

# 含双 T 切换接口的胶束电动色谱 毛细管区带电泳 二维电泳芯片上混合氨基酸的分离富集

徐溢<sup>\*1,2,3,4</sup> 申纪伟<sup>3</sup> 曹明霞<sup>1,2,3,4</sup> 张文品<sup>1,2,3,4</sup>

(重庆大学新型微纳器件与系统技术国防重点学科实验室<sup>1</sup>, 微纳系统及新材料技术国际研发中心<sup>2</sup>,  
化学化工学院<sup>3</sup>, 微系统研究中心<sup>4</sup>, 重庆 400044)

**摘要** 基于时间顺序设计提出了含双 T 切换接口的胶束电动色谱 (MEKC) 和毛细管区带电泳 (CZE) 的二维芯片, 构建了相应的芯片分析测试系统。基于 FITC 标记的氨基酸样品的一维 MEKC 和 CZE 实验结果, 对二维进样时间、二维分离启动时间等二维芯片电泳关键操作参数进行了优化。采用所构建的 MEKC-CZE 二维芯片电泳分析系统对精氨酸、赖氨酸、组氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸的混合样品进行了二维芯片电泳分离分析, 计算得到两种分离模式的正交性为 56.0%。

**关键词** 二维芯片电泳, 胶束电动色谱, 毛细管区带电泳, 氨基酸分离

## 1 引言

在微流控芯片上集成微管道网络构建的二维芯片分离系统是近年来发展起来的一种用于复杂样品的分离分析的新型复合分离技术<sup>[1]</sup>。它将两种不同的电泳分离模式耦联起来, 具有接口处死体积小等优点, 在提高分离系统的分辨率和峰容量方面显示出巨大潜力, 使其成为复杂生化样品体系分析中备受关注的分离分析手段<sup>[2~4]</sup>。胶束电动色谱 (Micellar electrokinetic chromatography, MEKC) 与毛细管区带电泳 (Capillary zone electrophoresis, CZE) 是两种正交性较好的分离模式, 以这两种分离模式进行耦联来构建二维分离分析系统, 分析成本较低, 操作难度适中<sup>[5]</sup>, 且 MEKC 在线富集技术可以使样品浓缩, 使得初始浓度很低的样品能够在第二维 CZE 分离中得以实现, 提高了微系统的检测能力<sup>[6,7]</sup>。

切换接口的设计是微流控二维电泳芯片技术的难点和核心。针对基于时间的微流控二维芯片电泳分离方式, 一般是在两维之间采用门式进样, 其切换接口的结构为常规的十字型结构。这种操作方法的操作难度大, 重现性差。双 T 型结构本身是基于体积的进样方式, 以这种结构为微流控二维电泳芯片的切换接口, 可根据分析对象方便地调整接口尺寸, 二维芯片电泳的操作难度明显降低, 既能应用于时间顺序上的二维芯片电泳分离方式, 又能保持体积进样方式的优点, 有效降低了二维进样的样品损失。

本研究将胶束电动色谱 (MEKC) 与毛细管区带电泳 (CZE) 两种分离模式进行耦联, 设计了基于时间顺序的二维电泳芯片双 T 切换接口, 构建了相应的二维芯片电泳分析测试系统。以荧光标记的氨基酸为样品, 进行 MEKC 和 CZE 分离过程的缓冲介质、分离场强等芯片电泳操作参数优化, 用以实现混合氨基酸样品的二维芯片电泳分离分析, 并对所构建的二维分析系统进行了评价。本系统为新型微全分析系统的研发提供了一定的理论依据和技术支撑。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

XCDY 微流控芯片智能多通道高压电源 (山东省化工研究院仪表研究所); 共聚焦激光诱导荧光检测器 (山东省化工研究院仪表研究所); KCN 7E-12500 高压电源 (Omiran Ltd Mildenhall, England)。

硼砂 (AR, 重庆市东方红试剂厂); L 精氨酸 (L-Arg)、L 赖氨酸 (L-Lys)、L 组氨酸 (L-His)、L 酪氨酸 (L-Tyr)、L 苯丙氨酸 (L-Phe) (AR, 上海康达氨基酸厂); 异硫氰酸荧光素 (FITC, AR, Sigma 公司); 十二烷基硫酸钠 (CR, 上海化学试剂厂); 聚二甲基硅氧烷 (PDMS, Sylgard 184 有机硅弹性体美国道康

