

# 微流控分析芯片的两种液相传质模式及其应用<sup>\*</sup>

沈 宏<sup>\*\*</sup> 方 群

(浙江大学化学系微分析系统研究所 杭州 310058)

**摘 要** 微流控分析芯片的微米级结构不仅显著增大内部流体的比表面积,同时缩短微通道内不同溶液间的传质距离,使传质效率相比于宏观体系有显著提高,从而可实现试样分析检测前的高效扩散分离和萃取富集等。本文综述了微流控分析芯片中两种液相传质模式即互溶液相间扩散分离分析和不互溶液相间萃取分离分析的研究进展,讨论了上述传质模式在微芯片装置和功能的集成化方面的应用,并讨论了相关研究的难点和发展趋势。

**关键词** 微流控分析芯片 液相传质 扩散 萃取 分离

**中图分类号:** O652.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-281X(2008)12-2053-08

## Application of Two Kinds of Liquid-Phase Mass Transfer in Microfluidic Analytical Chip

Shen Hong<sup>\*\*</sup> Fang Qun

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

**Abstract** Due to the micro scale of inner structure of microfluidic analytical chip, the fluid possesses high specific surface area as well as small diffusion distance which remarkably improves mass transfer rate and enhances sample pretreatment efficiency, such as diffusion or extraction separation before determination. In this paper, the applications of two kinds of liquid-phase mass transfer between miscible phases or immiscible phases in microfluidic analytical chip are reviewed. Further microfabrication and integration based on liquid-phase mass transfer for more complex devices and wider range of functions are introduced. The difficulties in technique development and application tendency are also discussed.

**Key words** microfluidic analytical chips; liquid-phase mass transfer; diffusion; extraction; separation

微全分析系统是目前迅速发展的高新技术和多学科交叉前沿领域之一,其核心技术是以微流控技术为基础的微流控分析芯片<sup>[1,2]</sup>。微流控分析芯片可在使用数皮升至纳升的试样和试剂的条件下,完成高倍率的分离和富集,也可在数秒至数十秒内实现分离、检测;分离分析效率高于相应的常规分析方法 1—2 个数量级。这种高效分析能力与高传质效率直接相关,因为微流控芯片内用于容纳试样、试剂等流体的有效结构(如微通道和反应室等),至少在一个维度上处于微米尺度。该微米级的结构不仅显

著增大内部流体的比表面积,同时也显著减小传质距离。

从溶液的互溶性来看,微流控芯片通道内液相传质,可分为互溶液相间扩散传质和不互溶液相间萃取传质两大类。本文综述了基于这两类液相传质的微流控分析芯片的研究进展,包括微通道内高效传质的理论基础,基于液相传质的微流控分析芯片在试样扩散分离、萃取富集、芯片装置和功能集成化等方面的应用现状,并分析了微流控液相传质芯片的研究难点和发展趋势。

收稿: 2008 年 1 月, 收修改稿: 2008 年 5 月

<sup>\*</sup>国家自然科学基金项目 (No. 20775071) 资助

<sup>\*\*</sup>通讯联系人 e-mail: shzju@mail.hz.zj.cn

## 1 互溶液相间扩散传质

微通道内径小,流体流量很低,流体以通常范围是 0.01—10 cm/s 的流速流过时,其雷诺数小于 1<sup>[3]</sup>,表现为稳定层流。同向流动的互溶的液相(如水溶液)流体,可在通道中平行流动,形成互不相混的多相层流流形。利用微流控芯片通道普遍存在的层流效应的优势,可进行宏观系统中无法实现的互溶液相间的无膜传质、分离、富集、反应和检测。

爱因斯坦方程可用来近似估算微流控芯片通道内,分子传质时间  $t$  与传质距离、扩散系数的关系:

$$t = \frac{l^2}{D}$$

其中  $l$  为传质距离(如微通道宽度), $D$  为扩散系数。溶质的分子量可显著影响其传质速度。如蔗糖分子的分子量为 342,其在水溶液中的扩散系数为  $D = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ;若蔗糖溶液的流速为 10 cm/s,流经 1 cm 后,相对于相邻水溶液流体界面的径向传质距离为 10  $\mu\text{m}$ ;较大的牛血清白蛋白(BSA)的扩散系数  $D = 6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,同样的条件下传质距离减小为 6  $\mu\text{m}$ ,而更大的、直径约 0.5  $\mu\text{m}$  的细胞,则传质距离仅约 10<sup>-2</sup>  $\mu\text{m}$ 。因此,在径向距离很小的微流控芯片通道内,可利用分子大小不同产生的传质速率差异,实现通道内的分离和检测。

1997 年,Yager 和 Weigl 等首次报道在微流控芯片上实现互溶液相间扩散传质分离(H-Filter)<sup>[4]</sup>和检测(T-Sensor)<sup>[5]</sup>的方法,适用于复杂试样中小分子的分离检测。通过微加工制备 H 型(或 T 型)通道的微流控芯片,试样溶液和接受液分别由注射泵推入 H 型(或 T 型)通道的两个入口,汇流后在主分离通道形成同向流动的平行流,试样溶液中的分子在两相界面通过扩散传质进入接受液,利用分子大小不同所产生的速度差异实现分离;或在接受液中直接加入显色试剂,在扩散分离的同时,直接显色、检测。Yager 和 Weigl 等应用上述两种微流控芯片开展了一系列分离、分析研究<sup>[6]</sup>:如将 H-Filter 层流扩散分离作为色谱分析的前处理技术,用于血液试样中头孢拉定分析<sup>[7]</sup>;将 T-Sensor 用于血液试样中酸度<sup>[8,9]</sup>和白蛋白<sup>[8]</sup>的测定;利用药物底物分子与抗体结合前后分子量的明显差异,用 T-Sensor 结合免疫分析技术测定苯妥英血药浓度<sup>[10]</sup>,该方法无需任何预分离即可分析含 10% 原血的试样,且试样和试剂用量均小于 1  $\mu\text{l}$ ,分析时间小于 1 min,定量检测的动态线性范围达 3 个数量级。

