

微加工芯片式流通池在 顺序注射可更新表面反射光谱检测中的应用*

王建雅, 方肇伦^{**}, 徐章润, 马泓冰, 徐淑坤

(东北大学分析科学研究中心, 辽宁 沈阳 110006)

摘要:提出了一种以湿法蚀刻技术制备的用于流动注射(FI)或顺序注射(SI)进样可更新表面检测的芯片式流通池,并将此流通池与SI系统及检测器相匹配,用于顺序注射可更新表面(SI-RST)反射光谱法检测。流通池由两片玻璃封接而成,流通池通道蚀刻在玻璃基片上。流通池通过多股双岔光纤分别与光源、检测器相耦合,以实现微珠表面的反射光谱法检测。将此SI-RST反射光谱法检测系统用于对锌的检测,并测定人发试样中微量锌的含量。

关键词:微加工芯片式流通池;顺序注射可更新表面;反射光谱法;锌

中图分类号:O657.3

文献标识码:B

文章编号:1006-3757(2001)04-0193-06

将固体微珠做为试剂的载体,通过流动注射或顺序注射系统将微珠注入检测系统;以及随后排废的流动注射可更新表面技术FI-RST(flow injection renewable surface technique)是流动注射分析的前沿领域之一^[1,2]。通过用微珠做为一次性使用的反应及检测表面,可以在浓集作用下提高灵敏度,分离干扰基体并省去费时的洗脱过程。近来,该技术在痕量分析及生物分析中虽有一些成功的应用,但总体上仍处于发展的初始阶段,具有较大的发展余地。而具有可对微珠进行截留和排放功能的流通池是FI-RST系统的关键部件,适合于不同的检测方法的流通池已见报道。Pollema等^[3]提出依靠电磁效应截留和排放磁性微珠的可更新固定化酶反应器。Ruzicka等^[4]报道了用于反射光谱和表面荧光检测的喷流环池。Holman等^[5]设计了用于径向和轴向吸收光谱检测的流通池。Mayer等^[6]提出与安培检测器相耦合的用于电化学检测的流通池。Harrison^[7,11]等提出以蚀刻方法制作的围堰式微流控系统,通过电渗流将微珠注入并排废,用于在线固相萃取和电动色谱检测。Andersson^[8]等将微加工的流通式过滤室用于流动注射可更新表面检测。Sato^[9]等提出三层组合结构的堤坝式流通池用于可更新表面免疫检测。我

们^[10]曾提出三层组合结构的芯片式流通池用于SI-RST反射光谱检测。

用于FI-RST反射光谱检测的流通池-喷流环池已见报道^[4],这种结构的流通池环隙要小于所用微珠直径的三分之二,环隙的大小影响反向流对堆积在检测窗口上的微珠的冲洗,因而检测窗口的面积受到所用微珠大小的限制,且排废时需要自动化的机械操作来完成。文献^[8,9]报道的以深层等离子体蚀刻微加工方法制备的流通池,微加工条件要求较高。

本文提出了一种以湿法蚀刻进行微加工的新型的芯片式流通池检测系统,并将此流通池与顺序注射系统及检测系统相匹配,用于流动注射可更新表面反射光谱法检测。锌试剂是对 Zn^{2+} 检测的灵敏试剂,在pH 8.5~9.5范围内,其与 Zn^{2+} 反应形成蓝色配合物,在620 nm处有最大吸收。本文以此反应为模型反应系统用于SI-RST检测,并将此系统用于对生物样品中微量锌的检测。

1 实验部分

1.1 仪器

顺序注射系统由ASD-10注射泵(Bodenseewerk,

* 教育部科学技术研究重点项目(批准号:2000031)。

** 通讯联系人。

收稿日期:2001-09-10。

Perkin-Elmer, Überlingen, Germany) 和 10 位选择阀 (Valco, Houston, TX, USA) 组成, 配 5 mL 针筒. 选择阀和注射泵的操作由计算机同步控制, 计算机程序以 Visual Basic 语言编写. 722 型光栅分光光度计. LM14164 型记录仪.

