

## 微流控器件-质谱联用接口技术研究进展与应用\*

王伟萍<sup>1)</sup> 王志畅<sup>1)</sup> 张 燮<sup>1)</sup> 赖劲虎<sup>1)</sup> 陈焕文<sup>1,2)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>东华理工学院应用化学系, 抚州 344000; <sup>2)</sup>吉林大学化学学院, 长春 130021)

**摘要** 生物分析是生命科学研究中的重要环节, 分析仪器的小型化是提高生物分析灵敏度、速度、通量和降低成本的有效途径之一. 微流控技术能够方便地操纵微量样品, 具有集成度高、样品耗量小、污染少等诸多其他常量流控技术难以具备的优点, 适用于进行多通道样品处理和高通量分析. 除广泛采用的光学和电化学检测手段外, 质谱也被用作这些微流控器件的检测器, 并逐渐形成了微流控器件-质谱联用技术专门研究领域, 进一步促进了自动化程度好、灵敏度高、特异性强的高通量生物分析方法的迅速发展. 在大量调研国内外文献的基础上, 对微流控器件-质谱联用领域的研究背景和现状进行了综述, 不但介绍了微流控器件的制造技术还着重介绍了微流控器件-质谱联用技术在蛋白质组学等生物质谱分析方面的应用和新近进展, 评述了可能的发展趋势.

**关键词** 微流控器件, 质谱, 蛋白质组学, 生物分析

**学科分类号** O657.63, O859

质谱是生命科学研究中不可或缺的重要仪器之一. 一般情况下, 在进行质谱分析之前需要对样品进行色谱分离等预处理. 无论是传统的色谱分离还是 2-D 毛细管电泳, 通常都包括采样、制样、分离等系列过程, 操作繁琐而且耗时费力, 效率低下. 当分析样品含量低而成分复杂 (如蛋白质消解液, 各种体液) 时, 往往还需要进行样品的预富集, 使得整个分析过程更加繁杂而效率低下.

微流控芯片是以微流控技术为基础, 把生物和化学等领域中所涉及的样品制备、生物与化学反应、分离检测等基本单元集成后得到的, 面积为几平方厘米的芯片, 它通过微通道形成网络, 以可控流体贯穿整个系统, 主要用以完成不同的生物或化学反应过程, 并对其产物进行分离和分析. 微芯片与毛细管电泳(CE), 毛细管电色谱(CEC), 微流液相色谱( $\mu$ LC)作为分离技术联用早已受到重视, 甚至还用作预富集和反应器, 或作为进样系统耦合到电喷雾质谱仪 (ESI-MS) 上. 芯片上精确进样技术<sup>[1,2]</sup>、超高速 CE 分离技术<sup>[3]</sup>、级联 2-D 分离技术<sup>[4,5]</sup>、高通量检测技术<sup>[6]</sup>是微流控技术发展中最具有代表性的成果. 通常, 这些分析中微流控器件所操作的样品为微升级, 且最小检测体积为 1~10 pL. 典型的分析过程包括样品注射、分离、标记、检测等步骤, 通常能够在几分钟甚至几秒钟<sup>[7]</sup>内完成,

在 DNA、蛋白质、多肽的日常分析和药物筛选中展示出诱人的发展前景.

微流控器件和质谱仪 (MS) 之间的接口 (即离子源) 有 ESI、MALDI 等不同形式, 但是, 现在仍然存在许多需要改进的地方. 首先, 多通道的微型 ESI 喷嘴只能通过微制造技术在硅或塑料而非玻璃基质上进行加工, 另一方面, 许多成功地进行复杂微流控操作的器件都采用玻璃做为材料, 而即使采用玻璃材料, 也仍然难以方便地加工高集成度的 ESI 喷嘴. 其次, 在单通道的 CE 和 CEC 中, 液流的运动主要依靠电场进行控制, 当将这些通道高度集成时, 很难在各个通道中都获得能够使 ESI 稳定工作的电压 (3~5 kV). 近年来, 为了改善这个问题, 虽然可以采用非电场 (比如高压气流, 压电效应, 离心效应, 甚至利用电化学反应产生的动力) 进行液体的推进, 但是目前尚处在初级研究阶段.

本文将介绍适合于质谱分析的微流控器件的制造技术, 评述其优缺点, 介绍相关的应用, 展望微流控器件和 MS 联用技术在生物学分析中的前景, 指出其发展趋势.

\*国家自然科学基金资助项目(20505003).

\*\* 通讯联系人. Tel: 0794-8258703, E-mail: chw8868@gmail.com

收稿日期: 2006-05-21, 接受日期: 2006-06-28

## 1 微流控器件的制造

微流控器件一般仅有几个平方厘米的大小, 通常可以在玻璃、石英、硅片和聚合物等多种材料上进行加工. 在通常进行光学检测的器件中, 材料的透明度和荧光性质是需要考虑的首要因素, 而在与质谱联用的器件中, 材料的选择主要依赖于表面性质、化学活性、加工工艺和成本. 因此, 完全不透明的无定型碳也是很好的材料, 而一般的环氧树脂、碱金属玻璃器件则可能带来一定的化学干扰. 除了释放化学物质外, 器件材料对样品的吸附也是一个不可忽略的问题, 尤其是在低浓度物质分析时更是如此.

微流控器件主要用光刻技术<sup>[7]</sup>进行制作, 当然还可能包括必要的化学或等离子体刻蚀过程和化学沉积(如金属或二氧化硅等物质沉积在模板上)过程. 如果是聚合物基质, 往往还需要激光抛光、打磨等过程以便获得更精致的器件.

用来加工玻璃、石英或硅片的典型光刻-化学刻蚀过程如图1所示. 首先, 器件的基质材料涂上一层厚度约 100 nm 的保护金属(通常是金或铬), 然后再涂上一薄层光刻胶(0.4~2  $\mu\text{m}$ , 均匀性为  $\pm 1\% \sim \pm 3\%$ ). 接着将具有需要刻制结构的影像的光掩膜(通常由涂有紫外吸收剂(厚度为 80~100 nm)的玻璃或石英材料制作, 详细过程见文献[7])直接放置在准备好的基质材料上, 然后放置在近紫外光(350~500 nm)下进行光化学反应(即刻蚀), 根据光刻胶性质的不同, 随着光化学反应的进行, 暴露在光照下的胶体将保留或消失, 从而形成所需要的结构. 当光刻完成后, 首先还要将保护金属层去掉,

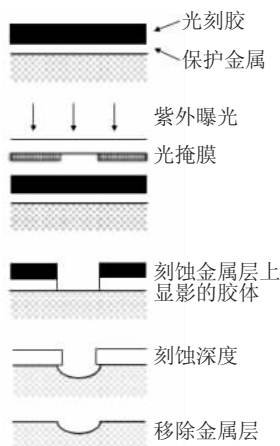


Fig. 1 Photolithographic microfabrication process with a positive photoresist

图1 光刻胶的化学刻蚀过程

然后将光刻后的基质进行化学刻蚀过程, 比如将玻璃基质浸泡在  $\text{HF}/\text{NH}_4\text{F}$  溶液中, 直到获得所需要的刻蚀深度(1~50  $\mu\text{m}$ )为止. 化学刻蚀后的基质必须用水、甲醇等彻底清洗, 然后通过热熔的办法(通常是将基质材料和盖封片贴在一起, 加热到 500~600 $^{\circ}\text{C}$ , 保温一段时间)将所形成的通道封闭起来, 最终才形成所需要的器件.