Cho 等<sup>[11]</sup>扩展了 H-Filter 的功能,将其应用于精子活力分析。由于体积较大,精子单纯依靠自由扩散作用,迁移 10  $\mu\text{m}$  距离需要 690 s,因此无活力的精子无法在试样流过通道的时间内以自由扩散方式进入收集液流;而对于自身具有游动能力的活性精子,其在 25 s 时的运动速度为 20  $\mu\text{m}/\text{s}$ ,经过 20 s 的流动时间,可在整个通道径向达到均匀分布。采用 H-Filter 分离方法,最终可有相当数量的活性精子进入收集通道,通过记数后可分析精液质量。

H-Filter 微流控芯片也被应用于石油成分分析<sup>[12]</sup>。用原油溶液作为供试液,有机溶剂作为接受液,试样在芯片内的分离时间仅需数秒。另外还有用微机械加工制备深通道微芯片,增加 T-Sensor 的传质速率和检测光程,提高检测灵敏度的报道<sup>[13]</sup>。

Huh 等<sup>[14]</sup>改进 H-Filter 的微通道构型,开展蛋白质溶液的脱盐纯化研究,分离尿素(细胞裂解缓冲液组分之一)。5 个溶液平行流过微通道,依次为金属离子( $\text{Mn}^{2+}$  或  $\text{Fe}^{3+}$  或  $\text{Zn}^{2+}$ )溶液、缓冲溶液(Tris-HCl, pH = 7)、蛋白质试样溶液、缓冲溶液(Tris-HCl, pH = 7)、金属离子( $\text{Mn}^{2+}$  或  $\text{Fe}^{3+}$  或  $\text{Zn}^{2+}$ )溶液。因为金属离子与尿素具有配位亲合作用,蛋白质溶液所含的尿素可同时向两侧 Tris-HCl 缓冲溶液扩散,并与金属离子结合,这比单侧扩散效率更高;同时,在蛋白质试样溶液与金属离子溶液之间,夹流 Tris-HCl 缓冲溶液,可防止金属离子过快扩散进入蛋白质试样液流,避免污染及保持蛋白质的活性。

在微流控芯片通道内,利用多个同向并行液流,在扩散传质作用下,可形成浓度梯度变化的微环境<sup>[15]</sup>。通过改变微通道结构、溶液浓度和流速等,浓度梯度范围甚至可达到 5 个数量级<sup>[16]</sup>。这种微环境十分有利于开展微米直径的细胞的化学趋向性和药物趋向性研究。

Mao 等<sup>[17]</sup>设计了一种三入口、多出口的微流控芯片,研究包括野生型和不同变种等数种大肠杆菌细胞的化学趋向性。3 个入口分别引入吸引因子(如左旋天冬氨酸)溶液、细胞悬浊液和空白缓冲液。在低流速下,吸引因子溶液和空白缓冲液可在汇流通道的内形成一定浓度梯度的微环境,待测细胞进入汇流通道并流经特定的浓度梯度微环境,再从多个出口通道中的不同通道流出并记数。该方法测得 3.2 nM 的左旋天冬氨酸对野生型大肠杆菌的分布有吸引作用,该浓度比标准方法测得的浓度低 3 个数量级。Koyama 等<sup>[18]</sup>采用类似的三入口的微流控芯片,研究小鼠精子对卵细胞提取物的生物趋向性。

实验显示,一定浓度梯度的趋向因子环境对精子的活动有影响,但若该浓度梯度过高或过低,则对精子的趋向作用消失。Jeon 等<sup>[19]</sup>以白细胞介素-8 为趋化因子,开展嗜中性粒细胞在微通道内的趋化现象的研究。将标记的嗜中性粒细胞注入这几种梯度变化的微环境内,经过一段时间的细胞迁移后,可观察到明显的细胞趋化现象,并提示细胞对趋化因子浓度的急剧变化和缓慢变化的响应不同。

用常规方法,很难在数百微米的微小区域产生蛋白质浓度分布梯度。Dertinger 等<sup>[20]</sup>应用扩散传质,使具有趋化作用的层粘连蛋白与无趋化作用的牛血清白蛋白在微通道内形成浓度梯度微环境,研究各种浓度梯度对海马神经元细胞培养中的神经轴突生长方向的影响,结果显示层粘连蛋白对轴突生长的导向作用。

Pihl 等<sup>[16]</sup>通过扩散传质,控制通道内形成  $0.1 \sim 5\,000\mu\text{M}$  的  $\text{BaCl}_2$  以及  $0.1 \sim 1\,000\mu\text{M}$  的  $\alpha$ -氨基丁酸的浓度梯度变化微环境,开展中华仓鼠卵巢细胞的电压门控钾离子通道的药理学研究,以及 WSS1 细胞的配体门控  $\alpha$ -氨基丁酸 A 型受体的药理学研究。结果表明,该方法在低试样消耗的情况下,可高效地获取细胞的半数抑制浓度和半数效应浓度等大量数据。

