

聚合物微流控芯片消毒灭菌技术研究进展

刘竞技, 张亚军, 范一强*

北京化工大学, 北京 100029

刘竞技, 张亚军, 范一强. 聚合物微流控芯片消毒灭菌技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1902-1911

Liu Jingji, Zhang Yajun, Fan Yiqiang. Research progress on sterilization technology of polymer microfluidic chip[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1902-1911

摘要: 聚合物微流控芯片成本低、易加工, 目前在医药、生物检测和化学合成等领域得到了普遍应用。以热塑性聚合物聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA)和热固型聚合物聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)为基材的高分子聚合物材料因具有较好的生物相容性和光学透明性, 已逐渐成为聚合物微流控芯片加工的主导材料, 被广泛应用于生物医药类微流控芯片的制备。鉴于该类芯片应用场景的特殊性, 需在使用前进行消毒灭菌处理以避免微生物干扰。目前, 针对 PMMA 和 PDMS 的消毒灭菌方法包括高压蒸汽灭菌、紫外线灭菌、电子束、⁶⁰Co γ 射线辐射灭菌、超临界二氧化碳灭菌、乙醇消毒、环氧乙烷灭菌、过氧化氢低温等离子体灭菌、绿原酸消毒、清洗剂消毒。本文从基本原理、消毒灭菌方法、应用场景等方面, 回顾和总结了相关技术在 PMMA 和 PDMS 基体微流控芯片中的实现方法, 并在芯片材质、适用范围等方面分析了所适用的消毒灭菌方法, 为以聚合物为基材的生物医药类微流控芯片的消毒灭菌提供有益参考。

关键词: 聚合物微流控芯片; 消毒灭菌; 物理方法; 化学方法

Research progress on sterilization technology of polymer microfluidic chip

LIU Jingji, ZHANG Yajun, FAN Yiqiang*

Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

Abstract: Polymer microfluidic chips have a wide range of application in medicine, biological detection, chemical synthesis and other fields because of its low cost and easy fabrication. Polymer materials based on thermoplastic polymer polymethylmethacrylate (PMMA) and thermosetting polymer polydimethylsiloxane (PDMS), with good biological compatibility and optical transparency, are commonly used as the base material for the preparation of microfluidic chips in biomedicine. However,

*Corresponding author: E-mail: fanyq@mail.buct.edu.cn

Received: 2021-07-17; Accepted: 2021-10-11; Published online: 2022-01-17

in view of the particular application scenarios, this kind of chips need to be sterilized prior to use to avoid microbial interference. The available sterilization methods for PMMA and PDMS based materials include autoclaving, ultraviolet, electron beam, ^{60}Co gamma radiation, supercritical carbon dioxide sterilization, ethanol, hydrogen peroxide, ethylene oxide, chlorogenic acid and detergent. This paper reviews and summarizes the related operation methods for the PMMA and PDMS based microfluidic chips from basic principle, sterilization methods, and application scenarios. Meanwhile, we analyze the applicable sterilization methods according to chip material and application, aiming to provide reference for the sterilization of microfluidic chips in biomedicine.

Keywords: polymer microfluidic chips; sterilization; physical method; chemical method

微流控芯片可将腔室、连接通道、泵、阀和传感器等集成在微尺度空间内^[1], 通过操控微量流体的流动行为实现化学、生物分析过程。由于该技术试剂消耗少、反应灵敏度高、占用空间小^[2], 目前已在生物医药等多个领域得到广泛的应用。

微流控芯片的制备环境并非严格的无菌环境, 而针对分子生物学、体外诊断等生物医学类应用的聚合物微流控芯片, 需要芯片在使用时无污染以确保实验结果的准确性。因此, 为避免芯片的污染及微生物干扰, 对芯片进行灭菌处理是开展后续实验前的必需步骤^[3]。

聚甲基丙烯酸甲酯(polymethylmethacrylate, PMMA)和聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)材料透光性好、加工方法简单, 在微流控领域普遍适用于各类应用微流控芯片的制备。图 1A 为注塑成型的 PMMA 微流控芯片, 包含可用于液滴生成、流体混合的功能单元, 该技术可实现微流控芯片的快速制备^[4]; 采用软光刻技术制备 PDMS 微流控芯片如图 1B 所示^[5], 该芯片可用于 2 种流体混合性能的研究, 具有良好的可视化效果。鉴于材料良好的光学性能、机械性能和生物兼容性, 以 2 种材料为基材的微流控芯片在生物检测、药物合成等领域也得到了广泛的应用, 如图 2 所示^[6-7]。

因此, 本文根据现有的 PMMA 和 PDMS 聚合物微流控芯片的杀菌方法, 从物理方法和化学方法 2 个方面进行归纳, 针对每种消毒灭菌方法从基本原理、操作步骤、应用场景和灭菌的