1.2 材料、试剂及配制

微芯片玻璃基片铬版为 Um 级(中国长沙韶光微电子总公司). Polysorb ACT-1 G-18 微珠(Transgenic, Omaha, USA), 直径 20~60 μm . 0.12 g 微珠以 1 mL 无水乙醇润湿, 用去离子水定容至 50 mL, 微珠浓度 2.4 mg/mL. 锌试剂(北京育才精细化工厂)溶液的配制: 先将 0.030 g 锌试剂溶于 1.5 mL 2.0 mol/L NaOH 溶液中, 再加水稀释至 50 mL (0.06%). Zn^{2+} (2.0 mol/L HCl 中) 标准溶液为 1 000 mg/L. Zn^{2+} 标准系列的配制: 将此 Zn^{2+} 标准溶液以 2.0 mol/L NaOH 溶液中和并稀释而成标准系列. pH 9.0 缓冲溶液的配制: 37 g KCl, 31 g 硼酸, 10 g 硫脲溶于约 800 mL 去离子水中, 以 2.0 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 9.0, 以水稀释至 1 000 mL. 实验中所用试剂均为分析纯, 实验所用水为脱气去离子水.

1.3 可更新表面微流控芯片流通池的制作

玻璃芯片的微加工方法详见文献^[4]. 主要操作如下: 以计算机绘图软件分别绘制 P1、P2 芯片(参

见图 1) 所需图形, 并以高分辨率激光照排机制备掩模. 将掩模盖在铬版上并以光刻机紫外曝光 60 s. 在 0.7% NaOH 溶液中显影得到图形, 以去离子水冲洗干净后放入干燥箱中烘干. 以 $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ 、 HClO_4 、 H_2O 溶液腐蚀铬层. 室温下以 HF、 NH_4F 混合溶液腐蚀玻璃, 用 2% NaOH 溶液去除光刻胶. 用铬层腐蚀液去除其它铬层.

在玻璃片上刻蚀通道的两端打直径为 0.7 mm 的孔, 然后将玻璃片放入浓硫酸和 H_2O_2 混合液中浸泡, 浸泡后以去离子水充分冲洗. 在真空干燥箱中烘干后, 两片玻璃在马福炉中 625 $^{\circ}\text{C}$ 条件下热键合.

1.4 芯片式流通池可更新表面检测系统

光纤及微加工芯片式流通池结构示意图如图 1 所示.

流通池由键合的两层玻璃芯片组成(图 1a). P1 玻璃片上钻有两个孔, 与内径 0.75 mm 的聚四氟乙烯导管 A1 和 A2 相接. 此片玻璃上以湿法刻蚀技术刻有深度为 600 μm 的流通池通道(图 1c), 通道中部保留一宽度 600 μm 的微堰, P2 玻璃片上与此微堰对应的位置蚀刻一平面为 2 mm $\times$ 2 mm、15 μm 深的长方形通道, 两片玻璃热键合后, 液体可从 P1、P2 间的缝隙通过, 而微珠被微堰截留.