2009-01-19 收稿; 2009-04-20 接受

本文系国家自然科学基金项目 (Nos 20675089, 90307015), 国家科技部 863 计划项目 (No 2006AA04Z345) 和科技部国际科技合作项目 (No 2006DFA13510), 重庆市自然科学基金重点项目 (No 2006BA4012) 资助

\* E-mail: xuyibbd@sina.com

宁公司)。所有试剂和溶液均用二次蒸馏水配制,上片前均用  $0.22\ \mu\text{m}$  水性微孔滤膜过滤。

## 2.2 MEKC-CZE二维电泳芯片设计和制作

芯片结构如图 1 所示,其中含微管道的玻璃基板采用标准湿法刻蚀工艺加工而成,与 PDMS 直接键合得到玻璃-PDMS 复合芯片。由此建立的二维电泳芯片分离分析系统包括多通道高压电源、MEKC-CZE 二维芯片、激光诱导荧光(LIF)检测器以及 N2000 色谱工作站等。

## 3 结果与讨论

### 3.1 MEKC-CZE 二维芯片电泳芯片设计

MEKC-CZE 二维电泳芯片的设计不仅要满足每一维分离的需要,而且芯片接口须有效地保证样品的连续切换。本研究提出了用于 MEKC-CZE 二维芯片分离分析系统的双 T 型耦联接口设计,既可根据分析对象设计接口尺寸,又能满足基于时间顺序的微流控二维芯片电泳分离方式的需要。通过双 T 切换接口的设计,降低了操作难度,有效地控制了二维进样量,提高了检测的重现性,避免了二维进样的样品损失。

### 3.2 二维芯片电泳操作参数优化

**3.2.1 MEKC 模式中 SDS 浓度的优化** 在电泳操作过程中,缓冲介质的选择对于减小溶质与管壁的相互作用,克服峰型畸变,改善分离度都具有十分重要的作用。由于 MEKC 模式电泳缓冲溶液中含有大量 SDS 胶束,SDS 浓度是进样和分离操作的关键因素。用含 SDS 胶束的硼砂 ( $10\ \text{mmol/L}$ ) 缓冲液对 FITC 标记的 *L*-Arg, *L*-Lys, *L*-His, *L*-Phe 和 *L*-Tyr 混合样品进行分析,分别考察  $10, 15, 20$  和  $25\ \text{mmol/L}$  的 SDS 对样品分离效果的影响(图 3)。通过氨基酸单样品电泳图谱与混合氨基酸样品图谱的比对,对样品峰进行了识别,分析样品的出峰顺序依次为 *L*-Arg, *L*-Lys, *L*-His, *L*-Phe 和 *L*-Tyr。实验表明:当 SDS 浓度为  $20\ \text{mmol/L}$  时,保留时间、分离度、样品峰形均处于较佳状态,所以 MEKC 缓冲液中 SDS 的浓度选择为  $20\ \text{mmol/L}$ 。

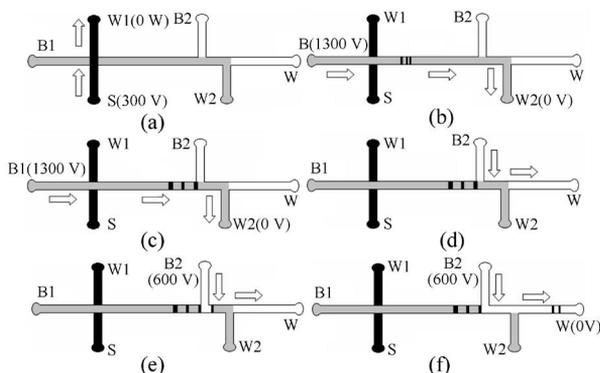


图 2 二维芯片电泳过程及电压施加程序

Fig 2 Protocol of micellar electrokinetic chromatography (MEKC)-CZE procedure and high voltage

a~c: 一维进样、一维分离 (Injection and separation of first dimension); d~f: 二维进样、二维分离及其循环过程 (Injection and separation of second dimension and its circulation)。

