

第一章 手性拆分文献综述

1.1 手性

手性是用来表达化合物分子因原子三维排列引起结构不对称性的术语。手性分子就是具有上述手性特征的化合物分子，这种空间结构的不对称性所造成的彼此成实物和镜像关系而又不能重合的化合物分子称为对映异构体(enantiomer)[1]。由于自然界中构成生命体基本组成单元的氨基酸和单糖等的对映体含量不同，甚至有的仅以单一对映体形式存在，使生物大分子如蛋白质，酶、核酸和多糖等均表现出明显的手性选择性。这种自然界的天然属性使得作为药物的对映体分子在药效和毒理性能上往往存在很大差异[2, 3]。如 20 世纪中期，以消旋体形式出售的用于治疗妊娠反应的药物沙利度安(thalidomide, 又称作反应停)造成数千名的婴儿畸变，后经研究发现，该药的 S-构型具有强烈的致畸作用，R-构型才具有止吐作用[4]。此后，药物的手性问题得到了世界范围的普遍关注。1992 年，美国食品及药物管理局(FDA)规定，制药公司必须测定每个药物立体异构体的组成，并提供每个异构体的药理活性资料，尤其是新药报批[5]。1996 年，单旋光体形式的手性药物销售额达 740 亿美元，并以每年超过 25%的速度递增[6]。除手性药物之外，手性化合物还涉及农用化学品和香精香料。例如，(R)-苧烯有桔子香味，而其(S)-对映体则具有柠檬香味。时至今日，手性化合物已经与人类生活息息相关，其需求量随着人们对身体健康、环境保护的关注，药品管理部门对手性药物开发的监管，以及手性化合物制备技术的革新而日益增长。

手性技术市场的不断扩大也推动了手性相关科学研究的蓬勃发展，自 1998 年起，欧洲每年召开一次 Chiral Europe 会议，美国自 1993 年起也开始举办每年一次的 Chiral USA 会议，2006 年中国科学家组织召开了首届“手性

中国”国际会议。Wiley 和 Elsevier 出版社创办了 Chirality 和 Tetrahedron 系列多本专门报道手性研究进展的专业期刊。仅 2007 年 SCI 收录以“chiral”为关键词的文献超过 5800 篇。

手性技术涉及手性合成，手性拆分和测定，手性化学品的应用等几大方面。本章重点对手性拆分方法及基本原理，特别是以微流控芯片为载体的手性拆分进展进行综述。

1.2 手性拆分方法及基本原理

手性拆分是将手性化合物的外消旋对映体通过生化、化学或物理手段分离开来的技术。手性拆分不仅是制备手性化合物的重要途径之一，也是深入研究对映体药理、毒理作用的技术基础，同时也是评估对映体纯度的必要条件。尽管通过外消旋体拆分的方法获得单一对映体的产率最大只有 50%，但由于手性源合成和不对称合成等方法难以满足市场需求以及成本因素的制约，拆分外消旋体目前仍是工业生产手性化合物的有效方法之一。由于对映体物理化学性质相似，分离难度较大，并且涉及领域多，需求量大等原因，开发高效、快速、高通量或便携的手性拆分平台一直受到关注。目前，手性拆分方法包括结晶法拆分、化学法拆分、酶法拆分、色谱/电泳法拆分几类。其中，结晶法、化学法和酶法拆分主要用于对映体制备，色谱/电泳法拆分可以制备少量对映体，也可以进行对映体纯度分析。下面将对上述几类手性拆分技术分别加以阐述。

1.2.1 结晶法拆分

结晶法拆分是通过物理或化学手段使对映体分别结晶加以分离的方法[7]。结晶法适合拆分外消旋混合物，即同种对映体间的作用力大于相反对映

体间的作用力，两种对映体分别结晶，宏观上是两种晶体的混合物。常规直接结晶拆分法适用于外消旋混合物中两种相反的对映体分别生成的晶体较大，且从外观能直接看出差别的情形。随着技术的进步，“接种晶种拆分法”，也称为“诱导结晶法”或“优先结晶法”的出现使直接结晶拆分的适用面有所拓宽。这种方法的具体做法是：在热的饱和或过饱和的外消旋体溶液中加入其中一个对映体的晶种，使该对映体稍稍过量造成不对称环境，然后迅速冷却，则同种对映体将附在晶体上析出；滤去晶体后，母液重新加热并补充外消旋体使之达到饱和，然后加入另一种对映体的晶种，冷却，使另一对映体析出[1, 8]。这种方法操作简单、成本低，适合大批量生产，缺点在于受纯对映体晶种的限制。工业生产氯霉素[9]和 L-多巴[10]就是采用这种“诱导结晶法”。

1.2.2 化学法拆分

化学法拆分适合用于拆分外消旋化合物，即同种对映体之间的作用力小于相反对映体之间的作用力，两种相反的对映体配对结晶出现。这种方法的具体做法是利用外消旋体的化学性质，使其与某种光学活性拆分试剂作用生成两种非对映体的盐或复合产物，然后利用两种非对映体盐或复合物溶解度等物理性质上的差异，使他们分别结晶析出，然后脱去光学活性试剂，则分别得到两种对映体[11]。奎宁、金鸡纳碱和金鸡纳啶等常用作拆分消旋的酸性化合物的试剂；联苯甲酰酒石酸（DBTA）常用于拆分碱性化合物。例如，一种有效的抗癌药物中间体 flavopyridol 就是利用 R, R- DBTA 进行拆分[12]。利用这种方法进行拆分的关键因素是光学活性拆分剂的选择，拆分剂需满足廉价易得，易于和外消旋化合物反应及回收，形成的非对映体易于结晶等条件。由于拆分剂和非对映体结晶条件的选择往往依赖实验经验，与直接结晶法相比，这种方法稍显复杂，造作过程偏长。

1.2.3 酶法拆分

众所周知，酶是一类具有催化性能的特殊蛋白质。酶法拆分是利用从微生物和动植物细胞中提取出的酶，或直接利用微生物或细胞作为酶的载体，选择性催化外消旋体底物中的某个对映体优先反应，再利用其与未反应对映体物理或化学性能上的差异达到拆分目的。通常认为酶法拆分外消旋体的基本原理是：对映体经酶催化时活化能不同使二者的反应速度不同，反应速度快的对映体将优先完成反应，剩下反应慢的对映体，从而使两个对映体得以拆分[7, 13]。

酶法拆分外消旋体具有以下优点：① 酶催化反应通常具有高度专一性，副反应少，因此得到的产物旋光纯度很高，产品分离纯化简单；② 酶催化反应大多在温和条件下进行，反应温度通常在 0~50℃，pH 值接近中性，因此少有设备腐蚀，生产安全性高；③ 酶无毒，易降解，对环境有好，符合“绿色化学”的要求，适用于工业化大规模生产[14]。

酶法拆分已经在工业生产和科学研究中进行了大量实践，常用于拆分手性醇、胺和酯等[15]。例如合成 DL-氨基酸成本低廉，因此不少 D-或 L-型单旋光氨基酸均通过酶法拆分进行制备[16, 17]。其中 D-苯甘氨酸属于非天然氨基酸，是制备青霉素类药物氨苄西林和头孢苄氨的原料之一，化学法合成制得的苯甘氨酸是外消旋体。早先工业上用(+)-樟脑磺酸拆分，因拆分剂生产困难，使上述两种药物的生产受到很大限制。经方法改进采用酶法拆分，反应过程见图 1-1，即将外消旋苯甘氨酸用醋酸酐酰化，然后用氨肽酶水解，由于只有 L-乙酰苯甘氨酸被水解，经分离，D-乙酰苯甘氨酸用盐酸水解即得到 D-苯甘氨酸。而 L-苯甘氨酸可与硫酸供热，使之外消旋化，再次拆分，原料利用率达 100%[18]。

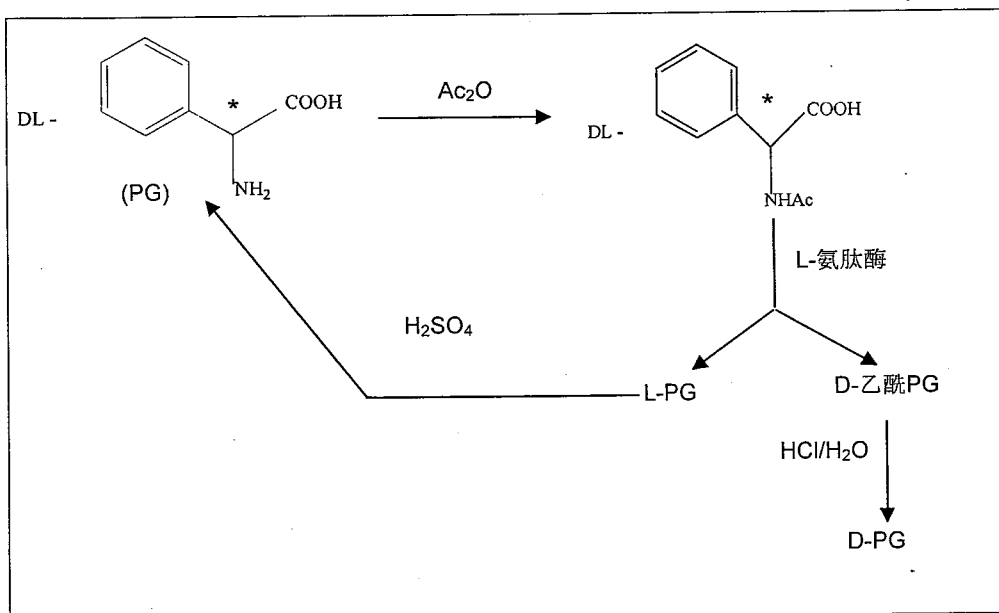


图 1-1 酶拆分法制备 D-苯甘氨酸流程

Fig. 1-1 The scheme of the flow chart for enzymatic resolution of D-phenylglycine

常用于手性拆分的酶类包括水解酶、脂肪酶、酯酶、蛋白酶、酰胺酶、腈水合酶和酰化酶等。根据酶的存在形式，酶法拆分可以分为游离酶和固定化酶两类。游离酶特别是天然游离酶稳定性差，易失活，难以重复使用，并且由于和反应物以及产物混杂在一起，纯化困难，限制了其应用范围。固定化酶是将酶通过物理或化学手段固定或限制在一定材料的表面或区域内，并保持其的催化性能的一种技术。固定化酶技术有效克服了游离酶的上述不足，容易实现酶的回收和重复使用，成为酶工程和手性拆分中活跃的研究领域之一[19, 20]。当然，固定化酶技术也存在一些缺点，如酶经固定化后，在一定

程度上限制了酶空间取向的自由度，并有可能屏蔽其活性位点，导致酶活性的降低。

1.2.4 色谱/电泳法拆分

色谱/电泳法拆分对映体通常被用作对映体的分离分析方法。色谱/电泳法手性拆分可采用两种形式：直接法和间接法。直接法是利用手性固定相或手性添加剂构建的手性环境，使对映体在与其接触时发生非共价相互作用而产生暂时性的差异得以分离。间接法是使对映体先与一种手性试剂（光学纯试剂）反应生成非对映体，然后在非手性环境下分离。这种方法要求手性试剂具有很高的纯度，与对映体反应过程中不发生消旋化；手性试剂本身具有 UV 或荧光官能团或带有易于衍生的基团；手性试剂与对映体生成的反应产物易于还原为原来的对映体，且对映体易于与手性试剂分离开来[21]。常用的手性试剂包括异硫氰酸酯和异氰酸酯类、萘衍生物类、酰氯与磺酰氯类，以及光学活性氨基酸等几类。二者相比，直接法简单易行，应用相对广泛。

色谱/电泳法拆分对映体的原理一直没有定论，大多解释沿用 Dalgliesh 提出的“三点作用原理”，认为对映体和手性拆分剂之间至少存在三个作用点，至少其中一个具有立体选择性，从而区别两个对映体[22]。对映体或对映体与拆分剂之间形成的络合物产生保留时间或电泳迁移速率差异而得以分离。

常用的色谱/电泳拆分技术包括高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、超临界流体色谱(SFC)、气相色谱(GC)、毛细管电泳(CE)和毛细管电色谱(CEC)等，这些技术可以实现较快速的手性拆分以进行对映体定性、定量分析，其中部分技术还可以实现对映体少量制备。下面将针对不同的色谱/电泳手性拆分和分析技术分别加以介绍。