微加工芯片式流通池通过一根多股双岔光纤与

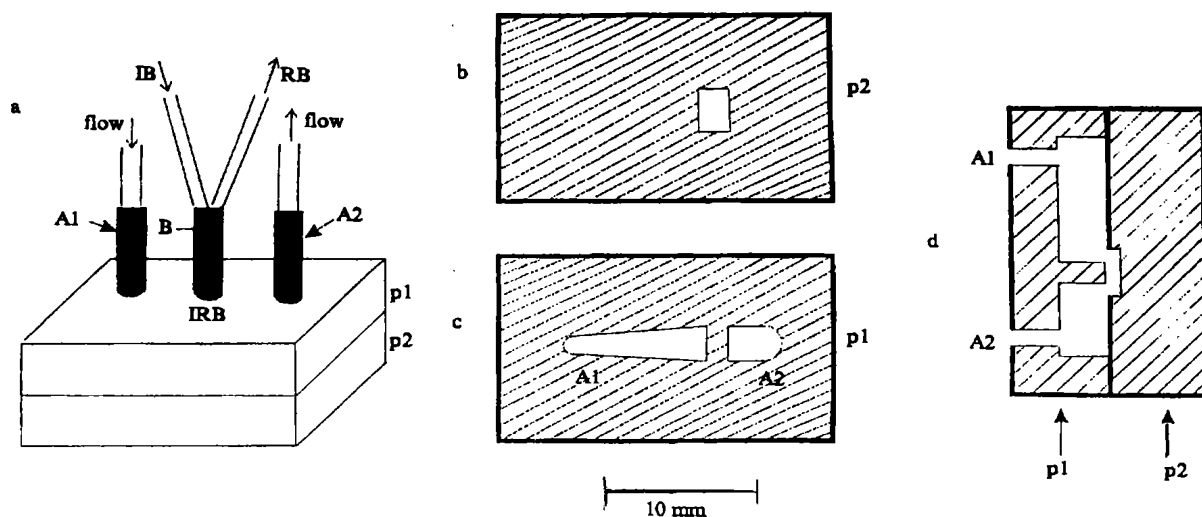


图 1 光纤及微加工芯片式流通池结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of microchip flow cell and multi-strand bifurcated fibre optical cable

a: Schematic diagram of the structure of microchip flow cell system. A1 and A2: tube;

B: multi-strand bifurcated fibre optical cable; P1 and P2: glass plate with etched structure;

RB: reflectance beam; IB: incident light; IRB: incident and reflectance terminal;

b: top view of P2; c: top view of P1; d: side view of microchip flow cell.

检测器相耦合, 流通池固定在分光光度计的液槽室中. 多股双岔反射式光纤 B 之 IB 臂将光度计 620 nm 入射光导出, RB 臂置于光度计检测器前. 直径为 2 mm 的 IRB 端对准流通池中微珠所在区域. 可更新反应表面的反射光在 620 nm 处检测.

1. 5 SI-RST 系统操作过程

SI-RST 检测系统结构见图 2a. 流通池与 SI 系统用长 25 cm、内径 0.7 mm 的聚四氟乙烯管相连接. 贮存管 HC 直径 0.96 mm, 长 150 cm, 体积为 1 100 μL . 废液贮存管 WHC 直径 0.96 mm, 长 56 cm, 体积为 400 μL . 多位阀与微珠悬浮液储瓶连接的管道直径为 0.7 mm, 长 20 cm. 与其它试液储瓶间连接管道直径为 0.5 mm. 微珠悬浮液储瓶置于 45° 倾角保持旋转以维持微珠的悬浮.

SI 系统从流通池 A1 端将微珠悬浮液、试剂、试样等注入流通池, 检测器实时监测微珠表面反射光度变化并记录. 检测结束后 SI 泵以反向流将微珠及废液从 A1 端吸出流通池并排废. SI 系统计算机控制程序见表 1.

第 1~ 7 步分别将载流水、空气间隔的 pH 缓冲溶液、0.06 % 锌试剂溶液、微珠悬浮液、载流水吸入贮存管中, 排列次序见图 2b. 第 8 步为将载流水推入流通池, 冲洗通道和流通池. 第 9 步将 HC 中的微珠悬浮液、锌试剂溶液、pH 缓冲溶液推入流通池, 微珠被截留在流通池中, 锌试剂溶液流经微珠层时吸附在微珠表面, pH 缓冲溶液冲洗微珠层, 此时确定检测基线. 第 11~ 12 步将 HC 中试样带推入流通池, Zn^{2+} 与微珠表面的锌试剂反应并记录吸光度变化, 实时记录的吸光度- 时间曲线见图 3. 第 13~ 14 步将反应后的微珠及 WHC 中的废液吸出排废并冲洗通道.

1. 6 人发试样的处理

准确称取 0.2 g 发样, 加 10 mL 混合酸(HNO_3 : $\text{HClO}_4=3:1$), 于电热板上缓慢加热至样品溶解, 于 170 $^{\circ}\text{C}$ 加热至近干. 以 5 mL 3.0 mol/L HNO_3 多次冲洗样杯, 加 4 mol/L NaOH 中和至中性. 加 15 mL pH 缓冲溶液及水至 25 mL. 取此样液 700 μL , 加 pH 缓冲溶液至 1 500 μL 后测定.

