

一种直接测定微流控芯片电渗流速度的新方法

孙 悦, 沈志滨, 曾常青

(广东药学院中药学院, 广东 广州 510006)

摘要 随着微芯片技术的成熟,越来越迫切地需要有一个准确而简洁的电渗流速度的检测方法。根据荧光物质罗丹明 123 (Rh123) 在不同 pH 缓冲溶液中迁移时间的变化,推导出 Rh123 在 pH 9 和 10 条件下分别有中性分子存在,而中性分子的移动速度等于电渗流速度,因此建立了直接以 Rh123 中性分子为标记物测定电渗流速度的方法。通过直接检测 Rh123 中性分子的迁移时间,计算得出所用玻璃微流控芯片在 pH 9.3 和 pH 10.1 的电渗流速度为 $3.9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/(\text{s} \cdot \text{V})$ 和 $4.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/(\text{s} \cdot \text{V})$,与经典方法对照无明显差异。

关键词 电渗流;微流控芯片;罗丹明 123

中图分类号 O658 **文献标识码** A **文章编号** 1000-8713(2007)05-0690-04 **栏目类别** 研究论文

A Novel Method for the Direct Measurement of Electroosmotic Flow Velocity on Microfluidic Chips

SUN Yue, SHEN Zhibin, ZENG Changqing

(College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract : As microfluidic technologies mature, accurate methods for the measurement of electroosmotic flow velocity on microfluidic chips are becoming increasingly important. A change of migration time of Rhodamine 123 (Rh123) at different pH values of the buffer was observed during the electrophoresis, and it was deduced that there is uncharged molecular form of Rh123 in alkaline solution because of deprotonation. Therefore, a method of direct measurement of electroosmotic flow velocity on microfluidic chip was developed based on the detection of migration time of the uncharged Rh123, because the migration speed of uncharged molecule is equal to the electroosmotic flow velocity. The electroosmotic flow velocity of glass microchip at pH 9.3 and 10.1 of the buffer was detected to be $3.9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/(\text{s} \cdot \text{V})$ and $4.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/(\text{s} \cdot \text{V})$, respectively, which were in agreement with those obtained by the traditional method.

Key words : electroosmotic flow ; microfluidic chip ; Rhodamine 123

微流控分析是当前十分活跃的领域,而芯片毛细管电泳是当前在微流控分析领域中应用最多的分析技术^[1]。由于芯片电泳分离通道短、散热快、可施加的分离场强高,使分离速度和分离效率大大提高。因为外加电场而产生的电渗流成为芯片电泳中越来越普遍的分动力,因此迫切需要一个准确而简洁的电渗流速度的检测方法。传统的检测方法只能检测速度慢的电渗流,因此不适应微流控芯片中微通道中速度快的电渗流的测定^[2]。

目前,测定电渗流速度的方法主要有 3 种。一种方法是电流测定法^[2-5]:先在毛细管中充满一种溶液,然后在电渗流的作用下用另一种有相同电解质但不同浓度的溶液替换原溶液,通过记录在此期间电流的变化所需要的时间,然后计算出电渗流的平均速度。该方法简单,但需要置换溶液,且时间和

空间分辨率差,两种不同的溶液间易发生扩散或混合。另一种方法是中性微粒镜像计速法^[6,7]:用微小的示踪粒子的运动情况来推断液流速度。该方法直观,但要考虑到布朗运动的影响、粒子间的亲和力以及粒子和通道壁的作用力。再一种方法是染料法^[2,8-10]将隔离染料^[2,8,9]加入到电泳缓冲溶液中,电泳后,在通道中的一个特殊的位置,隔离染料被释放并且被激发光照射得到荧光,用荧光显微镜或 CCD (电感耦合型) 照相机直接观察通道中微量荧光染料运动轨迹来计算电渗流速度。或者是光漂白一段荧光染料^[10],观察染料在通道中的流型,通过染料塞的替换计算液流速度。该方法是从第二种方法衍生而来,方法直观,但是需要特殊的试剂,对仪器设备要求高,需要复杂的激光器和其他光学设备。

众所周知,电渗流的一个特点是可以使几乎所有的组分不管电荷大小,以同样的方向移动,其中中性分子的移动速度和电渗流速度相等^[11],因此只要有一种合适的中性分子,且该中性分子对电渗流的影响可以忽略,并有简便的检测方法,通过检测该中性分子的表现迁移率,即可得到电渗流速度。

