2012 年 5 月 色 谱 Vol. 30 No. 5
May 2012 Chinese Journal of Chromatography 440 ~ 444

研究论文

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2011.12041

超支化聚酰胺酯改性聚甲基丙烯酸甲酯微流控芯片的制备及其在生物分子分离检测中的应用

刘 冰[1]， 林 栋[2]， 许 林[1]， 类彦辉[1]， 薄强龙[1]， 寿崇琦[1*]
(1. 济南大学化学化工学院，山东 济南 250022; 2. 滨州医学院药学院，山东 滨州 256603)

摘要: 利用亲水性超支化聚酰胺酯通过化学键合的方法对聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)微流控芯片的表面进行改性。对改性后 PMMA 微流控芯片的表面进行了接触角的测定，利用扫描电子显微镜(SEM)和体视显微镜观察了改性后芯片的表面形貌。结果表明，改性后的 PMMA 微流控芯片表面形成了一层均匀、致密、连续的亲水性涂层，芯片表面的亲水性得到了明显提高，接触角由未改性时的 89.9°降低到 29.5°。改性后芯片的电渗流较之改性前明显降低。利用芯片对腺苷和 L-赖氨酸两种生物分子进行了分离检测。两种生物分子实现了完全分离，所得到的检测峰峰形尖锐，分离清晰。对腺苷和 L-赖氨酸的分离柱效(理论塔板数)分别高达 8.44×10^4 塔板/m 和 9.82×10^4 塔板/m，分离度(R_s)达到 5.31，均远远高于未改性的芯片。改性后的芯片具有良好的分离时间重现性。本研究为提高 PMMA 微流控芯片的亲水性和应用范围提供了一种新的有效方法。

关键词: 超支化聚酰胺酯; 微流控芯片; 表面改性; 亲水性; 氨基酸分离
中图分类号: O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8713(2012)05-0440-05

Preparation of poly(methyl acrylate) microfluidic chips with surface-modified by hyperbranched polyamide ester and their application in the separation of biomolecules

LIU Bing[1], LIN Dong[2], XU Lin[1], LEI Yanhui[1], BO Qianglong[1], SHOU Chongqi[1*]
(*1. School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Jinan, Jinan 250022, China; 2. College of Pharmacy, Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China*)

Abstract: The surface of poly(methyl acrylate) (PMMA) microfluidic chips were modified using hyperbranched polyamide ester via chemical bonding. The contact angles of the modified chips were measured. The surface morphology was observed by scanning electron microscope (SEM) and stereo microscope. The results showed that the surface of the modified chips was coated by a dense, uniform, continuous, hydrophilic layer of hyperbranched polyamide ester. The hydrophilic of the chip surface was markedly improved. The contact angle of the chips modified decreased from 89.9° to 29.5°. The electro osmotic flow (EOF) in the modified microchannel was lower than that in the unmodified microchannel. Adenosine and L-lysine were detected and separated via the modified PMMA microfluidic chips. Compared with unmodified chips, the modified chips successfully separated the two biomolecules. The detection peaks were clear and sharp. The separation efficiencies of adenosine and L-lysine were 8.44×10^4 plates/m and 9.82×10^4 plates/m respectively, and the resolutions (R_s) was 5.31. The column efficiencies and resolutions of the modified chips were much higher than those of the unmodified chips. It was also observed that the modified chips possessed good reproducibility of migration time. This research may provide a new and effective method to improve the hydrophilicity of the PMMA surface and the application of PMMA microfluidic chips in the determination of trace biomolecules.

* 通讯联系人: 寿崇琦，教授，主要从事毛细管电泳、微流控芯片研究. Tel: (0531)82767867, E-mail: scq211@163.com.
基金项目: 山东省自然科学基金项目(No. ZR2010BL003).
收稿日期: 2011-12-14

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Key words: hyperbranched polyamide ester; microfluidic chip; surface modification; hydrophilicity; amino acid separation

聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)微流控芯片因其独特的优势已广泛应用于生命科学领域[1-4]。但由于其表面存在着疏水性、对生物分子产生吸附等不足,需要对其表面进行改性,以提高其表面的亲水性,抑制其对生物分子的吸附[5]。但就目前为止,对 PMMA 微流控芯片表面进行的改性仅限于使用传统的线性聚合物。但线性聚合物通常伴随着溶液浓度的增大,其黏度迅速增大,导致形成的涂层不均匀,并且极易堵塞芯片微通道。另外,线性聚合物还有一个缺点就是可供键合的活性端基数目较少,使形成的亲水性涂层稳定性较差,这也影响了改性的效果[6-8]。因此有必要寻求一种新的、有效的表面改性材料,以抑制分析物在 PMMA 微流控芯片内壁的吸附,提高芯片的分析性能,更好地满足日益增长的 PMMA 微流控芯片分析生物分子的需要。

本研究工作利用亲水性超支化聚酰胺酯通过化学键合的方法对 PMMA 微流控芯片的表面进行改性,并利用改性后的芯片对生物分子进行分离检测。超支化聚合物与线性聚合物相比具有一些独特的性质,如类似球状的结构、分子间不易链缠绕、溶解度高、黏度比线性聚合物低得多、含有大量的活性末端基团等,是一种极具潜力的改性材料[9-13]。

1　实验部分

1.1　仪器与试剂

S-2500 扫描电子显微镜(SEM): 日本日立公司; XTB-1 型体视显微镜: 南京江南光电股份有限公司; DSA100 接触角测量仪: 德国 KRUSS 公司; 微流控芯片检测分析仪: 自制。

L-赖氨酸、腺苷(生物纯,美国 Sigma 公司); 二甲亚砜、对甲苯磺酸(分析纯,天津大茂化学试剂公司); *N*,*N*-二甲基乙酰胺(DMAc)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(分析纯,天津广成化学试剂有限公司); 甲醇(色谱纯,上海化学试剂有限公司); 氢氧化钠(分析纯,莱阳康德化工有限公司)。实验用水为二次去离子水。

PMMA 微流控芯片采用硅模板通过热压法来制备[14]。不同代数的羟基官能化的超支化聚酯酰胺参考文献[15]合成,所制备的第二、三、四代产物分别用 G2、G3、G4 表示。

1.2　芯片表面的改性过程

将 PMMA 微流控芯片用 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液在 0.3 MPa 氮气压力下冲洗 30 min,再用水和 DMAc 顺序冲洗芯片各 15 min,最后用氮气吹干,备用。

将第二代羟基官能化的超支化聚酯酰胺 G2 和对甲苯磺酸(用量为 G2 质量的 0.5%)用 DMAc 配成质量分数为 10% 的改性溶液,用 0.6 MPa 氮气将其压入到芯片的微通道中,然后用水玻璃密封通道端部; 将微通道内充满改性溶液的芯片放入真空干燥箱内,于 80 ℃下反应 8 h,最后依次用甲醇和去离子水冲洗干净,制得一种基于 G2 改性的 PMMA 微流控芯片,改性过程如图 1 所示。采用同样方法可分别得到基于 G3、G4 改性的 PMMA 微流控芯片。

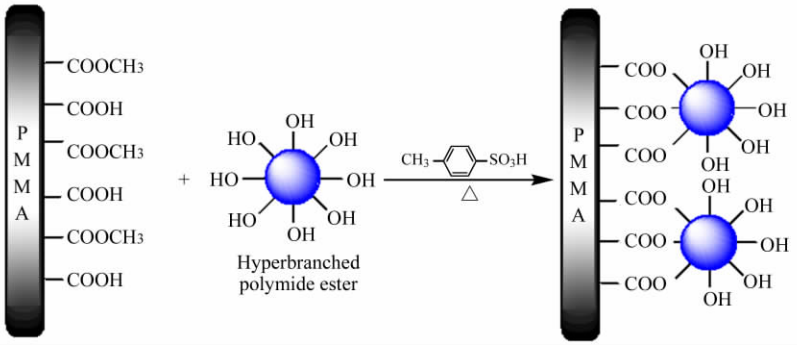

图 1　PMMA 微流控芯片的改性过程

Fig. 1　Modification process of PMMA microfluidic chips

2　结果与讨论

2.1　改性 PMMA 微流控芯片的表面接触角

接触角是指在气、液、固三相交点处所做的气-液界面的切线穿过液体与固-液交界线之间的夹角 θ,是润湿程度的量度; 接触角越小说明其亲水性越

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

好。为了表征改性前后 PMMA 微流控芯片亲水性的变化，采用接触角测量仪测定了改性后的 PMMA 微流控芯片的接触角，所得结果及所测改性后接触角的形状如图 2 所示。

