

## 阵列式多通道芯片液相色谱初探

周拙恒 刘娅 张博\*

(厦门大学化学化工学院, 厦门 361005)

**摘要** 分离技术的微型化不仅可以节约试剂和样品,还具有高效、快速、高分辨和高通量等优点。本研究以微流控芯片作为液相分离平台,构建了阵列式并行多通道分离与多道检测系统。基于玻璃芯片、聚甲基丙烯酸甲酯芯片和聚二甲基硅氧烷芯片构建了三重复合芯片作为分离平台,实现了单张芯片上 8 个色谱填充床的制备。芯片系统的承压考察实验证明,玻璃芯片可以作为可靠的芯片材料支持压力驱动的芯片液相色谱。通过层级式分流获得单根芯片柱 300 nL/min 的纳升级流速。考察了 8 通道芯片色谱分离的可行性和有效性,获得了 80000 plates/m 的优良柱效和保留时间 RSD=1.1% 的柱间重现性。以蛋白酶解物为样品,考察了此系统在复杂生物样品高通量分离分析中的应用潜能。

**关键词** 微流控芯片; 液相色谱; 芯片色谱; 并行多道; 高通量

### 1 引言

自 1990 年 Manz 等<sup>[1]</sup>将电泳操作单元引入微流控芯片上以来,芯片电泳技术得到了长足发展<sup>[2]</sup>。毛细管平台与芯片平台在液体尺度上大体相近,得益于毛细管电泳技术的不断发展和完善,各种电泳模式逐步从毛细管向芯片实现自如转换,展示出广阔的应用前景。与电泳相比,液相色谱具有更好的重现性和稳定性;同时,由于流动相与固定相的作用机理可以有多种选择,使其对分析物种类覆盖范围更宽。近几十年来,高效液相色谱(HPLC)已成为药物研发、环境保护、食品安全以及生物医学研究中最重要分离分析手段。但由于填充技术、接口技术、进样技术和仪器自动化等多方面的挑战,芯片液相色谱的发展远比芯片电泳迟缓<sup>[3]</sup>。在液相色谱平台的微型化方面,毛细管微径柱色谱,特别是纳流液相色谱(Nano-LC)走在了发展前沿,已逐步成为蛋白质组学分析的主要方法之一,Nano-LC与质谱联用是目前大规模蛋白质鉴定的重要方法。与毛细管相比,微流控芯片与之尺度相当,在微型化层面能满足几乎所有技术要求。微流控芯片能够通过微加工技术使得管路一次成型,有效避免了由于连接不当带来的死体积;并且由于其集成性能强,样品的前处理和下游目标组分提取单元可以很好地与分离单元集成;此外,分离通道自身可以实现阵列化集成,从而缩短整个 workflow 时间,提高分析效率。可以预见,芯片液相色谱在蛋白质组学的样品分离中有广阔的应用前景。

对于芯片液相色谱系统而言,色谱柱加工技术无疑是整个分离平台的核心,芯片液相色谱脱胎于毛细管液相色谱,相关的柱加工技术可以借鉴使用。同时,由于微加工技术的发展,也相应出现了基于微制造的原位柱制作技术。最早出现的芯片柱加工技术是开管柱,其制作简单,在所有制柱技术中最容易实现。Jacobson 等<sup>[4,5]</sup>在玻璃芯片上键合 C<sub>18</sub>固定相用以分离染料,理论塔板高度达到了 4.5 mm。开管柱加工便捷,柱再生容易,但是由于其相比太低、柱容量有限,样品很容易过载,因而近二十年来发展缓慢。为了提高柱内固定相比表面积,He 等<sup>[6]</sup>提出了 COMOSS( Collocated monolith support structures)结构,该结构利用微加工技术在芯片分离通道中直接刻蚀出完全均一的微柱结构,用以提供固定相载体,并在表面键合聚苯乙烯磺酸作为固定相,用于反相模式的电色谱分离,在 4.5 cm 长的柱床中获得了 35000 塔板数。然而,这种逐步“雕刻”柱床的方式加工成本过高,制约了其进一步研发和普及应用。

2018-12-07 收稿; 2019-01-20 接受

本文系国家自然科学基金项目( Nos. 21475110, 21535007, J1310024)、中央高校基本科研业务费( No. 20720160051)和厦门市科技计划项目( No. 3502Z20173019)资助