罗国安等<sup>[8]</sup>将材质对芯片质量的影响进行了比较, 发现腐蚀液的成分和配比对腐蚀后光掩膜玻璃表面的质量也有很大的影响. 比如用  $\text{HCl}:\text{BOE}$  (5:16) 腐蚀时出现不溶物, 并阻碍了进一步的腐蚀, 使得表面非常粗糙(图2 a), 而用  $\text{HF}:\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}$  (5:10:85) 进行同样操作则得到了表面平滑的管道(图2 b).

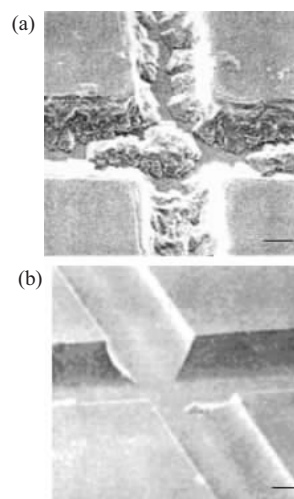


Fig. 2 Channels on photomask glass substrates etched with different etching solution

图2 不同腐蚀液在光掩膜玻璃上得到的蚀刻通道

(a) 在光掩膜玻璃上被  $\text{HCl}:\text{BOE}$  (5:16) 蚀刻的通道. (b) 在光掩膜玻璃上被  $\text{HF}:\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}$  (5:10:85) 蚀刻的通道.

在选择材料和方法来制作这些器件时, 有些因素, 如刻蚀深/宽比、需要制作的最小或最大尺寸、刻蚀宽度和分辨率, 是必须考虑的. 如果使用各向异性的材料并且需要获得最大的深宽比, 则一般适宜选择等离子体刻蚀或高能离子刻蚀等干刻法而不用化学刻蚀等方法. 此时, 等离子体中各组分的浓度和能量就是需要精确控制的重要参数. 有人已经采用这个技术在硅片上制作了性能良好的 ESI 喷嘴<sup>[9]</sup>.

除了无机物外, 有机聚合物(聚二甲基硅氧烷橡胶、聚酰亚胺、聚苯乙烯、聚碳酸酯等)因其具有成本低廉、熔合温度低等优点而经常使用, 而且可以采用紫外激光光解、紫外激光切除、质膜沉积无定型硅碳膜方法、母板复制、热金属丝/硅片压

制、深层离子蚀刻、快速成型、X 射线刻蚀、微立体光蚀刻技术等多种不同的技术进行制作, 也制作了集成的 ESI 离子源<sup>[10]</sup>. 详细的微流控器件制作工艺和技术述评可以参见近年的文献[11]和相关网站 (<http://www.nnin.org> 和 <http://www.mic.dtu.dk/Research/BCMS/MicroTAS.aspx/microtas.htm>).

## 2 微流控器件与质谱的接口

### 2.1 功能元件和微流控

能够执行特定功能的元器件称为功能元件. 独立功能元件的微加工技术和它们的集成技术已经有人进行评述<sup>[12,13]</sup>. 通常情况下, 在制作具有分离功能的微型质谱仪接口器件时, 必须将具有 4 种不同功能的独立元器件进行集成, 它们包括: a. 分离元件, 用以执行样品分离功能; b. 样品引入系统, 用以添加样品; c. 微流控器件, 用以操纵液流; d. 微型 MS 接口, 用以将样品离子化后引入质谱仪进行质谱分析. 微制造技术的发展使得在单片基质材料 (substrate) 上集成样品运送通道、液流分配器、检测器等成为可能, 而且与具有同样功能的常规器件相比, 大大降低了器件的复杂性、死体积, 提高了集成度.

**2.1.1 分离元件.** 基于微流控器件的 CE 和 CEC 已经广为人知, 然而由于微色谱系统 ( $\mu$ LC) 在分离蛋白质和氨基酸混合物方面显示的优势 (如分离效率, 分辨率, 样品容量等), 使得它在微流控器件中也具有魅力. 有人已经通过修饰 (packing) 液流渠道表面的办法将色谱柱集成在微器件上<sup>[14]</sup>, 虽然提高了分离效果, 但是器件的制作难度大, 而且不很稳定, 目前仍然难以推广. 另外的途径是在通道内合成具有微孔的色谱柱 (75  $\mu$ m i.d.), 不但能够获得很高的塔板数 (不小于  $10^5$ ), 而且具有液流阻力小的特点, 适合于在微型器件上使用<sup>[14]</sup>. Throckmorton 等<sup>[15]</sup>采用类似的技术在 45 s 内分离了具有生物活性的多肽, 获得了具有  $60 \times 10^5$  板/m 的分离效率. Lazar 等<sup>[16]</sup>已经将类似的微型接口和 ESI-TOF-MS 联用, 用于蛋白质消解液的分离和检测.

**2.1.2 样品引入.** 在 CE、CEC、 $\mu$ LC 系统中, 样品的引入能够通过施加在十字或双 T 字结构通道上的电场来完成. 如果仔细选择合适的通道尺寸, 样品的引入也可以采用气体压力或真空的办法来完成<sup>[17]</sup>, 这样做的优点是不需要高压电场, 缺点是制作工艺要求高, 而且不是非常稳定. 如果在样品引

入前添加微型反应器<sup>[18]</sup>或消解器<sup>[19]</sup>, 则可以使器件的功能更加强大, 甚至具备常规实验室内进行合成、分离、纯化、检测的多种功能.