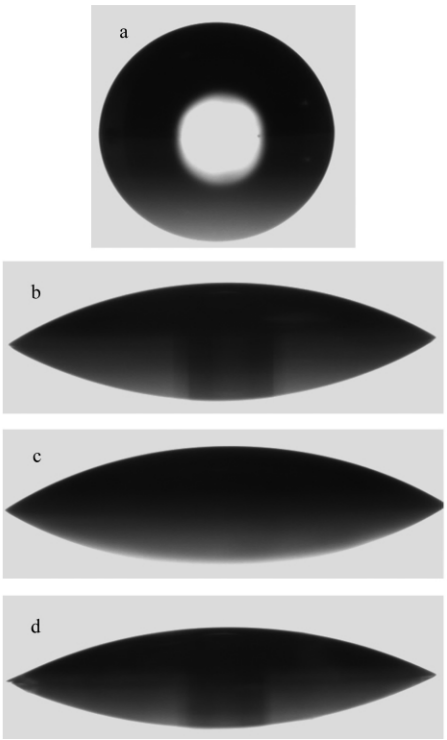

图 2　未改性和改性后 PMMA 微流控芯片的接触角

Fig. 2　Contact angles of unmodified and modified PMMA microfluidic chips

a. original chip, 89.9°; b. G2 modified chip, 36.3°; c. G3 modified chip, 32.7°; d. G4 modified chip, 29.5°.

从图 2 可以清楚地看出，未经改性的 PMMA 微流控芯片的接触角为 89.9°，经过超支化聚酰胺酯改性后，芯片的接触角有了大幅度的下降，尤其是基于 G4 化学键合改性后的芯片其接触角降低到 29.5°。这说明超支化聚酰胺酯已成功地结合到了芯片内壁的表面，在芯片内壁形成了一层均匀致密的亲水性涂层，从而使得 PMMA 微流控芯片表面的亲水性有了质的提高，有效弥补了 PMMA 微流控芯片表面疏水性强的缺陷。

从图 2 也可以看出，随着超支化聚酰胺酯代数的增加，其接触角降低的幅度增大；这是因为随着代数的增加，化合物的相对分子质量增大，三维球状面积增大，分子表面所含与芯片内壁发生作用的羟基数目亦成倍地增加，进而增加了与芯片内壁反应的活性位点，因此形成的亲水性涂层的厚度增加，芯片表面的亲水性更好。

2.2　SEM 分析

为了进一步细致地观察改性前后芯片表面形貌的变化，采用 SEM 对改性前后的 PMMA 微流控芯片的表面形貌进行了表征。图 3 分别为未改性芯片和经 G4 化学键合改性后芯片微通道分别放大 1 000 和 3 000 倍以后的表面形貌的 SEM 照片。

从图 3 可以看出，未经改性的 PMMA 微流控芯片其微通道表面比较粗糙；经 G4 化学键合改性后其表面变得比较光滑，有一层致密的聚合物接枝在上面，这说明超支化聚酰胺酯已成功地接枝到 PMMA 微流控芯片的表面，形成了一层均匀、连续的亲水性涂层。从放大 3 000 倍的图片可以进一步看出，PMMA 微流控芯片经改性后，其表面形貌发生了很大的变化，有一层致密、光滑的亲水性涂层完全覆盖在芯片内壁表面，从而提高表面亲水性。

2.3　体视显微镜分析

为了更形象地观察改性前后芯片的表面形貌，对 G4 改性后的 PMMA 微流控芯片进行了体视显微镜的表征，结果如图 4 所示。

从图 4 也可以看出 PMMA 微流控芯片经 G4 改性后其通道内表面有一层明显的涂层状物质，说明超支化聚酰胺酯已成功地结合到 PMMA 微流控芯片的内表面，形成均匀而致密的亲水性涂层，从而提高了芯片表面的亲水性。