\* E-mail: bozhang@xmu.edu.cn

与通过表面修饰形成的固定相不同,填充柱有更大的比表面积和柱容量。不同的商品化填料也为各类分析物的分离提供了便利。Yin等<sup>[7]</sup>自2005年起连续介绍了Agilent公司研制的高性能液相芯片色谱/质谱联用系统。他们利用激光烧蚀技术在聚酰亚胺芯片上设计了150 mm的分离孔道,填充3.5 mm Zorbax 300-SB C<sub>18</sub>反相填料,同时集成了纳升级进样阀和电喷雾质谱喷嘴,后端与质谱系统连接。该系统性能稳定,成功应用于糖基化和磷酸化蛋白的分离分析。类似地,整体材料也被引入芯片色谱中,通常采用光照或加热诱导芯片孔道中的单体溶液在原位发生聚合反应,形成连续的多孔结构柱床。通过三甲氧基硅烷基正丙基甲基丙烯酸酯进行表面功能化处理,Zeng等<sup>[8]</sup>在聚二甲基硅氧烷(PDMS)芯片上制得了键合有 $\beta$ 或 $\gamma$ -环糊精的聚甲基丙酰胺整体柱床用于氨基酸的手性分离。Throckmorton等<sup>[9]</sup>在玻璃芯片上采用紫外引发方式,聚合生成7 cm长的甲基丙烯酸酯类整体柱并应用于多肽分离,在45 s内分离出6种多肽。

目前,芯片液相色谱均为单个分离通道,相比于纳流液相色谱而言,只是平台的方式由毛细管变为微流控芯片,并未充分发挥芯片在集成化方面的优势。由于生物医学样本数目多、体积小、成分复杂,迫切需要微尺度、高分辨、高通量的分离分析工具。基于微流控芯片的多通道微纳尺度分离平台成为理想选择。虽然核酸的高通量分析已经成功地使用了96通道的毛细管和芯片电泳平台,并出现了商品化的仪器,已经广泛地应用在第一代基因测序中<sup>[10]</sup>,但多通道的空心毛细管或芯片孔道无需填充,不仅制备和再生成本低,且简单易行<sup>[11]</sup>。相对而言,多通道的微纳色谱系统还鲜见报道,这主要是由于多根芯片柱的加工更具挑战。此外,对于压力驱动的液相色谱系统而言,承压与密封是关键。常用的PDMS芯片虽然易于设计和加工,但其弹性和透气属性使其无法胜任芯片上的HPLC操作<sup>[12]</sup>。综合来看,石英毛细管、PDMS芯片、PMMA芯片与玻璃芯片在微纳尺度加工和液相分离平台构建方面各有优缺点<sup>[12]</sup>,如何有机地组合使用这些材料是有效构建微纳液相色谱分离系统的关键。

本研究利用芯片在多通道、多流路集成方面的特点,发展了阵列式液相色谱芯片,进行高通量微纳尺度液相分离。本研究在多通道色谱芯片设计与加工,以及芯片柱制备方面取得的阶段性成果,对其可行性和有效性进行了初步评价。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器、试剂与材料

JKG-2A光刻机(上海光学机械厂); Nikon L150金相显微镜(日本NIKON公司); CK-250L超声波打孔机(汕头市金士达超声机器制造公司); Centurion Q50烤瓷炉(美国NEY公司); Harvard PHD 2000精密注射泵(美国Harvard公司); KQ-50DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。依利特P230高压泵(大连依利特分析仪器有限公司); 手动泵(美国Unimicro Technologies公司); PDC-002等离子体处理机(美国Harrick Plasma公司); Ultimate 3000纳流泵(美国Thermo Fisher公司); 200 nL手动进样阀(荷兰Valco Instrument公司); ActiPix D100多道紫外柱上检测器(英国Paraytec公司)。

去铬液(硝酸铈铵洗液: 50 g硝酸铈铵加12 mL HClO<sub>4</sub>,加水至300 mL); 玻璃腐蚀液(HF-HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O 5:10:85, V/V); 二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、三氟乙酸(分析纯,美国Sigma-Aldrich公司); 血管紧张素、细胞色素C、胰蛋白酶(试剂级,美国Sigma-Aldrich公司); 乙腈(色谱纯,德国Merck公司); 实验用水为Milli-Q超纯水系统(美国Millipore公司)制备的超纯水。

匀胶铬版玻璃基片(型号SG2506,等级Um, 铬层厚度145 nm,光胶类别Az1805,胶厚570 nm)以及同型号抛光片均购自长沙韶光微电子公司; PMMA芯片(深圳日昌亚克力有限公司); 螺丝密封胶圈(厦门大学化学化工学院金工室); PEEK接头(美国IDEX公司); 弹性石英毛细管(50 mm i.d., 365 mm o.d., 永年锐泽色谱器件有限公司); PTFE套管(美国Sigma-Aldrich公司); PDMS单体和固化剂(美国Dow Corning公司)。

### 2.2 实验方法

**2.2.1 芯片设计与制备** 本研究所用多通道芯片如图1所示。芯片主体结构采用玻璃芯片键合而成,在

其上游的石英毛细管输送液体,通过 PEEK 接头连接玻璃芯片;在其下游的玻璃芯片与 PDMS 芯片通过等离子体键合,并在 PDMS 芯片上插入石英毛细管,导出每一通道的色谱流出液至下游的光学检测单元。