**2.1.3 微量液流的控制.** 微流控器件的一项重要功能是能够方便地使微量液体在微型通道内按照一定的目的和方式移动. 一般情况下, 对微量液流的操纵主要通过电场梯度或压力梯度来完成. 电场梯度作用下, 在微流控器件内能够方便地进行液流的输送、混合、分流等操作, 广泛应用于光学检测 (如 LIF) 器件中. 然而, 在与 MS 联用的微型器件中, 除了需要完成常规器件对液流的操作外, 还需要对液体样品进行雾化, 形成带电的离子后才能够被引入质谱仪中进行分析. 基于此目的, 常使用压力梯度<sup>[20]</sup>或外加电渗流装置<sup>[21]</sup>来对液流进行操控, 也有在微型器件中耦合 nESI 喷嘴的例子<sup>[22]</sup>, 在该装置中液体流量为 20~30 nl/min, 由于流量较大, 可以通过 nESI 源喷雾过程本身产生的拉力来进行液流输送. 有人还利用电解的方法获得 200 psi 和 20 nl/min 的气体流量, 并且成功地耦合到 ESI-MS 中<sup>[23]</sup>. 另外, 基于压电效应的液流泵也应用到了这些微流控器件中<sup>[24]</sup>, 并可与 MALDI-MS 联用.

### 2.2 ESI-MS 微流控接口

微流控器件中液流一般为 0~300 nl/min, 正好与 nESI 离子源的液流要求一致. 现阶段, 电喷雾现象可以直接从芯片表面上产生, 也可以用 nESI 离子源或十字形液体控制器件来产生. 近年来, 也有将 ESI 喷嘴和微型芯片直接装配后使用的报道<sup>[25]</sup>. 在设计微型器件与 MS 的接口时, 必须考虑到: a. 离子化效率, 如果离子化效率低则灵敏度差; b. 如果在芯片上已经进行了分离, 则应该将分离区与 ESI 喷嘴间的距离尽可能缩小; c. 液体回流, 即使用合适的办法克服待测物样品因为电场消失而回流的现象, 尤其是在 CE 和 CEC 场合中.

#### 2.2.1 芯片表面产生的喷雾.

早期的接口中, 电喷雾直接从微型器件表面的开口处产生<sup>[26,27]</sup>, 当采用注射泵或电渗泵注入多肽样品时则可以获得非常强的信号. 为了防止液体的损失, 在通道的开口处还用疏水的硅烷醇进行修饰, 并且成功地应用到多通道 ESI-MS 中进行蛋白质消解液的分析<sup>[28]</sup>. 大量的理论和实验研究表明, 直接在开口处产生的电喷雾信号基本等同于常规的 ESI/APCI 所获得的信号<sup>[27]</sup>.

虽然能够在芯片表面的开口处直接获得 ESI 信号, 但是这样的结构对进行分离的系统来说并不是



很方便,因为它具有大约 12 nl 的死体积<sup>[26]</sup>,而分离出来的单组分的样品一般约 5 nl,如果不采用非常尖细的 ESI 喷嘴,将使分开的组分在检测前再次混合。

### 2.2.2 接入芯片的毛细管上产生的喷雾。

与直接产生电喷雾不同,很多方法还将现成的毛细管 ESI 喷嘴或熔融石英刻槽连接在芯片上,形成新的电喷雾源,其性能也很不错。将氨基硅烷修饰后的毛细管作为电渗泵垂直插入芯片的表面,

芯片通道内的液体则被此电渗泵拉入微型的 ESI 系统中,如图 3a 所示。微型 ESI 喷嘴也可以直接从芯片的边缘插入<sup>[29]</sup>,如图 3 b 所示。为了增加液流的导电性,还将通过注射泵从紧挨着 ESI 喷嘴的地方注入电解质(如醋酸等)溶液,以便稳定 ESI 产生的信号。ESI 电场可以直接施加在芯片上或镀有金膜的喷嘴上,甚至将 ESI 喷嘴直接插入到芯片的鞘液中。

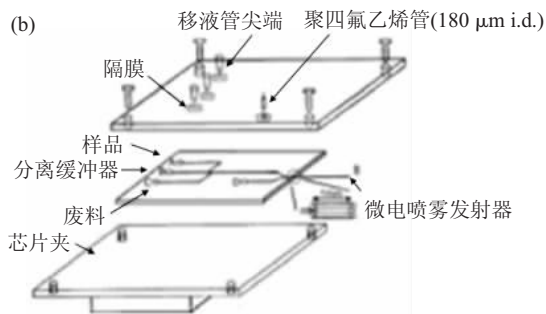
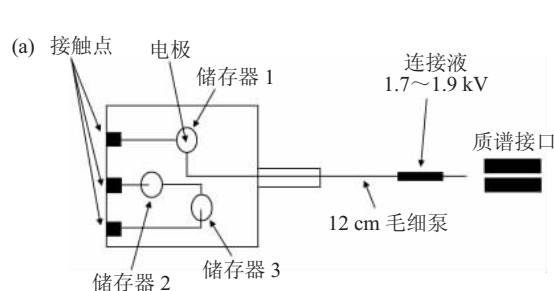


Fig. 3 Microchip configurations with inserted ESI needles<sup>[29]</sup>

图 3 插入微芯片的 ESI 喷嘴<sup>[29]</sup>

近年来,有人将 nESI 喷嘴(5 μm i.d.)直接插入微流控器件的通道中,在没有外部连接器件的情况下获得了稳定的 ESI 信号。此外,独立的微型 ESI 也已经发展起来,在与 TOF-MS 联用时获得单个全谱谱图的时间约 10 ms,可以获得的检出限为 340~500 zmol 蛋白质<sup>[26]</sup>。如果采用另外一种微型 ESI 设计,可以将可拆卸的 ESI 接口安装在芯片上的液流溶合区<sup>[17]</sup>,如图 4 所示。恰当地调节接口处的压力,可以使电喷雾辅助液流(如甲醇,醋酸混

合液)稳定地流向 ESI 喷嘴,同时和 CE 分离后的样品混合起来。液流溶合区可以在芯片上或芯片外边,甚至可以用类似的结构在 CE 芯片平整的边缘上耦合 ESI 电离源,这种设计的优点是可以利用外部的注射泵将电喷雾溶液液流(μl/min)平稳地输送到液流溶合区,进一步提高了信号的稳定性。

有人采用微流雾化器与毛细管 HPLC-MS 无鞘耦合,在流速为 3~7 μl/min 时可以提供最佳的雾化,流速也可以向下延伸至 0.5 μl/min,但是会增加信号的不稳定性。Giusti 等<sup>[30]</sup>开发了一种 nHPLC 与 ICP-MS 耦合的无鞘微流喷雾器——nDs-200,如图 5 所示,该雾化器在液体流速 0.5 μl/min 以下也能正常工作。

为了获得良好的分离效果,一般要求微流控器件的死体积小于 10 μl<sup>[17]</sup>。此外,分离后的液流与 ESI 的耦合对获得良好的 ESI 信号和减小带宽也非常关键,在分离通道出口处使用辅助通道或者液流溶合区将有助于提高系统的整体性能<sup>[17]</sup>。罗国安等<sup>[31]</sup>研究了一种微流控芯片与 ESI-MS 联用的接口制作方法。如图 6 所示,在芯片上制作了旁路管道引入辅助液体,并用外接管路将样品送入质谱离子源,实现了稳定电喷雾和检测。

