

芯片毛细管电泳-原子荧光在线联用设计

李 峰¹, 王冬冬¹, 严秀平^{1*}, 苏荣国², 林金明²

1. 南开大学化学学院分析科学研究中心, 天津 300071

2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

摘要 讨论了芯片毛细管电泳-原子荧光在线联用技术的若干问题。针对芯片的集成化特点, 直接在芯片上蚀刻了一条补充液通道, 优化了芯片设计、芯片-原子荧光接口、气液分离器以及原子化器等, 成功地消除了引入流体(补充液 HCl、还原剂 KBH_4 和氩气)对芯片电泳分离的不利影响。

主题词 联用技术; 芯片毛细管电泳; 原子荧光光谱; 形态分析

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)06-1158-04

引言

近年来, 以毛细管电泳为核心技术、以芯片为操作平台的微流控芯片毛细管电泳(Chip-CE)技术迅速崛起, 成为一个极为活跃的热点^[1, 2]。Chip-CE具有分辨率高、分析快速、样品试剂消耗低, 污染少、体积小、自动化、集成化程度高等优点, 应该是一种很有吸引力的形态分离技术。但是, 到目前为止, 基于Chip-CE分离用于形态分析的工作却少有报道^[3-6]。Prest等^[3, 4]在PMMA芯片上采用等速电泳分离、电导检测的方法, 实现了硒(IV)和硒(VI)、砷(V)和砷(III)的基线分离。Song等^[5, 6]首次实现了Chip-CE与电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)联用, 并应用于元素的快速形态分析。Chip-CE和元素选择性检测器联用, 不仅选择性好、灵敏度高。但ICP-MS价格昂贵、操作费用高以及对分析人员要求高, 因而限制了其普及和实际应用。原子荧光光谱法(AFS)是目前常用的痕量元素检测技术之一, 具有维护和操作费用低, 能提供与ICP-MS相近的灵敏度, 且易于操作等优点, 十分适合用做Chip-CE形态分析时的柱后检测器^[7]。本文在前文^[7]基础上主要就Chip-CE-AFS联用技术中若干关键问题作进一步讨论, 如芯片设计、接口设计、气液分离器的选择、原子化器的优化以及接口中反压的消除等。

1 实验部分

1.1 试剂

所用试剂均为分析纯。稀释和配制溶液均使用二次去离

子水(DDW, $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$)。1 000 mg $\text{Hg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化汞(北京第二化学试剂公司)溶液。1 000 mg $\text{Hg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化甲基汞(Alfar公司)甲醇溶液。储备液置于4 °C避光保存。标准溶液都是由储备液用0.05% m/v L-半胱氨酸(Sigma)水溶液现用现配。CE缓冲液: $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ (北京化学试剂厂), 8% φ CH_3OH (天津泰兴化学试剂公司)配制, pH 9.36, 使用前用0.45 μm 滤膜过滤。还原剂: 0.22% m/v KBH_4 溶液(溶于0.1% m/v KOH)。修饰液: 1.1% φ HCl 溶液。

1.2 仪器

XGY-1011A型非色散原子荧光光度计(国土资源部物化探研究所, 廊坊)。高强度汞空心阴极灯(衡水宁强光源厂)。自制石英原子化器和气液分离器(GLS)。千谱色谱工作站(南京千谱软件有限公司)。XCDY型微流控芯片智能高压电源(山东化工研究院仪表研究所)。FIA-3100型流动注射分析仪(万拓仪器有限公司, 北京)。WaterPro纯水系统(Labconco公司, Kansas, MO, USA)。

2 结果与讨论

2.1 原子荧光光度计及其操作模式的选择^[8]

为了便于与Chip-CE联用, 原子荧光光度计在测定时必须持续工作(如空心阴极灯、原子化器、信号输出与采集)几分钟至十几分钟, 以便得到完整的电泳图。为此, 我们选择了结构简单、手动控制的XGY-1011A型非色散原子荧光光度计, 以便于自行设计联用系统。此型号仪器原用于间歇式

收稿日期: 2005-05-16, 修订日期: 2005-08-09

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2003CB415001), 国家自然科学基金项目(20437020)及高等学校博士学科点专项科研基金(20040055038)资助课题