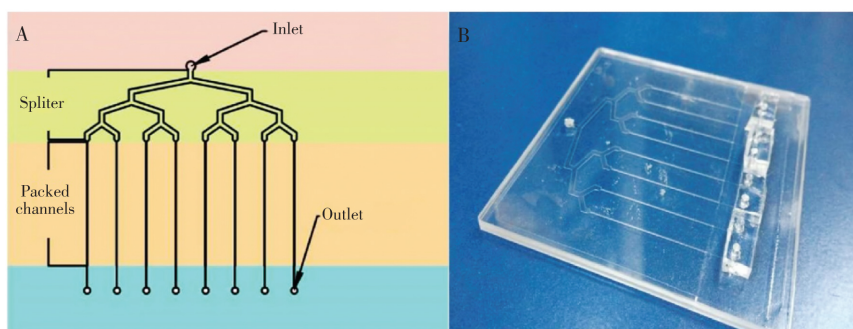


图 1 阵列式色谱芯片设计图(A)与芯片实物(B)

Fig.1 Design of array column chromatography chip (A) and photo of real device (B)

玻璃芯片采用标准光刻结合湿法腐蚀制作(步骤如图 2): (1) 绘制掩膜 用 AutoCAD 绘图软件设计出芯片结构,委托深圳清溢光电股份有限公司加工成 60 cm×60 cm 光刻掩膜菲林片。(2) 曝光 使用 JKG-ZA 光刻机进行曝光。曝光前用氮气将掩膜版吹净,在暗室黄光下,将掩膜版带有微图形的一面朝下,小心覆盖在铬版玻璃基片上,并尽量避免相对移动,以免擦伤铬版表面的光刻胶,同时应避免用手触摸铬版玻璃涂有光刻胶的一面。掩膜版与铬版玻璃对准后,放置在光刻机光圈下方,使光刻机光源发出的紫外光透过掩膜版照射到涂有光刻胶的玻璃基片上,曝光时间为 80 s。(3) 显影 使用 0.5% NaOH 显影液进行显影,显影时间为 7 s,轻微晃动玻璃片,以大量超纯水中冲洗,浸泡 5 min 后,取出用氮气吹干,135℃下烘 15 min,起坚膜的作用,显微镜下观察光刻效果。(4) 去铬层 将光刻好的玻璃基片置于去铬液中,浸泡振荡 60~70 s,超纯水冲洗干净。显微镜下观察微通道部分的 Cr 层完全除去。(5) 刻蚀通道 将去铬层的玻璃基片浸入盛有腐蚀液的塑料烧杯中,使铬板玻璃与腐蚀液充分接触,然后将其转移至恒温水浴锅中。控制恒温水浴锅温度为 45℃,根据所要得到的通道宽度、深度确定刻蚀时间(1 h),锥尾孔道部分因所需尺寸较小,第一次刻蚀时用胶带封住。刻蚀后取出,以大量流动超纯水冲洗干净,氮气吹干,此时玻璃基片表面获得一定深度的微凹槽结构。(6) 二次刻蚀 将锥尾部分胶带揭开,暴露孔道继续刻蚀 15 min,得到锥尾部分孔道。(7) 去光刻胶和铬层 将腐蚀有微凹槽的玻璃基片置于丙酮中浸泡、轻轻振荡,去除光刻胶。待玻璃表面由红棕色变为亮黄色,取出,以超纯水彻底清除基片表面的光刻胶。将玻璃置于去铬液中浸泡,直到露出透明的玻璃表面为止,以超纯水冲洗干净。(8) 超声钻孔 采用 CK-250L 超声波打孔机以超声钻孔的方式在玻璃芯片相应的位置上加工小孔。芯片入口孔径为 2 mm,出口孔径为 0.5 mm。(9) 键合前预处理 将玻璃基片和盖片依次经丙酮、乙醇、超纯水各超声清洗 10 min,以除去玻璃基片表面的残余光胶、玻璃碎片、尘埃颗粒等。将玻璃基片与盖片在浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(3:1, V/V) 溶液中浸泡 8~12 h。(10) 高温键合 将玻璃基片和盖片从浓硫酸中取出,在流动的超纯水中清洗,至玻璃表面形成薄薄的水膜,将基片和盖片合并,用氮气吹干。接着放入程序升温烤瓷炉中,设置升温程序:10 min 内从室温升至 100℃,恒温 1 h,然后在 30 min 内升至 580℃,恒温键合 2 h,再缓慢降至室温。键合前,在芯片的下面和上面分别垫表面清洁后的硅片,并用铁夹将其固定,以保证芯片的平整和光洁,并能防止键合过程中基片和盖片之间出现相对滑动。

