

微型全分析系统(μ TAS)中的微分离技术

徐 溢^{1,2} 张晓凤¹ 海显来¹ 兰宇卫¹

(¹重庆大学化学化工学院 ²光电技术及系统教育部重点实验室 重庆 400044)

摘 要 介绍了微型全分析系统(μ TAS)中微分离的重要性和它的概念,除了毛细管电泳芯片分离技术外,对其它诸如萃取分离、膜分离、色谱、磁分离等新兴微分离技术在 μ TAS 中的研究和应用进行了综述,并对微流控芯片上微分离技术的进展作了评述和展望。

关键词 微型全分析系统(μ TAS) 微流控芯片 微分离

Micro-separation in Miniaturized Total Analysis System

Xu Yi^{1,2}, Zhang Xiaofeng¹, Hai Xianlai¹, Lan Yuwei¹

(¹Chemistry and Chemical Engineering College, Chongqing University)

(²Photo-electric Tech.& System Key Lab of Chinese Educational Committee, Chongqing 400044)

Abstract The importance and conception of micro-separation for miniaturized total analysis system (μ TAS) were introduced in this paper. In addition to simple presentation of capillary electrophoresis separation on micro-fluidic chip, many other new micro-separation methods, such as extraction separation, membrane separation, chromatography, magnetic separation and so on, were demonstrated and evaluated in detail about their application in μ TAS. Research works on micro-separation for μ TAS were reviewed. The potential development in the field of micro-separation on μ TAS was prospected.

Key words Miniaturized total analysis system(μ TAS), Micro-fluidic chip, Micro-separation

微型全分析系统(Micro Total Analysis System, μ TAS)是一个跨学科的新领域,它涉及到分析化学、微机电加工(MEMS)、计算机、电子学、材料学、生物学及医学等学科^[1],其最终目标是在微芯片上实现化学全分析系统,以取代常规分析实验室的所有功能,成为近年来分析化学研究热点。

近几十年来,随着 μ TAS 迅猛发展和应用前景不断扩大, μ TAS 在临床检验、新药合成与筛选、生物医学中人类基因与疾病关系研究,以及食品和商品检验、环境检测、刑事科学、军事科学及航天科学等领域发挥巨大潜力,其应用领域将逐步扩大到涉及化学成分分析的所有方面^[1]。但在实际分析测试中,特别是对环境科学、生命科学、生物医学等领域中的样品分析,经常要求检测 $\mu\text{g/g}$ 、 ng/g 、 pg/g 甚至更低含量的组分^[2],目前虽然有许多灵敏度很高的分析方法,

徐 溢 女, 38 岁, 副教授, 从事分析化学和应用化学科研和教学工作。E-mail: xuyicd@cta.cq.cn

国家教委留学回国人员基金(1999-363)、国家自然科学基金(20007005)以及教育部光电技术及系统教育部重点实验室访问学者基金资助项目

2003-04-24 收稿, 2004-02-12 接受

但常由于存在基体效应以及其它各种干扰而难以得到准确的分析结果。采用适当的分离富集技术,有可能获得选择性更高且准确可靠的分析结果,所以对样品进行分离富集等预处理显得尤为重要。

在 μ TAS 中,为了降低检出线、消除干扰组分、以得到准确可靠的分析结果,样品的分离富集是必不可少的一步。目前除了电泳芯片外,其它为系统中样品的分离富集等预处理过程都是在微芯片外实现的,这难免会引起样品的损失和污染等问题,同时也不利于微型分析系统集成化。因此发展微芯片上样品的分离与富集技术成为 μ TAS 迫在眉睫的任务,这也是 μ TAS 发展的必然趋势。这种技术的实现必将 μ TAS 的发展推向一个更新、更高的台阶。

林炳承^[3]曾以电泳芯片为基础,提出电泳芯片微分离学的平台特征,即微芯片材料和微小尺寸效应对微分离的影响,指出微芯片上的微分离在材质上较毛细管电泳有更多的选择余地,不同材料影响分离通道加工工艺,同时也影响分离通道中的电渗流、表面吸附、杂质种类和含量,可以借助传递理论,从理论上比较微小尺寸效应对分离的影响。Jankowski 等^[4]将毛细管电泳、Murrihy 等^[5]将微芯片上离子色谱都称作微分离(Micro-separation),陆豪杰等^[6]称毛细管电泳分离为微分离技术。这里我们将这种在 μ TAS 基础上提出来的、具有上述微分离学平台特征的、在几厘米大小微流控芯片上实现样品分离与富集等预处理过程,以取代常规分析实验中的分离方法,使整个分析过程实现真正意义上的微型化、自动化、集成化和便携化的技术统统归入到为微分离学中。