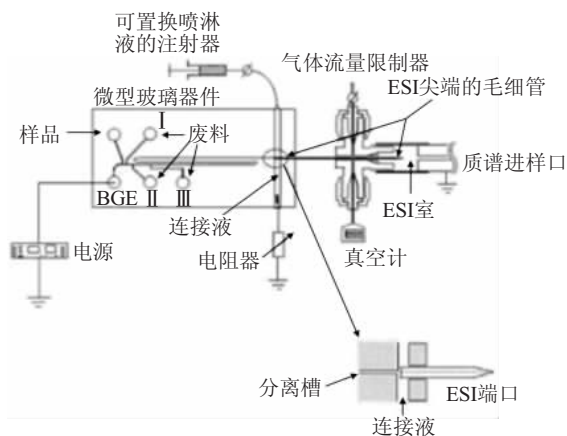


Fig. 4 Microchip device with an integrated liquid junction interface for high performance CE-MS analysis<sup>[17]</sup>

图 4 微芯片和液态接合器接口用于高效 CE-MS 分析<sup>[17]</sup>



(ii)是有埋置电极的盖板, (iii)是在 PMMA 芯片的尖端放大的 PPM 的芯片配置; 图 9b 中的 A~C 分别是采用的 3 种聚合基质在电子显微镜下的扫描图, D~F 分别是用这 3 种不同的聚合基质形成 PPM 多孔结构微流芯片的 SEMS 进一步放大图. 结果显示, COC 的效果最佳. 于是, Mohamed 等就在 COC 聚合基质上用 PPM 材料制作微流芯片,

而且能够在出口通道 10 mm 处形成泰勒锥的微型通道(图 10), 图 10a、b、c 分别是在电极计数器间隔 5 mm 处施加 4.0~4.5 kV 的电压, 流速分别为 100、500、1000 nl/min 时所形成的不同泰勒锥. 实验证明, 使用 PPM 来做微型电喷雾的喷嘴, 大大提高了其灵敏度.

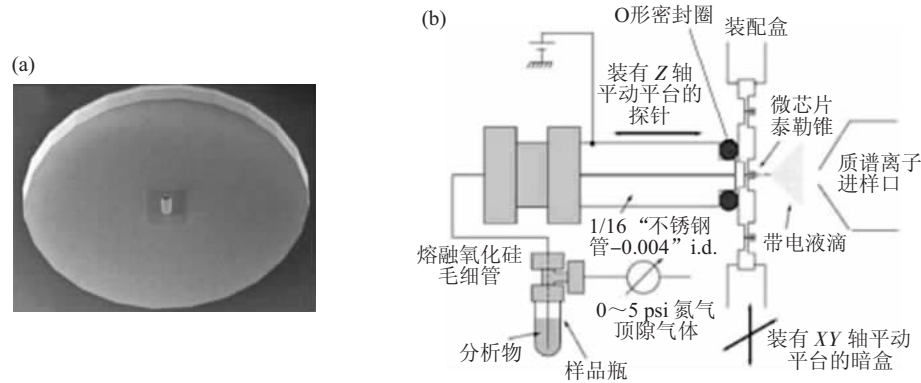


Fig. 8 Microchip with integrated electrospray emitter [9]  
图 8 集成 ESI 喷嘴的微芯片 [9]

(a)电子显微镜下硅片上 ESI 喷嘴. (b)芯片处理和流体交付系统的示意图.

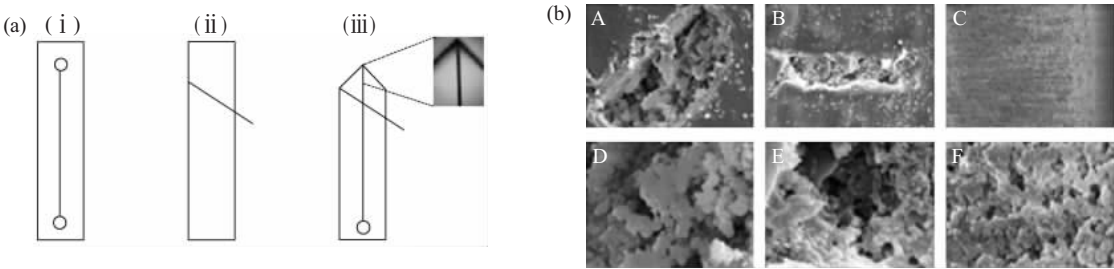


Fig. 9 Photopatterns of PPM forming from different substrates at the end of microchip channel [34]  
图 9 不同基质材料在微芯片通道末端形成 PPM 的光图案 [34]  
(a)简略示意图. (b)A~F 不同基质材料上 PPM 的电子显微镜扫描图.

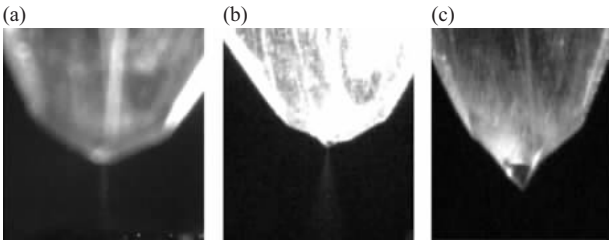


Fig. 10 Optical microscope images of stable Taylor cone established at a microchannel exit [34]  
图 10 泰勒锥微型通道的形成 [34]

2.3 微型 MALDI-MS 接口

基体辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)是除了 ESI 外最常用于生物大分子分析的质谱. 与 ESI 不同, MALDI 一般在质谱仪的真空腔内在激光的

作用下利用基体辅助来进行样品的解吸和电离. 由于大量的样品能够同时滴置在同一个样品板上, 使得 MALDI 比 ESI 具有更高的通量和效率, 更适合于批量样品的分析. 因此, 发展高通量的样品处理技术对 MALDI-MS 来说更具有吸引力.

2004 年, 一个外形类似 CD 光盘的全自动微流控样品处理系统[35]已经开发出来(图 11), 样品和试剂可以存放在光盘中心附近的小洞中, 通过离心作用将样品输送到光盘的边缘以形成约 200 μm × 400 μm 的样品斑点供 MALDI 进行检测. 该 CD 至少可以同时处理 96 个样品, 包括对其进行富集、选择、脱盐、消化等过程, 最小的样品耗量为 1 μl, 检测的蛋白质为 0.5~5 fmol, 目前该系统已



经实现了产业化(详见 [www.gyros.com](http://www.gyros.com)), 获得了极大的成功。

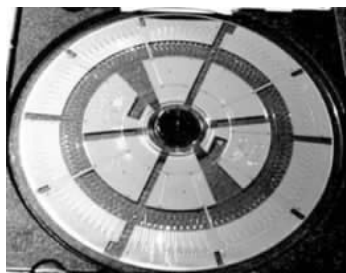


Fig. 11 Photograph of a centrifugal CD for high-throughput MALDI-MS from a chip

图 11 外形类似 CD 光盘的高通量的 MALDI-MS 芯片

### 3 应用

#### 3.1 样品注入分析

虽然微型质谱接口器件的历史还很短, 但是相关的设计、加工和应用方面的研究却呈现出强劲的发展态势, 已经引起广泛的关注. 早期的微流控器件仅用于样品的输送, 直到后来才实现了喷雾和离子化的功能, 接着出现毛细管 ESI 阵列<sup>[36]</sup>, 如图 12 所示.