**2.2.2 芯片柱填充** 将 1 mg 5 mm C<sub>18</sub> 反相填料与 1.5 mL 乙腈在超声条件下混匀,制得填料匀浆液,用高压恒流泵填充,在用高压泵填充之前可先用手动泵预填充约 0.1 cm,使其形成基石效应,形成稳固的柱塞。在用高压泵填充时,首先使用较低压力填充,当填充到 2 cm 时,使用高压填充。在倒置显微镜下观测,当填充到所需要的长度(2.5 cm)时,可不再加压,待其压力降到 0 psi 时,卸下芯片,完成填充。在芯片柱使用之前,需连接至高压泵对柱床进行平衡和压实。由于在芯片柱床的入口端没有柱塞,在使用过程中避免柱压的骤降,降低填充床弹出的风险。

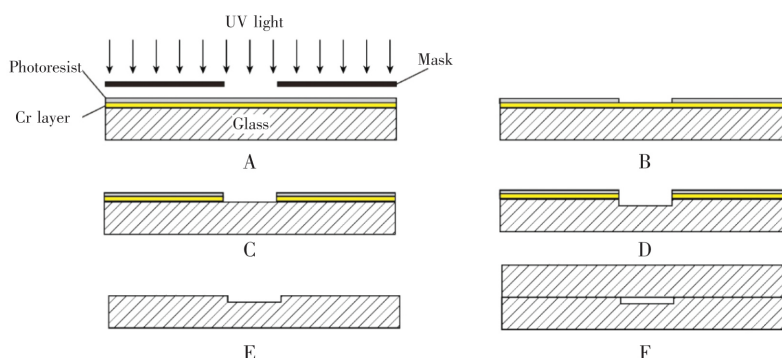


图2 玻璃芯片加工流程

(A) 曝光; (B) 显影; (C) 去铬层; (D) 刻蚀通道; (E) 去光刻胶和铬层; (F) 高温键合。

Fig.2 Fabrication workflow of the glass chip

(A) Exposure; (B) Development; (C) Removal of Cr layer; (D) Etching channel; (E) Removal of photoresist and Cr layer; (F) High temperature bonding.

**2.2.3 接口设计与加工** 由于芯片柱阵列需要和上游的纳流泵以及下游的光学检测器耦合,因此需要设计牢固的芯片接口装置。在入口端,在两块 $3\text{ cm}\times 8\text{ cm}$ 的PMMA芯片上利用车床铣出4个螺纹孔,以4个不锈钢螺钉固定两张芯片。两张PMMA芯片内部依次夹入PEEK接头、密封圈和玻璃芯片。在其中一片中央钻出孔径为 $2\text{ mm}$ 的圆孔用以固定PEEK接头,接头与玻璃芯片连接处点入 $0.8\text{ mm}$ 的橡胶圈密封。经承压测试,入口端在 $600\text{ psi}$ 条件下无漏液情况发生。入口密封装置示意图如图3所示。

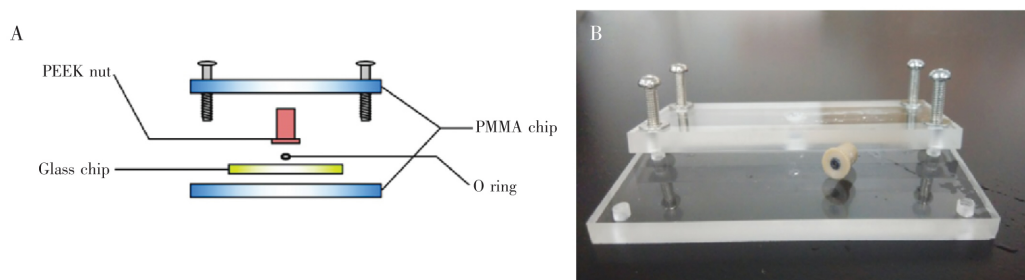


图3 入口端三层夹具型耐压接口设计(A)与实物(B)

Fig.3 Sandwich configuration for the high pressure entry interface design (A) and photo of the real device (B)

芯片出口端需与毛细管连接,用以将洗脱液接出,进行柱上紫外检测。将PDMS单体与固化剂以质量比 $10:1$ 混合,充分搅拌混匀,倒入玻璃培养皿中,真空脱气。将盛有预聚体的培养皿放入电热鼓风干燥箱中, $65^\circ\text{C}$ 固化 $2\text{ h}$ 。将固化好的PDMS切割成 $0.5\text{ cm}\times 1.0\text{ cm}$ 小块,中央位置用打孔器开孔径为 $1.2\text{ mm}$ 的小孔。打孔后的小块和玻璃芯片一起放入等离子处理机真空处理 $2\text{ min}$ ,将小块上的孔和芯片上的孔对准后贴合,然后依次在孔内插入PTFE套管和毛细管,实现毛细管和芯片的连接(图4)。

