lab Chip, 2012, 12: 3150.

[48] Nie Z H, Deiss F, Liu X Y, Akbulut O, Whitesides G M. Lab Chip, 2010, 10: 3163.

[49] Li X, Tian J F, Shen W. Cellulose, 2010, 17: 649.

[50] Li X, Tian J F, Nguyen T, Shen W. Anal. Chem. , 2008, 80: 9131.

[51] Delaney J L, Hogan C F, Tian J F, Shen W. Anal. Chem. , 2011, 83: 1300.

[52] Abe K, Koter K, Suzuki K, Citterio D. Anal. Bioanal. Chem, 2010, 398: 885.

[53] Abe K, Suzuki K, Citterio D. Anal. Chem. , 2008, 80: 6928.

[54] Dungchai W, Chailapakul O, Henry C S. Analyst, 2011, 136: 77.

[55] Olkkonen J, Lehtinen K, Erho T. Anal. Chem. , 2010, 82: 10246.

[56] Määttänen A, Fors D, Wang S, Valtakari D, Ihalainen P, Peltonen J. Sens. Actuators B: Chem. , 2011, 160: 1404.

[57] Chitnis G, Ding Z W, Chang C L, Savran C A, Ziaie B. Lab Chip, 2011, 11: 1161.

[58] Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Laiwattanapaisal W. Talanta, 2011, 85: 2587.

[59] Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Henry C S, Laiwattanapaisal W. Lab Chip, 2012, 12: 3392.

[60] Sugimura H, Ushiyama K, Hozumi A, Takai O. Langmuir, 2000, 16: 885.

[61] Bai Z Q, He Q H, Huang S S, Hu X Q, Chen H W. Anal. Chim. Acta, 2013, 767: 97.

[62] Zhang A L, Zha Y. AIP Advances, 2012, 2: 022171.

[63] 白鹏 (Bai P), 罗雁 (Luo Y), 李英 (Li Y), 余晓东 (Yu X D), 陈洪渊 (Chen H Y). 分析化学 (Chinese J. Anal. Chem.), 2013, 43: 20.

[64] Arena A, Donato N, Saitta G, Bonavita A, Rizzo G, Neri G. Sens. Actuators B: Chem. , 2010, 145: 488.

[65] Nie Z H, Nijhuis C A, Gong J H, Chen X, Kumachev A, Martinez A W, Narovlyansky M, Whitesides G M. Lab Chip, 2010, 10: 477.

[66] Lei K F, Lee K F, Yang S I. Microelectron. Eng. , 2012, 100: 1.

[67] Wang L B, Chen W, Xu D H, Shim B S, Zhu Y Y, Sun F X, Liu L Q, Peng C F, Jin Z Y, Xu C L, Kotov N A. Nano Lett. , 2009, 9: 4147.

[68] Yu J H, Ge L, Huang J D, Wang S M, Ge S G. Lab Chip, 2011, 11: 1286.

[69] Wang S M, Ge L, Song X R, Yu J H, Ge S G, Huang J, Zeng F. Biosens. Bioelectron. , 2012, 31: 212.

[70] 王方方 (Wang F F), 陈锦 (Chen J), 何治柯 (He Z K). 分析科学学报 (J. Anal. Sci.), 2011, 27: 137.

[71] Ornatska M, Sharpe E, Andreescu D, Andreescu S. Anal. Chem. , 2011, 83: 4273.

[72] Wang W, Wu W Y, Wang W, Zhu J J. J. Chromatogr. A, 2010, 1217: 3896.

[73] Li C Z, Vandenberg K, Prabhulkar S, Zhu X N, Schneper L, Methee K, Rosser C J, Almeida E. Biosens. Bioelectron. , 2011, 26: 4342.

[74] Hossain S M Z, Luckham R E, McFadden M J, Brennan J D. Anal. Chem. , 2009, 81: 9055.