1.2.4.1 高效液相色谱法

高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 是目前手性分离分析最重要的技术之一, 特别是基于手性固定相的液相色谱技术在过去的 20 年内发展迅速, 成为药物开发中使用最为广泛的手性分离技术 [23, 24]。目前已经出现超过 200 种的商品化手性柱产品 [25]。常用的手性固定相主要包括蛋白质类、环糊精类、多糖衍生物类、氨基酸及 Pirkle 型、手性聚合物类、大环抗生素类及其它小分子类等几大类。高效液相色谱适用范围广, 可用于对映体纯度检测等定量分析, 随着制备色谱技术和模拟移动床技术的发展, 其在对映体制备方面的应用将进一步扩大。高效液相色谱法的缺点在于, 试剂耗费量大, 分析时间长。

1.2.4.2 超临界流体色谱法

超临界流体色谱 (supercritical fluid chromatography, SFC) 是以超临界或近临界流体 (如 CO_2) 为流动相对化合物进行分离的技术 [26], 由 Mourier 等 [27] 于 1985 年首次将其引入手性拆分领域。这种技术可分为两类: 一类是填充柱 SFC, 包括制备级的填充柱 SFC 和超临界流体模拟移动床色谱; 一类是毛细管 SFC, 类似于气相色谱 [28]。超临界流体色谱因其高扩散速度、低粘度的特点比常规液相色谱分离快 3-5 倍; 由于超临界流体对样品溶解度高, 较气相色谱更具普适性, 被看做液相色谱和气相色谱的补充, 不仅可以用于分离分析, 在制药工业对映体制备方面也应用广泛 [29]。超临界流体色谱对仪器的要求较高, 普及性较差, 这在一定程度上限制了该技术的应用。

1.2.4.3 气相色谱法

气相色谱法也是手性拆分的重要技术之一, 主要利用毛细管色谱柱内壁

上的手性固定相进行直接拆分[30, 31]。常用的手性固定相包括手性氨基酸衍生物, 光学活性的金属配合物和环糊精及其衍生物等三类; 近年来也出现了少量的新型手性固定相, 如环肽、纤维素衍生物和手性离子液体[32]。气相色谱具有很高的分离度和柱效、流动相成分简单, 易于操作、定量准确, 在分析无芳环的化合物(这类化合物难以用液相色谱进行分离和检测)方面独具优势[23]。但由于气相色谱分离通常在较高温度下进行, 可能使手性固定相发生消旋化导致分离能力下降, 且只能分离挥发性好和热稳定性高的手性化合物, 应用范围有一定局限性。

1.2.4.4 毛细管电泳法

毛细管电泳因其分离能力高, 操作简单, 样品和试剂消耗少, 分析时间短等优点, 自 20 世纪九十年代起成为手性拆分的新兴力量, 成功拆分了农药、药物等多种手性分子[33-36]。毛细管电泳拆分对映体无需制备手性固定相, 通常将手性拆分剂添加到运行缓冲液中, 对映体在电泳过程中与手性拆分剂发生立体识别作用, 形成暂时的非对映体复合物, 导致表观电泳淌度不同而得以分离。应用较多的手性分离模式包括毛细管区带电泳、毛细管胶束电动色谱和毛细管凝胶电泳。手性拆分剂选择范围广, 如环糊精及其衍生物、冠醚、蛋白质、胆汁盐、糖、手性表面活性剂等, 其中前两者是最为常用的毛细管电泳手性拆分剂。与液相色谱和气相色谱相比, 毛细管电泳最显著的优点是其分离效率高, 尤其适合分离带电荷和高分量的手性样品。这种方法由于也是在毛细管内进行, 与气相色谱一样, 难以进行对映体制备。

1.2.4.5 毛细管电色谱法

毛细管电色谱法是一种在毛细管内制备固定相, 并以电渗流为驱动力的分离方法。这种方法兼具毛细管电泳高效分离能力, 以及液相色谱固定相的

高选择性, 适合用于手性分离分析[37, 38]。根据固定相制备方式的不同, 毛细管电色谱分为开管柱、填充柱和整体柱三类。开管柱电色谱是将固定相涂覆或键合到毛细管柱的内壁, 这种方式相比低, 选择性差。填充柱是将修饰有手性拆分剂的颗粒填充至毛细管内, 通常需要在填充柱的一端烧制塞子以防止固定相流失。这种方式较开管柱而言相比高, 选择性好, 但填料填充费时, 塞子烧结处易产生气泡, 影响分离。整体柱是由单体和致孔剂在毛细管内原位聚合而成, 手性拆分剂可以通过修饰作为单体引入, 也可以在整体柱制成后再进行偶联。这种方法无需制备塞子, 柱压小, 相比高, 是近年来较受关注的手性拆分技术之一。与毛细管电泳拆分法类似, 这种方法因在毛细管内进行, 也难以用于对映体制备。

上述方法已经在手性拆分和分析中得到广泛应用[36, 39-41], 但是随着手性技术的迅速发展和手性市场的不断扩大, 现有方法仍难以满足手性拆分和分析的需求, 高通量手性拆分技术的开发依然是研究热点。此外, 手性产品在农药和精细化学品领域的渗透, 使得质量控制和农残检验亦需进行手性分析, 由此产生对便携化、微型化的现场手性分析装置研究的需要。

1.3 微流控芯片手性拆分

1.3.1 微流控芯片

微流控芯片 (microfluidic) 又称微流控芯片实验室或芯片实验室 (lab-on-a-chip) 是指把生物和化学领域中所涉及的样品制备、反应、分离和检测等基本操作单元集成到一块几平方厘米或更小的芯片上, 由微通道形成网络, 以可控流体贯穿整个系统, 用以取代常规化学或生物实验室的各种功能的一种技术, 如图 1-2 所示。微流控芯片的基本特征和最大优势是多种单元技术在整体可控微小平台上的灵活组合和规模集成[42]。上述特征使得微

流控芯片有可能为传统实验室研究模式带来革命性的变革，使多步操作的复杂实验过程、微观科学研究、野外考察、现场检测等得以借助微流控芯片技术实现。

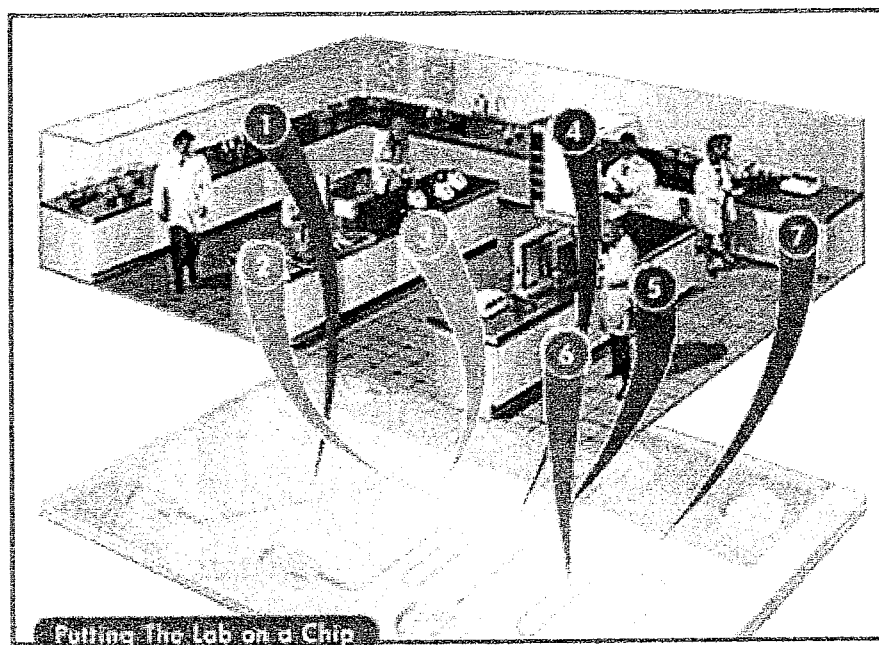


图 1-2 “微流控芯片实验室”概念展示

注：数字代表不同的操作单元

Fig. 1-2 Illustration of microfluidic based laboratory on a chip

事实表明，自 20 世纪 90 年代初以芯片电泳为雏形发展至今，微流控芯片技术取得了长足进步[43-46]。主要表现为：

(1) 芯片材料及相应制作工艺多样化，早期主要通过光刻和湿法刻蚀技术在硅片和玻璃材料上制作微通道，软光刻工艺的出现和 MEMS 技术的发

展，使应用高聚物、陶瓷和硅橡胶等材料制作芯片成为可能[47-49]。

(2) 微流控芯片单元技术日渐成熟，单元集成度越来越高。样品引入单元、预处理单元（如过滤、萃取、透析、膜分离等）、以及分离、反应、收集等单元的部分或全部集成在很大程度上体现了微流控芯片的特征和优势。代表性工作为 Motorola 公司研制的一种全集成 DNA 分析芯片[50]。如图 1-3 所示，该芯片集成了混合器、阀、泵、通道、反应室、加热器和传感器，可以完成复杂样品中的 DNA 全自动分析，包括基于磁珠的细胞捕获、细胞富集纯化和裂解、聚合酶链反应、DNA 杂交，电化学检测等过程。

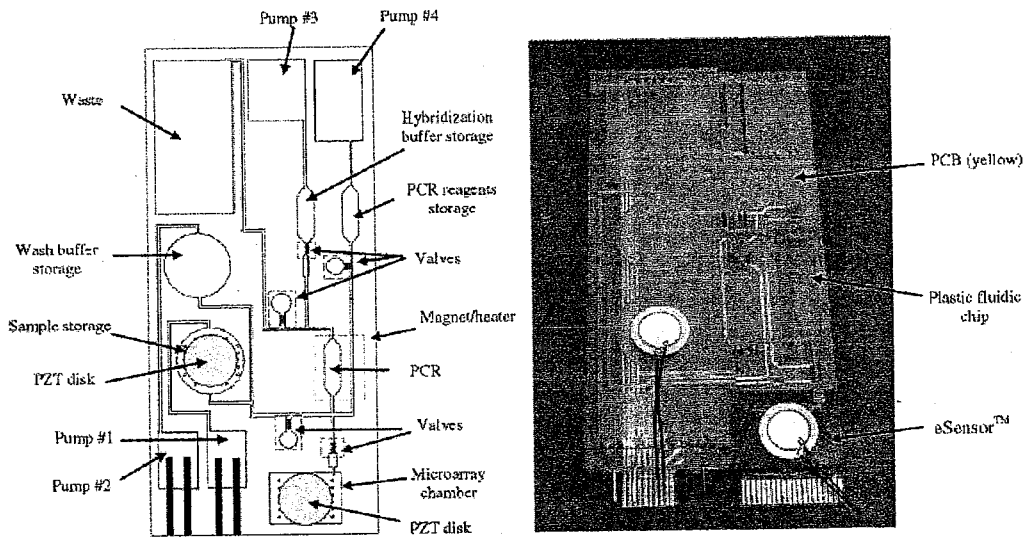


图 1-3 Motorola 公司研制的全集成 DNA 分析芯片[50]

Fig. 1-3 A fully-integrated microfluidic device for DNA analysis developed by Motorola labs

(3) 应用领域广泛。早期微流控芯片主要集中于核酸、蛋白质、小分子和离子的分离分析,随着技术的进步以及不同学科研究工作者的关注和介入,微流控芯片的研究范畴已涉及生物、化学、物理、医学、药学等诸多学科的许多方面。2006年 Nature 杂志推出微流控芯片专辑[51],并就其在光流控技术[52],单分子检测[53],反应控制[54],细胞芯片[55],诊断芯片[56]等领域取得的进展分别加以介绍。此举也成为肯定微流控芯片作为一门重要的前沿技术的里程碑。

微流控芯片技术不容忽视的发展潜力和市场前景推动了的相关技术和设备的产业化。1995年,首家专门从事微流控芯片开发的 Caliper 公司成立,1999年 Agilent 公司推出了首台用于核酸和蛋白质分离分析的微流控仪器—2100 Bioanalyser。据统计,美国现有从事微流控及相关技术的公司超过 30家[57]。迄今为止,多数微流控芯片研究处于科学探索阶段,关键性的应用(killer application)突破尚未取得,微流控芯片在各个领域的应用仍然有待深入发掘。

1.3.2 微流控芯片手性拆分概述

如前所述,手性拆分在制药工业中具有举足轻重的作用,在农业和精细化工产业也逐渐受到重视。微流控芯片作为新兴技术能否在手性拆分所迫切需要的高通量、便携化等方面有所作为值得探索。

1999年,Mathies 小组率先将微流控芯片技术应用于手性拆分领域[58]。如图 1-4 所示,他们在玻璃芯片上刻蚀出有效长度为 19 cm 的十字交叉型折叠通道,以 γ -CD 为拆分剂,通过荧光染料标记成功测定了墨其森陨石(Murchisom meteorite, 1969年9月28日坠落于澳洲墨其森)样品中的氨基酸成分。随后,以微流控芯片为载体的手性拆分研究逐渐展开,并在 2003