**2.2.4 蛋白酶解** 称取 $6\text{ mg}$ 细胞色素C,溶于 $150\text{ mL}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 缓冲溶液( $40\text{ mmol/L}$ ,  $\text{pH } 8.0$ )中,加入 $48\text{ }\mu\text{L}$  DTT溶液( $50\text{ mmol/L}$ ), $56^\circ\text{C}$ 水浴 $45\text{ min}$ 。冷却至室温后加入 $162\text{ }\mu\text{L}$  IAA( $55\text{ mmol/L}$ )。黑暗中放置 $30\text{ min}$ 。加入适量的胰蛋白酶,使蛋白质与酶的质量比为 $50:1$ , $37^\circ\text{C}$ 下水浴 $2\text{ h}$ 。加入等量的酶, $37^\circ\text{C}$ 水浴 $17\sim 18\text{ h}$ 。加入适量甲酸终止反应。将此样品脱盐,加入适量的缓冲液,于 $-20^\circ\text{C}$ 保存,待用。

**2.2.5 芯片色谱分离** (1) 烷基苯色谱分离条件 样品: 烷基苯,进样量: $200\text{ nL}$ (每柱 $25\text{ nL}$ )。流动相:  $60\%$ ( $V/V$ )乙腈,总流速: $2.4\text{ mL/min}$ (每柱 $300\text{ nL/min}$ )。检测波长: $214\text{ nm}$ 。(2) 蛋白酶解物色谱分离条件 样品: 细胞色素C酶解产物,进样量: $200\text{ nL}$ (每柱 $25\text{ nL}$ )。流动相A:  $0.05\%$ ( $V/V$ )三氟乙酸溶液;流动相B:  $0.05\%$ ( $V/V$ )三氟乙酸的乙腈溶液。梯度洗脱:  $0\sim 4\text{ min}$ ,  $5\%$  B;  $4\sim 30\text{ min}$ ,  $5\%\sim 60\%$  B;  $30\sim 60\text{ min}$ ,  $60\%$  B。总流速: $2.4\text{ mL/min}$ (每柱 $300\text{ nL/min}$ )。检测波长: $214\text{ nm}$ 。

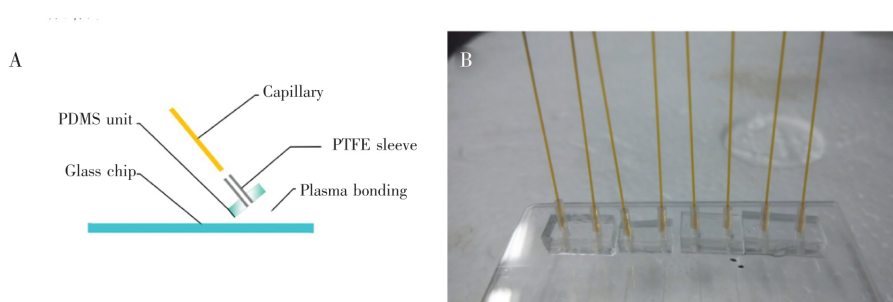


图 4 出口端接口设计( A) 与实物( B)

Fig.4 Design of exit interface ( A) and photo of real device ( B)

PDMS, Polydimethylsiloxane; PTFE, poly( tetra fluoroethylene).

### 3 结果与讨论

#### 3.1 芯片设计与加工

本研究采用的芯片设计如图 1 所示。此芯片分为 4 个功能区域: ( 1) 样品与液体引入区、( 2) 分流区、( 3) 填充柱床区、( 4) 出口区。由于采用了压力模式的液相色谱分离, 所以芯片主体材料选择了能够耐受高压的玻璃芯片。然而, 在选择芯片的上下游接口材料时, 除了承压问题, 还需要综合考虑芯片材料的易加工性。因此, 在样品与液体引入区, 在玻璃芯片母体之上, 以三层夹心的方式在玻璃芯片上下层耦合了 PMMA 芯片。这主要是因为 PMMA 材料易于螺纹钻孔, 通过 PEEK 螺丝与刃环引入并固定上游的石英毛细管, 实现压力下液体的导入( 图 3)。

在出口区, 为了将液体导出至下游的光学检测单元, 使用了 8 根石英毛细管。由于在芯片色谱分离的末端( 即出口区) 是降压的终点, 故无需担心压力密封问题。同样, 从易于加工的角度考虑, 出口区选用了弹性 PDMS 芯片, 既有利于钻孔插入毛细管, 又可与玻璃芯片稳定键合, 加工难度明显降低。