实验中观察到,带正电荷的荧光染料罗丹明 123 (Rh123) 在碱性溶液中发生去质子化,成为中性分子。以此作为电渗流标记物,该中性分子的移动速度与文献方法所得电渗流速度相同。因此,以 Rh123 为标记物可直接得到碱性溶液中的电渗流速度。此方法简便可行,方法准确,结果处理简单,不需要复杂的仪器和特殊试剂,有较好的实用意义。

1 实验部分

1.1 仪器

参照文献[12]自制如图 1 所示的微流控玻璃芯片。其中,储液槽 2[#]-储液槽 3[#]为进样通道,储液槽 1[#]-储液槽 4[#]为分离通道。通道宽 48 μm,深 12 μm。通道两端钻有 1.2 mm 直径的小孔,用环氧树脂粘合直径 4 mm、高 6 mm 的微量移液管头作为储液槽。

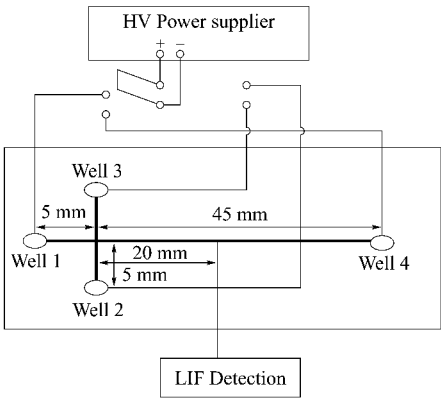


图 1 微流控芯片电渗流测定示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the channel design of the microfluidic chip (in mm)

自制四路高压直流电源和共聚焦激光诱导荧光 (LIF) 检测器 (激光器激发波长 488 nm, 荧光发射波长 520 nm)。

1.2 试剂

Rh123 标准溶液:取一定量的 Rh123 溶于 3 mL 乙腈中,配成浓度为 0.35 mmol/L 的储备液。

电泳缓冲溶液:分别配制 pH 为 7.3, 8.4, 9.3, 10.1 的 20 mmol/L 硼酸-硼砂-氢氧化钠缓冲液。

所用试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.3 方法测定

分别在图 1 的储液槽 1[#]、储液槽 3[#]和储液槽 4[#] 中加 100 μL 缓冲溶液,储液槽 2[#] 中加 100 μL Rh123 标准溶液,进样和分离时各储液槽所加电压如表 1 所示,进样 1 min 后将进样电压切换为分离电压。

表 1 溶液进样和分离时各储液槽所加的电压

Table 1 Applied injection and separation voltages V		
Reservoir	Injection voltage	Separation voltage
Well 2	400	700
Well 3	0	700
Well 1	400	1200
Well 4	400	0

2 结果与讨论

2.1 不同 pH 值下 Rh123 的电泳分析

图 2-a ~ d 为不同缓冲溶液 pH 条件下 Rh123 的电泳图。在芯片电泳分析中, $t = lL / V(\mu_{ep} + \mu_{e0})$, 其中 t 为迁移时间, l 为微通道有效长度, L 为微通道总长, V 为施加电压, μ_{ep} 为电泳迁移率, μ_{e0} 为电渗流迁移率。因为 μ_{e0} 随着 pH 增加而增大,如果是同一种物质, μ_{ep} 不变,则根据上式物质的迁移时间应随 pH 值升高而减小,但实际结果表明, Rh123 不仅不以一种形式存在,且其迁移时间随 pH 值升高而增大,所以推测 Rh123 在不同 pH 缓冲溶液中电荷和结构发生了改变,其变化如图 3 所示。