作者简介: 李 峰, 1970年生, 南开大学化学学院分析科学研究中心博士 * 通讯联系人

AFS 分析。正如尹学博等^[8]所述,为便于联用,我们完全抛弃了 XGY-1011A 原来的进样系统。经适当修改,找到用于联用的 AFS 的操作模式:连续泵入 HCl 和 KBH_4 产生氢气从而维持氩-氢火焰,采用预热状态使空心阴极灯处于连续工作状态,可以实现不需对仪器结构进行改动而进行 Chip-CE-AFS 的联用。

2.2 芯片设计、加工和处理

图 1 为我们设计的三种不同结构的玻璃芯片 ($63.0 \text{ mm} \times 63.0 \text{ mm} \times 1.8 \text{ mm}$)。为增加进样体积,提高检测灵敏度,芯片均为双 T 型结构 ($200 \mu\text{m}$), 其中芯片 (a), (b) 为简单的“十字”通道, (c) 是“弯道”结构。1, 2, 3 和 4 分别是样品池, 样品废液池, 缓冲溶液池和修饰液池。进样通道和分离通道上宽 $118 \mu\text{m}$, 深 $39 \mu\text{m}$, 其他通道上宽 $900 \mu\text{m}$, 深 $350 \mu\text{m}$ 。液池直径为 3 mm , 液池到交叉点均为 10 mm 。芯片 (a), (b) 的有效分离通道长 42 mm , 而芯片 (c) 的有效分离通道长 90 mm 。通道 5~6 长 5 mm 。在芯片 (b), (c) 上, 为解决 Chip-

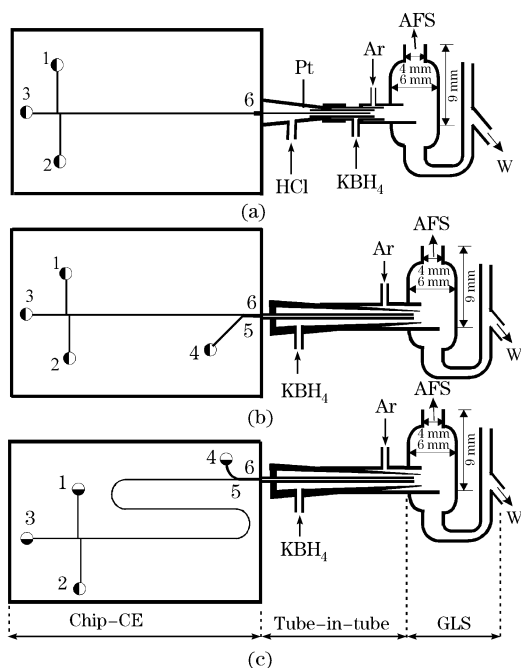


Fig. 1 Schematic diagram of the Chip-CE-AFS system (not to scale)

- 1: Sample reservoir; 2: Sample waste reservoir;
- 3: Buffer reservoir; 4: Makeup solution reservoir;
- 5: Junction of separation channel and makeup solution channel;
- 6: Chip exit port

CE 和 AFS 流速的不匹配,将修饰液通道 4~5 直接刻蚀在芯片上,这样就省去了管道之间的连接,从而减小了死体积。芯片 (b) 修饰液通道与分离通道夹角为 45° 。芯片 (c) 修饰液通道为四分之一圆且与分离通道的末端相切,这样的通道尺寸大小和结构特点能确保 Chip-CE 分离物及时有效地被修饰液传输而不至于过度稀释。

玻璃芯片的加工,采用标准光刻、蚀刻和热键合技术^[9]。在芯片液池 1, 2, 3 上方,用环氧树脂胶固定贮液槽,在修饰液池 4 上方固定 GC 进样橡胶塞以插入一段 PTFE 细

管和 Pt 电极用于引进修饰液及形成稳定的电回路。修饰液选用稀盐酸溶液,既是 Chip-CE 流出液的携带者,又为后续挥发性物种产生或氢化物发生提供所需要的介质。芯片通道依次用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$, DDW 和缓冲溶液冲洗平衡。

2.3 接口设计

实现 Chip-CE-AFS 联用技术的关键是接口问题。接口必须能够完成稳定的电泳回路,将分离液及时有效输送到气-液分离器从而实现挥发性物种或氢化物的在线发生,引入 AFS 系统,得以检测。为此,我们设计了如图 1 所示的联用接口。