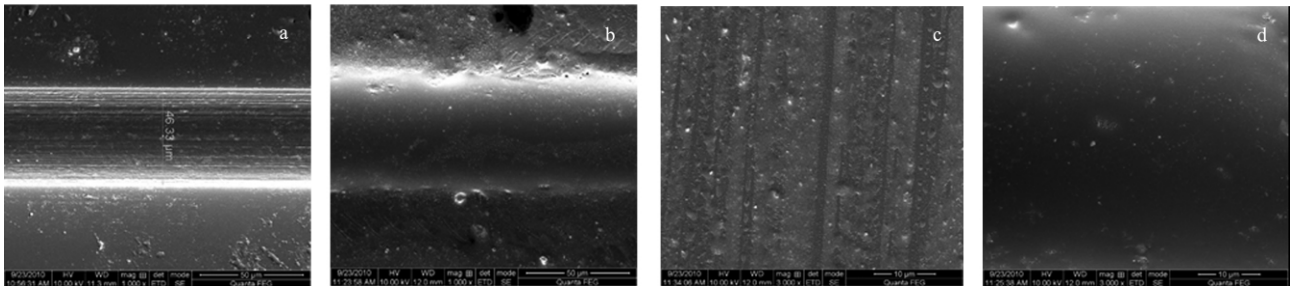

图 3　PMMA 微流控芯片的 SEM 图片

Fig. 3　SEM pictures of PMMA microfluidic chips

Enlarged 1000 times: a. original chip; b. G4 modified chip. Enlarged 3000 times: c. original chip; d. G4 modified chip.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

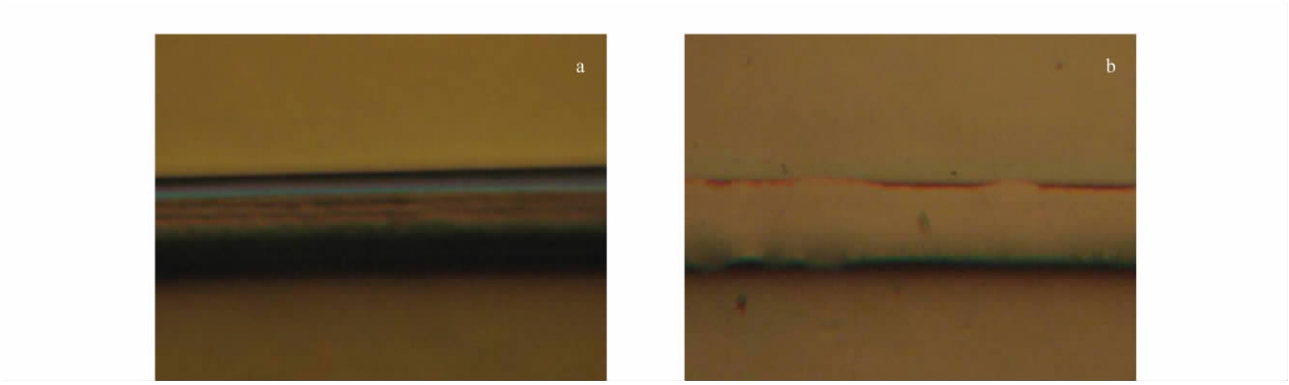

图 4　PMMA 微流控芯片的体视显微镜图

Fig. 4　Stereo microscope pictures of PMMA microfluidic chips

a. original chip; b. G4 modified chip.

2.4　电渗流的测定

以二甲亚砜的水溶液为中性标记物测定了未改性芯片和 G2、G3、G4 改性后芯片在不同 pH 条件下的电渗流,改性芯片的电渗流测定的结果见图 5。可以看出,在 pH 3.0 ~ 9.0 范围内,随着 pH 的增加,未改性和改性后芯片的电渗流淌度均随之增大,但是改性后芯片的电渗流淌度要远远低于未改性芯片的电渗流,这说明超支化聚酰胺酯涂层能有效地屏蔽芯片内壁上羧基等带电基团的解离,使芯片内壁电荷密度减小,从而大大降低了电渗流淌度。

从图 5 中也可以看出,随着超支化聚酰胺酯代数的增加,电渗流淌度降低的程度增大; 这是由于随着代数的增加,其相对分子质量增大,分子内与芯片内壁发生作用的活性基团数目增多,使得亲水性涂层的厚度增加,从而更加有效地屏蔽了羧基等基团的解离,进一步降低了电渗流。

2.5　改性芯片对两种生物分子的分离

利用改性后的芯片对腺苷和 L-赖氨酸进行电泳分析,以评价基于超支化聚酰胺酯改性后PMMA微流控芯片的性能。采用的最佳检测条件: 磷酸盐缓冲液浓度为 40 mmol/L(pH 4.8) ,分离场强为 500 V/cm,检测波长为 214 nm。分别利用 G2、G3、G4 改性的 PMMA 微流控芯片及未改性芯片对 L-赖氨酸和腺苷进行分离,所得谱图如图 6 所示。同时将改性芯片及未改性芯片对两种生物分子的分离柱效和分离度进行了计算,结果列于表 1 中。