1 微芯片上的微分离技术

上世纪 90 年代至今,国内外学者在 μ TAS 方面做了大量研究,其中多数研究主要集中在混合、反应、检测等方面。现阶段微分离方面研究又主要集中在毛细管电泳芯片,而微流控芯片上其它微分离技术涉及较少,目前也只是一些初步研究,发展相对比较薄弱。

1.1 电泳芯片微分离技术

电泳芯片(EC)微分离技术是当今的研究热点。从 1991 年至今,国际上在其制作工艺方面的进展与在生化快速分析中的应用,充分表明毛细管电泳微型化的潜力和可行性。微芯片上毛细管电泳(CE)是,在常规 CE 原理和技术基础上,利用微型制造技术在几平方厘米大小的芯片上刻蚀出扁平管道和其它功能单元,通过不同管道网络设计和布局,实现样品分离,是一种快速、高效、低耗的微分离技术^[7]。由于 EC 属于电场驱动微管道分离,进样能够通过电场实现,因此相应技术和装置较易微型化,微型化后实验条件变化不大,容易移植。王辉^[8]、金亚^[7]等已对微芯片上的毛细管电泳技术进行了相关综述,这里不再赘述。

目前,电泳芯片的研究主要以电渗流泵为驱动力,以激光诱导荧光(LIF)、紫外或电化学检测器为检测技术。但是电渗流泵只适于离子性液体,LIF 只能检测荧光标记化合物,而且整个系统需高压电源,这就限制了电泳芯片在样品选择、进样和检测等方面的进一步发展和应用;而且光学检测方法,特别是 LIF,目前难于微型化,这些不足之处为 EC 的发展带来诸多不便。因此国外学者在微流控芯片上其它微分离技术方面,诸如:固相萃取、液-液萃取、膜分离、色谱分离、磁场分离以及利用扩散速度差异进行的微分离技术等,做了大量的研究,以取长补短,共同促进微分离技术和微分析系统整体的发展。

1.2 萃取技术

微流控芯片上萃取技术涉及到固相萃取(SPE)和液-液萃取(LLE)。

SPE 是一种用固相吸附剂吸附液体样品中目标化合物,与样品基体和干扰化合物分离,然后再用洗脱液洗脱或加热解析,达到分离富集目标化合物的目的。SPE 不仅可以富集待测组分,而且可以分离干扰组分,无需使用超纯溶剂,有机溶剂消耗低,无相分离操作,容易收集分析物,操作简单。Oleschuk 等^[9]在微芯片上采用电渗流泵,将直径为 $1.5\sim 4\mu\text{m}$ 的十八烷基硅烷(ODS)颗粒从管道一端引入特意设计的空穴中,空穴由两个梯形堰构成,填满 ODS 后的空穴作为分离床,对荧光素和非极性 BODIPY 进行 SPE 分离富集,富集后样品浓缩 500 倍,而且填充颗粒可以更换。Broyles 等^[10]将 C18 固定相涂覆在深 $5\mu\text{m}$ 、宽 $25\mu\text{m}$ 、长 30mm 微管道内,与开管电色谱(OCEC)联用,分离富集多环芳香烃。Cong 等^[11]在微芯片管道中,利用紫外(UV)激发原位聚合反应,在管道中形成多孔状聚合物作为 SPE 固定相,并通过改变正己烷和甲醇混合液的比例,实现对聚合物孔的性质和管道流动阻力的控制,分离富集了疏水四肽和绿色荧光蛋白质。微芯片上 SPE 不同于 EC,它不受液流驱动方式和检测技术限制,而且避免微芯片外分离富集样品时引起样品损失和污染问题。通常将 SPE 接到微芯片上,会降低检出限,改善样品处理范围。但由于微芯片体积比较小,所以在其上制作 SPE 比较困难。这里 Oleschuk 巧妙的微芯片结构设计和 Cong 的引入分子印迹技术为微流控芯片 SPE 的制作提供了新的思路。