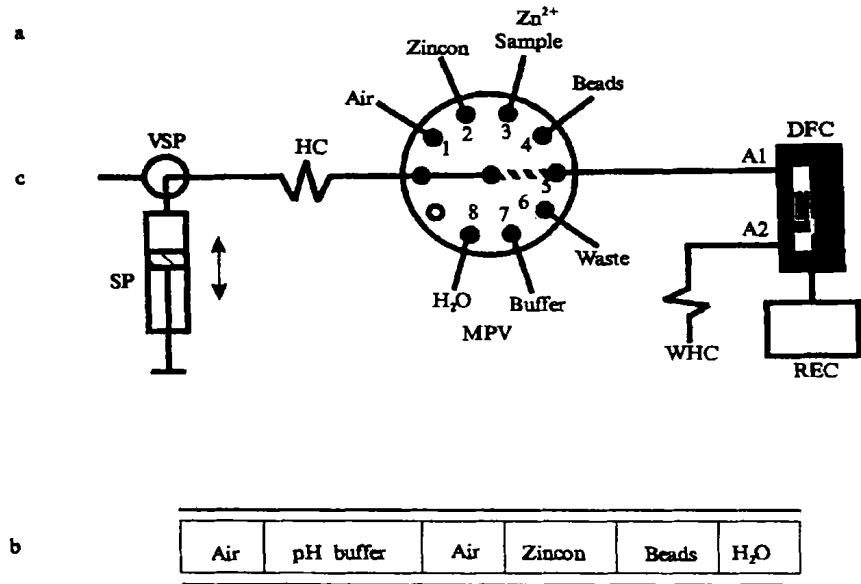


图 2 顺序注射可更新表面检测系统结构

Fig. 2 System for sequential injection renewable surface assay

a: Schematic diagram of the SI-RST system. C: H_2O carrier; SP: syringe pump; HC: holding coil; MPV: multiposition valve; VSP: two-position valve of syringe pump; DFC: detector and microchip flow cell; WHC: waste holding coil; REC: recorder; A1: tube A1; A2: tube A2.

b: Schematic diagram of the sequence of zones in the holding coil before sample loading.

表 1 顺序注射系统操作程序

Table 1 Operation sequence of the SI system

Sequence No	Valve MPV position	Valve VSP position	Syringe steps Moved	Volume processed(μL)	Time(s)	Function
1	1	Left	300	500	3	H ₂ O aspiration
2	1	Right	60	100	1	Air aspiration
3	7	Right	180	300	2	pH buffer aspiration
4	1	Right	15	25	1	Air aspiration
5	2	Right	60	100	1	Reagent aspiration
6	4	Right	225	375	2	Bead suspension aspiration
7	8	Right	120	200	1	H ₂ O aspiration
8	5	Right	- 195	- 325	3	flow cell and tube washing
9	5	Right	- 390	- 650	15	Bead, reagent, pH buffer loading
10	3	Right	90	150	1	Sample aspiration
11	5	Right	- 60	- 100	3	pH buffer loading
12	5	Right	- 170	- 283	17	Sample loading
13	5	Right	300	500	3	Waste bead back-suction
14	6	Right	- 535	- 892	5	Waste and holding coil washing