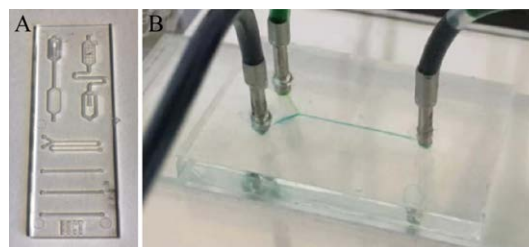


图 1 注塑成型 PMMA 微流控芯片^[4] (A)和用于流体混合的 PDMS 微流控芯片^[5] (B)

Figure 1 Injection molding PMMA-based microfluidic devices^[4] (A) and PDMS microfluidic chip for fluid mixing^[5] (B).

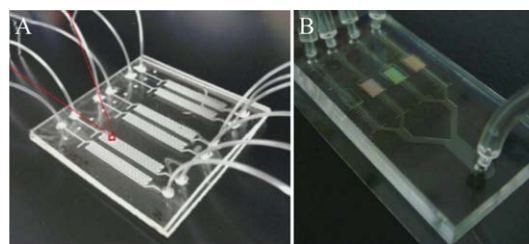


图 2 用于 mRNA 分离和扩增的 PMMA 微流控芯片^[6] (A)及一种可分离、富集细胞的 PDMS 微流控芯片^[7] (B)

Figure 2 Isolation and amplification of mRNA within a PMMA microfluidic lab on a chip^[6] (A) and PDMS device for cell separation and enrichment^[7] (B).

有效性等方面逐一进行讨论,并分析了每种方法的利弊,以期为科研人员的后续工作提供有价值的参考。

1 物理方法

物理灭菌方法或微生物的杀灭通常是采用温度、压力、辐射等物理方法破坏微生物的繁殖环境,使酶失活促进微生物死亡。该类灭菌方法操作过程相对简单且具有一定效果,已在生物细胞培养等方面得到了广泛应用。目前,已应用于 PMMA、PDMS 微流控芯片的物理灭菌方法包括高压蒸汽灭菌、紫外线灭菌、电子束、 ^{60}Co γ 射线辐射灭菌和超临界二氧化碳灭菌,本文分别就每种方法的灭菌机制、操作方法和设定参数等进行了描述,同时也对其优缺点和所适用的场合进行讨论。

1.1 高压蒸汽灭菌

19 世纪诞生了一台以 Chamberland 为名的高压蒸汽灭菌器实验室模型^[8],而后逐渐被广泛用于消毒和杀菌。高压蒸汽灭菌是饱和蒸汽在高压和高温的联合作用下,使蛋白质变性失活从而达到杀菌的目的。目前该技术已在生物芯片灭菌过程中得到了广泛应用^[9]。

高压蒸汽灭菌(*autoclaving*)过程通常在高压灭菌装置中进行,在装置内放置适量的水以排尽空气,密闭蒸锅,在设定灭菌温度和时间后,装置内温度升高,压力增大,当饱和蒸汽温度上升至 121 °C (以最难杀灭的芽孢而定)后,灭菌 15–30 min (取决于需要灭菌的物品尺寸和内容物)^[10]即可使微生物及其孢子或芽孢热致死。

PDMS 材质的微流控芯片具有良好的透气性,细胞培养类微流控芯片可通过 PDMS 基材直接向微腔中输送氧分子。有研究表明,采用高压蒸汽灭菌技术(1×10^5 Pa、15 min)对 PDMS

材质芯片进行灭菌,并未发现灭菌步骤对氧气的扩散产生不利影响^[11],使用效果良好。同样,采用 1×10^5 Pa、20 min 的灭菌方法对生物医学类 PDMS 芯片进行灭菌^[12],得到较好的实验结果。Leclerc 等^[13]采用该技术对用于肝细胞培养的三维 PDMS 微器件在键合后灭菌 20 min,培养结果良好。

PMMA 的玻璃化转变温度在 100 °C 左右^[14],低于高温灭菌技术所使用的温度,因此采用高压灭菌技术(1×10^5 Pa, 20 min)对芯片进行灭菌,会因温度过高而导致芯片表面和微通道产生扭曲变形^[15],从而导致该技术不适用于 PMMA 基材微流控的灭菌。

高压蒸汽灭菌技术操作过程简单、所需设备单一,而且灭菌时长短、灭菌效果好,应用范围相对广泛。然而该方法所需温度较高,对不耐高温聚合物材料不友好,该类材料可采用紫外线、环氧乙烷等灭菌方法。