对于芯片 (a): 在出口 6 位置,用微型电钻打一小孔,用事先调好的环氧树脂胶仔细地将 $50 \mu\text{m}$ i. d., $375 \mu\text{m}$ o. d. 的一段毛细管尽可能正对和靠近芯片分离通道出口粘接固定,作为传输毛细管。截取约 12 mm 长的 $100 \mu\text{L}$ 圆锥型塑料 Eppendorf 取液枪头尖端合适的一段,将 0.5 mm i. d., 1.0 mm o. d. 的硅橡胶管紧紧插入到 Eppendorf 取液枪头尖端约 5 mm , 硅橡胶管另一端插入 1.2 mm i. d. 的 T 型 PEEK 三通中,末端离 PEEK 三通出口约 $4 \sim 5 \text{ mm}$ 。在三通的外面再套一段胶管作为载气通道。分别在 Eppendorf 取液枪头和胶管适宜处开小孔,用于插入 Pt 电极、PTFE 管 (HCl 和 Ar 气通道),用环氧树脂胶固定。将传输毛细管出口插入到硅橡胶管内部离硅管出口约 0.5 mm 处。显然,这样的接口,存在着很大的弊端:一是接口处死体积大,造成峰展宽,影响分离效果。二是在毛细管的粘接中,重现性很难保证,并且传输毛细管口很容易被胶堵死,一旦出现这样的情况,需将胶除掉后重新粘接,十分费时。经反复实验,用该芯片和接口,未能得到很好的实验结果。

对于芯片 (b), (c): 为保证后续挥发性物种或氢化物的有效发生和及时传输,而避免因还原剂 KBH_4 的泵入以及反应过程产生大量的气体导致的反压对 Chip-CE 分离的影响,我们采用如图 1 所示的同心“管套管”的套管流接口:截取约 15 mm 长的 $100 \mu\text{L}$ 的圆锥形塑料 Eppendorf 取液枪头 (中管) 尖端合适的一段,在合适位置开一小孔,插入 KBH_4 通道管,用环氧树脂胶将其固定。同样在分离通道末端出口 6 位置,小心用微型电钻打一 $4 \sim 5 \text{ mm}$ 深的小孔,接纳 0.5 mm i. d., 1.0 mm o. d. 的硅橡胶管 (内管)。硅管另一端插入取液枪头至距枪头尖端约 $0.1 \sim 0.2 \text{ mm}$ 处。在中管取液枪头外面再紧紧地套上一外管,并在外管上开一小孔,插入 Ar 气通道管,用环氧树脂胶将其固定。从 Chip-CE 分离出来的样品和修饰液 HCl 在内管口与来自中管的 KBH_4 混合反应。反应混合物在 Ar 气的推动下,进入 GLS,挥发性物种或氢化物分离出来并导入原子化器中得以原子化进而被 AFS 检测,而液体从废液出口流出。从内管、中管到外管内径越来越大,这就缓解了 HCl 与 KBH_4 的剧烈反应并使反应产生的氢气得以及时释放。显然,修饰液 HCl 将 Chip-CE 分离出来的样品携带出来, KBH_4 、氩气分别从后面推动前面的流体按同一方向前进,这样的同心“管套管”的套管流在很大程度上减少了“反压”及其对分离带来的不利影响。然而,对于芯片 (b),未能实现我们的想法,无论如何改变实验条件,都未能检测到待测物。这可能是修饰液通道和分离通道的夹

角不合适,而造成的修饰液对分离通道的“反压”所致。而就芯片(c)而言,修饰液通道为四分之一圆,且与分离通道的末端相切。因而,修饰液能及时将 Chip-CE 分离出来的样品携带出来。另外,可能是弯道缓解了因修饰液引入带来的“反压”,最终我们采用了如图 1(c)的流程,成功实现了 Chip-CE 和 AFS 的联用。

2.4 气液分离器和原子化器

为减小挥发性物种或氢化物在 GLS 和原子化器中的不可避免的混合和扩散,得到较高的分离效率,应采用尽可能小体积的 GLS 和原子化器。我们设计使用的玻璃 GLS(液面以上体积仅约为 0.23 mL),如图 1 所示。其结构(不会产生涡流)与尹报道使用的 GLS^[10]类似,但体积远远小于后者。考虑到 GLS 内径太小,会由于反应剧烈而导致液体进入原子化器,另外受加工工艺的制约,因而没有再加工更小体积的 GLS。