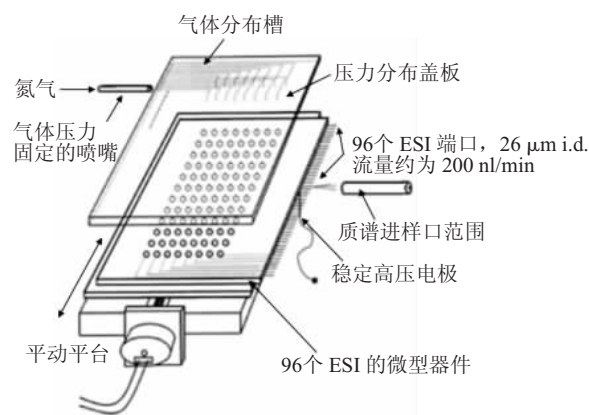


Fig. 12 Exploded view of the 96-array microchip-MS system<sup>[36]</sup>

图 12 96 阵列微流控芯片-质谱联用体系图<sup>[36]</sup>

每条进样槽都与各自对应的一根毛细管相连, 采用气体动力进样.

目前, 最常用的微型 ESI 器件是在硅片上集成的 400 个 ESI 阵列, 由于大批量生产(详见 [www.advion.com](http://www.advion.com)), 单个阵列的成本相对低廉, 甚至可以作为一次性用品. 如果和移液管(如 ZipTip®)构成的脱盐系统联用, 则可以进行高通量的质谱分析而没有严重的化学干扰和记忆效应, 可以方便地用于血浆中药物<sup>[37]</sup>、蛋白质相互作用<sup>[38]</sup>、糖类分析<sup>[39]</sup>.

#### 3.2 样品预富集

为了提高灵敏度, 可以将样品在进入芯片前进行富集, 或者在芯片上进行浓缩. 有人采用微芯片 CE-ESI/Qq-TOF-MS 系统, 对从大肠杆菌上分离的膜蛋白水解后的多肽进行快速分析<sup>[40]</sup>, 整个分离分析过程在 1.5 min 内完成, 检出限为 2.5 nmol/L 多肽. 此外, 还可以用  $C_{18}$  柱进行样品的富集<sup>[20]</sup>, 然后再进行 ESI-MS 分析, 可以获得约 0.1 nmol/L 检出限.

最近, 芯片上进行的富集已经引起人们的关注. 在硅片制作的芯片上集成了微萃取装置, 能够对 2~10 nmol/L 多肽溶液进行富集, 然后再进行 MALDI-MS 分析, 一般可以获得 1 000 倍以上的富集率, 并可用于人尿中微量药物(0.025 mg/L)的分析<sup>[41]</sup>.

为了提高选择性, 人们还根据物质之间相互作用的强弱, 设计了对某些物质进行选择性吸附和富集的微型器件. 比如将抗体固定在  $C_{18}$  柱或琼脂小球上, 然后可以对人血浆中 20  $\mu$ g/L 抗原多肽进行选择性富集<sup>[42]</sup>, 类似地可以将金属固定在小球上后富集含磷的蛋白质, 可以同时处理 96 个以上的样品. 同样原理, 人们可以富集脑脊髓液中的白蛋白<sup>[43]</sup>, 黄曲霉毒素<sup>[44]</sup>等.

#### 3.3 样品清洗

用于样品在线脱盐的微型器件一般具有膜状结构, 可以用激光直接进行刻蚀. 有人将通透性不同的半透膜封在聚碳酸酯的弯曲通道两端, 制成了能够选择性地消除低分子或高分子物质的微型在线样品清理器件, 并且耦合到以四极杆离子阱为质量分析器的 ESI-MS 中进行样品的在线脱盐和质谱分析, 大大消除了 DNA 和蛋白质分析时的化学噪音, 提高了信噪比<sup>[45]</sup>.

#### 3.4 蛋白质的在线酶催化水解

在线酶催化蛋白质水解<sup>[46]</sup>系统能够在较高的酶/底物比的情况下工作, 一般在 5~15 min 内即可完成血红蛋白的分解过程, 并很方便地对水解产物进行在线 ESI-TOF-MS 检测. 类似方法也出现了采用硅片制作的与 MALDI 耦合的在线酶催化蛋白质水解系统, 能够在 1~3 min 内完成水解过程, 而且以 50~100 个/s 样品斑点的速度制作 MALDI 样品板. 目前也有将催化酶固定在小球或 PDMS 塑料上的微型在线蛋白质消解器件, 能够在 3~12 min 内完成对大多数蛋白质的水解.

### 3.5 与 MS 联用的微型分离器

在微型芯片上插入 ESI 喷嘴后则能够将具有分离功能的微型器件与 MS 耦合起来, 是蛋白质和多肽分析的强有力工具. 比如在长度为 11 cm 的通道上获得的毛细管电泳的分离效率一般大于 300 000 塔板/m, 而且能够通过液流融合区方便地与离子阱质谱联用, 目前已经出现了商品化的集成 LC 系统 (详见 [www.advion.com](http://www.advion.com); [www.agilent.com](http://www.agilent.com)), 并且成功地和 MS 联用<sup>[47]</sup>, 所获得的典型谱图如图 13 所示.