1.2 紫外线灭菌

紫外线(*ultraviolet*)灭菌技术常被用于对生物实验室和医疗设施中使用的工具进行消毒^[16],该方法简单易操控、杀菌效率高,得到了诸多领域的青睐。紫外线灭菌技术通常采用波长为 200–280 nm 的短波长紫外线(*ultraviolet C radiation, UVC*)^[17],其主要原因是该波段紫外线易被生物体 DNA 吸收,位于该波段的 254 nm 波长紫外线与杀菌效果曲线的峰值(DNA 吸收紫外线的效果)具有很好的致一致性^[18],因此具有很好的灭菌效果。在紫外灭菌的照射下,微生物 DNA 碱基胸腺嘧啶变成胸腺嘧啶二聚体,从而不能进行基因代码读取而致其死亡^[19]。

对于应用于医学、生物领域所使用的 PDMS 微流控芯片的灭菌过程,可采取直接将微流控芯片暴露于紫外灯光下灭菌 2 h 的灭菌方法^[11],该方法同样也适用于 PMMA 基材的

芯片灭菌过程, 具有良好的灭菌效果^[15]。

紫外灭菌技术通常灭菌效果良好, 方法操作简单便捷、高效、无二次污染, 灭菌率高, 处理过的材料结果没有明显化学变化^[15]。然而 UVC 波段的紫外线波长最短, 穿透能力最弱, 对于键合后或多层 PMMA、PDMS 芯片, 受芯片厚度和 2 种材料本身对光的能量吸收程度的影响, 紫外线无法穿透至深层次微通道或反应腔室实现消杀。另外, 该波段波长最短、能量最高, 对人体的伤害程度最大, 如对人眼、皮肤等会有不同程度的损伤^[20], 因此使用该方法时候需做好防护。

1.3 电子束、⁶⁰Co γ 射线辐射灭菌

电子束(electron beam)、⁶⁰Co γ 射线(⁶⁰Co gamma radiation)灭菌技术导致微生物死亡的方式主要是使 DNA 降解或通过辐射与水相互作用形成自由基进而破坏细胞膜导致微生物死亡^[21-22], 通常是将材料暴露在 25 kGy ⁶⁰Co γ 射线下即可实现灭菌, 但根据材料属性的差异所采用的辐射剂量也会发生改变^[23]。目前, 该类灭菌技术在食品、医疗器械等领域有着广泛的应用。

相比于紫外辐射灭菌技术, 电子束、⁶⁰Co γ 射线的辐射灭菌辐射深度更深, 针对多层微流控芯片该方法可实现灭菌过程。研究人员^[24]采用 2 MeV、10 J/g 辐射剂量的电子束进行 6 层 PDMS 多层微流控芯片的键合, 并同时实现腔室的灭菌; 实验过程中, 所需辐射剂量应根据研究目的确定, 电子束能量为 1 MeV 和 2 MeV 的参数条件下针对密度为 0.97 g/cm³ 的 PDMS 可穿透深度分别为 3.6 mm 和 8.3 mm, 而 γ 射线的辐射剂量率为 2.5×10^{-3} J/(g·s) 时可穿透近似为 1 000 mm。

电子束、⁶⁰Co γ 射线灭菌技术灭菌效率高、无毒, 能很好地适用于多层键合的微流控

芯片的灭菌过程, 但辐射对人体伤害较大, 导致该类设备在使用时对安全措施要求很高。

1.4 超临界 CO₂ 灭菌

二氧化碳的临界点为 31.1 °C、7.4 MPa, 当温度和压强高于上述值时, 二氧化碳成为超临界体, 介于液体和气体之间, 如图 3 所示^[25]。该方法的灭菌过程是由于 CO₂ 溶解生成 CO₃²⁻, 释放 H⁺ 降低细胞外 pH, 导致 CO₂ 向膜内的渗透性增强并抑制关键酶活性, 由于渗透的 CO₂ 浓度过高导致无法自我调节到能够维持细胞内正常活动的 pH, 致使细胞活力受损^[26-27]。

超临界二氧化碳(supercritical carbon dioxide, SC-CO₂)灭菌技术对 PMMA 基材微流控芯片的灭菌已有报道, 但对于该方法能够达到灭菌效果的参数如温度、压强、时间等都有较高要求。Yavuz 等^[15]比较了不同温度、压强、时间下超临界二氧化碳对 PMMA 芯片的灭菌效果, 发现当温度为 40 °C、压强为 1.2×10^7 Pa 时, 灭菌 60 min 效果最佳, 但过高的压强如 1.5×10^7 Pa 和 2.5×10^7 Pa 会导致 PMMA 表面出现微坑且使基片不透明。目前, 尚未发现该技术应用于 PDMS 基材微流控芯片的灭菌过程。

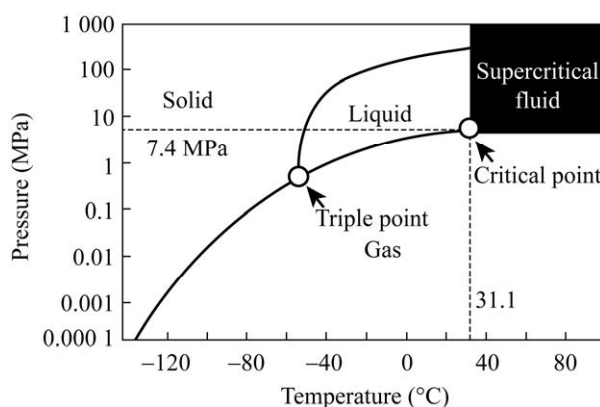


图 3 物质相态与温度和压强的关系^[25]

Figure 3 Relationship between the phase state of matter and temperature/pressure^[25].