年出现研究高潮，见如 1-5 所示。我们正是在同年介入微流控芯片手性拆分研究领域。

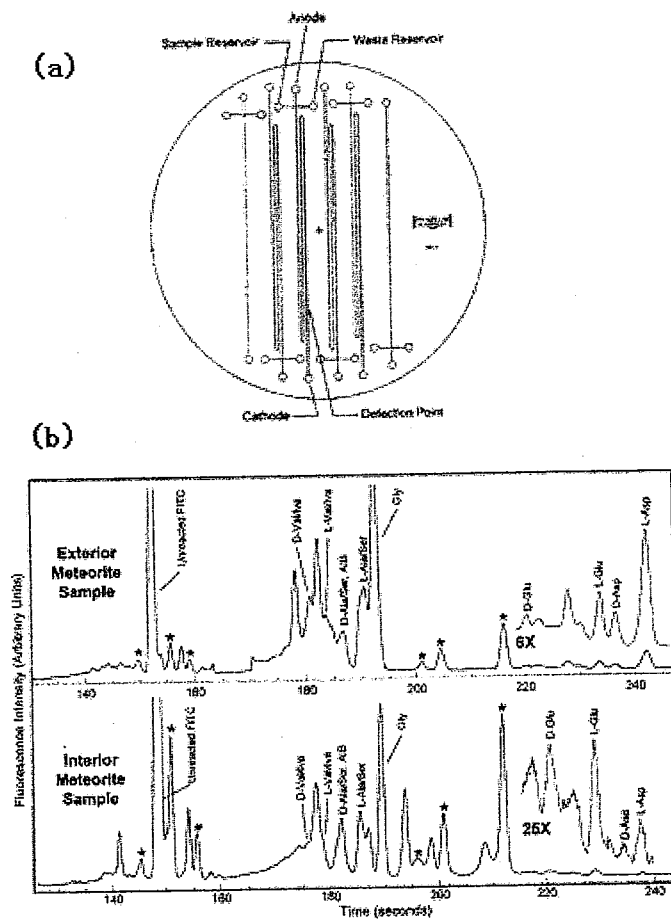


图 1-4 宇宙探索用芯片电泳氨基酸手性分析器

(a) 芯片结构设计图，据此图刻蚀出的相应通道尺寸为 $110\ \mu\text{m}$ 宽， $21.4\ \text{cm}$ 长，十字交叉处至检测点长 $19.0\ \text{cm}$ ，转角处曲率半径为 $500\ \mu\text{m}$ ；(b) FITC 标记的提取自外星陨石的手性氨基酸样品电泳图

Fig. 1-4 Microfabricated capillary electrophoresis amino acid chirality analyzer for extraterrestrial exploration

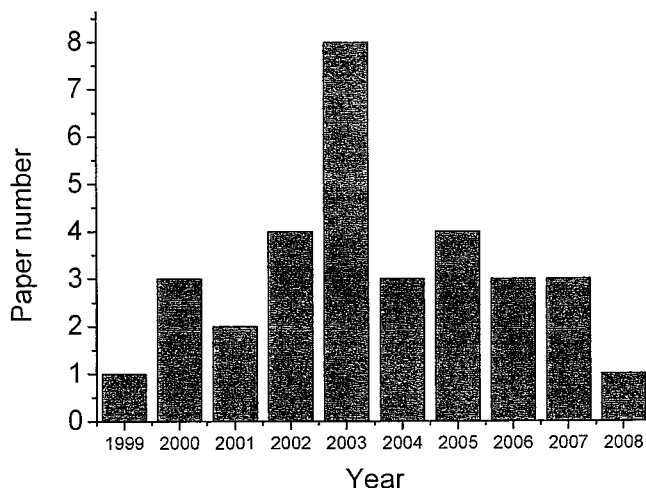


图 1-5 微流控芯片手性拆分文献统计

Fig. 1-5 Statistics of the literatures for chiral separations on microfluidic chips

纵观微流控芯片手性拆分 10 年研究历程, 发表文章数量远少于微流控芯片在核酸、蛋白等生物大分子研究方面的文章量, 究其原因, 一方面基因组学、蛋白质组学是当前世界范围内的研究热点, 生物、化学、物理、医学等领域的研究工作者从不同视角探索微流控芯片在基因和蛋白研究中的价值, 而手性拆分相对集中在化学领域, 特别是目前仅为分析化学和有机化学工作者所关注, 范围较窄; 另一方面, 手性拆分一直是分析化学中的研究难题, 在微小平台上的拆分更具难度。微流控芯片不是利用新的机理进行手性拆分, 它是提供了一个可灵活设计的微小平台, 其上可平移各种传统手性拆分技术, 并有可能将不对称反应, 样品处理, 手性拆分等多个单元集成起来。尽管文章数量不多, 且多集中于利用芯片电泳拆分氨基酸、神经递质和手性药物,

已有的研究进展也体现出微流控芯片从事手性拆分方面的一些优势，如超快速的拆分，集成有反应或样品预处理单元的手性拆分等。以下将详细介绍微流控芯片手性拆分相关技术及研究进展。

1.3.3 微流控芯片手性拆分相关技术

1.3.3.1 微流控芯片材料和制作

微流控芯片是整个系统的核心部件，其制作过程涉及材料的选择，结构设计和芯片制作。其中制作方法取决于所选择的材料，所以往往将二者结合介绍。

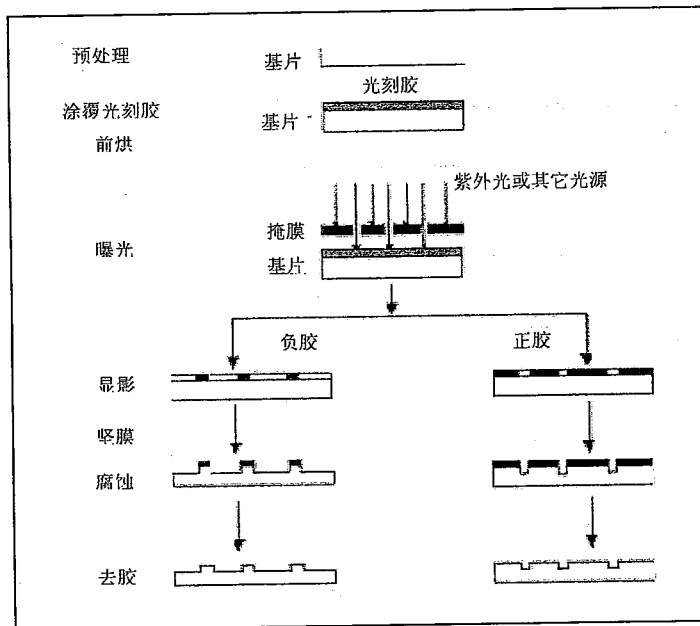


图 1-6 光刻与蚀刻的一般步骤

Fig. 1-6 Fabrication protocol for photolithography and etching

制作芯片的材料有单晶硅、石英、玻璃，以及有机聚合物，如刚性材料聚甲基丙烯酸甲酯（polymethylmethacrylate，PMMA）、聚碳酸酯（polycarbonate，PC）、弹性材料聚二甲基硅氧烷（polydimethylsiloxane，PDMS）和水凝胶等。其中石英和玻璃具有很好的电渗性质、光学特性和导热性能，是手性拆分最常用的芯片制作材料。

石英和玻璃芯片的制作过程基本一致，包括微通道制作、打孔和封接三个主要流程。其中微通道的制作工艺采用半导体和集成电路制作中广泛使用的微细加工技术，主要包括光刻（lithography）和刻蚀（etching）等步骤，如图 1-6 所示。

以作者实验室制作玻璃芯片为例，具体过程是：① 通过气相沉积、涂敷和热氧化等方式在光学玻璃基片上沉积一层二氧化硅（ SiO_2 ）或氮化硅（ Si_3N_4 ）；② 在其上涂敷一层光刻胶；③ 通过 CAD 或 freehand 等绘图软件设计微通道结构，再将图形印刻到铬板或胶片上制成光刻掩膜；④ 将光刻掩膜覆盖到涂有光刻胶的玻璃上，经紫外光或其他光源照射，掩膜图形区域可以让光完全透射，非图形区域将光完全吸收；⑤ 将基片放入光刻胶显影液，受到光照部分的光刻胶因溶解度增加而溶解于显影液，暴露出二氧化硅层，由此将图形转移至基片上；⑥ 将显影后的基片在一定温度下烘烤，使未曝光部分的胶与基片紧密黏附，并增强胶的抗蚀能力（又称之为坚膜）；⑦ 以坚膜后的光刻胶作为掩蔽层，通过化学刻蚀方法将硅膜剥离掉，进而在暴露出的玻璃上刻蚀出通道；⑧ 将刻蚀后的玻璃浸泡到适当的溶液中，使光刻胶和二氧化硅层由于溶胀或溶解而依次脱落；⑨ 刻蚀好的芯片按照图案设计进行打孔以形成储液池或与外界的接口，打孔可以通过超声波或金刚石打孔器完成；⑩ 将打好孔后的芯片清洗干净，将有通道的一面与一片洁净的盖片对接，抽真空后放入高温炉内进行程序升温，然后冷至室温，如此一个完整的玻璃芯片就制作好了。

当然，上述方法只是制作玻璃芯片的方法之一，微加工技术在涉及芯片制作的每一步骤都发展了不同的方法，如在刻蚀方法中除了化学刻蚀法，还有深层反应离子体刻蚀（deep reactive ion etching, DRIE）法[59]。二者各有所长，化学法成本低，刻蚀速度快，应用广，但由于反应是放热反应，容易造成刻蚀液的扰动，使通道表面质量降低，且难以生成高深宽比，规则的四方体型或圆形的通道；深层反应离子体刻蚀法可以获得较高深宽比，且近乎垂直的侧壁通道，但是设备昂贵，刻蚀速度缓慢，而且必须在超真空环境中进行，很大程度上限制了这项技术的应用[60]。实际应用中往往根据加工设备、投入成本和精度要求等选择合适的加工路线。

1.3.3.2 微流控芯片控制和检测

微流控芯片液流控制可以通过注射泵[61, 62]、集成于芯片上的微泵[63, 64]、微阀[65, 66]实现。其中通过电渗泵控制液流是微流控芯片发展最早、简单易行、应用广泛的一种方式。进行电渗的控制仅需一套高压电源，并将高压输出线通过金属电极与微通道内的溶液接触即可。利用电渗泵不仅可以进行液流的驱动，而且可以同时实现不同分子的分离。通过电渗进样并进行分离也是微流控芯片手性拆分中应用最多的流体控制方式。目前用于电渗控制的高压电源可以外置，也可以集成到微流控芯片分析仪内[67]，随着微流控芯片技术的快速发展，高压电源的微型化也取得了长足的进步。

与常规反应检测相比，微流控芯片上所进行的各种生化反应和过程均是在微米甚至纳米量级的通道内完成，检测光程短，分离速度快，因此灵敏度高、响应速度快的检测器才能满足要求。自微流控芯片问世以来，检测器的研究一直是人们关注的焦点。迄今为止，已经发展出十几种用于微流控芯片的检测器，见图 1-7。其中以荧光检测器和吸收光度检测器为代表的光学检测器和电化学检测器是目前微流控芯片手性拆分常用的检测器。

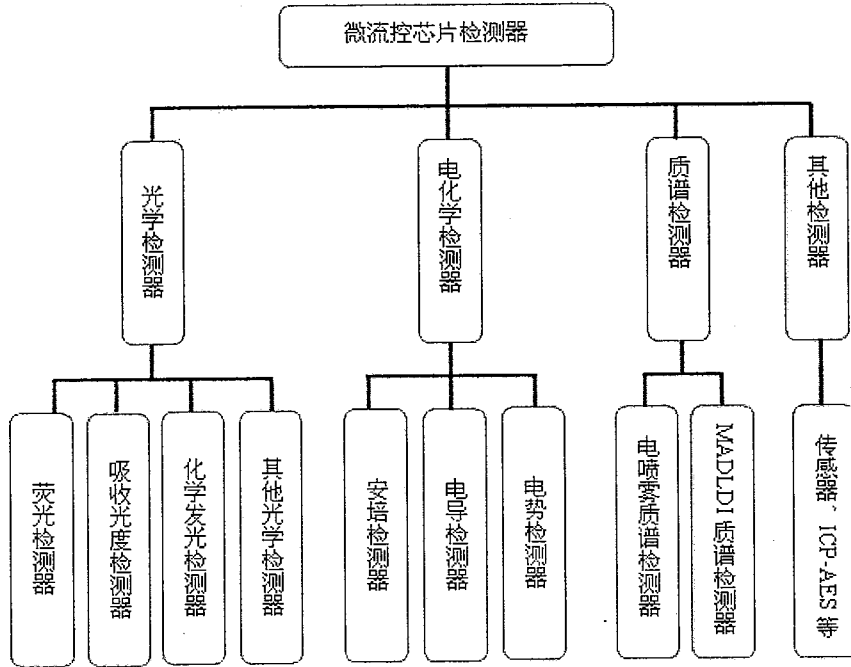


图 1-7 微流控芯片检测器分类

Fig. 1-7 Detectors used on microfluidic platform

激光诱导荧光 (laser induced fluorescence, LIF) 是目前微流控芯片手性拆分中使用最广泛的光学检测技术。究其原因, 一方面因为这种检测技术具有高灵敏度和高选择性; 另一方面这类检测器易于搭建。激光诱导荧光检测可以划分为单通道激光诱导荧光检测和多通道激光诱导荧光检测两类。多通道激光诱导荧光检测用于手性拆分除本论文工作涉及之外尚未见其它报道, 详细内容将在第三章中详细叙述。此处仅介绍单通道激光诱导荧光检测。