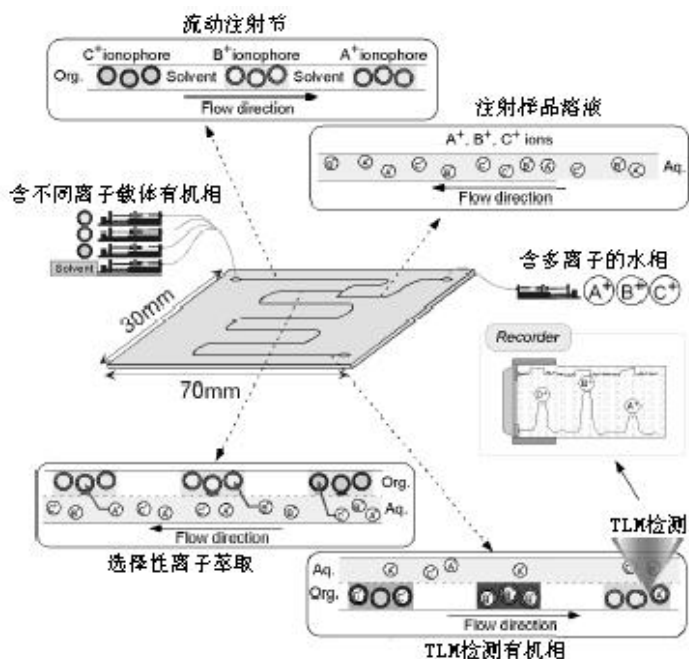


图 1 多离子传感仪的操作原理^[14]

Fig.1 Operation principle of the multi-ion sensing device^[14]

LLE 是一种利用物质在互不溶解的两相中不同分配特性进行分离的方法。利用与水不混溶的有机溶剂,借助萃取剂的作用,使一种或几种组分进入有机相,而另外一些组分仍留在水中,从而达到分离和富集的目的。LLE 是一种常用的分离富集方法,具有选择性好、回收率高、

设备简单、操作简便、快速,以及易实现自动控制等特点。这种分离方式适用于所有液体,包括水溶液和有机溶剂。Hisamoto 等^[12-14]在 30mm×60mm 微流控芯片上采用多种有机相分段注射法,根据不同有机相含不同离子选择性中性离子载体,中性离子载体只能萃取特定离子,有机相和水相在管道中形成层流,随着液流在管道中流动,不同有机相萃取不同离子后到达热透显微镜检测器(TLM),如图 1 所示的该系统可同时萃取分离多种离子,因此将其称为多离子传感仪。微芯片管道宽 250 μ m、深 100 μ m,所需最小试剂量 125nL,大大降低试剂消耗量。因微管道扩散距离短、有机溶剂流速低,所以信号响快,一般为 8s。采用的 TLM 检测器可检测荧光物质和非荧光物质。对于微芯片上 LLE,虽然分离管道缩微化了,但液-液接触面增大,分子扩散距离减小,反而有利于萃取效率的提高。而且试剂消耗量少,降低了萃取成本,减少环境污染,无需机械振动和多级萃取等繁琐过程。但是微芯片上 LLE 的基材必须采用耐有机溶剂的玻璃或石英,有机聚合物基材在这里不太适用。