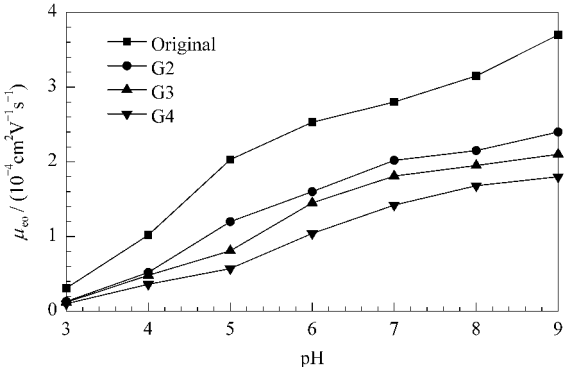

图 5　缓冲液 pH 对改性芯片电渗流淌度的影响

Fig. 5　Effect of the buffer pH on EOF velocity in modified chips

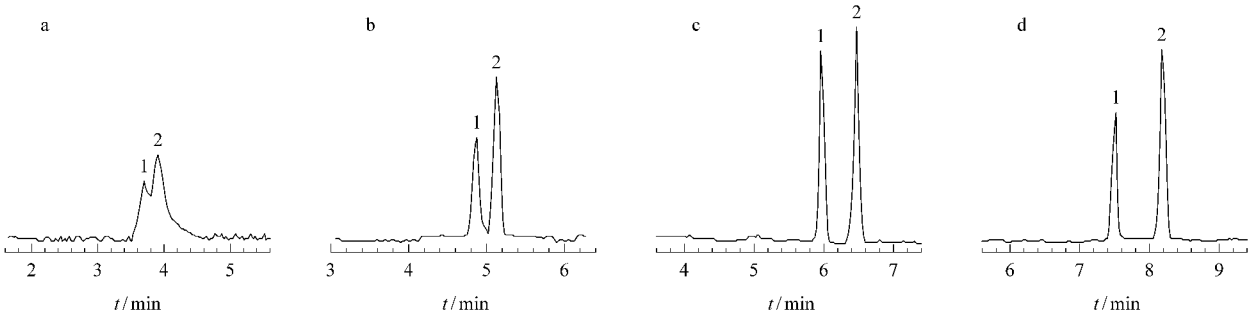

图 6　未改性及改性 PMMA 微流控芯片分离腺苷和 L-赖氨酸的电泳谱图

Fig. 6　Electropherograms of adenosine and L-lysine by unmodified PMMA microfluidic chip and modified PMMA microfluidic chips

a. original chip; b. G2 modified chip; c. G3 modified chip; d. G4 modified chip.

1. adenosine; 2. L-lysine.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 改性芯片与未改性 PMMA 微流控芯片分离腺苷和 L-赖氨酸的柱效与分离度

Table 1 Column efficiencies and R_s of unmodified and modified PMMA microfluidic chips for the separation of adenosine and L-lysine

PMMA microfluidic chip	Column efficiency/ (10^4 plate/m)		R_s
	Adenosine	L-Lysine	
Original chip	0.87	1.26	0.24
G2 modified chip	3.12	3.98	1.59
G3 modified chip	5.76	7.21	3.28
G4 modified chip	8.64	9.82	5.31

从图 6 可以明显地观察到未经改性的 PMMA 微流控芯片没有对腺苷和 L-赖氨酸实现有效的分离，所得到的检测峰展宽，峰形较差，而且出现了拖尾现象，这是由于生物分子与芯片内壁由于疏水相互作用等原因出现了严重的吸附所致；而经过超支化聚酰胺酯改性的 PMMA 微流控芯片，其芯片内壁上具有一层致密的亲水性涂层，这层亲水性涂层有效地抑制了芯片内壁对生物分子的吸附，从而成功地实现了对两种生物分子的分离，所得到的检测峰峰形尖锐，分离清晰。从图 6 中也可以看出，随着超支化聚酰胺酯代数的增加，组分的迁移时间随之延长，这是由于随着代数的增加，使形成的涂层更加均匀致密，芯片电渗流减小，进而使得迁移速率降低所致。从表 1 中的数据可以看出，基于亲水性超支化聚酰胺酯改性后的 PMMA 微流控芯片其分离柱效和分离度有了明显的提高，尤其是基于 G4 改性的芯片对腺苷和 L-赖氨酸的分离柱效（理论塔板数）分别高达 8.64×10^4 塔板/m 和 9.82×10^4 塔板/m，分离度达到 5.31，大大提高了 PMMA 微流控芯片的灵敏度，进一步改善了其分离分析性能。