单通道微流控芯片激光诱导荧光检测器通常采用共聚焦型光路设计, 基本结构图如图 1-8 所示[68]。从激光器发出的激光经过滤波片后被二色分光镜反射, 再由一物镜聚焦到芯片微通道内, 通道内的荧光物质受激后发射出的

荧光由同一物镜收集，透过二色分光镜后由发射滤光片滤掉杂散光，进入光电倍增管 (PMT) 或电感耦合器件 (CCD) 检测并转化为电信号或图像信号。由于激光聚焦和荧光收集都是通过同一物镜完成，且激光聚焦和分色镜分别处于物镜的两个焦点上，所以称为共聚焦型检测器。微流控芯片手性拆分多由此类检测器完成。

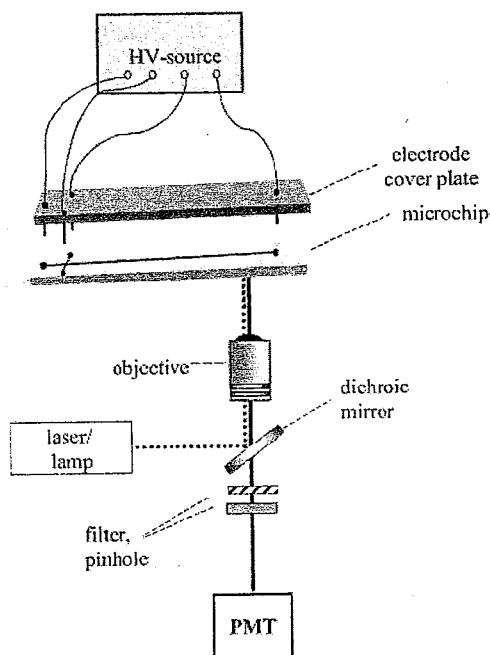


图 1-8 共聚焦型激光诱导荧光检测器[68]

Fig. 1-8 Basic fluorescence setup for fluorescence detection in microchip electrophoresis

微流控芯片手性拆分报道中，多采用单色激光器作为激发光源[58, 69-72]，如 488 nm 的氩离子激光器 (FITC, NBD-F) [58, 69]；325 nm He-Cd 激光器[73, 74]；473 nm 二极管泵浦激光器[72]。多数手性化合物没有荧光，需通过荧光染料加以标记才能进行荧光检测，荧光染料的引入有时会影响拆

分剂对对映体的识别，解决方案之一是更换荧光染料。而单一波长激光器限制了荧光染料的选择范围，因此，发展多波长激发光源以扩大荧光染料选择范围成为手性拆分的研究热点之一。

汞灯光源在一定范围内波长可调，有以荧光显微镜系统作为检测器，以其自带的高压汞灯作为激发光源，通过滤光片选择性透过 450-490 nm 的激发光，发射的荧光信号通过物镜收集，由光电二极管检测，手性拆分氨基酸的报道[70]。近来，Belder 等采用大功率汞灯作为激发光源，通过滤光片调节三个波段，分别是 360-370，450-480，511-560 nm，通过光学原件共聚焦的结构设计，以 PMT 为检测器，成功拆分 FITC 标记的 nM 浓度的环己乙胺[75, 76]。但是，汞灯不及激光器单色性好，强度大，在微流控芯片手性拆分研究中应用的较少。

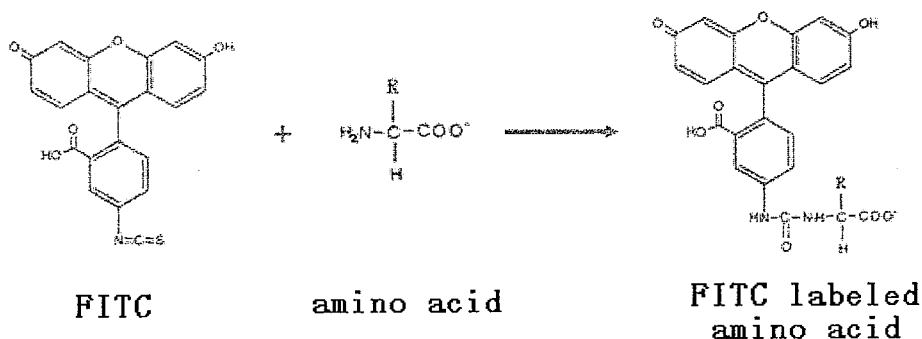


图 1-9 FITC 标记氨基酸示意图

Fig. 1-9 Schematic illustration of amino acid labeled with FITC

手性拆分中常用的荧光染料是荧光素异硫氰酸酯 (fluorescein isothiocyanate, FITC)，其分子中的活性部位 S=C=N-与被标记分子如氨基酸的-NH₂结合，见图 1-9。激发波长为 488 nm。在高 pH 条件下，标记后的化

合物分子通常因 FITC 上的羧基解离而带负电荷。在芯片电泳手性拆分的过程中,这一特点在一定程度上简化了手性拆分的条件,对于原本不带电的中性手性分子可以选择中性拆分剂如环糊精及其衍生物,而无需引入 SDS 等带电荷的表面活性剂或手性拆分剂。该染料的缺点是 FITC 遇水降解,产生的一系列杂峰可能会干扰待测分子的检测。芯片电泳手性拆分氨基酸[58, 70, 71, 77]和有机胺[75, 76]大都选择了 FITC 为荧光标记染料。

微流控手性手性拆分报道中使用的另一荧光染料是 4-氟-7 硝基苯并呋喃 (4-fluoro-7-nitrobenzofurazane, NBD-F), 这种染料不带电荷, 激发波长也在 488 nm, 可与 $-NH_2$ 和 $-NH-$ 快速反应, 见图 1-10。Wallenborg 等[69]利用该染料标记安非他明及其类似物, 并 HS- γ -CD 为拆分剂通过胶束电动色谱方式将其拆分。

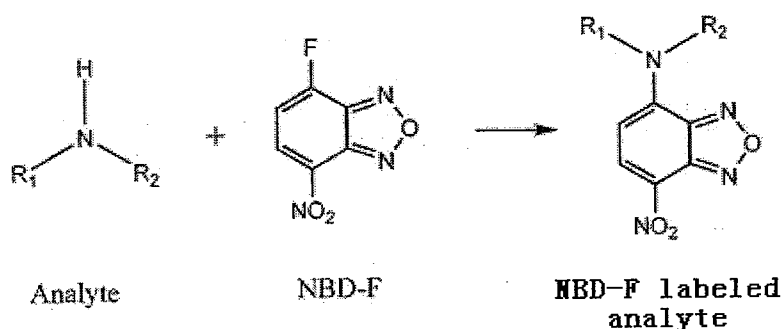


图 1-10 NBD-F 标记氨基化合物示意图

Fig. 1-10 Schematic illustration of amino compound labeled with NBD-F

除了通过荧光染料标记手性分子以进行荧光检测外, Cho 等[73]还利用吉米沙星(gemifloxacin)手性分子具有自荧光的性质,采用激发波长为 270 nm 的 He-Cd 激光器为激发光源,以冠醚为拆分剂对喹诺酮类抗菌药吉米沙星进

行了芯片电泳拆分，结果见图 1-11。

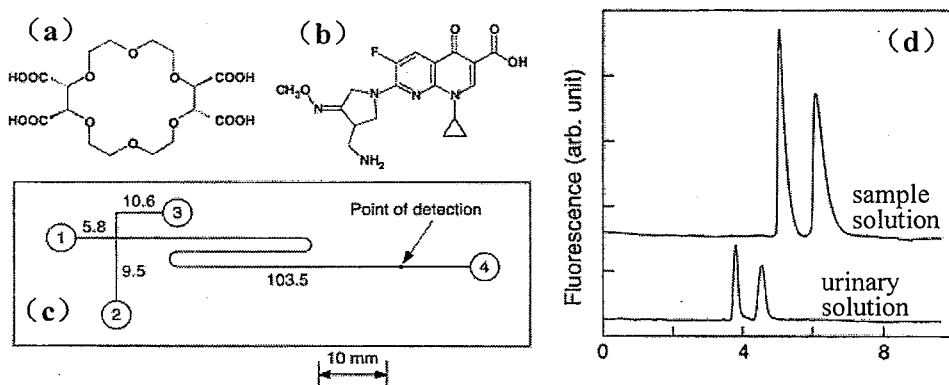


图 1-11 自荧光检测芯片电泳手性拆分 gemifloxacin

(a) 拆分剂冠醚 18C6H4 结构图；(b) gemifloxacin 结构图；(c) 芯片结构示意图；(d) 芯片电泳手性拆分 Bis-Tris 样品溶液和尿样中的 gemifloxacin

Fig. 1-11 Chiral separation of gemifloxacin by microchip electrophoresis with native fluorescence detection

因为许多手性分子都具有紫外响应，紫外检测器成为毛细管电泳手性拆分中使用广泛的检测器。但是芯片电泳通道通常不足 $100\ \mu\text{m}$ 宽， $40\ \mu\text{m}$ 深，光程较传统毛细管短，且紫外光肉眼不可见，与通道可灵活设计的微流控芯片相匹配的紫外检测器光路搭建困难，而且芯片材料必须选择成本很高的石英材质，上述原因导致紫外检测器鲜有用于芯片电泳。目前商品化的紫外检测器仅有岛津公司推出的 MCE 2010 系统以及我们实验室与北京彩陆联合研制的 CL 4010 系统。前者的特点在于通过线性二极管阵列收集信号实现全通道线性成像检测，并已经用于微流控芯片手性拆分[78, 79]。代表性工作为

Belder 等[78]利用该系统,以高度磺化的环糊精 HS- α -CD、HS- β -CD 和 HS- γ -CD 为拆分剂,无需衍生快速拆分了 19 种碱性或酸性的手性药物,每种药物对映体的拆分可在 1 min 内完成。其中最快的一次拆分可在 2.5 s 内完成,而三种手性药物混合物的拆分在 11 s 内完成。之后,在此系统上,Kitagawa 等在 14 s 内完成了对 1-氨基二氢化茛 (1-aminoindan) 的拆分[79]。

电化学检测在手性拆分中的应用不如荧光检测使用的多,但电化学检测器体积小、装置简单、易于集成到微流控芯片上,具有微型化和集成化的潜力。在安培检测、电导检测和电势检测三种电化学检测方式中,安培检测使用的最多,这种方式主要根据待测物质在工作电极上发生的氧化还原反应过程中引起的电流变化进行检测。2001 年 Schwarz 和 Hauser 率先将安培检测用与芯片电泳手性拆分儿茶酚胺,研究者设计并制作了只有工作电极和地电极的双电极系统,避免了传统安培检测中参比电极和对电极的使用[80]。由于儿茶酚胺的氧化反应属于 pH 依赖,采用电化学检测时,麻黄素 (ephedrine) 和伪麻黄素 (pseudoephedrine) 的手性拆分在 pH 12.6,以 CM- β -CD 作为拆分剂时实现。在此基础上,该小组利用两电极系统的安培检测器,完成了对一系列神经递质混合物的手性拆分[81]。电导检测因灵敏度不高被认为不适合区带电泳检测,而等速电泳由于具有样品浓缩的作用较少受检测器灵敏度的限制。Olvecka 等将电导检测用于等速电泳手性拆分色氨酸 (tryptophan) 对映体,为了提高检测灵敏度,研究人员设计了连续两次等速电泳过程,在第一次等速电泳完成手性拆分后,再引入更低离子强度的前导电解质,使区带进行第二次等速电泳浓缩过程,通过这种方式,1.5 nM 的色氨酸对映体可以拆分并由电导检测器检测,见图 1-12[82]。

1.3.3.3 微流控芯片手性拆分方法

微流控芯片手性拆分不是依据新的拆分原理进行拆分,它主要提供一个

平台，理论上可以将传统手性拆分技术悉数平移其上，并可集成其它操作单元以实现手性拆分的自动化和微型化。受技术所限，前面提及的手性拆分方法尚未完全在微流控芯片上实现，目前已报道的拆分方法包括芯片电泳、芯片电色谱以及芯片酶法拆分。