超临界二氧化碳灭菌技术具有一定的灭菌效果,而且二氧化碳无毒、不易燃易爆、价廉,可通过气相液相间循环反复使用,是环保灭菌材料的优选。然而使用该技术对 PMMA 微通道进行灭菌时,应注意其诱导通道轮廓的变化对流体流动产生的影响,如图 4 所示^[15]。

2 化学方法

化学消毒灭菌通常是利用化学物质的强氧化性,与蛋白质表面的羧基、氨基、羟基发生反应导致蛋白质失活,或破坏细胞膜导致微生物无法正常进行生命活动后致死。该类消毒灭菌方法对设备的依赖性较低,操作过程简单,但鉴于各类化学试剂天然的危险性等因素,需在使用前对化学试剂的基本属性、存放方式及使用过程的注意事项进行相关培训。

本文针对目前常用于 PDMS 和 PMMA 这 2 类聚合物微流控芯片的化学消毒灭菌技术如乙醇消毒、环氧乙烷灭菌、过氧化氢低温等离子体灭菌、绿原酸消毒和清洗剂消毒等方法进行了归纳总结,并分析了每种方法的利弊,为采用上述化学消毒灭菌技术的研究学者提供有力依据。

2.1 乙醇消毒

乙醇(ethanol)能够引起膜损伤使细菌细胞破坏溶解,阻碍正常代谢,导致蛋白质快速变

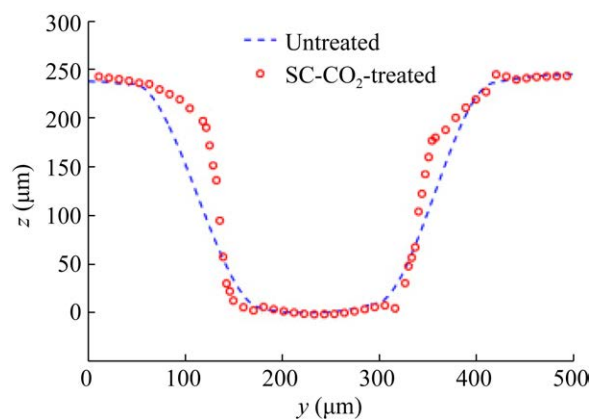


图 4 使用超临界二氧化碳和未经过超临界二氧化碳处理过的通道轮廓图^[15]

Figure 4 Channel profile comparisons of untreated vs SC-CO₂-treated^[15].

性^[28],进而抑制微生物的生长繁殖。目前该杀菌技术已被广泛应用于细胞培养类和疾病诊断等领域微流控芯片使用前的杀菌处理过程。乙醇杀菌方法通常采用浓度为 70%的乙醇溶液对键合后芯片采用浸泡微器件或从入口以一定速率冲洗微通道一段时间为主要消毒手段,相关应用如表 1 所示。

该方法不建议用于 PMMA 基材微流控芯片的杀菌,是由于 PMMA 为非晶态聚合物,分子间相互作用较弱,其本身也存在加工后应力造成的微裂纹,导致小分子溶剂乙醇很容易扩散并渗入 PMMA 使其溶胀,产生裂纹。

表 1 微流控芯片的乙醇消毒方法

Table 1 Ethanol sterilization method for microfluidic chip

材料	浓度	方法	时间	应用
Material	Concentration	Method	Time (min)	Application
PDMS	70%	浸泡	15	用于细胞培养的输氧装置 ^[11]
		Soak		A microfluidic oxygen delivery device for cell culture ^[11]
PDMS	70%	浸泡	30	生物医学类微流控芯片 ^[12]
		Immerse		Biomedical micro/Nanosystems ^[12]
PDMS	70:30	冲洗	30	阻止上游污染的微流体流量限制方法 ^[29]
	Ethanol:Water	Flush		Microfluidic device to avoid upstream contamination in a reactor ^[29]

2.2 环氧乙烷灭菌

环氧乙烷(ethylene oxide)灭菌技术的作用机制是利用环氧乙烷易与核心蛋白、DNA 发生烷基化反应, 导致蛋白质失活使微生物致死^[30-31]。该灭菌技术对灭菌装置的依赖性高, 灭菌过程略复杂, 而且对温度、灭菌维持的时间、环氧乙烷浓度要求较为严格。