Walker 等<sup>[21]</sup>改进上述单纯依靠分子扩散改变浓度梯度的方法,采用多层通道微芯片,结合流速差异对扩散传质的影响,产生浓度梯度,开展细胞毒性分析。

Shinohara 等<sup>[22]</sup>开展微芯片液相层流传质对纳米晶体形成影响的研究,获得并筛选多种型态的  $\text{C}_{60}$  纳米晶体。在甲苯/乙醇两相层流通道内,通过调节层流界面温度和两相接触时间,使分散在甲苯溶液中的  $\text{C}_{60}$  纳米微粒,在乙醇溶液中聚集、结晶。他们提出,根据奥斯德瓦尔德结晶阶段定律,晶体形成前会首先生成的亚稳态“介晶”物质,因介晶存在时间极短,在宏观体系中难以观察到。而微流控通道的微米空间内,不仅有高比表面积和短扩散距离的优势,而且有利于新生亚稳态纳米介晶的观察和确认,可为药物多晶型(包括  $\text{C}_{60}$  等富勒烯)生成和稳定条件的研究提供帮助。

Heeren 等<sup>[23]</sup>则在 H 型通道微芯片内,开展液相间不同于通常径向传质的轴向传质研究。左右两个纵向通道分别流通两种溶液,中部横向连接通道内,两种溶液沿通道方向相互扩散传质,形成轴向浓度梯度。实验建立了通道内浓度梯度产生原因的判断

方法,以及浓度大小的检测方法。

## 2 不互溶液相间的萃取传质

在微流控芯片内,不互溶液相间的萃取传质效率同样决定于分子扩散,也可以用爱因斯坦方程描述。常见分子或离子的扩散系数一般为  $10^{-5}\text{cm}^2/\text{s}$ ,在  $100\mu\text{m}$  的微小空间内,传质时间仅需几十秒;即微通道内溶液的比表面积显著增大,相当于分液漏斗剧烈振摇的结果。Tokeshi 等<sup>[24]</sup>溶质在微通道和分液漏斗内的传质速率进行了比较:甲苯与含待测试样的水溶液在宽  $250\mu\text{m}$ 、深  $100\mu\text{m}$  的微通道中汇流,达到两相萃取平衡的时间为  $50\text{s}$ ;而在分液漏斗中加  $10\text{ml}$  同样的水相与  $10\text{ml}$  甲苯,机械振摇  $300\text{次}/\text{min}$ ,达到两相平衡需时  $600\text{s}$ 。因此当通道的尺度小于  $250\mu\text{m}$  时,萃取效率很高。

Kitamori 等<sup>[25]</sup>在 2000 年首次报道采用“水相/有机相”Y 型汇流的微流控芯片,用于液-液萃取分离  $\text{Fe}^{2+}$ 。水相含  $\text{Fe}^{2+}$  配位阴离子、有机相含有有机阳离子,两溶液平行引入微通道, $\text{Fe}^{2+}$  配位阴离子萃取进入有机相并与有机阳离子缔合。实验中萃取平衡时间仅  $45\text{s}$ 。随后,相继有一系列采用 Y 型汇流通道,同向平行流萃取不同金属离子、有机分子的报道,如  $\text{Co}^{2+}$ <sup>[24]</sup>、 $\text{Al}^{3+}$ <sup>[26]</sup>、 $\text{Ni}^{2+}$ <sup>[27]</sup>、 $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$ <sup>[28,29]</sup>、麻黄碱<sup>[30]</sup>等。还有在 Y 型芯片一次汇流的基础上,增加一次汇流,制成先反应、再萃取的两次汇流型芯片的报道,研究  $\text{Co}^{2+}$  的萃取<sup>[31]</sup>。

除金属离子和小分子有机物外,Yamada 等<sup>[32]</sup>以聚乙二醇水溶液和葡聚糖水溶液的双水相为萃取体系,以直径为  $37 \sim 96\mu\text{m}$  的植物细胞为分析对象,在 Y 型汇流通道的微流控芯片内,开展细胞等大质量颗粒物质的萃取分配研究。由于常规萃取依靠重力实现上下层分相,处于上层相溶液中的大质量颗粒物质常因重力作用,积聚分相后的两层溶液界面附近,对分离不利。而微流控芯片通道内的两相平行液流既相互接触又互不相混,水平方向萃取时,可最大限度避免重力场的干扰,有利于更好地研究大颗粒物质在两相间的迁移和分配情况。

随着微流控液液萃取分离研究的发展,一些研究者改进微通道结构,采用  $\pi$  型汇流芯片,开展“水溶液/有机溶液/水溶液”三相平行流萃取体系的研究。还有人利用微通道内三相液流厚度仅几十微米且可控的优势,进一步开展基于微米级有机相液膜的选择性分离、富集、仿生等研究。