1.3 膜分离技术

膜分离是以选择性透过膜为分离介质,当膜两侧存在压力差、浓度差、电位差等不同的推动力时,所需组分选择性地透过膜,以达到分离提纯的目的^[15]。膜分离可以通过控制膜孔径、膜表面修饰等方法分离所需组分。且分离过程中大多无相变化,常温操作,有高效、节能、简便等特点。Khandurina 等^[16]在深 8~10 μ m,半深宽 60~65 μ m 的电泳芯片上,将硅酸钠低温键合到盖片上,硅酸钠聚缩后,在相邻主管道与侧管道之间形成 3~12 μ m 宽的硅酸钠多孔膜,当样品流经膜时,离子可以透过该膜,而大分子的 DNA 被截留富集,富集后的 DNA 进入分离管道,用 LIF 进行检测, DNA 浓度提高了 2 个数量级。这种膜只能对大分子和小离子的混合物进行初步的筛分,而对于粒径相近的物质就显得无能为力了。Cannon 等^[17]和 Spencer 等^[18]在三维(3D)微芯片上,用核径迹刻蚀(nuclear track-etched)聚碳酸酯膜,形成圆柱形孔径,孔径 $15\text{nm} \leq d \leq 220\text{nm}$,孔密度 $1 \times 10^8 \text{cm}^{-2} \leq N_p \leq 6 \times 10^8 \text{cm}^{-2}$ 的膜作为分子门,膜厚为 5 μ m,如图 2 所示,膜夹在十字交叉的聚二甲基硅氧烷(PDMS)微流管道之间,PDMS 管道宽 100 μ m、深 30 μ m,穿过微流管道传递区与分子门相连,在分子门进样口和出样口用激光诱导荧光或荧光显微镜进行检测。这种分离技术的特点是通过控制分子门膜的物理和化学性质,可捕获和释放特定分子,因此可以作为一种高选择的、可控制的分离方法。而且通过控制分子门的连接,特别是采用 3-D 微流控系统,可实现智能分子筛选。

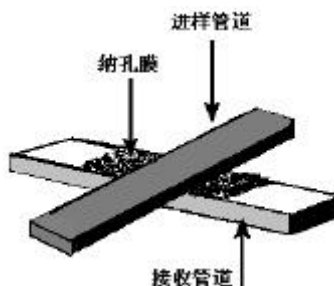


图 2 在微流控管道中夹纳孔膜组成 3D 微流控系统^[17]

Fig.2 Simplified schematic of three-dimensional microfluidic system comprising of a nanoluidic porous membrane sandwiched between two microfluidic channels^[17]

1.4 色谱技术

色谱是基于不同组分在两相间具有不同分配系数和溶解度, 或不同组分对固定相吸附作用和亲和力不同, 或按分子大小而进行的分离, 是一种分离效率很高的分离技术。早在上世纪 70 年代, 美国宇航局(NASA)就支持斯坦福大学研制“芯片上的气相色谱”, 但由于技术不成熟, 该项研究成果没有像计划那样用于海盗号火星探测器^[19]。目前有关微流控芯片上的色谱只是一些初步研究: Ishizuka 等^[20]用溶胶-凝胶法在 50 μm 熔融石英毛细管中形成多孔凝胶体骨架, 作为微型色谱分离管道, 实现样品分离, 并用反相液相色谱法进行评估, 其柱压是常规柱的 1/25~1/30, 可在非常低的压力下产生 100000 理论塔板数, 克服了传统 HPLC 颗粒填充柱的限制; Chmela 等^[21]利用体动力色谱法(Hydrodynamic Chromatography, HDC), 由于大分子接触不到管壁附近的缓流区, 在狭窄管道中大分子跑得比小分子快, 在长 80mm、宽 0.5mm、深 0.001mm 的微管道中分离了生物高分子、合成高分子和粒子, HDC 克服常规排阻色谱法(SEC)需要固定相的限制, 因此分离速度快、效率高; Murrihy^[5]等完成了芯片上离子色谱对无机阴离子的分离, 他们将季铵乳胶颗粒涂渍在芯片的分离管道上, 芯片管道为 0.5~10 μm , 分离样品和固定相之间相互作用, 芯片分离管道上的作用几率要比在 50 μm 的毛细管上高的多。在芯片外进样(20nL)和紫外检测, 利用 1mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 作为洗脱剂分离了 NO_2^- 、 NO_3^- 、 I^- 和硫脲。对 NO_2^- 、 NO_3^- 的线性范围为 5~1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测限为 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Frye-Mason 等^[22]开发了一种微芯片上气相微化学分析系统(Gas Phase Miniature Chemical Analysis Systems), 如图 3 所示。在 300 $\mu\text{m}\times 300\mu\text{m}$ 管道中填充多孔高分子或碳材料作为 GC 柱, 柱长 20cm, 分离甲烷、乙烷、乙烯、乙炔和高挥发性有机物。并在芯片上可以进行样品解析过程, 通过加热微芯片上的绝热膜, 挥发性样品被解析, 进入 GC 柱中进行分离分析。还可以在芯片开管柱上采用快速程序升温, 分离低挥发性物质, 如: 炸药、甲基脂肪酸。该方法可分离从气体到低挥发性的物质, 样品分析范围较宽。