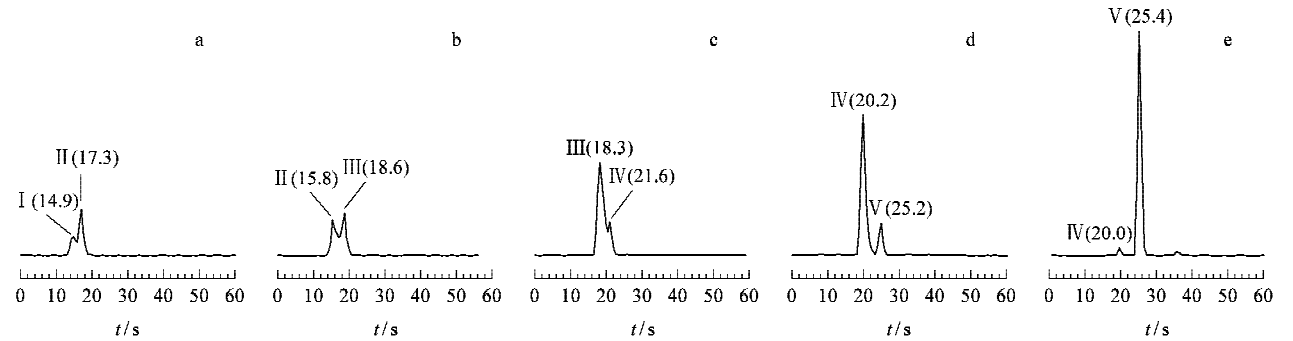


图 2 Rh123 在不同 pH 的 20 mmol/L 硼砂-NaOH 缓冲溶液下的电泳谱图

Fig. 2 Electropherograms of Rh123 at different pH values of 20 mmol/L sodium borate-NaOH buffer

Conditions: field strength, 240 V/cm; separation length, 2.0 cm.

a. pH 7.3; b. pH 8.4; c. pH 9.3; d. pH 10.1; e. pH 10.1 and heating 10 min at 100 °C. For I - V, see Fig. 3.

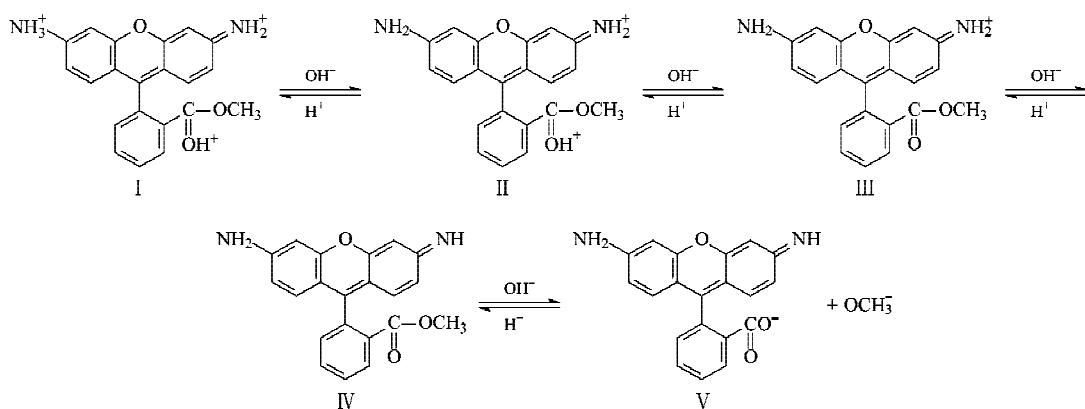


图 3 Rh123 随着溶液酸碱度的变化
Fig. 3 The acid-base equilibria in Rh123 solution

随着溶液 pH 值的升高, Rh123 的去质子化程度逐渐增强, 存在如图 3 所示的多种酸碱组分 I、II、III 和 IV, 这些组分的浓度随溶液的 pH 改变而变化, 且它们所带的正电荷数依次递减, 因此电泳图中迁移时间随 pH 值升高而增加。在 pH 值为 7.3 时, Rh123 的主要形式可能是 I 和 II; pH 值是 8.3 时, 主要形式是 II 和 III; pH 值为 9.3 时, 主要形式是 III 和 IV; pH 值为 10.1 时, 主要形式是 IV 和它的水解产物 V。将 Rh123 标准溶液用 NaOH 调节 pH 到 10.1 并于 100 °C 水浴中加热 10 min 后, 得到的电泳图示于图 2-e。与图 2-d 相比较, 可见水解产物 V 的峰显著增大, 组分 IV 的峰明显缩小。因此可推测在 pH 值为 9.3 和 10.1 的缓冲溶液中有 Rh123 的中性分子存在。

Rh123 溶液中直接加入 0.1 mol/L 的氢氧化钠, 在 pH 11.0 的缓冲溶液中进行电泳测定, 结果没有峰出现。因此怀疑 Rh123 分子在强碱性溶液条件下发生了分解而在 488 nm 激发光下检测不到。

一个离子在电场下的移动速度 $v = \mu_{ep} E$, 其中 μ_{ep} 为电泳迁移率, E 为电场强度。电泳迁移率正比于分子受到的电场力, 反比于通过介质时的摩擦力, 即 $\mu_{ep} \propto F_E / F_F$, 其中 F_E 为电场力, $F_E = qE$; F_F 为摩擦力, $F_F = -fv = -6\pi\eta Rv$, 式中 f 为摩擦系数, q 为离子电荷数, η 为介质粘度, R 为离子半径。在稳定的电泳状态下, 电场力和摩擦力相等, 方向相反, 即 $qE = 6\pi\eta Rv$, 则 $v = qE / (6\pi\eta R)$, 代入 $v = \mu_{ep} E$, 得 $\mu_{ep} = q / (6\pi\eta R)^{[11]}$ 。因此, 对于中性分子来说: $\mu_{ep} = 0$ 。因此对于中性分子, 迁移时间 $t = lL / V(\mu_{ep} + \mu_{e0}) = lL / (V\mu_{e0})$ 。因此根据中性分子的迁移时间即可求得电渗流速度 μ_{e0} 。