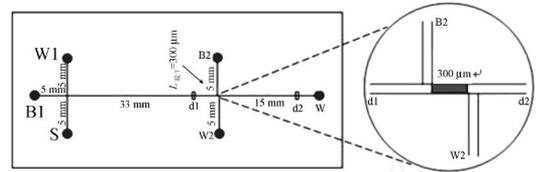


图 1 双 T 切换结构的二维芯片结构示意图

Fig 1 Scheme of two-dimensional CE chip with double T switching interface

微管道宽 (Width of channel)  $80\ \mu\text{m}$ , 深 (Depth of channel)  $25\ \mu\text{m}$ ; S, W, B1, W1 分别为第一维样品池、样品废液池、缓冲液池和缓冲废液池 (Sample cell, waste cell, buffer cell and waste cell for first part, respectively), B2 和 W2 分别为第二维缓冲液池和缓冲废液池, d1 为第一维检测点, d2 为第二维检测点 (B<sub>2</sub> and W were buffer cell and waste buffer cell for second part, respectively. d1 and d2 were the detecting point)。

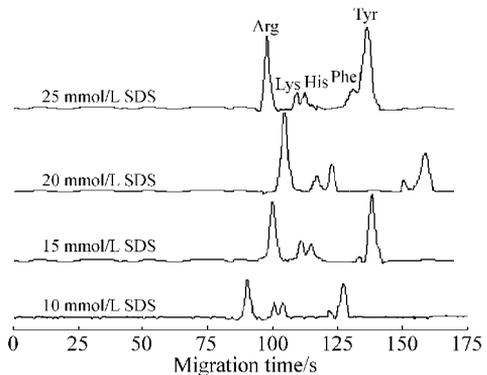


图 3 MEKC 模式中 SDS 浓度对样品分离的影响

Fig 3 Effect of SDS concentration on sample separation in MEKC

缓冲液 (Buffer solution):  $10\ \text{mmol/L}$  硼砂 (Borate), pH 10.0; 进样及分离场强 (Injection and separation field strength):  $300\ \text{V/cm}$ ; 进样时间 (Injection time):  $15\ \text{s}$

**3.2.2 CZE 模式中分离场强的优化** 采用电驱动进样方式具有便于自动控制的优势。在进行混合氨基酸样品芯片电泳分离时,需要合理选择分离场强以达到最佳分离效果。以硼砂缓冲液 (10 mmol/L, pH 10.0) 配制的混合氨基酸为样品,硼砂缓冲液为运行缓冲液,在 3.7 cm 的有效分离长度和 300 V/cm 的进样场强下,考察 200、250、300 和 350 V/cm 的分离场强对分离效果的影响 (图 4)。以各组分之间的分离度作为选择 CZE 模式分离电压的依据,结合混合氨基酸样品分离谱图的信息可见,在 350 V/cm 分离场强下,混合氨基酸的分离度、理论塔板数及样品峰形处于较佳状态,因此,选择 350 V/cm 作为 CZE 芯片电泳分离的分离场强。

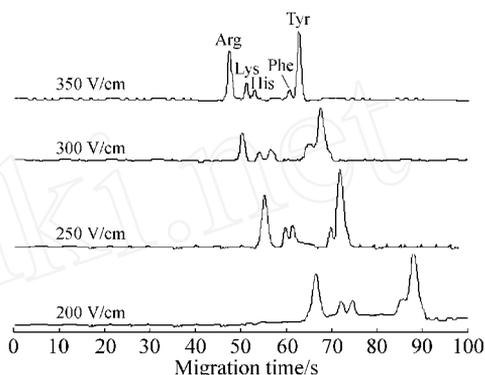


图 4 CZE 模式中分离场强对样品分离的影响

Fig 4 Effect of field strength on sample separation  
缓冲液 (Buffer solution): 10 mmol/L 硼砂 (Borate), pH 10.0;  
进样场强 (Injection field strength): 300 V/cm; 进样时间  
(Injection time): 15 s