Hibara 等<sup>[33]</sup>研究了这种三相层流萃取体系,发

现不互溶的“水溶液/乙酸乙酯/水”体系不仅可在直通道、弯曲通道均能保持三相稳定层流,而且在有机相宽度仅15 $\mu\text{m}$ 时,稳定距离仍能达18cm以上。由于三相层流萃取的传质距离仅为两相层流的一半,且萃取界面面积增大一倍,该体系的萃取平衡时间仅3s,是类似两相层流萃取体系<sup>[24]</sup>平衡时间的1/20左右。Surmeian等<sup>[34]</sup>则研究“水溶液/有机溶液/水溶液”的三相层流萃取-反萃取系统,试图建立新型的人工生物膜系统,模拟体外药物透膜。实验采用特殊的湿法刻蚀工艺,制备微通道底部带引导槽的结构芯片,以稳定“水/环己胺/水”的三相界面;以甲基红为分析物、盐酸溶液为供试水溶液和接受水溶液,结果显示在10s内三相便可达到萃取-反萃取平衡。Maruyama等<sup>[35]</sup>用“水溶液/庚烷/水溶液”三相层流中的有机相分离金属离子 $\text{Y}^{3+}$ 和 $\text{Zn}^{2+}$ ,微通道中有机相流通区域用十八烷基硅烷改性,以减小有机相液膜的厚度。有机相中含有机膦萃取剂,试样为含 $\text{Y}^{3+}$ 和 $\text{Zn}^{2+}$ 的水溶液,接受相为硝酸水溶液。在两相界面,萃取剂所含的质子与金属离子发生交换反应,使试样离子与萃取剂分子结合而被萃取。通过调节水相的pH值,可控制质子-萃取剂与金属离子-萃取剂的竞争反应并最终影响金属离子的萃取程度。

微流控芯片通道的深度常小于宽度,尤其对于微流控萃取中广泛使用的玻璃芯片,因各向同性,加工后深度远小于宽度;因此,与左右平行流萃取相比,上下平行流萃取不论在比界面积,还是在扩散距离等方面均有优势。因此Kuban等<sup>[36]</sup>开展上下平行流萃取研究,通过在微芯片上下液流汇合处夹入一片厚50 $\mu\text{m}$ 或80 $\mu\text{m}$ 、长约8mm聚酯片,使其如舌状夹在通道中,引导生成稳定的上下平行流。研究表明上下平行流的形成和保持稳定,受舌状引导薄膜、两相间界面张力、有机相密度和黏度等因素的影响。实验者用甲基蓝水溶液作试样,考察了有机相、溶液流速、微通道深度等对传质的影响,表明该上下平行流比左右平行流的萃取效率提高17—100倍。最近,Mata等<sup>[37]</sup>同样用舌状薄膜引导的上下平行流微芯片,通过扩散萃取,有效地从细胞悬液中分离防冻剂二甲基亚砷,并提示该分离方法比离心等传统方法更有效。

除上述同向平行层流外,其它流型的微流控传质萃取方式也有报道。

Hibara等<sup>[38-40]</sup>开展了多种微芯片中的逆流液相萃取研究,所用的芯片均由玻璃基片经湿法刻蚀、

加压封合而成;水相通道未作进一步处理,而有机相通道用十八烷基硅烷表面改性。他们最初研究平行于上下底面的逆向交叉流萃取<sup>[38]</sup>,上层为水相,下层为有机相,上下两通道的交叉区域成菱形,通道间夹角为30°。通过计算,认为通道内流体的雷诺数为0—1.96,只要压差小于600Pa,可实现两相界面的稳定;当有机相(硝基苯)和水相流速分别为3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 时,该系统可实现界面稳定的逆向交叉流萃取。近来该小组还分别报道了两种逆向平行流萃取,分别采用上下平行流逆流萃取<sup>[39]</sup>和左右平行流逆流萃取<sup>[40]</sup>的方式。通过测量两相溶液与通道壁的接触角、溶液间的表面张力、黏度等一系列物性参数,提出并验证了微通道逆流萃取的压力平衡模型。研究表明,在上下平行流逆流萃取中,尽管试样的接受相/供试相分配系数仅为1.54,优化条件下,最大萃取效率仍可达到98.6%,显示出该萃取方法极高的萃取效率。

Burns等<sup>[41]</sup>研究以间隔流方式实现两种不互溶液相间的萃取。在水相浸润的整个微通道环境中,有机相以间歇式间隔流方式向前移动。由于通道壁与栓状的间隔流之间产生剪切力,使溶液片段内部产生循环,显著促进了两相间传质并加快反应速率。实验表明间隔流的传质效率与同向平行流相当甚至更好。

Ismailov研究小组较早用独特的微通道结构和进样方式<sup>[42,43]</sup>,形成“水溶液/有机溶液/水溶液……”的多相间隔流,利用盐析作用,使水溶液的溶剂水在有机相液滴间渗透传质,实现蛋白质溶液的浓缩结晶。有机相在主通道内流动时,含不同溶质的水溶液从侧壁逐滴汇流进入微通道,形成悬浮于油相的水相液滴序列;其中一些水相液滴是不含无机盐的蛋白质(蛋白质加沉淀剂)低渗溶液,而与之相邻的另一些水相液滴是含高浓度无机盐的高渗溶液;由于水在有机相中的微量溶解性,低渗水相液滴中的溶剂水透过有机相,逐渐向高渗水相液滴渗透,使其中的蛋白质被浓缩结晶。近年来,该小组<sup>[44]</sup>深入研究微流控芯片间隔流蛋白质结晶的条件。在类似上述的间隔流小液滴内,分别将蛋白质晶体的成核和生长两阶段,控制在两种直径的微通道内分步进行。在微通道内,传质可由流速和时间等因素调控,有利于单晶的可控生成。研究者试验优化了数种蛋白质在十几秒的成核时间、数小时至数天的生长时间等实验条件,得到的蛋白质单晶用X射线衍射进行结构分析,晶体结构与常规方法测定的一致。