既然在 pH 值为 9.3 和 10.1 的缓冲溶液中有中性分子的 Rh123 存在, 因此可以通过测定 Rh123 中性分子的迁移时间来测定芯片电渗流的速度。

在 pH 值为 9.3 和 10.1 的缓冲溶液中测定 Rh123 的迁移时间 t 3 次, 分别得到其中性分子的保留时间为: pH 9.3 时, t 为 21.6 s, 21.3 s, 21.7 s; pH 10.1 时, t 为 20.2 s, 20.0 s, 20.3 s。分别取迁移时间的平均值, 则由此中性分子的迁移时间计算 pH 值为 9.3 和 10.1 时的电渗流速度为: $\mu_{e0(pH 9.3)} = lL / Vt = (2 \times 5) / (1200 \times 21.5) = 3.9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 / (\text{s} \cdot \text{V})$; $\mu_{e0(pH 10.1)} = lL / Vt = (2 \times 5) / (1200 \times 20.2) = 4.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 / (\text{s} \cdot \text{V})$ 。

实验中观察到: 将 Rh123 标准溶液稀释于 pH 10.1 的缓冲溶液中, 随着放置时间的延长, 图 2-d 中两组分峰面积的相对大小会发生变化, 后面峰的面积越来越大, 前面峰的面积越来越小。这是由于 Rh123 在碱性条件下缓慢水解所导致。因此用 Rh123 作电渗流标记物, 其储备液应保存在无水的有机溶剂中。

2.2 文献方法测定电渗流速度

参照文献[13]的方法测定电渗流速度, 即在芯片的储液槽及通道里充满 20 mmol/L 硼砂缓冲溶液, 如图 1 在 4 个储液槽中放入电极, 然后将储液槽 2# 中的缓冲溶液换为 1 mg/L 荧光素钠-20 mmol/L 硼砂缓冲溶液, 如“2.3”节施加电压, 进样 1 min 后撤去电压, 同时在 1#, 4# 储液槽之间施加分离电压, 由激光荧光检测系统检测。记录荧光素钠的迁移时间并由此计算出荧光素钠的有效迁移率 μ_{ef} , 实验测得荧光素钠在缓冲液的 pH 值为 9.3 和 pH 10.1 时的有效迁移率分别为 $(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ cm}^2 / (\text{s} \cdot \text{V})$ 和 $(1.4 \pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ cm}^2 / (\text{s} \cdot \text{V})$, 则电渗流速度 μ_{e0} 可以通过公式计算得到, 即 $\mu_{e0} = \mu_{ef} + \mu_{ep}$, 式中 μ_{ep} 为荧光素的电泳迁移速度。将荧光素的电泳迁移率 $\mu_{ep} = 2.8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 / (\text{s} \cdot \text{V})^{[7]}$ 代入, 由此计算出芯片在 pH 9.3 和 pH 10.1 缓冲液中的电渗流速度为 $(3.9 \pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ cm}^2 / (\text{s} \cdot \text{V})$ 和 $(4.2 \pm$

$0.2) \times 10^{-4} \text{ cm}^2/(\text{s} \cdot \text{V})$,与“2.1”节中所得值相吻合。

3 结论

本文建立了以罗丹明123的中性荧光分子为标记物测定电渗流速度的方法。方法简便可行,与经典方法对照无明显差异。

参考文献:

- [1] Wang E K, Chen Y. Life Analytical Chemistry. Beijing: Science Press (汪尔康, 陈义. 生命分析化学. 北京: 科学出版社), 2006: 68
- [2] Sinton D, Escobedo-Canseco C, Ren L Q, Li D Q. J Colloid Interface Sci, 2002, 254: 184
- [3] Huang X, Gordon M J, Zare R N. Anal Chem, 1988, 60: 1837
- [4] Arulanandam S, Li D Q. J Colloid Interface Sci, 2000, 225: 421