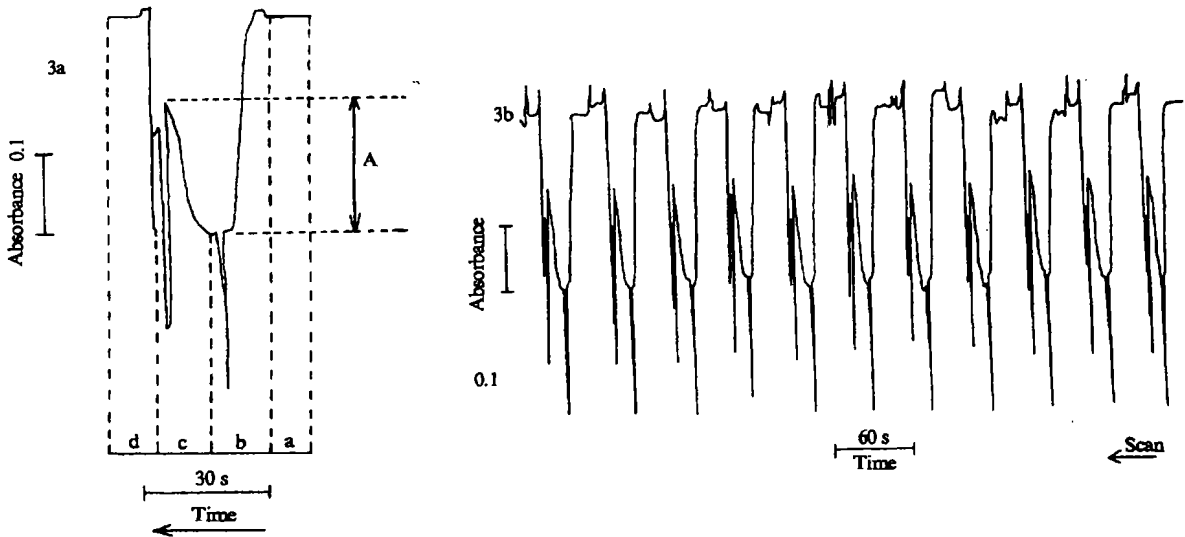


图 3 SI-RST 检测吸光度时间曲线

Fig. 3 Absorbance-time curve for SI-RST assay

a. Absorbance-time curve for SI-RST assay

b. Chart recording of replicate SI-RST assays to show precision

Bead suspension 375 μL (bead 0.9 mg), bead layer 600 μm , path width 1.8 mm, detection area 3.6 mm²;

0.06 % Zincon solution 100 μL , 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zn²⁺ sample 150 μL , Zn²⁺ sample flow rate 1.0 mL/min;

a: steps 1~ 7 of table 1; b: steps 8~ 9; c: steps 10~ 12; d: steps 13~ 14.

2 结果与讨论

2.1 流通池及 SI-RST 系统的设计

本文采用湿法蚀刻技术在玻璃基片上蚀刻出微管道制备芯片式流通池, 通过优化蚀刻时间即可在上下芯片上制作成不同深度的微结构, 无需采用多种基片材料或在同一芯片上进行难度较大的多次加工. 流通池的设计中将检测区至 A1 管间通道宽度以流线形由 1.8 mm 缩小至约 0.8 mm, 用通道中部的微堰实现对微珠的截留, 液体从微堰上方的缝隙流出, 检测结束时通过反向流将微珠冲洗出流通池. 这种结构的流通池有利于对微珠的注入和排废操作. 只要选择适当的微堰缝隙, 即可采用不同粒度的微珠进行检测.

2.2 实验参数的优化

2.2.1 微珠层厚度的选择

在保持微珠层在检测区形成的反射表面的面积、试样浓度、采样量、试样区带流速 1.0 mL/min 相同的条件下, 采用 Polysorb G-18 微珠, 测定了微珠层厚度对检测的影响. 微珠层厚度达 600 μm 时, 微珠层反射效率达最大值. 本文对参数的优化实验使用微珠层厚度为 600 μm 的流通池. 流通池宽度约为 1.8 mm, 长约为 2.0 mm, 流通池中微珠堆积区体积约为 2.2 μL , 以微珠平均直径 40 μm 计算, 与光束垂直方向上可堆积微珠 15 层, 检测区可堆积微珠约 36 000 粒(微珠悬浮液 375 μL , 微珠重量 0.9 mg).

2.2.2 流通池微堰与盖片间缝隙的选择

流通池微堰与盖片间缝隙影响对微珠的截留与系统的背压. 缝隙过小, 系统背压增大, 载流流速须降低, 检测时间增长. 缝隙过大, 微珠截留效果不好. 在采用本文所述微珠及流通池宽度的条件下, 适宜的缝隙高度为 15~20 μm .