针对微纳尺度流体的获得与控制, 通常采用大比例分流比的方式获得, 如母液流速 1 mL/min, 采用 1:1000 的分流比, 即可获得 1 mL/min 的流速。本研究需要同时获得 8 个通道的纳升级流速。采用如图 1 所示的( 分流区) 层级分流的方案, 即将母液以 1 分 2、2 分 4、4 分 8 的方式逐级分为每个通道 1/8 的母液流量。本研究中, 纳流泵输送的母液流量控制在 2.4 mL/min, 即可获得每个通道 300 nL/min 的流量。研究表明, 在保证加工准确无误( 包括光刻、芯片对准等) 的情况下, 此芯片可以稳定可靠地获得纳升级的流量。

#### 3.2 芯片柱床填充

与经典的柱液相色谱方式相同, 芯片柱的制备也是实现芯片色谱的技术关键。本研究组创建的单颗粒塞法能够很好地解决毛细管填充柱的制备问题<sup>[13-18]</sup>。类似地, 芯片柱的填充首先也要解决柱塞的问题, 即将填料颗粒限制在芯片柱床中, 同时载液又能排出。基于芯片的可加工性, 本研究直接在芯片柱床的下游设计制造了细内径的锥尾孔道( 图 5), 使填料颗粒形成基石效应<sup>[13]</sup>, 将填料限制于柱床内。此锥尾孔道宽度 20 μm, 对于 5 μm 填料, 能够很好地形成基石效应, 且填料不流失。

阵列式的 8 根芯片柱是逐一填充完成的。先将匀浆液由样品及洗脱液入口引入; 同时, 将 7 根芯片柱的下游出口堵塞, 仅留下欲填充的芯片柱下游保持敞开。待该芯片柱床填充完毕, 即停止填充; 然后将填充好的芯片柱床尾端封闭, 同时打开下一根欲填充柱床的封堵, 其余 7 根保持封闭, 依次填充至 8 根柱床全部填充完毕。

微通道尺寸如下: 分流区孔道宽度 300 μm, 柱床宽度 100 μm, 柱床长度 25 μm, 锥尾部分宽度 20 μm, 锥尾部分长度 5 μm。

对制备好的芯片柱床形貌进行了表征, 割去芯片柱床一段喷铂后拍摄扫描电镜图。如图 5 所示, 芯片孔道因化学刻蚀呈倒 U 型, 填充床在同一横截面处紧密程度一致, 在柱床两侧边缘区域仍然有较好的填充床。

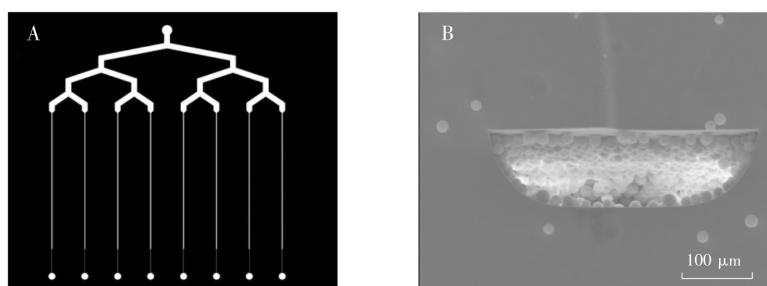


图5 (A) 芯片柱掩膜设计图; (B) 芯片柱床电镜图

Fig.5 (A) Mask design chip chromatography columns; (B) Scanning electron microscopy (SEM) image of a packed chip column bed

### 3.3 平台构建

在芯片柱阵列装置的入口端依次连入 PEEK 接头、PTFE 套管和毛细管; 毛细管另一端连接进样阀和高压纳流泵(图6)。柱阵列下游插入 8 根相同长度(10 cm)的毛细管(50 μm ID), 毛细管距末端 3 cm 处用电阻丝烧出 1 cm 宽光学检测窗口, 将 8 根毛细管捆扎成束置于多道紫外检测器的检测卡槽中。搭建完成后的平台如图 6 所示。使用了 ActiPix 多通道紫外检测器, 此检测器基于紫外分光光度法, 能够同时容纳 1~8 个通道的毛细管同步检测。本研究选定波长 214 nm, 对烷基苯和多肽混合物进行分析。

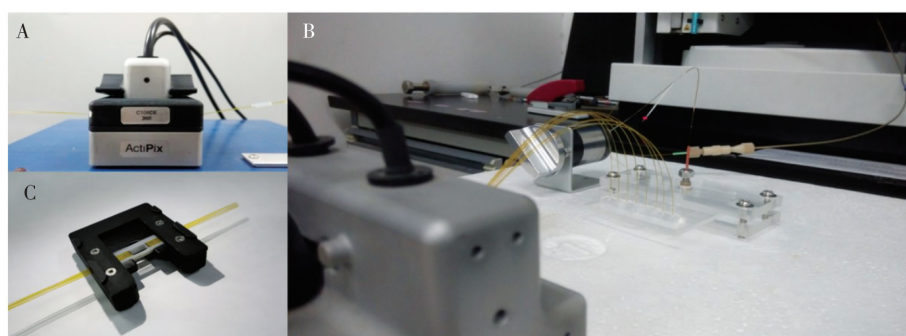


图6 阵列式芯片色谱操作平台: (A) 阵列式光学检测器; (B) 芯片色谱系统全貌; (C) 8 柱检测窗口集束

Fig.6 Array chip chromatography platform: (A) array optical detector, (B) total layout of the array chip chromatography system, and (C) cartridge for the 8 column optical detection windows