- [5] Ren L Q, Escobedo-Canseco C, Li D Q. J Colloid Interface Sci, 2002, 250: 238
- [6] Kim M J, Kihm K D. Journal of Visualization, 2004, 7: 111
- [7] Hsieh S S, Lin H C, Lin C Y. Colloid Polym Sci, 2006, 284: 1275
- [8] Sinton D, Li D Q. Colloid Surface A, 2003, 222: 273
- [9] Sinton D A, Li D Q. Int J Therm Sci, 2003, 42: 847
- [10] Sinton D, Erickson D, Li D. Experiments in Fluids, 2003, 35: 178
- [11] Fu X Y, Lü J D. Capillary Electrophoresis. Hangzhou: Zhejiang University Press (傅小芸, 吕建德. 毛细管电泳. 杭州: 浙江大学出版社), 1997: 10, 13, 18
- [12] Yin X F, Shen H, Fang Z L. Chinese Journal of Analytical Chemistry (殷学锋, 沈宏, 方肇伦. 分析化学), 2003, 31(1): 116
- [13] Ye M Y, Fang Q, Yin X F. Chinese Journal of Analytical Chemistry (叶美英, 方群, 殷学锋. 分析化学), 2004, 32(12): 1585

欢迎订阅《高等学校化学学报》

《高等学校化学学报》是中华人民共和国教育部委托吉林大学和南开大学主办的化学学科综合性学术刊物,以研究论文、研究快报和综合评述等栏目集中报道我国高等院校和中国科学院各研究所在化学学科及其相关的交叉学科、新兴学科、边缘学科等领域所开展的基础研究、应用研究和重大开发研究所取得的最新成果。

本刊由中华人民共和国教育部从全国重点高等院校和中国科学院聘请81位学术造诣精湛的化学家组成学术阵容强大的编委会,由国内外著名理论化学家唐敖庆教授任名誉主编,著名高分子化学家周其凤院士任主编。

本刊以“新(选题新、发表成果创新性强)、快(编辑出版速度快)、高(刊文学术水平和编辑出版质量高)”为办刊特色,载文学科覆盖面广,信息量大,学术水平高,刊载国家自然科学基金、攀登计划、“八六三”和“九七三”计划资助项目及其他科学基金资助项目成果文章达90%以上。从1995年起被美国科技信息研究所(ISI)数据库和SCIE、RA、CCI、CC/PC & ES和RCI等出版物收录;从1999年起被该所主办的世界著名的检索刊物《科学引文索引》(SCI)核心选刊收录。据ISI期刊引证报告(JCR)公布的文献计量学数据,本刊的总被引频次2001年为1959,2002年为2189,2003年为2391,2004年为2681,2005年为2808,2006年为2803;影响因子2001年为0.904,2002年为0.830,2003年为0.796,2004年为0.764,2005年为0.771,2006年为0.724。本刊刊文长期被《中国化学化工文摘》、《中国科学引文数据库》、美国《化学文摘》(CA)、美国《EI, PageOne》和俄罗斯《文摘杂志》(P. Ж.)等20多种国内外著名检索刊物和文献数据库摘引和收录,在C.A.“千种表”中连续多年居中国入选科技期刊之榜首。在《中文核心期刊要目总览》化学类核心期刊中居第一位。在中国科技期刊引证报告(CJCR)公布的中国科技期刊总被引频次和影响因子排序表中连续多年居前列,2005年总被引频次和影响因子分别达到4061和0.787。

本刊连续多次荣获全国、国家教育部和吉林省的优秀科技期刊奖和十佳期刊称号,2000年荣获首届国家期刊奖,2001年入选中国期刊方阵并居双高(高知名度、高学术水平)科技期刊第三位,2002年荣获第二届国家期刊奖,2004年荣获第三届国家期刊奖,2002~2006年连续五届入选中国百种杰出学术期刊,2006年荣获首届中国高校精品科技期刊。

《高等学校化学学报》为月刊,16开本(A4),每期13印张(208页),采用微机排版,胶版印刷,装帧质量高。国内定价30元,全年360元。公开发行人,国际刊号ISSN 0251-0790,国内刊号CN 22-1131/O6。国内读者可通过当地邮局订阅,邮发代号12-40;国外读者可通过中国国际图书贸易总公司订阅,国外发行代号M305。补订者可与本刊编辑部联系。

竭诚欢迎广大科研工作者踊跃投稿和订阅。

编辑部联系方式:

电话 0431-88499216 传真 0431-88925344 E-mail: cjcu@jlu.edu.cn

网址 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn>

通讯地址: 长春市解放大路2519号吉林大学前卫校区北区《高等学校化学学报》编辑部 邮政编码: 130021