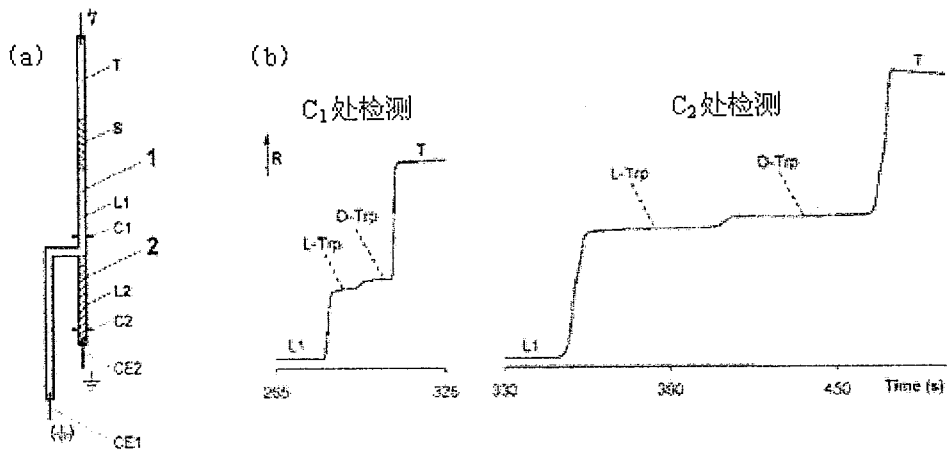


图 1-12 芯片等速电泳拆分色氨酸对映体

(a) 等速电泳芯片结构示意图，T 为尾随电解质，S 为样品，L 为前导电解质，C 为检测传感器，CE 为对电极，1, 2 为分离通道；(b) 等速电泳拆分色氨酸对映体电泳谱图

Fig. 1-12 Isotachopheresis separation of tryptophan enantiomers on microchip

芯片电泳因其简单易行成为微流控芯片手性拆分中使用最多的拆分方式，其中区带电泳[69, 73, 78, 80, 81, 83, 84]和胶束电动色谱[58, 70, 85]应用的最多。其操作与毛细管电泳手性拆分类似，即将拆分剂添加到运行缓冲液中，

在分离通道两端施加电压进行分离即可。近来, Olvecka 等利用微流控芯片平台实现了等速电泳拆分色氨酸 (tryptophan) [82]。如图 1-12 所示, 在图 (a) 所示的芯片通道 L1 和 L2 处引入两段前导电解质, 则消旋的色氨酸样品在等速电泳分离之后再行等速电泳浓缩, 使响应信号提高 2.5 倍。

芯片电色谱手性拆分目前包括开管电色谱和整体柱电色谱两类, 填充柱电色谱尚未见报道。Bi 等利用 BMA-MSMA (butyl methacrylate- γ -(methyl acryloxy) propyl trimethoxysilicane) 共聚物修饰 PMMA 芯片通道表面, 然后通过表层 MSMA 的硅醇基团与氧化铝溶胶形成的网络结构将牛血清白蛋白 (BSA) 固定于通道表面, 并将其用于拆分色氨酸对映体[86]。Zeng 等将烯丙基化的 γ -CD 作为单体之一, 与丙烯酰胺 (acrylamide) 和 2-丙烯酰胺基-2-甲基丙磺酸 (AMPS) 等在整个交叉型芯片通道内聚合形成凝胶型整体柱, 并将其用于拆分 FITC 标记的丹磺酰化天门冬氨酸 (DNS-Asp) 和丹磺酰化缬氨酸 (DNS-Val) [72]。

酶法拆分是手性拆分的重要方法之一, 2006 年 Hong 等[87]进行了微流控芯片上游离酶拆分布洛芬消旋体 (R,S-ibuprofen) 的研究。拆分原理主要利用微流控芯片易于形成层流的特点, 形成三层互不相溶的液流, 上样相为含有消旋布洛芬和假丝酵母脂肪酶 (CRL) 的水相, 中间层为离子液体, 离子液体选择性迁移酯化 S-布洛芬, 接收相为含猪胰脂肪酶 (PPL) 的水相, 假丝酵母脂肪酶选择性地酯化 S-布洛芬, 酯化后的 S-布洛芬溶解于离子液体中, 并扩散至接收相, 接收相中的猪胰脂肪酶将其水解成 S-布洛芬, 见图 1-13。最后通过高效液相色谱分析接收相中的布洛芬对映体来衡量拆分结果。如前所述, 与游离酶相比, 固定化酶可以提高酶的稳定性和使用寿命, 便于产物的分离纯化, 是酶催化的研究热点。由于基于微流控芯片平台酶法拆分刚刚起步, 固定化酶拆分尚未见报道。

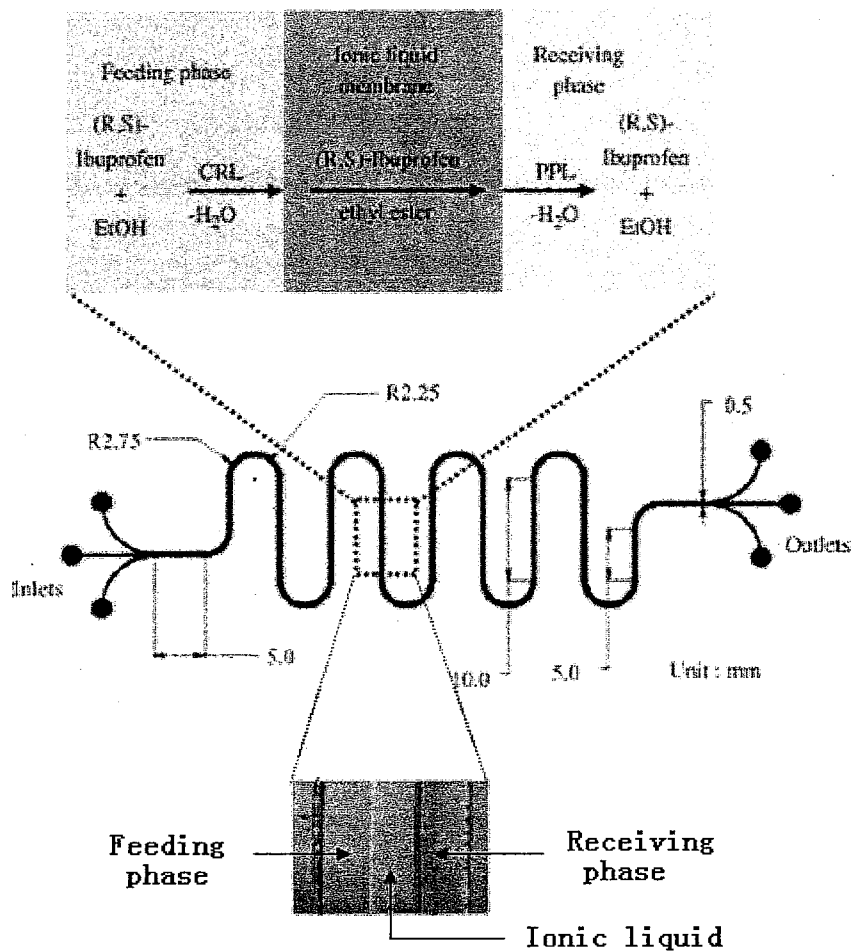


图 1-13 微流控芯片酶反应器拆分布洛芬

Fig. 1-13 Chiral separation of ibuprofen using enzyme reactor on microfluidic chip

1.3.4 微流控芯片手性拆分特色-操作单元集成化

微流控芯片应用于手性拆分研究已近十年，尽管报道不多，但也形成鲜

明特点,即主要体现了微流控芯片操作单元集成化的优势。这里集成化包括两个方面,一是相同操作单元的集成,如以高通量分析为目标的串联式或并联式芯片电泳的集成;二是不同操作单元的集成,如样品前处理和电泳分离的单元的集成。

1.3.4.1 集成相同操作单元的微流控芯片手性拆分

高通量手性拆分是各种手性拆分技术的共同目标,是手性技术领域的迫切需求。集成相同拆分单元是实现高通量手性拆分的重要方式,主要包括两种途径:一是在同一拆分通道内依次进行多个样品的拆分或多个拆分条件的考察,即串联式手性拆分,其关键技术是缩短单次拆分时间以提高通量;二是利用多个拆分通道同时进行多个样品的拆分或条件考察,即并联式手性拆分(平行拆分)。两种方法各有千秋,就操作过程和设备而言,缩短单次拆分时间因只需在一块芯片上进行,所需高压电极数目少,检测装置简单,但这种方式容易产生样品和试剂交叉污染的问题。平行进行多个拆分过程可通过阵列芯片实现,在这种方式中,不同样品或缓冲液在各自独立的通道内完成进样和分离,相互之间干扰小,有效避免了交叉污染,但搭建阵列芯片检测装置是一项挑战。

目前,微流控芯片在手性拆分中的探索多数体现芯片在快速拆分,即缩短串联式拆分中的单次拆分时间方面的优势。通常毛细管电泳拆分过程需要几分钟至几十分钟完成,而在微流控芯片上完成电泳拆分通常只需几十秒甚至更短。Rodrigues 等[70]在“十字”交叉型玻璃芯片上,以 SDS 胶束电动色谱方式,对荧光染料 FITC 标记的 21 种氨基酸分别进行了手性拆分,拆分时间在 75 -160 s 内,期间考察了缓冲液浓度、SDS 浓度、 γ -CD 浓度对拆分的影响。作者将结果与毛细管电泳拆分氨基酸进行了对比,指出芯片电泳表现出更好的分析性能,二者单位长度的塔板数之比为 395 000 : 116 000,芯片

电泳单位时间内的分辨率也高于毛细管电泳。但是，绝对塔板数和对映体分辨率还是毛细管电泳高。由于长通道有利于拆分剂对对映体的动力学识别，传统毛细管电泳手性拆分往往在较长的毛细管如 60 cm 甚至 90 cm 的毛细管内进行[88-90]，需加上万伏电压才能进行电泳，进行电压优化的空间很小，而芯片通道仅为毛细管的 1/10 长，可以通过提高电压进一步增加对映体的分离度。德国的 Belder 小组[78, 84]通过施加高场强在芯片电泳快速手性拆分方面不断取得突破。他们使用岛津 2010 紫外分析仪，在分离通道仅 25 mm 长，50 μm 宽，20 μm 深的石英芯片上，以 5% (V/V) HS- γ -CD 为拆分剂，施加 720 V/cm 的电压，在 1 min 内分别实现了对 19 种化合物对映体的手性拆分，其中仅用 2.5 s 就使 norephedrine 对映体基线分离[78]。此后，该小组使用分离通道为 35 mm 长，50 μm 宽，20 μm 深的石英芯片，施加高达 2012 V/cm 的电场，以 HS- γ -CD 为拆分剂，800 ms 内就完成了正亮氨酸对映体的分离。这是迄今为止最快的手性分离结果，见图 1-14[84]。

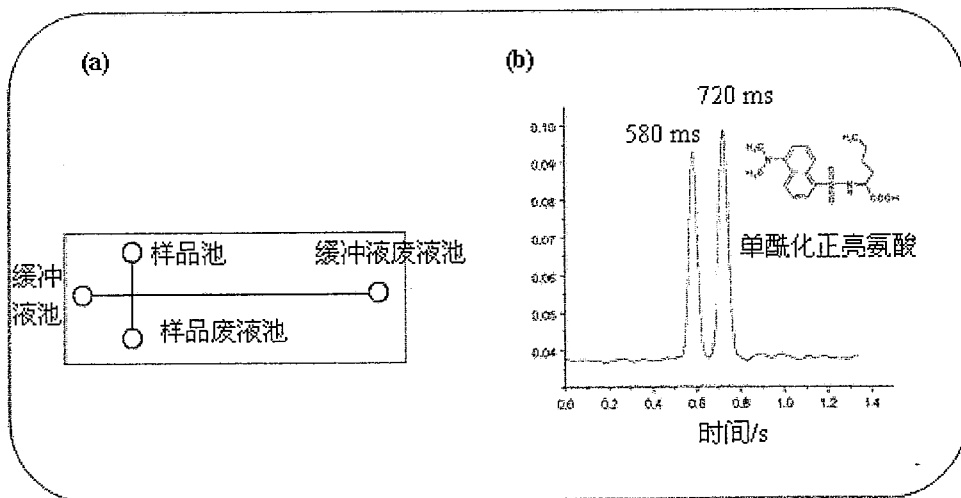


图 1-14 微流控芯片毫秒级手性拆分单酰化正亮氨酸

(a) 芯片结构示意图; (b) 手性分离单酰化正亮氨酸电泳谱图。有效分离长度: 1.5 mm; 缓冲液: 25mmol/L 三乙胺-磷酸+2% HS- γ -CD, pH 2.5; 电场强度: 2012 V/cm