Wang 等<sup>[45]</sup>也在芯片微通道“有机溶液/水溶液/有机溶液”间隔流动的基础上,研究降低水相相对体积,实现水溶液以微液滴的形式悬浮于有机相中并同时完成萃取的方法。实验中,采用“有机离子液体/水溶液/有机离子液体”三相汇流方法,通过调控通道直径、流速等,优化有机离子液体包裹水滴的条件,并用荧光物质罗丹明6G实时检测水滴与离子液体间的萃取传质情况。该方法可提高相比和改善传质效率。

同样是间隔流传质萃取, Kralj 等<sup>[46]</sup>设计了一种复合式芯片,在微通道的上下基片间夹入 $0.5\mu\text{m}$ 孔径的亲脂性聚四氟乙烯膜,形成上下两层通道,上层通道进行“水溶液/有机溶液/水溶液……”的间隔流萃取,而下层通道只流过有机溶剂;利用聚四氟乙烯膜的微孔对有机相的毛细管作用,使上层的间隔流中的有机相逐渐渗透进入下层有机溶剂中,实现间隔流传质萃取后的相分离。

虽然上述一系列不互溶液相间的传质萃取具有传质快、达到萃取平衡时间短和操作简单等优点,但上述研究中的水相和有机相一般处于同时流动或停流的状态,两相的相比小于 5,因此富集倍率一般很难大于 10。若能使接受相(如有机相)停流,而保持供试相持续流动,就可极大地提高相比,提高富集倍率,实现高速传质和高效富集的萃取目标。

陈宏等<sup>[47,48]</sup>研究了两种停流萃取的微流控芯片萃取体系,即捕陷液滴停流萃取<sup>[47]</sup>和有机相界面保持在 Y 型通道汇流处的停流萃取<sup>[48]</sup>。前者<sup>[47]</sup>在玻璃芯片的微通道的一侧,通过微加工制成收口式的类矩形微结构,先将有机接受溶剂捕陷停流在其中,再使水相供试溶液持续流过通道,萃取物逐渐进入有机相;另一方面,随着萃取的进行,捕陷在微结构内的有机溶剂体积会因缓慢溶解于水而逐渐减少。这种减少现象类似于溶剂的蒸发,可使萃取液的浓度快速增大。因此,高相比萃取和“类似溶剂蒸发”的双重效应,使该方法具有极高的浓度富集倍率;用激光诱导荧光检测器检测,萃取 8min 后富集倍率达 500 倍,11min 后达 1 000 倍。后者<sup>[48]</sup>在加工 Y 型汇流芯片时,在有机相进样通道与汇流后的主通道交界处形成收口,并对有机相进样通道表面进行硅烷化处理。萃取时,水相持续流过主通道,调节有机相压力,控制两相界面保持在有机相进样通道与主通道交界的汇流收口位置,萃取物逐渐进入有机相;同时,随着萃取的进行,相界面的有机溶剂因缓慢溶解于水而流失,而后面的有机溶剂则不断补充;当有机

相的流失速率稍大于萃取物在有机相内部的扩散速率时,萃取物试样带能始终保持在有机相界面附近而不扩散,甚至出现类似的溶剂“蒸发效应”的聚集作用,有利于进行原位光度检测。沈宏等<sup>[49]</sup>在此基础上,改进单捕陷液滴的停流萃取芯片<sup>[47]</sup>的结构,将微通道两侧的类矩形微结构增至 170 余个,增加捕陷有机溶剂体积。这样,在不影响萃取速率的情况下,明显增大了试样的萃取富集总量,使萃取后的检测方法从浓度型检测(荧光检测)扩展到质量型检测(化学发光检测)。试样在被萃取富集后,加入试剂发生化学发光反应,该系统无需复杂的激光诱导荧光检测器和光学器件,仅用光电倍增管检测,便可获得与单捕陷液滴芯片<sup>[47]</sup>相同的检测灵敏度。

### 3 基于液相传质的微流控分析芯片装置和功能的集成化

微流控芯片不仅在实验装置、通道结构和试样试剂消耗量等方面有优势,而且将各种分析单元,如分离器、反应室、检测器等集中到同一芯片上,实现分析系统从装置到功能的集成化,这也是微流控分析芯片研究的方向。微流控液相传质的集成化研究主要包括两方面:(1)利用液相传质进行通道内部的深加工,形成独特的微结构单元,扩展芯片的功能;(2)应用集成的微通道结构(如二维、三维的通道网络和分子组装微通道等),开展液相间多重组合传质分离、离子通道传质和纳米通道大分子可控传质等多种应用研究。

Kenis 等<sup>[50,51]</sup>利用层流间扩散传质,进行芯片内微加工反应,其中典型的是将一组三电极集成在微通道内。实验所用的芯片由一片具有矩形沟道结构的聚二甲硅氧烷(PDMS)基片与另一片玻璃基片封合而成,微通道玻璃壁的中部特定区域附着有带状金片。首先利用层流将通道中部的金片腐蚀,使之成为处于通道两侧的两个金电极(分别作为工作电极和对电极);然后将银离子溶液和还原剂溶液引入通道,使两相界面汇聚在通道中线,利用两相间的传质发生还原反应,得到一条附着在通道中线的银丝;再引入盐酸溶液使银丝表面转化为 AgCl,制成 Ag-AgCl 参比电极。整个制作过程充分利用微通道内多流体层流的特性,有针对性地在特定区域进行多相间的传质微反应。