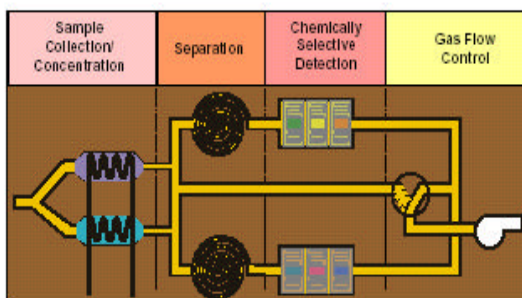


图 3 微型气相化学分析系统^[22]

Fig.3 Schematic of gas phase $\mu\text{ChemLab}^{\text{TM}}$ system^[22]

微流控芯片上的色谱技术涉及的方法很多, 但每一种方法都是对传统色谱分离技术的改进、发展和挑战, 它微型化、集成化、便携化特色正是人们对现代分析仪器发展所期望的, 因此其发展潜力是无法估量的。

1.5 磁分离技术

磁分离是利用外加磁场的作用使磁性物质得到分离。Chronis 等^[23]提出了生物磁化分离的概

念,如图 4 所示,即基于 H 形管道中两种缓冲溶液平行流动,一种缓冲液中含有生物磁珠,另一种不含生物磁珠的液流位于管道中靠近电磁场的一面,当两平行液流流过磁场时,远离磁场液流的磁珠受磁场吸引迁移到靠近磁场的液流中,达到了分离的目的。这种分离技术不同于集成免疫磁分离技术,它不需要在每一块微芯片上集成成本昂贵的电磁铁,也无需复杂的设备,而具有分离效率高、处理能力强、设计灵活等特点。Furdui 等^[24]利用磁分离,在微芯片上成功分离人体血液中的 T 细胞,它是根据磁性的蛋白质粒子 A(1~2 μm)对许多类型的 IgG 有很高亲和力,当蛋白质磁珠 A 与 CD3 溶液混合时,CD3 与蛋白质磁珠 A 结合成为有磁性的 CD3 磁珠,而 CD3 接受器对 T 细胞有专一性,外加磁场作用下,T 细胞可被选择性捕获分离。该方法不足之处是没有实现分离样品在线检测,分离后样品必须转移到微芯片外去检测。

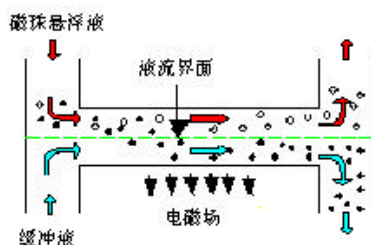


图 4 平流液流的分离(图中黑色的为磁珠)^[23]

Fig.4 Hydrodynamic parallel flow separation(magnetic beads shown in black)^[23]

工业上磁分离技术已经比较成熟,而微流控芯片上磁分离技术只是刚刚涉入,其研究和应用是对磁分离技术的一种挑战,有许多工作有待于进一步展开。

1.6 其它

Gaudio 等^[25]开发了一种利用扩散井分离的微制造模型,扩散井是在硅片上光刻蚀形成的,待测样品扩散的越快,越易进入到扩散井中,扩散较慢的后进井中,因此扩散较慢的先从柱上洗脱下来,成功的分离了 Ce19A 和 Ce15A 纤维素酶。亦有采用微加工有膜微渗析器完成质谱分析前样处理操作的^[26]。有利用大分子和小分子扩散速度的差异,采用多相层流技术实现微芯片上样品的无膜过滤、无膜渗析^[27]。还有采用微加工方法制作微型过滤器^[28]。其它已经开始介入的分离技术还有离心、分配、剪切等^[3]。

2 展望

微型化是现代分析科学的一个发展趋势,微分离技术是自 μTAS 问世以来,人们不断追求“芯片上的实验室(Lab-on-chip)”的必然结果,在微流控芯片上实现微分离技术已成为 μTAS 不可或缺的部分,它将进一步完善芯片上的实验室的思想。同时微分离的研究离不开 μTAS 理论方面的指导、芯片的设计加工与制作技术、芯片上的检测技术等方面的配合。笔者的小组在 μTAS 的理论方面^[29,30]、微芯片的加工与制作^[31]、芯片上的检测^[32]等方面做了一些初步的工作,在研究过程中也逐步发现和认识到 μTAS 中微分离的必要性和可行性,为下一步微分离研究工作打下了基础。目前国内外学者在微分离技术中所做的工作也证明了其尚未开发的巨大潜力。可以预料不久的将来,集成到芯片上的微分离技术,必将给分离科学带来一场新的革命。