Fig. 1-14 Subsecond chiral separation of DNS-norleucine on a microchip

微流控芯片快速拆分研究取得的结果表明, 这一技术具有高通量手性拆分和手性反应实时监测的潜在优势。当然, 上述快速手性拆分只是整个拆分过程中必不可少的一步, 真正意义上以快速拆分为依托的高通量手性拆分仪器还有待于进一步研究, 以实现样品制备、上样、拆分、通道清洗等一系列过程的自动化。

如上所述, 平行拆分是实现高通量手性拆分的另一途径。但是由于阵列微流控芯片制作和相应检测设备搭建中的技术难度和成本因素, 使多通道芯片的研究和应用集中在少数几个研究小组。就整个微流控技术而言, 阵列微流控芯片的平行单元不仅仅局限在芯片电泳, 还包括免疫反应微阵列[91-94]、细胞培养、捕获或分析微阵列[95-100]以及集成多个阀和反应器的阵列芯片[101, 102], 由于手性拆分尚主要依靠芯片电泳完成, 下面仅介绍阵列芯片电泳的研究进展。

阵列芯片电泳可以看做阵列毛细管电泳的继承和发展。1997年, Mathies小组在阵列毛细管电泳基础上, 研制出世界第一套 12 通道的微流控芯片电泳系统[103]。图 1-15 为该系统的光路系统, 检测原理是单点共聚焦的荧光检测系统固定不动, 放置阵列芯片的平台以 1.0 cm/s 的速度往复移动, 使各通道每 0.3 s 被扫描一次。继而, 该小组将检测方式由往复式扫描改进为旋转扫描, 并设计制作了放射状微流控阵列芯片, 将电泳通道数量逐步扩增, 48[104]、96[105]和 384[106]根通道的微流控阵列芯片陆续面世。除 Mathies

小组外, Ewing 小组致力于发展多通道芯片进样技术, 如毛细管进样[107]和光门控进样[108], Baba 小组侧重多通道塑料芯片[109, 110]的制作, Ehrlich 小组研制了 768 通道测序芯片[111], Fan 小组则设计制作了集成第一维等电聚焦 (IEF) 和第二维聚丙烯酰胺凝胶电泳的阵列微流控芯片, 并将其用于蛋白质分离分析[112]。国内只有作者所在实验室研制了阵列微流控芯片和匹配的芯片分析仪, 以及浙江大学殷学锋课题组制作的三层 6 通道阵列玻璃芯片, 并以负压方式进样对荧光素钠和罗丹明 123 进行了分离[113]。尽管阵列微流控芯片电泳研究取得了很大进展, 但是其应用领域集中于核酸分析, 至本论文实验设计之初, 尚未见阵列微流控芯片电泳用于手性拆分研究的报道。

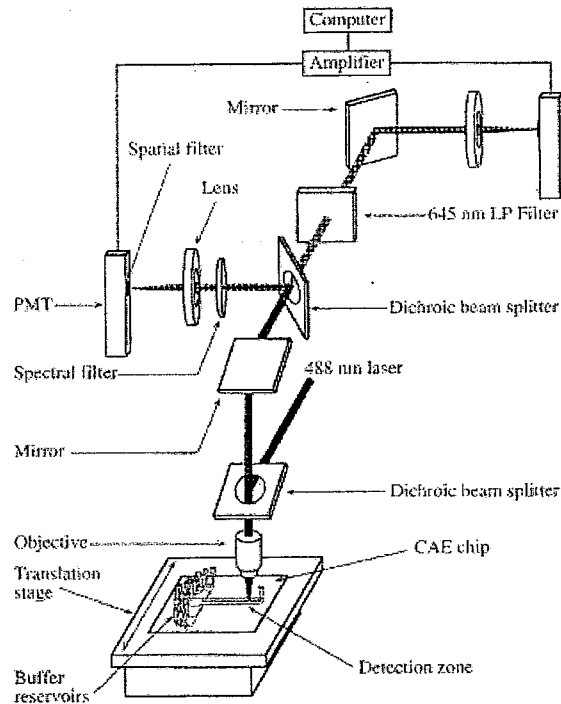


图 1-15 首个阵列微流控芯片平台示意图

Fig. 1-15 The schematic of the first microfluidic array system

1.3.4.2 集成不同操作单元的微流控芯片手性拆分

各种操作单元的集成是微流控芯片的重要特征和最大优势，在芯片电泳手性拆分的基础上集成如样品前处理等单元是近期微流控芯片手性拆分研究的热点之一。

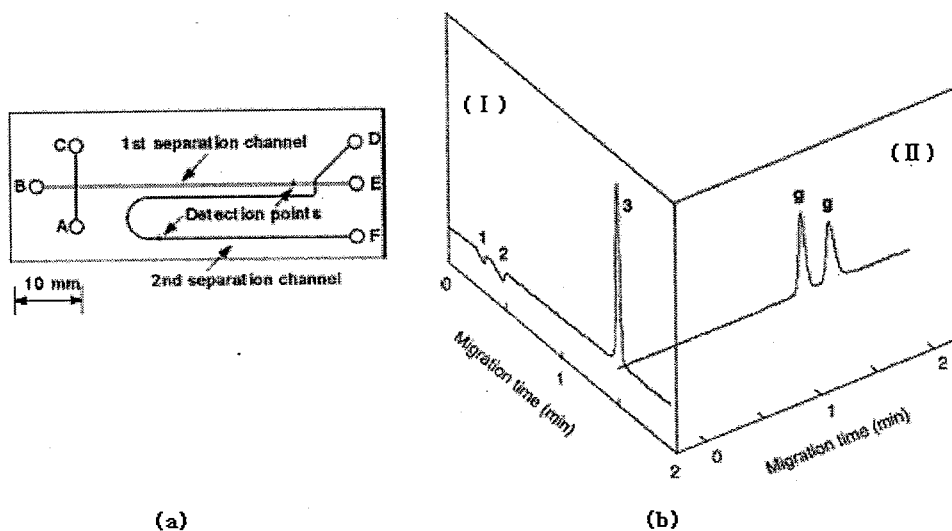


图 1-16 芯片电泳在线去除金属离子及手性拆分吉米沙星

(a) 芯片结构示意图，A，运行缓冲液池；B，样品池；C，样品废液池；D，缓冲液废液池；E，含手性拆分剂缓冲液池；F，含手性拆分剂缓冲液废液池；(b) 芯片电泳手性拆分吉米沙星，(I) 第一维电泳去除金属离子，1，K⁺，2，Na⁺，3，吉米沙星消旋体；(II) 第二维电泳冠醚 18C6H4 拆分吉米沙星，g 代表吉米沙星对映体

Fig. 1-16 On-line sample cleanup and chiral separation of gemifloxacin by microchip electrophoresis

2004年 Chung 小组[74]发展了在线去除金属离子偶联手性拆分喹诺酮类广谱抗菌药吉米沙星 (gemifloxacin) 的微流控芯片电泳技术。由于 Na^+ 和 K^+ 等碱性金属离子易和手性拆分剂冠醚 18C6H4 形成复合物, 从而影响 18C6H4 和拆分对象吉米沙星对映体的结合, 因此样品和缓冲液中的这类金属离子往往需要经过固相萃取或微透析等前处理步骤加以去除。如图 1-16 所示, 利用芯片电泳, 首先在 ABCD 组成的一维电泳上实现金属离子和吉米沙星的分离, 由于二者表观电泳速率相差较大, 故在经过检测点 15 s 后使 F 池接地, 从而将吉米沙星区带引入第二维电泳通道, 然后在 EF 之间施加电压, 进行手性拆分。金属离子经间接荧光检测, 吉米沙星进行自荧光检测。

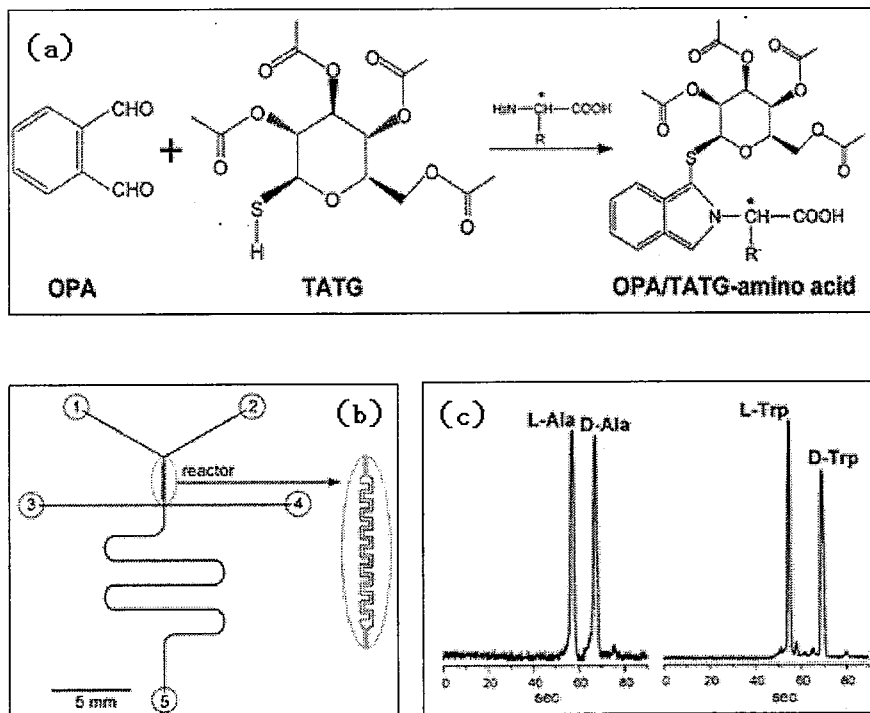


图 1-17 柱前去消旋化快速拆分氨基酸

(a) 氨基酸与手性试剂 OPA/TATG 反应原理; (b) 芯片结构示意图; (c)

氨基酸拆分结果

Fig. 1-17 Rapid chiral analysis of amino acids by precolumn diastereomerization

2005 年 Hahn 小组[114]实现了通过柱前衍生去消旋化拆分氨基酸的方法。如图 1-17 所示,氨基酸消旋体和荧光试剂及手性试剂 TATG 反应后生成去消旋化的荧光物质,这一过程在图 (b) 所示芯片上的反应区域完成,然后经门进样方式将样品区带引入分离通道,去消旋化的氨基酸对映体在非手性环境 SDS-硼砂缓冲液中实现分离,见图 (c)。这也是微流控芯片电泳间接手性拆分的首例。

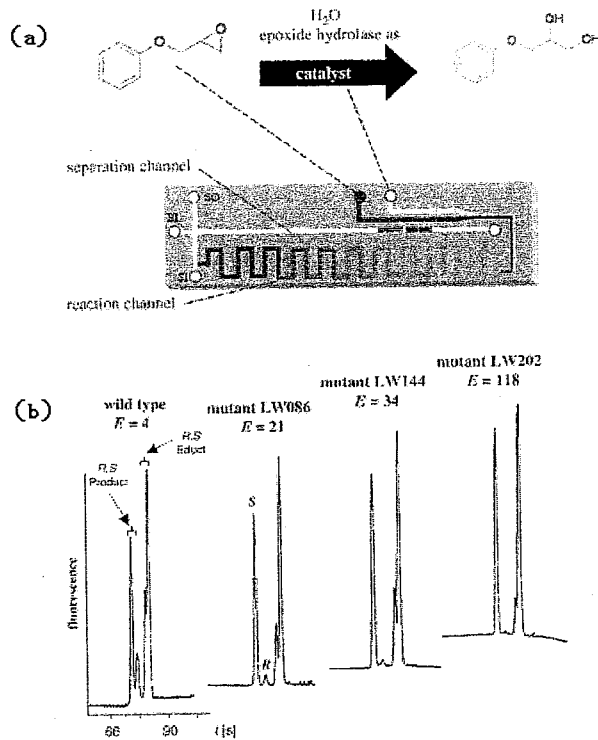


图 1-18 集成旋光选择性催化和分析的微流控芯片平台

(a) 集成催化和分析芯片的工作原理；(b) 集成式芯片用于野生型和变异型环氧水解酶催化形成的评估

Figure 1-18 Enantioselective catalysis and analysis on a chip

2006年 Belder 小组[115]在微流控芯片上实现了手性反应与拆分的集成,为微流控芯片在手性拆分领域应用的扩大实现了突破。如图 1-18 (a) 所示,在样品池(SI)处抽真空,使放在储液池内的反应物苯基缩水甘油醚(glycidyl phenyl ether)和催化剂环氧水解酶(epoxide hydrolase)进入蜿蜒曲折状的反应通道内接触并发生反应,生成不等量的手性邻二醇,各溶液由储液池抵达样品池历时 10 min 左右。然后在图中所示连接在反应通道末端的“十字”交叉通道内完成进样和电泳分离。野生型和三种变异型环氧水解酶催化该反应的芯片电泳分析结果见图 1-18 (b)。该工作展示了微流控芯片手性合成与拆分集成的可行性和优势。但是手性合成种类繁多,如水相和非水相反应、均相和异相反应、一步和多步反应等等,这些反应和怎样的拆分方法相匹配,又该如何实现这两个单元的连接仍是值得探讨的问题。