目前, 已有研究学者采用该灭菌技术对 PMMA 基材微流控芯片进行灭菌处理, 其主要步骤是将芯片置于温度为 55 °C、浓度为 5 mg/mL 的环氧乙烷中灭菌 3 h, 而后解析 12 h 以除去环氧乙烷的残留^[15]。针对该技术的解析过程通常是在环氧乙烷灭菌柜或专门的通风柜内进行。

环氧乙烷灭菌具有很好的灭菌效果, 目前在医疗器械灭菌领域应用广泛, 而且灭菌过程温度相对较低, 通常设定 54 °C 左右, 对温度敏感材料具有良好的适用性。然而环氧乙烷是易燃易爆的有毒气体, 水解后会产生致癌物质乙二醇, 因此不适用于食品相关芯片的灭菌。

2.3 过氧化氢低温等离子体灭菌

过氧化氢等离子体(hydrogen peroxide gas plasma)灭菌器是从国外引进而来, 以过氧化氢为灭菌介质的等离子灭菌装置。其灭菌机制一方面是由于过氧化氢本身普遍适用于细菌、真菌等微生物的灭菌, 另一方面由于过氧化氢形成过氧化氢等离子体过程会产生不稳定离子、电子、中性粒子的反应云, 在等离子体中形成自由基活性基团, 可攻击细胞组分包括细胞膜、脂质、蛋白质和 DNA 导致微生物死亡^[28,32]。

目前, 该技术已应用于 PMMA 基材的微流控芯片的灭菌过程, Yavuz 等^[15]采用美国进口 Sterrad 过氧化氢等离子体灭菌装置对 PMMA 微流控芯片处理 1 h, 并配合化学指示

卡对灭菌结果显色表征以监测灭菌结果是否达到要求。

该方法以过氧化氢为等离子体介质, 可在短时间内实现对细菌、芽孢、病毒、真菌的高效灭菌^[33]。然而棉、纤维素等可吸收过氧化氢灭菌剂, 因此不适用于布基、纸基微流控芯片的灭菌。

2.4 绿原酸消毒

绿原酸(chlorogenic acid)具有无毒、抗菌、抗病毒等特性, 被广泛应用于医疗、保健、化妆品、食品、临床等^[34]。绿原酸可破坏本体溶液中的细胞膜来抑制细菌生长^[35]。采用绿原酸包覆以 PDMS 为基材的微流控芯片表面, 对其表面细胞的生长和诱导细胞死亡具有很强的抑制能力。

绿原酸对大肠杆菌的最低抑制浓度是 80 µg/mL, 是对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和鼠伤寒沙门氏菌最低抑制浓度的 2 倍, 肺炎链球菌和痢疾志贺菌的 4 倍^[36]。因此以大肠杆菌作为细菌的研究对象, 可以很好地反映绿原酸对其他细菌的杀灭效果。用双蒸水溶解金银花中提取出的绿原酸(浓度为 10 mg/mL), 将其涂覆在未键合的 PDMS 基片表面室温孵育 2 h, 再用双蒸水清洗 PDMS 表面去除未附着绿原酸分子, 最后用氮气干燥表面^[37]。此时观察大肠杆菌在 PDMS 表面包覆绿原酸涂层表面的生长情况, 表现出大肠杆菌的生长速率较慢, 生物活性明显受到阻碍。

绿原酸是许多中草药的主要成分之一, 在植物中广泛分布^[38], 获取途径多、较为廉价, 从而降低了消毒成本, 而且该方法绿色环保无污染, 操作步骤简单, 对细菌的生长具有一定的抑制作用。

2.5 清洗剂消毒

Skaalure 等^[11]采用清洗剂溶液(detergent)对

PDMS 芯片进行消毒, 该溶液是由 4 mL 洗涤浓缩粉末溶解于 1 L 纯净水中配制而成。将芯片浸泡于 52 °C 溶液中 15 min, 然后在超纯水中浸泡 20 min 进行实验, 该方法对氧气在芯片上的扩散未产生不利影响。

3 小结

本文总结和归纳了目前已有报道的基于

PMMA 和 PDMS 微流控芯片的消毒灭菌方法, 将所述消毒灭菌方法归为物理方法和化学方法, 并从机理、操作过程、相关特点逐一进行了分析和讨论, 为以聚合物为基材的生物医药类微流控芯片的灭菌提供有益参考。根据所阐述的两类灭菌技术, 总结其操作方法及相关特征如表 2 所示。

总体而言, 物理灭菌方法残留少, 但对设

表 2 物理/化学消毒灭菌技术操作方法和相关特征

Table 2 Operation methods and characteristic of physical/chemical sterilization technology