2.2.3 微珠用量及锌试剂在微珠表面的吸附

微珠悬浮液浓度采用 2.4 mg/mL 时, 其用量对灵敏度的影响见图 4. 注入流通池微珠重量在 0.85~0.95 mg 范围内有一较恒定的灵敏度平台. 低于此范围时微珠不足以充满光纤检测区, 而超过时则部分反应发生在检测区之外, 本工作中选用 0.9 mg (微珠悬浮液 375 μL) 用量. 在此条件下, 当 0.04 % 锌试剂用量达 150 μL 以后, 检测灵敏度达到基本稳定值. 工作中锌试剂采用此用量.

2.2.4 载流流速及采样量的影响

载流的流速及采样量影响试样与反应表面的接

触时间, 从而影响反应产物的生成及检测灵敏度. 实验中观察到检测信号随着载流流速的提高而降低. 流速对灵敏度的影响见图 5 综合考虑检测灵敏度及分析速度等因素, 工作中选用 1.0 mL/min 流速. 采样量低于 150 μL 时, 吸光度随采样量的增大近似为正比例增大, 此范围外变化幅度较小. 工作中选用采样量 150 μL .

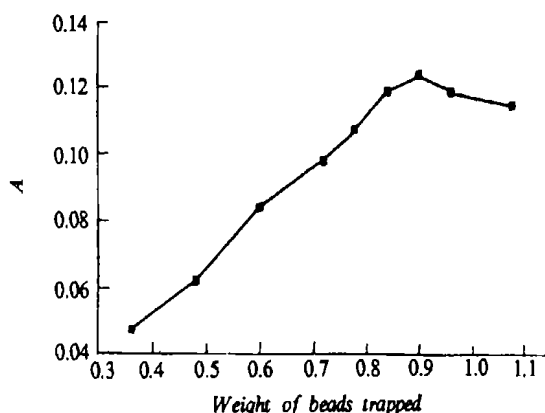


图4 微珠注入量影响

Fig. 4 Influence of amount of bead trapped on absorbance
Bead layer depth 0.6 mm; detection area 3.6 mm²; 1.0 $\mu\text{g/mL}$ Zn²⁺ sample 150 μL ; sample flow rate 1.0 mL/min; 0.06 % zincon 100 μL .

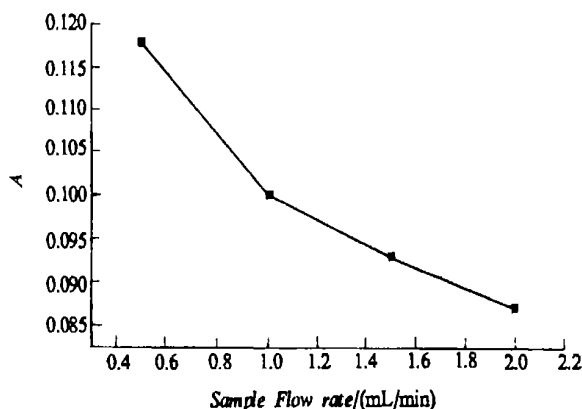


图5 流速影响

Fig. 5 Influence of the carrier flow rate on sensitivity
Bead layer 0.6 mm; detection area 3.6 mm²; 1.0 $\mu\text{g/mL}$ Zn²⁺ sample 150 μL ; 0.06 % zincon 100 μL ; weight of beads trapped 0.9 mg.

2.3 方法性能

在前述的系统优化条件下, 对 Zn²⁺ 标准系列进行检测. 采样量 150 μL , 样带流速 1.0 mL/min 条件下, 检测线性范围为 0.05~1.2 $\mu\text{g/mL}$ Zn²⁺, 检测限

(3σ) 为 0.04 μg/mL, 回归方程为 $A = 0.073C + 0.002$, 回归系数 r 为 0.999 2 ($n = 7$), 采样频率 62 h⁻¹. 连续 11 次重复实验 (图 3b) 测得的 RSD ($n = 11$) 为 1.5%. 检测灵敏度与文献[11]所述的固相表面检测方法相近, 而试剂、试样用量及检测时间、产生的废液量较其所述方法节省约 90%.