1.4 本论文工作的实验设计思路概述

高通量是手性拆分的迫切需求,微流控芯片具有表面体积比大、传质效率高、消耗少,分析速度快,以及操作单元灵活组合、规模集成的优势,具有作为高通量手性拆分平台的潜力。目前电泳拆分是微流控芯片手性拆分的主要方式,通过缩短单次拆分时间提高通量的研究已取得较大进展,以多通道芯片电泳进行平行手性拆分的研究尚属空白。本论文的主要工作围绕多通道芯片电泳手性拆分研究展开,探讨其可行性及潜在的优势。首先通过单通道芯片电泳手性拆分的实践掌握芯片电泳手性拆分的基本技能和知识,然后

设计并制作两种结构的四通道电泳芯片，分别实现同一拆分条件下不同手性药物的筛选和针对同一手性物不同拆分条件的筛选。最后，为了拓展微流控芯片手性拆分的方式，开展以微流控芯片为平台的固定化酶手性拆分研究。

参考文献

- [1] 尤田耙, 林国强. 不对称合成. 第一版, 北京: 科学出版社, 2006, 2
- [2] Wainer I W, Ducharme J, Granvil C P, Parenteau H, Abdullah S. Using Chirality as a Unique Probe of Pharmacological Properties. *Journal of Chromatography A*, 1995, 694(1): 169-179
- [3] Caldwell J. Importance of stereospecific bioanalytical monitoring in drug development. *Journal of Chromatography A*, 1996, 719(1): 3-13
- [4] 陈亚娜. 沙利度安临床应用进展. *临床医学*, 2002, 22(10): 56
- [5] Fda Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs. *Chirality*, 1992, 4(5): 338-340
- [6] Caner H, Groner E, Levy L, Agranat I. Trends in the development of chiral drugs. *Drug Discovery Today*, 2004, 9(3): 105-110
- [7] 张生勇, 郭建权. 不对称催化反应-原理及在有机合成中的应用, 第一版, 北京: 科学出版社, 2002, 2-14
- [8] 孙曰圣. 手性药物的结晶法拆分研究进展. *江西化工*, 2004, 4: 23-25
- [9] G A. Sur le dedoublement par entrainement - la notion de sursaturation remanente experientia. 1959, 15(38)
- [10] Reinhold D F. Synthesis of L-alpha-methyldopa from asymmetric intermediates. *JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY*, 1968, 33 1209
- [11] Fogassy E, Nogradi M, Kozma D, Egri G, Palovics E, Kiss V. Optical resolution methods. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2006, 4(16):

3011-3030

- [12] Kim K S, Sack J S, Tokarski J S, Qian L G, Chao S T, Leith L, Kelly Y F, Misra R N, Hunt J T, Kimball S D, Humphreys W G, Wautlet B S, Mulheron J G, Webster K R. Thio- and oxoflavopiridols, cyclin-dependent kinase 1-selective inhibitors: Synthesis and biological effects. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 43(22): 4126-4134
- [13] Turner N J. Enzyme catalysed deracemisation and dynamic kinetic resolution reactions. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004, 8(2): 114-119
- [14] Sun Z H. Chirotechnology and biocatalysis. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2004, 2(4): 6-10
- [15] Kamal A, Azhar M A, Krishnaji T, Malik M S, Azeeza S. Approaches based on enzyme mediated kinetic to dynamic kinetic resolutions: A versatile route for chiral intermediates. *Coordination Chemistry Reviews*, 2008, 252(5-7): 569-592
- [16] Altenbuchner J, Siemann-Herzberg M, Syldatk C. Hydantoinases and related enzymes as biocatalysts for the synthesis of unnatural chiral amino acids. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(6): 559-563
- [17] Yagasaki M, Ozaki A. Industrial biotransformations for the production of D-amino acids. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 1998, 4(1-2): 1-11
- [18] 尤田耙, 林国强. 不对称合成, 第一版, 北京: 科学出版社, 2006, 27-28
- [19] Cao L Q. Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9(2): 217-226

- [20] Mateo C, Palomo J M, Fernandez-Lorente G, Guisan J M, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(6): 1451-1463
- [21] 马明, 陈鹰. 药物对映体的拆分方法研究概述. *中国药师*, 2002, 5(6): 370-372
- [22] 林炳承. 毛细管电泳导论, 第一版, 北京: 科学出版社, 1996, 205-224
- [23] Zhang Y, Wu D R, Wang-Iverson D B, Tymiak A A. Enantioselective chromatography in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2005, 10(8): 571-577
- [24] D'Acquarica I, Gasparrini F, Pierini M, Villani C, Zappia G. Dynamic HPLC on chiral stationary phases: A powerful tool for the investigation of stereomutation processes. *Journal of Separation Science*, 2006, 29(10): 1508-1516
- [25] 秦峰. 多糖衍生物类手性固定相的制备及其在高效液相色谱和毛细管电色谱中的应用. 中国科学院研究生院博士学位论文, 2006: 3
- [26] Phinney K W. Enantioselective separations by packed column subcritical and supercritical fluid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 382(3): 639-645
- [27] Mourier P A E, E. Caude, M.H. Rosset, R.H. Tambute', A.G. Supercritical and subcritical fluid chromatography on a chiral stationary phase for the resolution of phosphine oxide enantiomers *Anal. Chem*, 1985, 57(14): 2819-2823
- [28] Terfloth G. Enantioseparations in super- and subcritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2001, 906(1-2): 301-307

- [29] Phinney K W. SFC of drug enantiomers. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(5): 204A-211A
- [30] Schurig V. Enantiomer Separation by Gas-Chromatography on Chiral Stationary Phases. *Journal of Chromatography A*, 1994, 666(1-2): 111-129
- [31] Vetter W, Schurig V. Enantioselective determination of chiral organochlorine compounds in biota by gas chromatography on modified cyclodextrins. *Journal of Chromatography A*, 1997, 774(1-2): 143-175
- [32] 李莉, 任朝兴, 袁黎明. 气相色谱手性固定相研究进展. *化学进展*, 2007, 19(2/3): 393-403
- [33] Gubitz G, Schmid M G. Advances in chiral separation using capillary electromigration techniques. *Electrophoresis*, 2007, 28(1-2): 114-126
- [34] Van Eeckhaut A, Michotte Y. Chiral separations by capillary electrophoresis: Recent developments and applications. *Electrophoresis*, 2006, 27(14): 2880-2895
- [35] Kodama S, Saito Y, Chinaka S, Yamamoto A, Hayakawa K. Chiral capillary electrophoresis of agrochemicals in real samples. *Journal of Health Science*, 2006, 52(5): 489-494
- [36] Ha P T T, Hoogmartens J, Van Schepdael A. Recent advances in pharmaceutical applications of chiral capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41(1): 1-11
- [37] Wistuba D, Schurig V. Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 2000, 875(1-2): 255-276
- [38] Lammerhofer M. Chiral separations by capillary electromigration techniques in nonaqueous media II. Enantioselective nonaqueous capillary

- electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1068(1): 31-57
- [39] Scriba G K E. Pharmaceutical and biomedical applications of chiral capillary electrophoresis and capillary electrochromatography: An update. *Electrophoresis*, 2003, 24(15): 2409-2421
- [40] Ward T J, Baker B A. Chiral separations. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(12): 4363-4372
- [41] Ward T J. Chiral separations. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(12): 3947-3956
- [42] 林炳承, 秦建华. 微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2006.
- [43] Reyes D R, Iossifidis D, Auroux P A, Manz A. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(12): 2623-2636
- [44] Auroux P A, Iossifidis D, Reyes D R, Manz A. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(12): 2637-2652
- [45] Dittrich P S, Tachikawa K, Manz A. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(12): 3887-3907
- [46] Crevillen A G, Hervas M, Lopez M A, Gonzalez M C, Escarpa A. Real sample analysis on microfluidic devices. *Talanta*, 2007, 74(3): 342-357
- [47] Fiorini G S, Chiu D T. Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. *Biotechniques*, 2005, 38(3): 429-446
- [48] McDonald J C, Duffy D C, Anderson J R, Chiu D T, Wu H K, Schueller O J A, Whitesides G M. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 2000, 21(1): 27-40

- [49] Fan Z H, Harrison D J. Micromachining of Capillary Electrophoresis Injectors and Separators on Glass Chips and Evaluation of Flow at Capillary Intersections. *Analytical Chemistry*, 1994, 66(1): 177-184
- [50] Liu R H, Yang J N, Lenigk R, Bonanno J, Grodzinski P. Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(7): 1824-1831
- [51] Whitesides G M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-373
- [52] Psaltis D, Quake S R, Yang C H. Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *Nature*, 2006, 442(7101): 381-386
- [53] Craighead H. Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature*, 2006, 442(7101): 387-393
- [54] deMello A J. Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, 2006, 442(7101): 394-402
- [55] El-Ali J, Sorger P K, Jensen K F. Cells on chips. *Nature*, 2006, 442(7101): 403-411
- [56] Yager P, Edwards T, Fu E, Helton K, Nelson K, Tam M R, Weigl B H. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*, 2006, 442(7101): 412-418
- [57] Haber C. Microfluidics in commercial applications; an industry perspective. *Lab on a Chip*, 2006, 6(9): 1118-1121
- [58] Hutt L D, Glavin D P, Bada J L, Mathies R A. Microfabricated capillary electrophoresis amino acid chirality analyzer for extraterrestrial

- exploration. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(18): 4000-4006
- [59] Nguyen T N T, Lee N E. Deep reactive ion etching of polyimide for microfluidic applications. *Journal of the Korean Physical Society*, 2007, 51(3): 984-988
- [60] <http://www.microe.cn/bbs/archiver/?tid-5011.html>.
- [61] Pradhan P, Guan J, Lu D, Wang P G, Lee L J, Lee R J. A facile microfluidic method for production of liposomes. *Anticancer Research*, 2008, 28(2A): 943-947
- [62] Funakoshi K, Suzuki H, Takeuchi S. Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(24): 8169-8174
- [63] Johnston I D, Tracey M C, Davis J B, Tan C K L. Microfluidic solid phase suspension transport with an elastomer-based, single piezo-actuator, micro throttle pump. *Lab on a Chip*, 2005, 5(3): 318-325
- [64] Jeong O C, Park S W, Yang S S, Pak J J. Fabrication of a peristaltic PDMS micropump. *Sensors and Actuators a-Physical*, 2005, 123-24: 453-458
- [65] Pal R, Yang M, Johnson B N, Burke D T, Burns M A. Phase change microvalve for integrated devices. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(13): 3740-3748
- [66] Grover W H, Skelley A M, Liu C N, Lagally E T, Mathies R A. Monolithic membrane valves and diaphragm pumps for practical large-scale integration into glass microfluidic devices. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2003, 89(3): 315-323
- [67] Jiang L, Jiang X N, Lu Y, Dai Z P, Xie M H, Qin J H, Lin B C. Development of a universal serial bus-powered mini-high-voltage power

- supply for microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2007, 28(8): 1259-1264
- [68] Belder D, Ludwig M. Microchip electrophoresis for chiral separations. *Electrophoresis*, 2003, 24(15): 2422-2430
- [69] Wallenborg S R, Lurie I S, Arnold D W, Bailey C G. On-chip chiral and achiral separation of amphetamine and related compounds labeled with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazane. *Electrophoresis*, 2000, 21(15): 3257-3263
- [70] Rodriguez I, Jin L J, Li S F Y. High-speed chiral separations on microchip electrophoresis devices. *Electrophoresis*, 2000, 21(1): 211-219
- [71] Reetz M T, Kuhling K M, Deege A, Hinrichs H, Belder D. Super-high-throughput screening of enantioselective catalysts by using capillary array electrophoresis. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2000, 39(21): 3891-3893
- [72] Zeng H L, Li H F, Lin J M. Chiral separation of dansyl amino acids by PDMS microchip gel monolithic column electrochromatography with gamma-cyclodextrin bonded in polyacrylamide. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 551(1-2): 1-8
- [73] Cho S I, Lee K-N, Kim Y-K, Jang J, Chung D S. Chiral separation of gemifloxacin in sodium-containing media using chiral crown ether as a chiral selector by capillary and microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2002, 23(6): 972-977
- [74] Il Cho S, Shim J, Kim M S, Kim Y K, Chung D S. On-line sample cleanup and chiral separation of gemifloxacin in a urinary solution using chiral crown ether as a chiral selector in microchip electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1055(1-2): 241-245