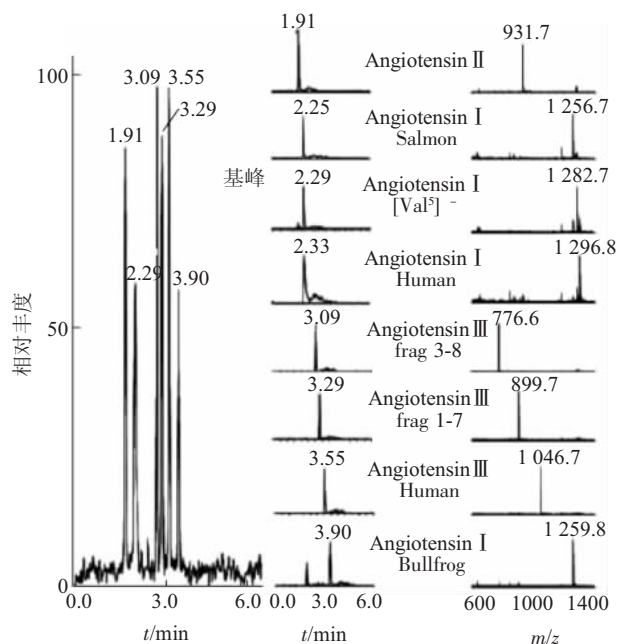


Fig. 13 Microchip-CE/ESI-MS analysis of a mixture of 10 µg/L angiotensin peptides using the device shown in Figure 5<sup>[47]</sup>

图 13 用图 5 的装置采用微芯片-CE/ESI-MS 来分析 10 mg/L 的混合的血管紧张素肽<sup>[47]</sup>

文献[28]报道的微型 ESI 装置能够与四极杆或 QqTOF 联用, 能够测定 25 ng 以下的样品, 实现对 1~5 µl 样品的操作, 甚至还可以实现在线消解、分离以及质谱检测, 并可以顺利地与 MALDI-MS 联用.

利用文献[48]报道的装置, 采用无鞘的喷雾器将 nHPLC-ICPMS 耦合起来, 检测硒肽可以达到 fmol/L 水平, 且检出限为 25 fg, 所获得的典型谱图如图 14 所示.

### 3.6 多任务处理

微型器件可以进行模块化设计, 再将不同的功能单元进行集成, 从而获得具有多功能的系统, 可以方便地进行复杂体系的全自动分析<sup>[49]</sup>. 图 15 a 所

示的器件包括 3 个模块: a. 样品引入模块, 除了保证顺利地将样品引入外, 还需要将样品模块和分析模块之间的距离减小, 以便缩小死体积; b. 分析模块, 主要是指进行分离、浓缩等功能的部分器件; c. 检测模块, 主要是指各种光学检测系统或与 MS 联接的 ESI 和 MALDI 接口. 图 15 b 示意了气动进样和清洗的装置, 可以提高每次进样的平行性和减少交叉污染. 图 15 c 给出了采用此装置对 BSA 消解液进行分析时获得的串联质谱图, 表明具有常规质谱分析所应有的灵敏度和准确度. 值得指出的是单个样品的分析过程只需要 5~10 s<sup>[30]</sup>, 充分展示了微型器件在高通量质谱分析中的前景. 具有在线消解和样品清理的微流控 ESI 器件能够分析 7~25 fmol/L 溶液, 每小时能够处理 12~30 个样品, 样品之间的残留不到 3%, 能够用于选择性测定癌细胞提取液中的微量特征蛋白.

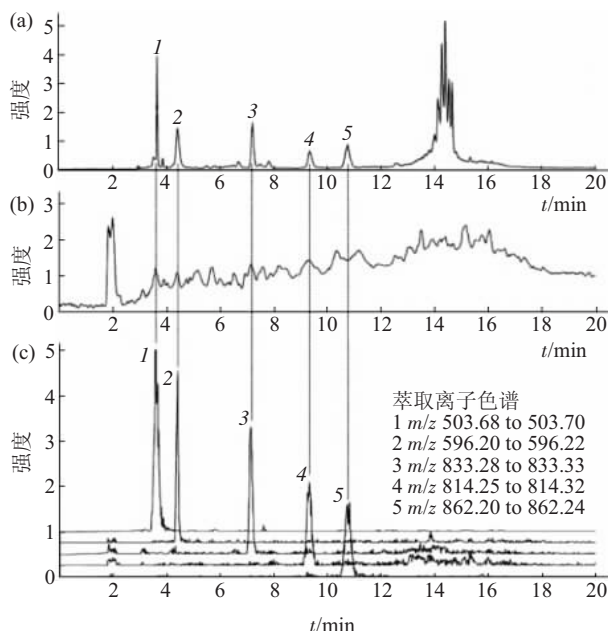


Fig. 14 NanoHPLC analysis of the tryptic digest of a high molecular weight fraction isolated from an aqueous extract of selenized yeast<sup>[48]</sup>

图 14 胰蛋白酶水解获得的硒肽的 nHPLC 分析<sup>[48]</sup>

(a) nHPLC-ICPMS 测定特殊元素 <sup>80</sup>Se 的色谱图. (b) nHPLC-ICPMS 检测的所有离子的色谱图. (c) nHPLC-ICPMS 对 5 种硒的萃取离子色谱图.

## 4 结 论

微流控器件的发展以及它们和质谱的联用将引发生物分析的新革命<sup>[50,51]</sup>. 显然, 微流控器件与质谱的联用能够实现微量生物样品的在线消解、富集、



脱盐和检测, 提高生物分析自动化程度, 实现对微量样品的精确操纵, 可显著缩短分析时间, 降低成本和提高效率. 随着此项技术的飞速发展, 在不久的将来将出现大量廉价的产品, 极大地提高生物质谱分析的效率.

值得指出的是不管采用何种功能的微型器件,

将多通道的微型器件与多通道的质谱仪联用则更具有诱惑力, 而微型多通道质谱仪<sup>[52]</sup>的发展正不断地向人们展示着这方面的前景. 这方面的真正突破将给蛋白质组学、基因组学、代谢组学、检验医学等任何需要高通量分析的领域带来革命性变化.