Hisamoto 等<sup>[52]</sup>在玻璃芯片微通道内,利用两相层流传质实现相界面的缩聚反应,形成分子组装憎水性的聚酰胺膜,并用该膜开展气体小分子选择性

渗透研究,还进一步在膜上固定辣根过氧化物酶,开展基于透膜传质的酶法分析。实验者在微通道内壁进行硅烷化处理后,以己二酰氯/二氯乙烷溶液为有机相,以己二胺/氢氧化钠水溶液为水相,将两相以平行流方式引入微通道,在相界面发生缩聚反应形成聚酰胺分子组装膜,随后开展芯片内氨和过氧化氢气体分子透膜的研究,结合特定的酸碱显色或酶反应显色等方法加以检测。实验结果表明气体分子对该缩聚膜的渗透性良好。

Schmidt 研究组<sup>[53,54]</sup>开展 PDMS 芯片内分子组装纳米通道液相传质的研究。首先向微芯片通道内引入“水相/有机相/水相”的间隔流,其中有机相(约 20nl)中含有一定浓度的磷脂分子。由于 PDMS 材料对有机溶剂具有高渗透性,因此可在数分钟内逐渐将有机溶剂抽提出微通道。在有机溶剂抽提过程中,磷脂分子在两相界面的浓度逐步增大,并趋向定向排列,最终形成类似细胞膜的平面类脂双分子薄膜。该薄膜成为微通道内沿径向分隔两侧水相的隔离膜,有效地避免了膜两侧互溶水相的自由传质。在此基础上,研究者进一步在该类脂膜中嵌入具有选择性开合和运输功能的通道蛋白,构建了膜上纳米离子通道,开展可控离子传质的研究。据称应用该类脂膜上的纳米通道,无需膜片钳和细胞培养等昂贵费时的工具和操作,有望在药物传输和链状生物大分子(如核酸测序、蛋白质折叠解析等<sup>[55]</sup>)研究中发挥作用。另外,为提高类脂膜的稳定性,Schmidt 研究组还开展了平面双分子类脂膜的水凝胶封合保护研究<sup>[54,56]</sup>。经水凝胶封合保护后,类脂膜纳米通道实现稳定传质时间可提高 100 倍以上。

Schilling 等<sup>[57]</sup>将 H Filter 和 T Sensor 组合在一起,构成包括细胞消解、杂质分离、胞内成分 半乳糖酶测定等一系列功能的集成化液相传质微流控芯片。首先大肠杆菌细胞和溶胞试剂引入 H 型通道并平行流动,溶胞试剂通过扩散使细胞在线消解;一些大分子干扰成分被分离除去后,收集含 半乳糖酶等成分的溶液进入相邻 T 型汇流通道,与检测试剂(异噻唑 -D-半乳糖苷)平行流动,发生酶反应,产生荧光基团(异噻唑)并被检测。结果表明,虽然待测的 半乳糖酶分子量较大,但仍可通过调节两相流速,与完整细胞等更大粒子或 DNA 等更大分子的分离并反应检测,整个实验溶胞分离及反应检测分别用时 190s 和 250s。

$\text{Co}^{2+}$  的常规湿法分析需要经历 40 个步骤,其中仅分离干扰离子时就需要经过酸洗、水洗、碱洗等反复

多次操作,整个分析过程操作繁琐,时间冗长。Tokeshi 等<sup>[58]</sup>在微流控芯片上集成 8 个微操作单元,采用连续流动化操作程序,将  $\text{Co}^{2+}$  湿法分析的完整过程集成到一个微芯片上完成,包括试剂引入、混合、反应、溶剂萃取和分相等多个步骤。整个芯片的微通道由两个不同的操作区域构成:萃取区,完成配位反应和配合物萃取;洗涤区,完成分解干扰离子配合物和分离干扰离子。首先,试样水溶液、配位剂水溶液、萃取剂有机相溶液同时引入萃取区微通道中,汇流后平行流动,其间试样中的待测离子和干扰离子与配位剂反应并被萃取,随有机相进入洗涤区;在洗涤区中,该有机相被盐酸溶液、氢氧化钠溶液夹流,由于干扰离子配合物在盐酸作用下可分解,于是被反萃取回酸、碱水溶液中,实现流动中干扰物质的快速分离和清洗。结果表明,配位反应和萃取时间仅 30s,且分解和洗涤干扰物的时间不到 1s,远远快于常规分析。

Kikutani 等<sup>[59]</sup>用 3 片玻璃基片经湿法刻蚀、热键合方法,制备高集成度的双层、三维微通道网络芯片。采用注射泵液压驱动调节流速的方法,在三维微通道内实现包括多重均相、非均相层流传质等反应、萃取、分离等操作,完成两种试样离子  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  与两种配合试剂的芯片反应、分离、检测的平行分析。实验中,引入微通道的  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  试样混合溶液分成两路,分别与两种配合试剂二苯基二氮菲(DPP)、亚硝基氨基苯酚衍生物(nitroso-PSAP)溶液汇流、反应,形成两组混合配合物溶液,第 1 组:Fe-DPP 和 Co-DPP,第 2 组:Fe-(nitroso-PSAP) 和 Co-(nitroso-PSAP)。第 1 组混合溶液与异戊醇汇流,Fe-DPP 被萃取,Co-DPP 不被萃取而留在水相;第 2 组混合溶液与盐酸清洗溶液汇流,Fe-(nitroso-PSAP) 被分解,Co-(nitroso-PSAP) 不被分解。最终分别检测第 1 组中的 Fe-DPP 和第 2 组中的 Co-(nitroso-PSAP)。实验中,试样与试剂的反应、萃取、分离等各步处理时间均可在数秒内高速完成。