类别	材料	方法	接触角	粗糙度	特征
Category	Material	Method	Contact angle	Roughness	Characteristic
高压蒸汽 Autoclaving	PDMS	1×10^5 Pa, 15–30 min ^[11-13]	无明显变化 ^[12] No significant difference ^[12]		耗时短易操作, 不适用于 PMMA 等不耐 高温的材料 ^[15] Short term, easy to operate, not suitable for PMMA and other refractory materials ^[15]
紫外线 Ultraviolet	PDMS	254 nm, 120 min ^[11]	无明显变化 ^[12] No significant difference ^[12]		灭菌高效, 但穿透力差, 而且短波长可 损伤人眼和皮肤 ^[20] High efficiency on sterilization, poor penetrating, shorter wavelengths can damage eyes and skin ^[20]
	PMMA	254 nm, 90 min ^[15]		轻微下降 ^[15] Reduce slightly ^[15]	适用于多层微流控芯片 ^[24] , 安全设施要 求高 Suitable for multilayer microfluidic chip ^[24] , high safety facilities requirement
电子束 Electron beam	PDMS	2 MeV, 10 J/g ^[24]	减小 ^[24] Reduce ^[24]		绿色环保, 价廉, 对通道轮廓有影响 ^[15] Environmental protection, low cost, effect on the channel surface ^[15]
超临界 二氧化碳 SC-CO ₂	PMMA	40 °C, 1.2×10^7 Pa, 60 min ^[15]		明显减小 ^[15] Significantly reduced ^[15]	易操作, 但会使 PMMA 溶胀 Easy to operate, swelling PMMA
乙醇 Ethanol	PDMS	70%, 15–30 min ^[11-12,29]	无明显变化 ^[12] No significant difference ^[12]		高效灭菌, 但耗时长, 易爆有毒 High efficiency on sterilization, long term, explosive and toxic
环氧乙烷 Ethylene oxide	PMMA	5 mg/mL, 55 °C, 3 h ^[15]		略下降 Prominently reduced ^[15]	耗时短、环保、有效、不适用于纸、布 类微流控芯片 Short term, environmental protection, high efficiency, not suitable for paper and cloth microfluidic chip
过氧化氢 低温等离子体 Hydrogen peroxide gas plasma	PMMA	60 min ^[15]		略下降 Prominently reduced ^[15]	廉价易得、易操作、无毒 Low cost, easy to operate and non-toxic
绿原酸 Chlorogenic acid	PDMS	10 mg/mL, 2 h ^[37]			快速便捷 Convenient and fast
清洗剂 Detergent	PDMS	52 °C, 15 min ^[11]			

备依赖性较高; 化学方法需考虑消毒灭菌气体或液体对人体的伤害性及灭菌后产物是否有毒。同时, 考虑到科研人员的不同需求, 针对本文所讨论的消毒灭菌方法, 根据芯片材质、应用场景等多角度分析了所适用的消毒灭菌方法, 以期为不同人员的所需提供参考。

(1) 操作简易性。高压蒸汽灭菌、紫外线灭菌、电子束、 ^{60}Co γ 射线灭菌、超临界二氧化碳灭菌、环氧乙烷灭菌、过氧化氢等离子体灭菌对设备的依赖性较强。若实验过程中无相关设备且无需严格达到灭菌程度, 可采用乙醇、绿原酸、洗涤剂浸泡法进行消毒。

(2) 材料特性。根据已有报道的消毒灭菌方法, 以 PMMA 为基材的微流控芯片可采用紫外线灭菌、环氧乙烷灭菌、过氧化氢等离子体灭菌及超临界二氧化碳灭菌技术, 同时还可改善通道表面粗糙度, 但需注意超临界二氧化碳也会使通道形貌发生变化; 该类基材不适用高压蒸汽灭菌和乙醇消毒的方法。以 PDMS 为基材的微流控芯片, 可采用高压蒸汽灭菌、紫外线灭菌、电子束、 ^{60}Co γ 射线灭菌、乙醇消毒、绿原酸消毒、清洗剂消毒技术, 而超临界二氧化碳灭菌、环氧乙烷灭菌、过氧化氢等离子体灭菌技术应用于 PDMS 基材的消毒灭菌的研究未见报道。

(3) 灭菌深度。针对芯片的腔室、微通道内壁及内部的深度灭菌, 以辐射灭菌、环氧乙烷灭菌、高压蒸汽灭菌、超临界二氧化碳灭菌、过氧化氢低温等离子体灭菌技术灭菌效果更佳, 而且辐射灭菌更适用于多层聚合物微流控芯片的腔室灭菌, 而紫外线灭菌方法因穿透能力较弱更适用于基片表面的灭菌过程; 乙醇消毒、绿原酸消毒、清洗剂消毒技术只能对腔室、通道内壁起到简单消杀作用。