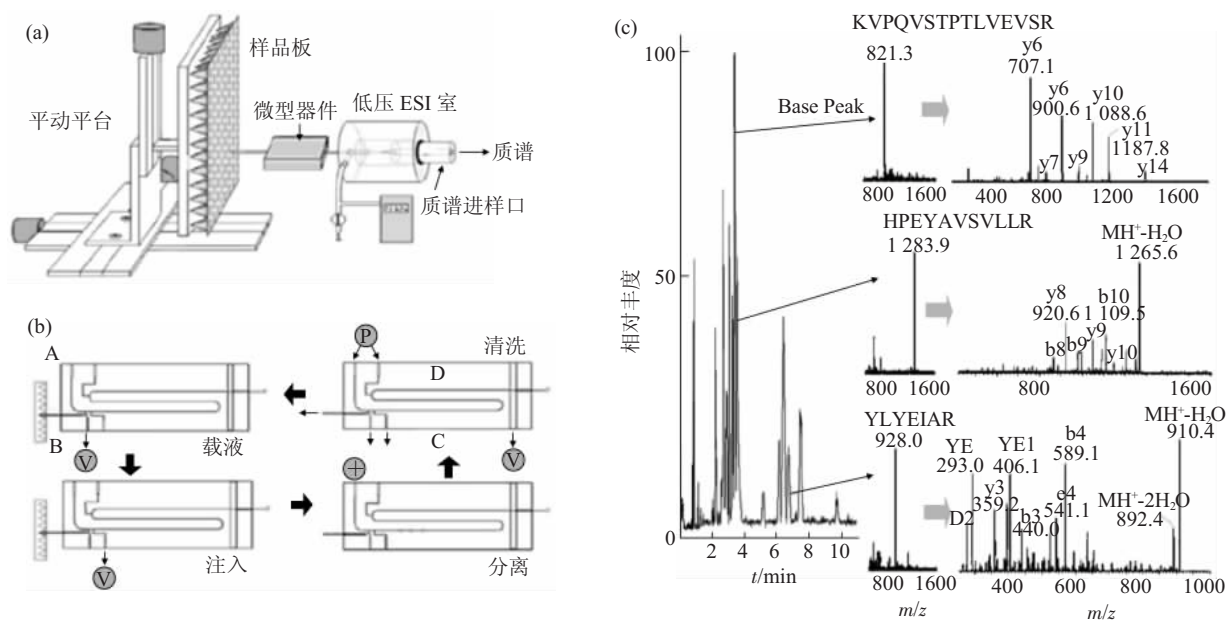


Fig. 15 An overall system for high throughput separation-MS analysis<sup>[24]</sup>

图 15 高通量分离-质谱仪系统<sup>[24]</sup>

## 参考文献

- Harrison D J, Manz A, Fan Z H, *et al.* Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Anal Chem*, 1992, **64** (17): 1926~1932
- Jacobson S C, Hergenroder R, Koutny L B, *et al.* Effects of injection schemes and column geometry on the performance of microchip electrophoresis devices. *Anal Chem*, 1994, **66** (7): 1107~1113
- Jacobson S C, Culbertson C T, Daler J E, *et al.* Microchip structures for submillisecond electrophoresis. *Anal Chem*, 1998, **70** (16): 3476~3480
- Rocklin R D, Ramsey R S, Ramsey J M. A microfabricated fluidic device for performing two-dimensional liquid-phase separations. *Anal Chem*, 2000, **72** (21): 5244~5249
- Gottschlich N, Jacobson S C, Culbertson C T, *et al.* Two-dimensional electrochromatography/capillary electrophoresis on a microchip. *Anal Chem*, 2001, **73** (11): 2669~2674
- Emrich C A, Tian H, Medintz I L, *et al.* Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis. *Anal Chem*, 2002, **74** (19): 5076~5083
- Madou M. *Fundamentals of Microfabrication*. Boca Raton: CRC Press, 1997. 574~575
- 金亚, 罗国安, 汤扬华, 等. 集成毛细管电泳芯片系统的制作、测试及应用. *分析科学学报*, 2001, **17** (2): 148~152
- Jin Y, Luo G A, Tang Y H, *et al.* *J Anal Sci*, 2001, **17** (2): 148~152
- Schultz G A, Corso T N, Prosser S J, *et al.* A fully integrated monolithic microchip electrospray device for mass spectrometry. *Anal Chem*, 2000, **72** (17): 4058~4063
- Le Gac S, Arscott S, Rolando C. A planar microfabricated nanoelectrospray emitter tip based on a capillary slot. *Electrophoresis*, 2003, **24** (21): 3640~3647
- Ziaie B, Baldi A, Lei M, *et al.* Hard and soft micromachining for BioMEMS: Review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, **56** (2): 145~172
- Auroux P-A, Iossifidis D, Reyes D R, *et al.* Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Anal Chem*, 2002, **74** (12): 2637~2652
- Reyes D R, Iossifidis D, Auroux P-A, *et al.* Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Anal Chem*, 2002, **74** (12): 2623~2636
- Stachowiak T B, Svec F, Fréchet J M J. Chip electrochromatography. *J Chromatogr A*, 2004, **1044** (1~2): 97~111
- Throckmorton D J, Sheppard T J, Singh A K. Electrochromatography in microchips: Reversed-phase separation of peptides and amino acids using photopatterned rigid polymer monoliths. *Anal Chem*, 2004, **76** (12): 2623~2636