**3.2.3 第二维进样时间的选择** 第二维进样时间是指将第一维分离管道中的检测到的样品分段电驱动至第二维分离通道时,每段样品所需的进样时间。以 FITC 标记的 *L*-Arg 为样品,在储液池 B1-S-W1-W2 中注入含 20 mmol/L SDS 的 MEKC 缓冲液,进样场强为 300 V/cm,进样时间 15 s, LIF 检测器的检测点置于 d1,进行第一维 MEKC 芯片电泳分离,通过检测 MEKC 分离过程中 *L*-Arg 样品峰宽,选择合适的第二

维进样时间。*L*-Arg 样品在 MEKC 及 CZE 模式分离中均首先流出,故以 *L*-Arg 单样品为分析对象,得到第一维 MEKC 分离时 *L*-Arg 样品到达双 T 接口处的时间为 45 s,样品峰宽为 16 s。在第一维 MEKC 采集到 *L*-Arg 样品信号之后,将此样品有效切换到第二维 CZE 分离通道。二维进样时间设为 3 s,理论上将会得到 6 个 *L*-Arg 样品节,实际得到 8 个显著的样品峰数。这表明在第二维分离过程中,第一维分离管道中的样品节存在样品区带展宽现象,过多的二维出峰易带来峰识别的困难。将二维进样时间提高到 5 s 后,得到 2 个 *L*-Arg 样品峰。同理,进行了 *L*-Lys, *L*-His, *L*-Phe 和 *L*-Tyr 的二维电泳实验,在第二维进样时间 5 s 时,其在第二维出峰的个数分别为 2, 2, 3 和 3,这在样本峰的分离和识别以及实验过程控制上更为有利。因此,选择二维进样时间为 5 s。

**3.2.4 MEKC-CZE 模式切换时间的优化** 通过 *L*-Arg 样品分段迁移的状况优化 MEKC-CZE 模式切换时间。在采集到 *L*-Arg 样品信号之后,启动二维分离过程,将样品有效切换到第二维 CZE 分离通道。检测点置于 d2 处,第二维 CZE 分离的开启时间分别设定为 45、55 和 60 s,二维进样时间 5 s,第二维 CZE 分离的运行时间 30 s,观测 *L*-Arg 样品节分段迁移状况。二维分离启动时间 45 s 时, *L*-Arg 在第二维分离管道出峰较多,不利于混合样品的分离和峰解析。将二维分离启动时间延长到 60 s 以上,样品节有流失现象,部分 *L*-Arg 样品已被驱动至储液池 W2,无法进行后续分离分析。将切换时间降低至 55 s 时, *L*-Arg 可在第二维分离管道内实现连续切换,得到稳定显著的样品吸收峰,因此,选择第二维电泳分离的启动时间为 50 ~ 55 s。

### 3.3 二维芯片电泳分离混合氨基酸样品

第一维分离缓冲液中的 SDS 在第二维检测点 (d2) 处可能出现响应信号,对二维芯片电泳分离的结果产生干扰。实验在未加样品的情况下获得的二维芯片电泳谱图中未出现由第一维缓冲产生的样品峰,表明缓冲组成的差异对二维检测不存在干扰。

为了考察所构建的二维芯片电泳分离分析系统的效能,进行了二维芯片电泳分离混合氨基酸样品实验,获得的二维芯片电泳谱图如图 5 所示。依据前面的测试结果,根据出峰的数量和顺序,对比分析得知,在第二维分离管道中 *L*-Arg, *L*-Lys 和 *L*-His 被分为 2 个峰, *L*-Phe 和 *L*-Tyr 被分为 3 个峰,并被有效检出,成功地实现了 *L*-Arg, *L*-Lys, *L*-His, *L*-Phe 和 *L*-Tyr 5 种混合氨基酸样品的二维芯片电泳的分离检测。