(4) 适用范围。对用于食品分析方面微流

控芯片, 可采用高压蒸汽灭菌, 但会破坏食品内部结构影响口感, 可采用如紫外线灭菌、辐射灭菌、超临界二氧化碳灭菌技术, 绿原酸消毒技术能起到消杀作用而非灭菌; 对用于生物医药、医疗诊断、体外诊断、药物筛选的微流控芯片, 可采用高压蒸汽灭菌、辐射灭菌、超临界二氧化碳灭菌、紫外线灭菌、乙醇消毒、过氧化氢低温等离子体灭菌、环氧乙烷灭菌技术, 但采用环氧乙烷灭菌技术其灭菌过程的残留环氧乙烷浓度须符合国家标准。

(5) 安全与环保。环氧乙烷易燃、有毒、会产生致癌物质, 短波长紫外线、辐射射线对人体有一定的伤害, 可采用高压蒸汽灭菌、超临界二氧化碳灭菌、乙醇消毒、过氧化氢等离子体灭菌、绿原酸消毒和清洗剂消毒的方式。

REFERENCES

- [1] Erickson D, Li DQ. Integrated microfluidic devices[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 507(1): 11-26
- [2] Elvira KS, I Solvas XC, Wootton RCR, DeMello AJ. The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis[J]. *Nature Chemistry*, 2013, 5(11): 905-915
- [3] Campeau MA, Lortie A, Tremblay P, Béliveau MO, Dubé D, Langelier È, Rouleau L. Effect of manufacturing and experimental conditions on the mechanical and surface properties of silicone elastomer scaffolds used in endothelial mechanobiological studies[J]. *Biomedical Engineering Online*, 2017, 16(1): 90
- [4] Ma XQ, Li R, Jin ZM, Fan YQ, Zhou XC, Zhang YJ. Injection molding and characterization of PMMA-based microfluidic devices[J]. *Microsystem Technologies*, 2020, 26(4): 1317-1324
- [5] Zhang YJ, Liu JJ, Wang HL, Fan YQ. PDMS-based microfluidic devices with shrinkable wax molds printed on biaxially orientated polystyrene film[J]. *Materials Research Express*, 2019, 6(7): 075329
- [6] Reinholt SJ, Behrent A, Greene C, Kalfe A, Baumner AJ. Isolation and amplification of mRNA within a simple microfluidic lab on a chip[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(1): 849-856

- [7] Kwon KW, Choi SS, Lee SH, Kim B, Lee SN, Park MC, Kim P, Hwang SY, Suh KY. Label-free, microfluidic separation and enrichment of human breast cancer cells by adhesion difference[J]. *Lab on a Chip*, 2007, 7(11): 1461-1468
- [8] Hugo WB. A brief history of heat, chemical and radiation preservation and disinfection[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1995, 36(3/4): 197-217
- [9] Khetani S, Yong KW, Guan K, Singh A, Phani A, Kollath VO, Kim S, Karan K, Sen A, Sanati-Nezhad A. UV-triggered polymerization of polycatecholamines enables the production of organ-on-chips inside a biosafety cabinet[J]. *Applied Materials Today*, 2020, 20: 100721
- [10] Vetten MA, Yah CS, Singh T, Gulumian M. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: effects on structural stability and biomedical applications[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2014, 10(7): 1391-1399
- [11] Skaalure SC, Oppgaard SC, Eddington DT. Characterization of sterilization techniques on a microfluidic oxygen delivery device[J]. *The Journal of Undergraduate Research at the University of Illinois at Chicago*, 2008. DOI: 10.5210/jur.v2i1.7462
- [12] Mata A, Fleischman AJ, Roy S. Characterization of polydimethylsiloxane (PDMS) properties for biomedical micro/nanosystems[J]. *Biomedical Microdevices*, 2005, 7(4): 281-293
- [13] Leclerc E, Sakai Y, Fujii T. Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane)[J]. *Biomedical Microdevices*, 2003, 5(2): 109-114
- [14] Kuo SW, Kao HC, Chang FC. Thermal behavior and specific interaction in high glass transition temperature PMMA copolymer[J]. *Polymer*, 2003, 44(22): 6873-6882
- [15] Yavuz C, Oliaei SNB, Cetin B, Yesil-Celiktas O. Sterilization of PMMA microfluidic chips by various techniques and investigation of material characteristics[J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2016, 107: 114-121
- [16] Mori M, Hamamoto A, Takahashi A, Nakano M, Wakikawa N, Tachibana S, Ikehara T, Nakaya Y, Akutagawa M, Kinouchi Y. Development of a new water sterilization device with a 365 nm UV-LED[J]. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 2007, 45(12): 1237-1241
- [17] Gupta A, Avci P, Dai TH, Huang YY, Hamblin MR. Ultraviolet radiation in wound care: sterilization and stimulation[J]. *Advances in Wound Care*, 2013, 2(8): 422-437
- [18] Soloshenko IA, Bazhenov VY, Khomich VA, Tsiolko VV, Potapchenko NG. Comparative research of efficiency of water decontamination by UV radiation of cold hollow cathode discharge plasma versus that of low- and medium-pressure mercury lamps[J]. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2006, 34(4): 1365-1369
- [19] Hidaka Y, Kubota K. Study on the sterilization of grain surface using UV radiation[J]. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 2006, 40(2): 157-161
- [20] Wu MS, Sun DS, Lin YC, Cheng CL, Hung SC, Chen PK, Yang JH, Chang HH. Nanodiamonds protect skin from ultraviolet B-induced damage in mice[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2015, 13: 35
- [21] Toh MR, Chiu GNC. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing[J]. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 8(2): 88-95
- [22] 王锦燕. ^{60}Co - γ 辐照灭菌在中药及其制剂中的应用[J]. *现代中药研究与实践*, 2003, 17(6): 59-61
Wang JY. Application of ^{60}Co - γ -ray irradiation sterilization in traditional Chinese medicine and preparation[J]. *Research and Practice on Chinese Medicines*, 2003, 17(6): 59-61 (in Chinese)
- [23] Halpern JM, Gormley CA, Keech MA, Von Recum HA. Thermomechanical properties, antibiotic release, and bioactivity of a sterilized cyclodextrin drug delivery system[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(18): 2764-2772
- [24] Oyama TG, Oyama K, Taguchi M. A simple method for production of hydrophilic, rigid, and sterilized multi-layer 3D integrated polydimethylsiloxane microfluidic chips[J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(13): 2354-2363
- [25] White A, Burns D, Christensen TW. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 123(4): 504-515
- [26] Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Spilimbergo S, Elst K, Van Ginneken LV, Debevere J, Van Impe JF, Devlieghere F. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117(1): 1-28
- [27] 王爱英, 李军. 超临界 CO_2 处理腐生酵母菌细胞内外