#### 4 微流控芯片分析中液相传质的研究难点和发展趋势

微流控分析中的液相传质有其自身的优势,如微通道的层流效应使微流控芯片内流体流动的时间空间易于操控,高比表面积有利于加速流体间传质和分析中的低试样试剂消耗等。但伴随着上述优势,微流控液相传质的研究也有其困难和问题。

微流控分析中的液相传质,无论是互溶液相间

还是不互溶液相间传质,最常见且最易实现的当属同向平行流扩散传质。但该传质方式供试相与接受相总是同时流动或停流,两相相比小于 5,因此分离后接受相的试样浓度较低,检测较困难。

间隔流传质的萃取效率虽高,但萃取后两相分离并不容易,通常需要借助分相装置,如在微通道中夹入聚四氟乙烯分相膜等;而这种在两片硬质基片中夹入软性膜的芯片,难以实现永久封合。因此,保证夹入分相膜的芯片在有机溶液和水溶液的长时间交替浸润后不泄漏,是间隔流传质萃取的难点。

无论是捕陷液滴停流萃取还是 Y 型通道芯片的汇流处停流萃取,停流传质萃取的主要难点是萃取后检测。若原位检测,如常用的激光诱导荧光检测或激光热透镜检测等,会受荧光条件或检测器通用性的限制;若萃取后洗脱检测,则会出现洗脱溶剂对萃取溶液的稀释问题。

另外,宏观尺度下常被忽略的粘性力(如表面张力),在微通道微米尺度环境中已代替体积力(如重力),成为影响内部流体运动行为的主要作用力,因此一些宏观尺度的流体力学理论在微尺度下适用性不强。如在生产实践和科研实验中,逆流萃取是十分常见的萃取形式,这主要由于宏观流体处于以重力场为主的环境中,易通过密度的差异实现两相的分离;而微尺度通道内逆流萃取较难实现,两相的密度差异不足以实现分层,此时更需要通过黏度差异、液相与其接触的通道壁亲和性的差异等表面性质实现分相。

由此,进一步开展微流控分析中的液相传质研究,实现微全分析的目标可包括以下几方面。

(1) 微尺度流体力学理论的研究。如液相流体分类和运动方程适用性,液固、液液界面的剪切力、表面张力对液体流动和多相稳定保持的影响等。

(2) 微加工新技术的研究。如将玻璃与聚四氟乙烯封合制成复合芯片,从根本上改善两相溶液的流动稳定性,使逆流萃取或高相比同向流萃取更易于实现;又如将分相膜夹入芯片并永久封合或直接在通道内原位合成分相膜,将有助于突破间隔流萃取的分相瓶颈。

(3) 微流控传质分离富集后的检测技术研究。微流控液相传质分析中,试样量体积小(纳升至皮升甚至更少),有时甚至不仅试样量小,分离所得溶液的浓度也不高(同向流液相传质尤甚),因此定量检测较困难。需要开展对现有检测技术(包括原位、在线或脱线检测)的微型化、通用性、接口技术等方面

的研究。

(4) 微流控液相传质分析的功能化研究。把握微流控液相传质的特点,研究具有独特功能的芯片传质分析系统,应用于生物医学、药物合成筛选、环境监测、卫生检疫、司法鉴定和生物战剂的侦检等领域。

总之,微流控液相传质因其独特的优势,成为微流控分析的重要组成部分之一。可以相信,随着研究的深入,该分析方法将展现其更广阔的应用前景。

### 参 考 文 献

- [1] 方肇伦 (Fang Z L). 微流控分析芯片 (Microfluidic Analytical Chips). 北京: 科学出版社 (Beijing: Science Press), 2003
- [2] 方肇伦 (Fang Z L). 微流控分析芯片的制作及应用 (Fabrication and Application of Microfluidic Analytical Chips). 北京: 化学工业出版社 (Beijing: Chemical Industry Press), 2005
- [3] Takayama S, McDonald J C, Ostuni E, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96: 5545—5548
- [4] Brody J P, Yager P. Sens. Actuators A, 1997, 58: 13—18
- [5] Weigl B H, Yager P. Sens. Actuators B, 1997, 38/39: 452—457
- [6] Weigl B H, Yager P. Science, 1999, 283: 346—347
- [7] Jandik P, Weigl B H, Kessler N, et al. J. Chromatogr. A, 2002, 945: 33—40
- [8] Kamholz A E, Weigl B H, Finlayson B A, et al. Anal. Chem., 1999, 71: 5340—5347
- [9] Weigl B H, Kriebel J, Mayes K J, et al. Microchim. Acta., 1999, 131: 75—83
- [10] Hatch A, Kamholz A E, Hawkins K R, et al. Nat. Biotech., 2001, 19: 461—465
- [11] Cho B S, Schuster T G, Zhu X, et al. Anal. Chem., 2003, 75: 1671—1675
- [12] Bowden S A, Monaghan P B, Wilson R, et al. Lab Chip, 2006, 6: 740—743
- [13] 沈宏 (Shen H), 叶美英 (Ye M Y), 方群 (Fang Q) 等. 分析化学 (Chinese J. Anal. Chem.), 2005, 33 (11): 1659—1662
- [14] Huh Y S, Yang K, Hong Y K, et al. Proc. Biochem. 2007, 42: 649—654
- [15] Jeon N L, Dertinger S K W, Chiu D T, et al. Langmuir, 2000, 16: 8311—8316
- [16] Pihl J, Sinclair J, Sahlin E, et al. Anal. Chem., 2005, 77: 3897—3903
- [17] Mao H, Cremer P S, Manson M D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100: 5449—5454
- [18] Koyama S, Amarie D, Soini H A, et al. Anal. Chem., 2006, 78: 3354—3359
- [19] Jeon N L, Baskaran H, Dertinger S K, et al. Nat. Biotech., 2002, 20: 826—830
- [20] Dertinger S K W, Jiang X, Li Z, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 12542—12547
- [21] Walker G M, Monteiro-Riviere N, Rouseab J, et al. Lab Chip, 2007, 7: 226—232