### 3.4 系统正交性评价

通过对实验数据的分析以及数学模型的建立,用数学的方法来表达不同分离模式之间的正交性,为

多维分离系统的构建提供更明确的指导,是评价多维分离系统中不同分离模式选择性的依据。

实验采用 Gilar 等<sup>[18]</sup>提出的正交性简化几何模型来估算 MEKC 模式与 CZE 模式之间的正交性。该模型首先采用公式 (1) 将每一维分离的保留时间进行标准化:

$$RT_i(\text{norm}) = \frac{RT_i - RT_{\min}}{RT_{\max} - RT_{\min}} \quad (1)$$

其中,  $RT_{\min}$  和  $RT_{\max}$  分别为样品分离的最小和最大保留时间,  $RT_i$  为样品组分  $i$  的保留时间,  $RT_i(\text{norm})$  为  $RT_i$  转化的标准化的保留时间。其范围为 0 ~ 1。

采用标准化的保留时间值得到如图 6 所示的二维分离空间图。二维分离的最大峰容量为  $P_{\max}$  为 5, 将整个二维图形区域划分成 5 个等面积的矩形块。以 bins 代表含有数据点的矩形块, 则二维分离的正交性 (O) 可以用式 (2) 计算:

$$O = \frac{\text{bin} - \sqrt{P_{\max}}}{0.63P_{\max}} \quad (2)$$

包含数据点的块的个数为 4, 总的容量为 5, 用式 (2) 计算得到的 2D 系统的正交性为 56.0%, 表明实验选择的两种分离模式具有较好的正交性。设计的微流控二维电泳芯片切换接口具有合理性和实用性, 适合于构建二维芯片电泳分析系统。

## 4 结 论

以微流控芯片分析系统及多维分离的原理为依据, 研究了基于时间顺序的双 T 型耦联接口实现的玻璃-PDMS 复合结构的 MEKC-CZE 二维芯片电泳芯片, 并由此构建了 MEKC-CZE 二维芯片电泳分离分析平台。在对氨基酸样品的二维分离分析中, 该系统显示出具有避免二维进样样品损失, 切换接口合理且实用的优点, 为痕量生化样品的分离分析提供了新的途径。

## References

- Zhang Yu-Kui (张玉奎), Zhang Wei-Bing (张维冰), Zhang Li-Hua (张丽华). *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), **2003**, 21(4): 299 ~ 302
- Jacobson S C, Koutny L B, Hergenroeder R, Moore A W, Jr Ramsey J M. *Anal Chem.*, **1994**, 66(20): 3472 ~ 3476
- Ramsey J D, Jacobson S C, Culbertson C T, Ramsey J M. *Anal Chem.*, **2003**, 75(15): 3758 ~ 3764
- Gottschlich N, Jacobson S C, Culbertson C T, Ramsey J M. *Anal Chem.*, **2001**, 73(11): 2669 ~ 2674
- Rocklin R D, Ramsey R S, Ramsey J M. *Anal Chem.*, **2000**, 72(21): 5244 ~ 5249
- Xu Yi (徐溢), Shen Ji-Wei (申纪伟), Lu Jia-Li (陆嘉莉), Wen Zhi-Yu (温志渝). *Progress in Chemistry* (化学进展), **2008**, 20(5): 754 ~ 761
- Kim J B, Quirino J P, Qtsuka K. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 916: 123 ~ 130
- Gilar M, Olivova P, Daly A E, Gebler J C. *Anal Chem.*, **2005**, 77(19): 6426 ~ 6434