参考文献

- [1] 方肇伦, 方 群. 现代科学仪器, 2001, (4): 3~6.
- [2] 周春山. 化学分离富集方法及应用. 长沙: 中南工业大学出版社, 1997: 1~12.
- [3] 林柄承. 现代科学仪器, 2001, (4): 21~24.
- [4] J A Jankowski, S T Racht, J V Sweedler. Trends in Analytical Chemistry, 1995, 14(4): 170~176.
- [5] J P Murihy, M C Breadmore, A Tan et al. J. Chromatogr. A, 2001, 924: 233~238.
- [6] 陆豪杰, 阮宗琴, 康经武 等. 分析测试技术与仪器, 1999, 5(3): 129~134.
- [7] 金 亚, 罗国安, 王如骥. 色谱, 2000, 18(4): 313~317.
- [8] 王 辉, 林柄承. 分析化学, 2002, 30(3): 359~364.
- [9] R D Oleschuk, L L Shultz-Lockyear, L Y Ning et al. Anal. Chem., 2000, 72: 585~590.
- [10] B S Broyles, S C Jacobson, J M Ramsey. In Proceedings of Micro Total Analysis System 2001, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p537~538.
- [11] Y Cong, M H Davey, F Svec et al. Anal. Chem., 2001, 73: 5088~5096.
- [12] H Hisamoto, T Horiuchi, M Tokeshi et al. Anal. Chem., 2001, 73: 1382~1386.
- [13] H Hisamoto, T Horiuchi, K Uchiyama et al. Anal. Chem., 2001, 73: 5551~5556.
- [14] H Hisamoto, T Horiuchi, K Uchiyama et al. In Proceedings of Micro Total Analysis System 2001, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p667~669.
- [15] 刘茉娥. 膜分离技术. 北京: 化学工业出版社, 2000: 1~10.
- [16] J Khandurina, S C Jacobson, L C Waters et al., Anal. Chem., 1999, 71: 1815~1819.
- [17] D M Cannon Jr, T C Kuo, W Feng et al. In Proceedings of Micro Total Analysis System 2001, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p199~200.
- [18] M G Spencer, B R Flachsbart, T Yasunaga et al. In Proceedings of Micro Total Analysis System 2001, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p195~196.
- [19] 孙彦平, 孟晓雄. 分析测试技术与仪器, 1997, 3(3): 168~173.
- [20] N Ishizuka, H Minakuchi, K Nakanishi et al. In Proceedings of Micro Total Analysis System 2001, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p555~556.
- [21] E Chmela, R Tijssen, M T Blom et al. Anal. Chem., 2002, 74: 3470~3475.
- [22] G Frye-Mason, R Kottenstette, C Mowry et al. In Proceedings of Micro Total Analysis System 2001, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p658~660.
- [23] N Chronis, W Lam, L Lee. In Proceedings of Micro Total Analysis System 2001, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p497~498.
- [24] V I Furdul, D J Harrison. In Proceedings of Micro Total Analysis System 2001, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p289~290.
- [25] J Gaudioso, D E Miller, S W P Turner et al. In Proceedings of Micro Total Analysis System 2001, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p107~108.
- [26] N Xu, Y Lin, S A Hofstadler et al. Anal. Chem., 1998, 70: 3553~3556.
- [27] A E Kamholz, B H Weigl, B A Finlayson et al. Anal. Chem., 1999, 71: 5340~5347.
- [28] Van den Berg, W A Olthuis, P Bergveld(Eds.), In Proceedings of Micro Total Analysis System 2000, Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 473.
- [29] 徐 溢, Jan C T Eijkel, A Manz. 分析化学, 2000, 28(10): 1295~1299.
- [30] 徐 溢. 重庆大学学报(自然科学版), 2002, 25(1): 150~153.
- [31] 徐 溢, 唐守渊. 压电与声光, 2001, 23(5): 124~126.
- [32] 徐 溢, F Bessoth, A Manz. 分析化学, 2000, 28(7): 876~878.