考察了三种不同大小原子化器(14 cm × 7 mm i. d., 14 cm × 4 mm i. d. 和 14 cm × 2 mm i. d. 的石英管)对扩散的影响。结果发现,内径越小,峰形越尖锐,但是内径过小(2 mm)的原子化器来不及将氙气夹带的气体带入原子化器中,尤其是反应剧烈时,气体将和液体一起从 GLS 废液出口溢

出。因此,我们最终选用 14 cm 长 × 4 mm i. d. 的原子化器用于进一步实验。

2.5 其他因素的影响

在保证挥发性物种或氢化物发生、火焰稳定的前提下,为减少扩散、稀释以及“反压”,应尽可能采用低流速的 HCl、KBH₃ 和氙气,所有的连接管应该尽可能的短而细以及接口应该紧凑。

2.6 Chip-CE-AFS 联用技术的应用

在优化的实验条件下,将所研制的 Chip-CE-AFS 联用体系成功地应用于 Hg(II) 和 MeHg(I) 快速形态分析中。图 2 是 Chip-CE-AFS 应用于汞形态分析时连续进样 5 次得到的电泳重现性图。

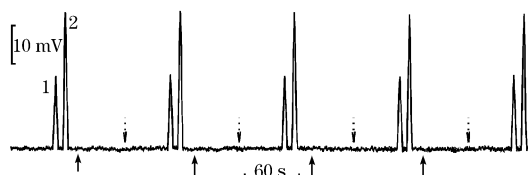


Fig. 2 Electropherogram of five consecutive runs for 4 mg · L⁻¹ MeHg(I) and 2 mg · L⁻¹ Hg(II)
1: Sampling; 2: Separation

参 考 文 献

- [1] Vilkner T, Janasek D, Manz A. *Anal. Chem.*, 2004, 76(12): 3373.
- [2] WANG Shi-li, FANG Zhao-lun(王世立, 方肇伦). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2000, 20(2): 143.
- [3] Prest J E, Baldock S J, Fielden P R, et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 376(1): 78.
- [4] Prest J E, Baldock S J, Fielden P R, et al. *J. Chromatogr. A*, 2003, 990(1-2): 325.
- [5] Song Q J, Greenway G M, McCreedy T. J. *Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18(1): 1.
- [6] Song Q J, Greenway G M, McCreedy T. J. *Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19(7): 883.
- [7] Li F, Wang D D, Yan X P, et al. *Electrophoresis*, 2005, 26(11): 2261.
- [8] YIN Xue-bo, JIANG Yan, YAN Xiu-ping, et al(尹学博, 江焱, 严秀平, 等). *Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 2004, 25(4): 618.
- [9] Fan Z H, Harrison D J. *Anal. Chem.*, 1994, 66(1): 177.
- [10] Yin X B, Yan X P, Jiang Y, et al. *Anal. Chem.*, 2002, 74(15): 3720.

Chip-Based Capillary Electrophoresis On-Line Coupled with Atomic Fluorescence Spectrometry and Its Application to Rapid Speciation Analysis

LI Feng¹, WANG Dong-dong¹, YAN Xiu-ping^{1*}, SU Rong-guo², LIN Jin-ming²

1. Research Center for Analytical Sciences, College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China

2. Research Center for Eco-Environment, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Abstract Chip-based capillary electrophoresis (chip-CE) is under rapid progress due to its high efficiency, fast separation, little sample consumption and integration. Due to the short optical path (30-50 μm), the conventional UV absorbance cannot satisfy the chip detection needs. Atomic fluorescence spectrometer (AFS) is a selective and sensitive detector for hydride-forming elements. With the strong points of low cost and easy operation, AFS is attractive as an ideal detector of chip-CE for mercury, arsenic and selenium, etc. A few important practical aspects of coupling chip-CE to AFS are critically discussed. These include the design of the chip, chip-AFS interface, gas-liquid separator, AFS atomizer, and elimination of the effect of backpressure on separation. The application of the developed chip-CE-AFS to the mercury speciation analysis is highlighted.

Keywords Hyphenated technique; Chip-based capillary electrophoresis; Atomic fluorescence spectrometry; Speciation analysis

(Received May 16, 2005; accepted Aug. 9, 2005)

* Corresponding author