- pH 值的变化[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(9): 45-49
- Wang AY, Li J. Determination of extracellular and intracellular pH of saprophytic yeast suspension under supercritical carbon dioxide treatment[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(9): 45-49 (in Chinese)
- [28] McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1999, 12(1): 147-179
- [29] Asayesh F, Zarabadi MP, Aznavah NB, Greener J. Microfluidic flow confinement to avoid chemotaxis-based upstream growth in a biofilm flow cell reactor[J]. Analytical Methods, 2018, 10(37): 4579-4587
- [30] Phillip Jr E, Murthy NS, Bolikal D, Narayanan P, Kohn J, Lavelle L, Bodnar S, Pricer K. Ethylene oxide's role as a reactive agent during sterilization: effects of polymer composition and device architecture[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials, 2013, 101(4): 532-540
- [31] 徐燕, 孙巍, 吴晓松. 环氧乙烷灭菌技术应用与发展[J]. 中国消毒学杂志, 2013, 30(2): 146-151
- Xu Y, Sun W, Wu XS. Application and development of ethylene oxide sterilization technology[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2013, 30(2): 146-151 (in Chinese)
- [32] Vassal S, Favennec L, Ballet JJ, Brasseur P. Hydrogen peroxide gas plasma sterilization is effective against *Cryptosporidium parvum* oocysts[J]. American Journal of Infection Control, 1998, 26(2): 136-138
- [33] Kirchner P, Oberländer J, Suso HP, Rysstad G, Keusgen M, Schöning MJ. Monitoring the microbicidal effectiveness of gaseous hydrogen peroxide in sterilisation processes by means of a calorimetric gas sensor[J]. Food Control, 2013, 31(2): 530-538
- [34] 王玲娜, 姚佳欢, 马超美. 绿原酸的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(11): 1121-1130
- Wang LN, Yao JH, Ma CM. Advances in research on chlorogenic acid[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, 36(11): 1121-1130 (in Chinese)
- [35] Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, Ahmad F, Babazadeh D, Xia FF, Modarresi-Ghazani F, et al. Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 97: 67-74
- [36] Lou ZX, Wang HX, Zhu S, Ma CY, Wang ZP. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(6): M398-M403
- [37] Ren S, Wu M, Guo JY, Zhang W, Liu XH, Sun LL, Holyst R, Hou S, Fang YC, Feng XZ. Sterilization of polydimethylsiloxane surface with Chinese herb extract: a new antibiotic mechanism of chlorogenic acid[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 10464
- [38] 刘颖, 郭明晔, 白根本. 绿原酸的研究进展[J]. 中药材, 2012, 35(7): 1180-1185
- Liu Y, Guo MY, Bai GB. Advances in research on chlorogenic acid[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2012, 35(7): 1180-1185 (in Chinese)