### 3.4 芯片色谱应用与评价

首先在等度洗脱条件下考察了此芯片柱的分离效果。以 4 种烷基苯的混合物为标准品, 在 60% (V/V) 乙腈条件下进行等度分离。由图 7 可见 4 种烷基苯均获得了良好的分离, 且 8 根芯片柱之间重现性良好。以最后一个峰即丁苯为标准, 计算 8 根芯片柱平均柱效为 2000 plates, 即 80000 plates/m, plate 高度 12.5 mm。显然, 对于 5 mm 硅胶颗粒填料, 柱效令人满意。但是, 需要指出的是, 此芯片柱的前端(分流区)和后端(毛细管)的连接管路都会造成死体积, 并影响柱效。

在梯度洗脱条件下, 以蛋白质细胞色素 C 的酶解物为样品, 评价色谱性能。如图 8 所示, 8 根芯片柱均获得了较理想的分离效果, 且柱与柱间重现性良好。以色谱图中部最高峰(保留时间约 33 min)为标准, 计算 8 根芯片柱梯度分离的保留时间柱间重现性, 结果令人满意 (RSD=1.1%  $n=8$ )。同样地, 还计算了峰面积(最后一个高峰, 约 39 min 处)和分离度(最后两个高峰, 约 38 和 39 min 处)的柱间重现性, 也获得了令人满意的结果(峰面积 RSD=3.4%, 分离度的 RSD=2.0%  $n=8$ )。

芯片柱阵列的等度和梯度分离结果都显现出优良的柱间重现性, 说明芯片的 8 个通道加工具有良好的精密度; 同时, 也说明采用的颗粒填充法制备的芯片柱床具有良好的稳定性和柱间重现性, 柱与柱之间保证了良好的分离同步性。

值得注意的是,此阵列式芯片色谱装置是由三类芯片单元(玻璃芯片、PMMA 芯片和 PDMS 芯片)与石英毛细管组合而成。实际操作中,各单元的制备需分别进行控制,而各个单元制备完成后的组装相对简单。并且,组装完成后从上机测试到后续分离均能够稳定运行。本研究使用的阵列芯片装置在一个月测试与运行中,均保持稳定,未发生堵塞、泄漏等问题。

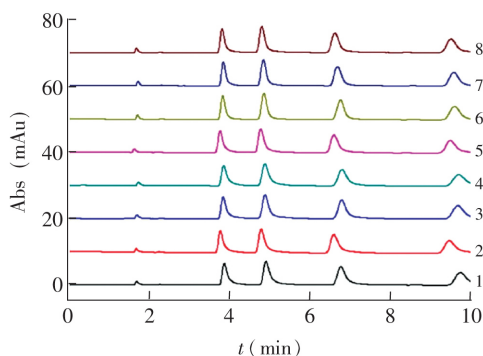


图 7 并行 8 通道芯片柱色谱等度分离烷基苯(甲苯、乙苯、丙苯、丁苯,按洗脱顺序)

Fig.7 Separation of alkylbenzenes by isocratic elution on parallel 8 chip columns (methyl-, ethyl-, propyl-, butylbenzene, in the order of elution)

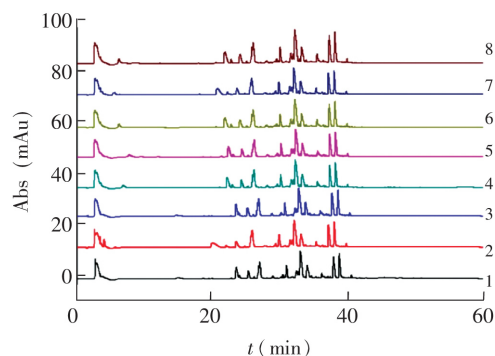


图 8 并行 8 通道芯片柱色谱梯度分离蛋白酶解物

Fig.8 Separation of protein digest by gradient elution on parallel 8 chip columns

本研究的 8 根芯片柱共享一个进样阀,即同一样品分流后进入 8 根柱子,进行了同样的分离。这主要是为了验证该阵列式芯片柱的可行性和有效性。今后将进一步考察并行多样本分离以及二维色谱分析应用。