2.4 对人发试样中锌含量的测定

文献^[11, 12]报道, Al³⁺、Fe³⁺、Cr³⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Mn²⁺、Pb²⁺、Mo(VI)、Cd²⁺、Hg²⁺ 离子浓度与 Zn²⁺ 摩尔浓度比大于 1:1 时对此检测有干扰. 在发样中这些离子浓度不大于 Zn²⁺ 浓度, 基本不干扰对 Zn²⁺ 的检测. Cu²⁺ 对检测有干扰, 在反应体系中加硫脲掩蔽. 以前述的测定方法对 GBW 09101 人头发标准样进行检测, 试样前处理见 1.5. 本法测定结果为 186 ± 3 μg/g, 标准值为 189 ± 8 μg/g.

3 结 论

实验结果表明, 将湿法蚀刻玻璃芯片式流通池与顺序注射系统及检测器相匹配, 用于 S-RST 反射光谱法检测具有其可行性与优越性. 此系统与不同的检测器相匹配, 可进行表面反射光谱、表面荧光、表面化学发光等方法检测, 可开发较广泛的应用领域. 如果采用更小直径的微珠, 流通池系统可能进

一步微型化, 试剂的用量可能进一步减少.

参考文献:

- [1] Ruzicka J, Scampavia L. *Anal. Chem.*, 1999, 71: 257A~263A.
- [2] 王建雅, 方肇伦. *分析化学*, 2001, 29: 466~472.
- [3] Pollema C H, Ruzicka J, Christian G D, Lenmark A. *Anal. Chem.*, 1992, 64: 1356~1360.
- [4] Ruzicka J, Pollema C H, Scudder K M. *Anal. Chem.*, 1993, 65: 3566~3571.
- [5] Holman D A, Christian G D, Ruzicka J. *Anal. Chem.*, 1997, 69: 1763~1765.
- [6] Mayer M, Ruzicka J. *Anal. Chem.*, 1996, 68: 3808~3814.
- [7] Oleschuk R D, Shultz-Lockyear L L, Ning Y, Harrison D J. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 585~590.
- [8] Andersson H, Ahmadian A, Wijngaart W V D. *Micro total analysis system 2000*, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000: 473~476.
- [9] Sato K, Tokeshi M, Odake T. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 1144~1147.
- [10] 王建雅, 方肇伦. *光谱学与光谱分析*, 待发表.
- [11] Harrison D J, Fluri K, Seiler K, Fan Z, Effenhauser C S, Manz A. *Science*, 1993, 261: 895~897.
- [12] Liu R M, Liu D J, Sun A L. *Talanta*, 1993, 40(3): 381~384.
- [13] Liu R M, Liu D J, Sun A L. *Talanta*, 1993, 40(4): 511~514.
- [14] 殷学峰, 叶美英, 沈 宏, 方肇伦. *分析化学*, 待发表.

Studies on a Sequential Injection Renewable Surface Reflectance Spectrophotometric System Using a Microfabricated Microchip Flow Cell and Its Application

WANG Jian-ya, FANG Zhao-lun, XU Zhang-run, MA Hong-bing, XU Shu-kun

(Research Center for Analytical Sciences, Northeastern University, Chemistry Building, Shenyang 110004 China)

Abstract: A sequential injection renewable surface reflectance spectrophotometric system employing a microchip flow cell was developed. The double-layer microchip flow cell with a weir structure for bead collection was fabricated on glass chips using a standard photolithographic procedure followed by thermal bonding. The flow cell was coupled to a sequential injection system and an optical fiber photometric detection system. The S-RST analysis system was applied to the determination of trace amounts of zinc by reflectance spectrophotometry. The analyte reacted with zinc sorbed on Polysorb G-18 beads trapped in the flow cell. The proposed method was successfully applied to the determination of zinc in human hair.

Key words: microfabricated microchip flow cell; sequential injection renewable surface technique; reflectance spectrophotometry; zinc

Classifying number: O657.3