- [22] Shinohara K, Fukui T, Abe H, et al. *Langmuir*, 2006, 22: 6477—6480
- [23] Heeren A, Luo C P, Roth G, et al. *Microelec. Eng.*, 2006, 83: 1669—1672
- [24] Tokeshi M, Minagawa T, Kitamori T. *J. Chromatogr. A*, 2000, 894: 19—23
- [25] Tokeshi M, Minagawa T, Kitamori T. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 1711—1714
- [26] Kim H B, Ueno K, Chiba M, et al. *Anal. Sci.*, 2000, 16: 871—876
- [27] Sato K, Tokeshi M, Sawada T, et al. *Anal. Sci.*, 2000, 16: 455—456
- [28] Hisamoto H, Horiuchi T, Tokeshi M, et al. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 1382—1386
- [29] Hisamoto H, Horiuchi T, Uchiyama K, et al. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 5551—5556
- [30] Xiao H, Liang D, Liu G C, et al. *Lab Chip*, 2006, 6: 1067—1072
- [31] Minagawa T, Tokeshi M, Kitamori T. *Lab Chip*, 2001, 1: 72—75
- [32] Yamada M, Kasim V, Nakashima M, et al. *Biotech. Bioeng.*, 2004, 88: 489—494
- [33] Hibara A, Tokeshi M, Uchiyama K, et al. *Anal. Sci.*, 2001, 17: 89—93
- [34] Surmeian M, Slyadnev M N, Hisamoto H, et al. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 2014—2020
- [35] Maruyama T, Mastushita H, Uchida J, et al. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 4495—4500
- [36] Kuban P, Berg J, Dasgupta P K. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 3549—3556
- [37] Mata C, Longmire E K, McKenna D H, et al. *Microfluid. Nanofluid.*, 2008, 5: 529—540
- [38] Hibara A, Nonake M, Hisamoto H, et al. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 1724—1728
- [39] Aota A, Nonake M, Hibara A, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 119: 896—898
- [40] Aota A, Hibara A, Kitamori T. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 3919—3924
- [41] Burns J R, Ramshaw C. *Lab Chip*, 2001, 1: 10—15
- [42] Zheng B, Tice J D, Roach L S, Ismagilov R S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 2508—2511
- [43] Zheng B, Tice J D, Ismagilov R S. *Adv. Mater.*, 2004, 16: 1365—1368
- [44] Gerdts C J, Tereshko V, Yadav M K, Ismagilov R S, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45: 8156—8160.
- [45] Wang W H, Zhang Z L, Xie Y N, et al. *Langmuir*, 2007, 23: 11924—11931
- [46] Kralj J G, Sahoo H R, Jensen K F. *Lab Chip*, 2007, 7: 256—263
- [47] Chen H, Fang Q, Yin X F, et al. *Lab Chip*, 2005, 5: 719—725
- [48] Fang Q, Chen H, Fang Z L. 9th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (eds. Jensen C F, Han J, Harrison D J, Voldman J.). Boston: Academic Publisher, 2005. 128—131
- [49] Shen H, Fang Q, Fang Z L. *Lab Chip*, 2006, 6: 1387—1389
- [50] Kenis P J A, Ismagilov R F, Whitesides G M. *Science*, 1999, 285: 83—85
- [51] Kenis P J A, Ismagilov R F, Takayama S, et al. *Acc. Chem. Res.*, 2000, 33: 841—847
- [52] Hisamoto H, Shimizu Y, Uchiyama K, et al. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 350—354
- [53] Malmstadt N, Nash M A, Purnell R F, Schmidt J J. *Nano Lett.*, 2006, 6: 1961—1965
- [54] Malmstadt N, Jeon T J, Nash M A, Schmidt J J. *Adv. Sci. Tech.*, 2006, 53: 22—31
- [55] Gershow M, Golovchenko J A. *Nature Nanotech.*, 2007, 2: 775—779
- [56] Jeon T J, Malmstadt N, Schmidt J J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128: 42—43
- [57] Schilling E A, Kamholz A E, Yager P. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 1798—1804
- [58] Tokeshi M, Minagawa T, Uchiyama K, et al. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 1565—1571
- [59] Kikutani Y, Hisamoto H, Tokeshi M, et al. *Lab Chip*, 2004, 4: 328—332