从表 1 中数据也可以看出，随着超支化聚酰胺酯代数的增加，分离柱效和分离度也随之增加，这是由于代数增加，其相对分子质量增大，其在芯片内壁表面形成的亲水性涂层厚度增加，从而更好地提高了芯片表面的亲水性，更加有效地抑制了对生物分子的吸附，得到了更加理想的分离效果。

2.6 改性芯片的重现性

改性的 PMMA 微流控芯片不但要使亲水性提高，有效抑制吸附，能够在较宽的 pH 范围内实现较高的分离效率，而且还应具备良好的重现性。采用基于 G4 改性的芯片对腺苷和 L-赖氨酸连续 5 次进样分析，其平均迁移时间分别为 7.48 和 8.26 min，其相对标准偏差（RSD）分别为 1.71% 和 1.07%；分离柱效分别为 8.40×10^4 塔板/m 和 9.47×10^4 塔板/m，RSD 分别为 2.29% 和 1.96。该结果表明基于超支化聚酰胺酯改性的 PMMA 微流控芯片具有良好的重现性，这主要是因为超支化聚酰胺酯在芯片内壁上形成稳定的亲水性涂层，近似球状结构的超支化聚酰胺酯分子末端含有大量的羟基，通过化学键牢固地键合于芯片微通道内壁上，保证了亲水性涂层牢固可靠，进而使改性后芯片能够具有良好的重现性。

3 结论

本研究利用超支化聚酰胺酯通过化学键合的手段对 PMMA 微流控芯片的表面进行改性，使其表面形成一层均匀、致密、连续的亲水性涂层，大大提高了芯片表面的亲水性，同时有效地抑制了电渗流。利用改性芯片对腺苷和 L-赖氨酸进行了分离检测，与未改性芯片相比，改性后的芯片有效抑制了对分析物的吸附，成功地实现了对两种生物分子的分离，所得到的检测峰分离清晰，大大提高了 PMMA 微流控芯片的分离性能。

参考文献：

[1] Vilkner T, Janasek D, Manz A. Anal Chem, 2004, 76(12): 3373

[2] Qin J H, Liu T J, Lin B C. Chinese Journal of Chromatography (秦建华，刘婷姣，林炳承. 色谱), 2009, 27(5): 655

[3] Yao B, He Q H, Du W B, et al. Chinese Journal of Chromatography (姚波，何巧红，杜文斌，等. 色谱), 2009, 27(5): 662

[4] Haeberle S, Zengerle R. Lab Chip, 2007, 7(9): 1094

[5] Li B C, Qin J H. Iconography for Laboratory on a Microfluidic Chip. Beijing: Science Press (林炳承，秦建华. 图解微流控芯片实验室. 北京：科学出版社), 2008

[6] Dang F, Kakehi K, Cheng J, et al. Anal Chem, 2006, 78(5): 1452

[7] Henry A C, Tutt T J, Galloway M, et al. Anal Chem, 2000, 72(21): 5331

[8] Liu J, Pan T, Woolley A T, et al. Anal Chem, 2004, 76(23): 6948

[9] Jikei M, Kakimoto M. Prog Polym Sci, 2001, 26(8): 1233

[10] Fang K J, Xu Z G, Jiang X, et al. Polymer Bulletin, 2008, 60: 533

[11] Xia M, Luo Y J, Zhang W S. Engineering Plastics Application (夏敏，罗运军，张文栓. 工程塑料应用), 2007, 35(3): 12

[12] Hong C Y, You Y Z, Wu D C, et al. J Am Chem Soc, 2007, 129(17): 5354

[13] Yang W, Lin D, Xu L, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (杨文，林栋，徐磊，等. 分析化学), 2011, 39(6): 890

[14] Du X G, Guan Y X, Wang F R, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (杜晓光，关艳霞，王福仁，等. 高等学校化学学报), 2003, 24(11): 1962

[15] Lin D, Liu B, Xu L, et al. J Appl Polym Sci, 2011, 121(2): 957

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net