## 4 结论

基于微流控芯片技术发展了一种阵列式多通道色谱芯片。在填充法制备芯片柱床的基础上,设计制作了芯片柱阵列的上游承压接口和下游毛细管连接单元,初步构建了多通道芯片色谱分离平台,并考察了其在生物样品多道分离分析方面的可行性。结果表明,此芯片柱阵列能够获得高柱效、高重现性的分离效果。本研究提出的基于微加工制造的制柱方法有望用于多通道色谱柱阵列制备,其并行多道的特征有望在高通量筛查分析方面起重要作用。基于芯片柱阵列构建的并行多道色谱分离平台有望与多种分离与检测模式耦合,在芯片中集成多维分离分析平台,对提高蛋白质组学的分析通量与分辨率有重要意义。同时,需要指出,本研究仅展示了在芯片上构建阵列式多通道色谱柱,并进行填充和同步分离的可行性。在未来的工作中,还需要构建多柱进样技术,并尝试在线耦合捕集小柱单元,针对实际的生物样品完成在线清洗、富集等操作,真正实现生物医学样本的高通量筛查分析。

## References

- 1 Manz A, Graber N, Widmer H M. *Sens. Actuators B*, **1990**, 1(1): 244-248
- 2 Whitesides G M. *Nature*, **2006**, 442(7101): 368-373
- 3 Reichmuth D S, Shepodd T J, Kirby B J. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(9): 2997-3000
- 4 Jacobson S C, Koutny L B, Hergenroeder R, Moore A W, Ramsey J M. *Anal. Chem.*, **1994**, 66(20): 3472-3476
- 5 Gottschlich N, Jacobson S C, Culbertson C T, Ramsey J M. *Anal. Chem.*, **2001**, 73(11): 2669-2674
- 6 He B, Tait N, Regnier F. *Anal. Chem.*, **1998**, 70(18): 3790-3797
- 7 Yin H, Killeen K, Brennen R, Sobek D, Werlich M, van de Goor T. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(2): 527-533
- 8 Zeng H L, Li H F, Lin J M. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 551(1): 1-8
- 9 Throckmorton D J, Shepodd T J, Singh A K. *Anal. Chem.*, **2002**, 74(4): 784-789
- 10 Kircher M, Kelso J. *Bioessays*, **2010**, 32(6): 524-536

- 11 HAI Qing-Feng, LI Jing, WANG Er-Kang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2018**, 46(6): 814–825  
翟庆峰, 李敬, 汪尔康. *分析化学*, **2018**, 46(6): 814–825
- 12 Nge P N, Rogers C I, Woolley A T. *Chem. Rev.*, **2013**, 113(4): 2550–2583
- 13 Zhang B, Liu Q, Yang L J, Wang Q Q. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1272(1): 136–140
- 14 Xiao Z L, Wang L, Liu Y, Wang Q Q, Zhang B. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1325(1): 109–114
- 15 Liu Q, Yang L J, Wang Q Q, Zhang B. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1349(7): 90–95
- 16 Liu Q, Wang L, Zhou Z H, Wang Q Q, Yan L J, Zhang B. *Electrophoresis*, **2014**, 35(6): 836–839
- 17 Han J, Ye L Q, Xu L J, Zhou Z H, Gao F, Xiao Z L, Wang Q Q, Zhang B. *Anal. Chim. Acta*, **2014**, 852(12): 267–273
- 18 Yang L J, Xu L J, Guo R, Gao T Y, Guo H X, Yu Y, Lv J J, Wang Q Q, Zhang B. *Anal. Chim. Acta*, **2018**, 1033(11): 205–212

## Microfluidic Array Liquid Chromatography: A Proof of Principle Study

ZHOU Zhuo-Heng, LIU Ya, ZHANG Bo\*

(College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** Miniaturization of separation techniques can minimize consumption of solvent and requirement of sample size and leads to high efficiency, high speed, high resolution and high throughput analysis. In this study, a microfluidic chip-based array liquid chromatographic platform enabling multicolumn separation and detection was developed. The platform was based on the combination of glass, poly(methyl methacrylate) (PMMA) and polydimethylsiloxane (PDMS) chips and up to 8 packed chromatographic channels were manufactured on such a microfluidic device. Pressurization experiments showed that the array chip could be reliably used under pressure-driven liquid chromatographic mode. A nanoflow of 300 nL/min per column was realized through multi-stage flow splitting. We investigated feasibility and effectiveness of the 8 column array chip and obtained a high efficiency of 80000 plates per meter and a good reproducibility of RSD=1.1% for the retention time. Using a protein digest as the sample, we also explored the chip's potential applicability in high throughput separations of complex biological samples.

**Keywords** Microfluidics; Liquid chromatography; Chip chromatography; Multicolumn array; High throughput

(Received 7 December 2018; accepted 20 January 2019)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21475110, 21535007, J1310024), the Fundamental Research Funds for Central Universities of China (No. 20720160051) and the Xiamen Municipal Science and Technology Plan Project (No. 3502Z20173019).