- 2002, **74** (4): 784~789
- 16 Lazar I M, Li L J, Yang Y, *et al.* Microfluidic device for capillary electrochromatography-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2003, **24** (21): 3655~3662
- 17 Zhang B L, Foret F, Karger B L. A microdevice with integrated liquid junction for facile peptide and protein analysis by capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *Anal Chem*, 2000, **72** (5): 1015~1022
- 18 Peterson D S, Rohr T, Svec F, *et al.* Dual-function microanalytical device by in situ photolithographic grafting of porous polymer monolith: Integrating solid-phase extraction and enzymatic digestion for peptide mass mapping. *Anal Chem*, 2003, **75** (20): 5328~5335
- 19 Jin L J, Ferrance J, Sanders J C, *et al.* A microchip-based proteolytic digestion system driven by electroosmotic pumping. *Lab on a Chip*, 2003, **3** (1): 11~18
- 20 Zhang B, Liu H, Karger B L, *et al.* Microfabricated devices for capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Anal Chem*, 1999, **71** (15): 3258~3264
- 21 Figeys D, Aebersold R. Nanoflow solvent gradient delivery from a microfabricated device for protein identifications by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 1998, **70** (18): 3721~3727
- 22 Lazar I M, Ramsey R S, Sundberg S, *et al.* Subattomole-sensitivity microchip nanoelectrospray source with time-of-flight mass spectrometry detection. *Anal Chem*, 1999, **71** (17): 3627~3631
- 23 Xie J, Miao Y N, Shih J, *et al.* An electrochemical pumping system for on-chip gradient generation. *Anal Chem*, 2004, **76** (13): 3756~3763
- 24 Laurell T, Nilsson J, Marko-Varga G. Silicon microstructures for high-speed and high-sensitivity protein identifications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, **752** (2): 217~232
- 25 Arscott S, Legac S, Rolando C. A polysilicon nanoelectrospray-mass spectrometry source based on a capillary microfluidic slot. *Sens Actuators B*, 2005, **106** (2): 741~749
- 26 Ramsey R S, Ramsey J M. Generating electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping. *Anal Chem*, 1997, **69** (6): 1174~1178
- 27 Svedberg M, Veszelei M, Axelsson J, *et al.* Poly(dimethylsiloxane) microchip: Microchannel with integrated open electrospray tip. *Lab on a Chip*, 2004, **4** (4): 322~327
- 28 Xue Q F, Dunayevskiy Y M, Foret F, *et al.* Integrated multichannel microchip electrospray ionization mass spectrometry: Analysis of peptides from on-chip tryptic digestion of melittin. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1997, **11** (12): 1253~1256
- 29 Li J, Kelly J F, Chemushevich I, *et al.* Separation and identification of peptides from gel-isolated membrane proteins using a microfabricated device for combined capillary electrophoresis/nanoelectrospray mass spectrometry. *Anal Chem*, 2000, **72** (3): 599~609
- 30 Giusti P, Lobinski R, Szpunar J, *et al.* Development of a nebulizer for a sheathless interfacing of nanoHPLC and ICPMS. *Anal Chem*, 2006, **78** (3): 965~971
- 31 金亚, 罗国安. 微流控芯片与电喷雾质谱联用接口的制作与应用. *分析仪器*, 2003, **2** (2): 4~10
- Jin Y, Luo G A. *Analytical Instrumentation*, 2003, **2**: 4~10
- 32 Zheng J, Norton D, Shensi S A. Fabrication of internally tapered capillaries for capillary electrochromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006, **78** (4): 1323~1330
- 33 Licklider L, Wang X Q, Desai A, *et al.* A micromachined chip-based electrospray source for mass spectrometry. *Anal Chem*, 2000, **72** (2): 367~375
- 34 Bedair M F, Oleschuk R D. Fabrication of porous polymer monoliths in polymeric microfluidic chips as an electrospray emitter for direct coupling to mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006, **78** (4): 1130~1138
- 35 Gustafsson M, Hirschberg D, Palmberg C, *et al.* Integrated sample preparation and MALDI mass spectrometry on a microfluidic compact disk. *Anal Chem*, 2004, **76** (2): 345~350
- 36 Liu H H, Felten C, Xue Q F, *et al.* Development of multichannel devices with an array of electrospray tips for high-throughput mass spectrometry. *Anal Chem*, 2000, **72** (14): 3303~3310
- 37 Leuthold L A, Grivet C, Allen M, *et al.* Simultaneous selected reaction monitoring, MS/MS and MS3 quantitation for the analysis of pharmaceutical compounds in human plasma using chip-based infusion. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, **18** (17): 1995~2000
- 38 Keetch C A, Hernandez H, Sterling A, *et al.* Use of a microchip device coupled with mass spectrometry for ligand screening of a multi-protein target. *Anal Chem*, 2003, **75** (18): 4937~4941
- 39 Zamfir A, Vakhrushev S, Sterling A, *et al.* Fully automated chip-based mass spectrometry for complex carbohydrate system analysis. *Anal Chem*, 2004, **76** (7): 2046~2054
- 40 Li J, Wang C, Kelly J F, *et al.* Rapid and sensitive separation of trace level protein digests using microfabricated devices coupled to a quadrupole-time-of-flight mass spectrometer. *Electrophoresis*, 2000, **21** (1): 198~210
- 41 Tan A, Benetton S, Henion J D. Chip-based solid-phase extraction pre-treatment for direct electrospray mass spectrometry analysis using an array of monolithic columns in a polymeric substrate. *Anal Chem*, 2003, **75** (20): 5504~5511
- 42 Li J, LeRiche T, Tremblay T L, *et al.* Application of microfluidic devices to proteomics research- Identification of trace-level protein digests and affinity capture of target peptides. *Mol Cell Proteom*, 2002, **1** (2): 157~168
- 43 Hirschberg D, Jagerbrink T, Samskog J, *et al.* Detection of phosphorylated peptides in proteomic analyses using microfluidic compact disk technology. *Anal Chem*, 2004, **76** (19): 5864~5871
- 44 Jiang Y, Wang P-C, Locascio L E, *et al.* Integrated plastic microfluidic devices with ESI-MS for drug screening and residue analysis. *Anal Chem*, 2001, **73** (9): 2048~2053
- 45 Le Gac S, Carlier J, Camart J-C, *et al.* Monoliths for microfluidic devices and proteomics. *J Chromatogr B*, 2004, **808** (1): 3~14

- 46 Lazar I M, Ramsey R S, Ramsey J M. On-chip proteolytic digestion and analysis using wrong-way-round electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*, 2001, **73** (8): 1733~1739
- 47 Fortier M H, Bonneil E, Goodley P, *et al.* Integrated microfluidic device for mass spectrometry-based proteomics and its application to biomarker discovery programs. *Anal Chem*, 2005, **77** (6): 1631~1640
- 48 Giusti P, Lobinski R, Szpunar J, *et al.* Development of a nebulizer for a sheathless interfacing of nanoHPLC and ICPMS. *Anal Chem*, 2006, **78** (3): 965~971
- 49 Zhang B L, Foret F, Karger B L. High-throughput microfabricated CE/ESI-MS: Automated sampling from a microwell plate. *Anal Chem*, 2001, **73** (11): 2675~2681
- 50 Lion N, Reymond F, Girault H H, *et al.* Why the move to microfluidics for protein analysis? *Curr Opin Biotech*, 2004, **15** (1): 31~37
- 51 水雯箐, 苏佳, 黄珍玉, 等. 微流控芯片与生物质谱联用技术的发展与展望. *质谱学报*, 2002, **23** (2): 100~111
- Shui W Q, Su J, Huang Z Y, *et al.* *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2002, **23** (2): 100~111
- 52 Tabert A M, Griep-Raming J, Guymon A J, *et al.* High-throughput miniature cylindrical ion trap array mass spectrometer. *Anal Chem*, 2003, **75** (21): 5656~5664

## The Development and Applications of Microfluid Devices Interfacing to Mass Spectrometry for Biochemical Analyses\*

WANG Wei-Ping<sup>1)</sup>, WANG Zhi-Chang<sup>1)</sup>, ZHANG Xie<sup>1)</sup>, LAI Jin-Hu<sup>1)</sup>, CHEN Huan-Wen<sup>1,2)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Department of Applied Chemistry, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000, China;

<sup>2)</sup>College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract** Miniaturization of analytical instrument is one way of addressing the issues of sensitivity, measurement speed, throughput and cost of analysis in biology analysis. Microfluidic devices can be used to manipulate the microscale sample expediently, and have many advantages including minimum sample consumption and minimum cross contaminant, which are typical problems in other conventional standard fluidic devices. The highly integrated microfluidic devices were suitable for high-density, parallel sample processing, and high-throughput analyses with extremely high duty cycles. Besides the optical spectroscopic measurement and electrochemical detection, mass spectrometry has been coupled to microfluidic devices as detector, resulting in rapid analysis of complex biological samples with high throughput and confidence. Microfluidic devices utilizing chromatographic or capillary electrophoresis separation techniques are under fast development, showing a predominant trend in modern analytical science. After giving a brief introduction to background of the microfluidic devices and fabrication techniques, documenting the technologies and applications of microfluidic mass spectrometry for the analysis of biological samples and emphasizing on the emergence of interfaces coupling microfluidic devices to various mass spectrometers for applications in proteomics, metabolomics and other biotechnology areas are reviewed.

**Key words** microfluidic device, mass spectrometry, proteomics, biochemical analysis

\*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (20505003).

\*\*Corresponding author . Tel: 86-794-8258703, E-mail: chw8868@gmail.com

Received: May 21, 2006 Accepted: June 28, 2006