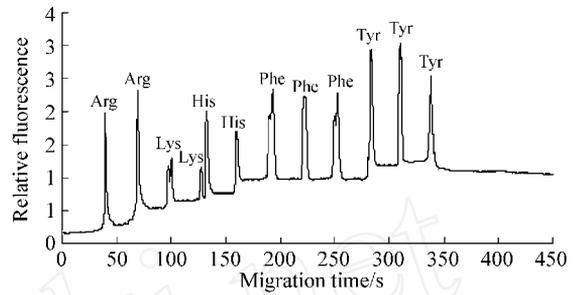


图 5 氨基酸混合样品宽二维芯片电泳分离谱图

Fig 5 Electropherogram of amino acids mixture by 2-D microchip separation

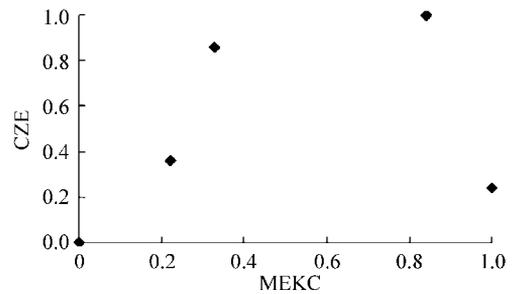


图 6 MEKC 与 CZE 模式正交性计算

Fig 6 Diagram of orthogonality

## Separation and Enrichment of Amino Acids on Micellar Electrokinetic Chromatography-Capillary Zone Electrophoresis Two-dimensional Microfluidic Chip with Double T Switching Interface

XU Yi<sup>1,2,3,4</sup>, SHEN JiWei<sup>3</sup>, CAO Ming-Xia<sup>1,2,3,4</sup>, ZHANG Wen-Pin<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>National key disciplines lab of Novel Micro-nano Devices and System Technology,

<sup>2</sup>International R & D center of Micro-nano Systems and New Materials Technology,

<sup>3</sup>College of Chemistry and Chemical Engineering, <sup>4</sup>Microsystem Research Center,

Chongqing University, Chongqing 400044)

**Abstract** Micellar electrokinetic chromatography-capillary zone electrophoresis (MEKC-CZE) two-dimensional microfluidic chip with double T switching interface based on time sequences separation was designed and the relative analytical system was established. The mixed amino acids labeled by FIIC were taken as samples and separated by this analytical system on the designed MEKC-CZE chip. Several conditions effected on the separation, such as startup time and injection time of the second dimension, were optimized. The separation of amino acids, including L-Arginine, L-Lysine, L-Histidine, L-Phenylalanine and L-Tyrosine, was carried out on the setup microchip. It was illustrated that complete separation of components was realized. The calculated orthogonality of MEKC and CZE was 56.0%.

**Keywords** Two-dimensional microchip electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography-capillary zone electrophoresis, amino acid separation

(Received 19 January 2009; accepted 20 April 2009)

## 2006 ~ 2007 年度《分析化学》优秀论文评选结果公布

为了推动中国科技事业的发展,展现当前分析化学的研究水平和优秀成果,举办 06 ~ 07 年度《分析化学》优秀论文评选活动。凡在本刊 06 年度和 07 年度发表并被 SC 收录的论文均可参评。本刊将把优秀论文的评选作为本刊的例行工作,每年评选一次。旨在鼓励专家学者发表创新性强的研究成果,推动我国分析化学学科的快速健康发展。获奖作者将获得奖金及奖牌证书,将于 10 月 30 日扬州——分析化学年会上颁发。

评选依据:

1. 研究成果在同类研究工作中处于领先水平,研究成果曾获奖或得到同行认可,并经同行专家评议。
2. 论文被 SC 检索,并有被引频次的统计数据,被引频次在本刊同期发表论文中排名靠前。

获奖论文如下:

1. 电喷雾解析电离质谱法对食品中苏丹红染料的快速检测. 陈焕文, 张燮, 罗明标, 2006, 34(44): 464 ~ 468 (吉林大学)
2. 一种基于最小二乘支持向量机算法的近红外光谱判别分析方法. 虞科, 程翼宇, 2006, 34(4): 561 ~ 564 (浙江大学药学院)
3. 氯丙嗪在离子液体 BM IMPF6 修饰玻碳电极上的伏安行为, 李江文, 赵发琼, 肖萍, 曾百肇, 2006, 34(增刊): S5 ~ S9 (武汉大学化学与分子科学学院)
4. 牛血清白蛋白中氨基酸的高效液相色谱荧光测定及质谱鉴定. 石运伟, 明永飞, 王彩萍, 赵先恩, 张蕊, 尤进茂, 2006, 34(4): 503 ~ 507 (曲阜师范大学化学与化工学院)
5. 衍生化固相微萃取与气相色谱质谱联用测定生活垃圾渗沥液中双酚 A. 李向丽, 林里, 邹世春, 蓝崇钰, 栾天罡, 2006, 34(3): 325 ~ 328 (中山大学生命科学院)