- [75] Belder D, Deege A, Maass M, Ludwig M. Design and performance of a microchip electrophoresis instrument with sensitive variable-wavelength fluorescence detection. *Electrophoresis*, 2002, 23(14): 2355-2361
- [76] Ludwig M, Belder D. Coated microfluidic devices for improved chiral separations in microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, 24(15): 2481-2486
- [77] Zeng H-L, Li H, Wang X, Lin J-M. Chiral separation of FITC-labeled amino acids with gel electrochromatography using a polydimethylsiloxane microfluidic device. *J Capill Electrophor Microchip Technol*, 2007, 10(1-2): 19-24
- [78] Ludwig M, Kohler F, Belder D. High-speed chiral separations on a microchip with UV detection. *Electrophoresis*, 2003, 24(18): 3233-3238
- [79] Kitagawa F, Aizawa S, Otsuka K. Rapid enantioseparation of l-aminoindan by microchip electrophoresis with linear-imaging UV detection. *Analytical Sciences*, 2005, 21(1): 61-65
- [80] Schwarz M A, Hauser P C. Rapid chiral on-chip separation with simplified amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2001, 928(2): 225-232
- [81] Schwarz M A, Hauser P C. Chiral on-chip separations of neurotransmitters. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(17): 4691-4695
- [82] Olvecka E, Masar M, Kaniansky D, Johnck M, Stanislawski B. Isotachopheresis separations of enantiomers on a planar chip with coupled separation channels. *Electrophoresis*, 2001, 22(15): 3347-3353
- [83] Skelley A M, Mathies R A. Chiral separation of fluorescamine-labeled amino acids using microfabricated capillary electrophoresis devices for

- extraterrestrial exploration. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1021(1-2): 191-199
- [84] Piehl N, Ludwig M, Belder D. Subsecond chiral separations on a microchip. *Electrophoresis*, 2004, 25(21-22): 3848-3852
- [85] 王辉, 戴忠鹏, 王利, 百吉玲, 林炳承. 氨基酸对映体的芯片毛细管电泳拆分. *分析化学*, 2002, 30(6): 665-669
- [86] Bi H Y, Weng X X, Qu H Y, Kong J L, Yang P Y, Liu B H. Strategy for allosteric analysis based on protein-patterned stationary phase in microfluidic chip. *Journal of Proteome Research*, 2005, 4(6): 2154-2160
- [87] Huh Y S, Jun Y S, Hong Y K, Hong W H, Kim D H. Microfluidic separation of (S)-ibuprofen using enzymatic reaction. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2006, 43(1-4): 96-101
- [88] Lin C H, Fang W R, Kuo C M, Chang W Y, Liu Y C, Lin W Y, Wu J C, Lin C E. Chiral separation of hydroxyflavanones in cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis using sulfated cyclodextrins as chiral selectors. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1188(2): 301-307
- [89] Liao A S, Liu J T, Lin L C, Chiu Y C, Shu Y R, Tsai C C, Lin C H. Optimization of a simple method for the chiral separation of methamphetamine and related compounds in clandestine tablets and urine samples by beta-cyclodextrine modified capillary electrophoresis: a complementary method to GC-MS. *Forensic Science International*, 2003, 134(1): 17-24
- [90] Ptolemy A S, Tran L, Britz-McKibbin P. Single-step enantioselective amino acid flux analysis by capillary electrophoresis using on-line sample preconcentration with chemical derivatization. *Analytical Biochemistry*,

- 2006, 354(2): 192-204
- [91] Li C W, Wang Y N, Gao Y H, Guo X Y, Gu Z Z. Magnetically actuated micromixing on an array-pattern microfluidic chip for immunoassay of human thyrotropin. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2005, 5(8): 1297-1300
- [92] Luo Y Q, Yu F, Zare R N. Microfluidic device for immunoassays based on surface plasmon resonance imaging. *Lab on a Chip*, 2008, 8(5): 694-700
- [93] Dong H, Li C M, Zhang Y F, Cao X D, Gan Y. Screen-printed microfluidic device for electrochemical immunoassay. *Lab on a Chip*, 2007, 7(12): 1752-1758
- [94] Wang Z H, Meng Y H, Ying P Q, Qi C, Jin G. A label-free protein microfluidic array for parallel immunoassays. *Electrophoresis*, 2006, 27(20): 4078-4085
- [95] Liu M C, Ho D, Tai Y C. Monolithic fabrication of three-dimensional microfluidic networks for constructing cell culture array with an integrated combinatorial mixer. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2008, 129(2): 826-833
- [96] King K R, Wang S H, Irimia D, Jayaraman A, Toner M, Yarmush M L. A high-throughput microfluidic real-time gene expression living cell array. *Lab on a Chip*, 2007, 7(1): 77-85
- [97] Meyvantsson I, Warrick J W, Hayes S, Skoien A, Beebe D J. Automated cell culture in high density tubeless microfluidic device arrays. *Lab on a Chip*, 2008, 8(5): 717-724
- [98] Di Carlo D, Aghdam N, Lee L P. Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell

- isolation arrays. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(14): 4925-4930
- [99] Gomez-Sjoberg R, Leyrat A A, Pirone D M, Chen C S, Quake S R. Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(22): 8557-8563
- [100] Lau A Y, Hung P J, Wu A R, Lee L P. Open-access microfluidic patch-clamp array with raised lateral cell trapping sites. *Lab on a Chip*, 2006, 6(12): 1510-1515
- [101] Thorsen T, Maerkl S J, Quake S R. Microfluidic large-scale integration. *Science*, 2002, 298(5593): 580-584
- [102] Hua Z S, Xia Y M, Srivannavit O, Rouillard J M, Zhou X C, Gao X L, Gulari E. A versatile microreactor platform featuring a chemical-resistant microvalve array for addressable multiplex syntheses and assays. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2006, 16(8): 1433-1443
- [103] Woolley A T, Sensabaugh G F, Mathies R A. High-speed DNA genotyping using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(11): 2181-2186
- [104] Simpson P C, Roach D, Woolley A T, Thorsen T, Johnston R, Sensabaugh G F, Mathies R A. High-throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(5): 2256-2261
- [105] Shi Y N, Simpson P C, Scherer J R, Wexler D, Skibola C, Smith M T, Mathies R A. Radial capillary array electrophoresis microplate and scanner for high-performance nucleic acid analysis. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(23): 5354-5361

- [106] Emrich C A, Tian H J, Medintz I L, Mathies R A. Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(19): 5076-5083
- [107] Smith E M, Xu H W, Ewing A G. DNA separations in microfabricated devices with automated capillary sample introduction. *Electrophoresis*, 2001, 22(2): 363-370
- [108] Xu X M, Roddy T P, Lapos J A, Ewing A G. Parallel analysis with optically gated sample introduction on a multichannel microchip. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(21): 5517-5522
- [109] Dang F, Shinohara S, Tabata O, Yamaoka Y, Kurokawa M, Shinohara Y, Ishikawa M, Baba Y. Replica multichannel polymer chips with a network of sacrificial channels sealed by adhesive printing method. *Lab on a Chip*, 2005, 5(4): 472-478
- [110] Dang F Q, Tabata O, Kurokawa M, Ewis A A, Zhang L H, Yamaoka Y, Shinohara S, Shinohara Y, Ishikawa M, Baba Y. High-performance genetic analysis on microfabricated capillary array electrophoresis plastic chips fabricated by injection molding. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(7): 2140-2146
- [111] Aborn J H, El-Difrawy S A, Novotny M, Gismondi E A, Lam R, Matsudaira P, McKenna B K, O'Neil T, Streechon P, Ehrlich D J. A 768-lane microfabricated system for high-throughput DNA sequencing. *Lab on a Chip*, 2005, 5(6): 669-674
- [112] Das C, Zhang J, Denslow N D, Fan Z H. Integration of isoelectric focusing with multi-channel gel electrophoresis by using microfluidic

- pseudo-valves. *Lab on a Chip*, 2007, 7(12): 1806-1812
- [113] Zhang L, Yin X F. Parallel separation of multiple samples with negative pressure sample injection on a 3-D microfluidic array chip. *Electrophoresis*, 2007, 28(8): 1281-1288
- [114] Ro K W, Hahn J H. Precolumn diastereomerization and micellar electrokinetic chromatography on a plastic microchip: Rapid chiral analysis of amino acids. *Electrophoresis*, 2005, 26(24): 4767-4773
- [115] Belder D, Ludwig M, Wang L W, Reetz M T. Enantioselective catalysis and analysis on a chip. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, 45(15): 2463-2466

第二章 单通道芯片电泳手性拆分研究

自芯片电泳首次报道到如今这一技术日渐成熟,单通道芯片电泳因简单易行在芯片电泳分离分析中一直占有很大比重。微流控芯片在手性拆分领域的诸多探索就芯片结构设计形式而言,也多为单通道芯片电泳。本章工作即是利用实验室自主研发的芯片,在自行搭建的激光诱导荧光芯片工作站上,进行单通道芯片电泳手性拆分研究的初步尝试。

2.1 引言

以对映体拆分为前提的手性拆分不仅是科学研究的热点问题之一,也是工业生产的重要环节。在各种手性手性化合物中,以手性药物的对映体拆分最受关注。因为手性药物对映体在药效和毒理等方面往往表现出较大差异,药监部门和市场共同推动单一对映体形式手性药物的转化和研发[1]。而手性药物开发的各个环节,诸如手性化合物的合成、药效和药理评估等通常需要通过拆分手性化合物以进行各个对映体的纯度检测或含量分析。随着手性药物在药物开发中所占比重的增加,相关领域迫切需要高通量、高灵敏度的手性拆分平台以满足日益增长的需求。

毛细管电泳技术因样品用量少、分析时间短和操作简单成为二十世纪九十年代备受关注的手性药物拆分平台[2, 3]。作者所在实验室在这一时期也利用毛细管电泳技术,成功对百余种手性药物进行了拆分,在手性化合物电泳拆分方面积累了大量经验[4-6]。

二十世纪九十年代中后期,包括作者所在实验室在内的一批研究小组将研究方向由毛细管电泳等传统的分析技术向微流控芯片转移。微流控芯片是在一块几平方厘米的芯片上,由微通道形成网络,以可控流体贯穿整个系统,

把化学和生物等领域涉及的样品制备、反应、分离、检测及细胞培养、分选、裂解等基本操作单元集成或者基本集成到用以取代常规化学或生物实验室的各种功能的一种技术平台。制作芯片的材料种类丰富，制作方法因材而异。尽管通过湿法或干法刻蚀，注塑，热压或激光烧蚀等常用芯片制作方法制作出的芯片电泳通道截面为矩形，半圆或者类梯形等规则或不规则形状，在其上进行的电泳行为与开管毛细管电泳行为相一致[7]。传统毛细管电泳的各种形式，如区带电泳（CZE），凝胶电泳（CGE），胶束电动色谱（MEKC）及等速电泳（ITP）均可在芯片上实现。特别是单通道芯片电泳，结构简单，对与之匹配的控制系统和检测器要求不高，已经在 DNA[8-10]、蛋白质[11, 12]、包括手性分子在内的小分子[13, 14]以及细胞[15, 16]的分离分析方面得到广泛应用。芯片电泳不仅是微流控芯片的早期形式，在功能单元集成度越来越高的发展趋势下，芯片电泳作为重要的分离单元也不容忽视。

作者实验室经过数年研究，开发了玻璃芯片制作工艺，搭建了激发波长分别为 532 nm 和 473 nm 的激光诱导荧光芯片分析仪，以此为基础进行了芯片单通道芯片电泳在蛋白质[12, 17, 18]和核酸[19, 20]分离分析方面的研究。

本章工作是利用实验室在毛细管电泳手性拆分方向的深厚积累，以及进行芯片电泳的有利条件，制作玻璃材质的电泳芯片，在 473 nm 激光诱导荧光芯片分析仪上，以七种中性环糊精为拆分剂对三种碱性的手性药物消旋体进行拆分。

2.2 实验部分

2.2.1 试剂

碱性手性药物消旋体（baclofen, norfenefrine 和 tocainide）由德国 Tuebingen 大学提供，结构见图 2-1。荧光素异硫氰酸酯（fluorescein

isothiocyanate, FITC) 购自 Amresco (Solon, Ohio), 中性环糊精 α -CD, β -CD, γ -CD, HP- α -CD, HP- β -CD, HP- γ -CD, DM- β -CD 购自 Wacker Chemie (Munich, Germany), 其它试剂均为分析纯。溶液均由二次水配制, 使用前经 $0.22\ \mu\text{m}$ 的滤膜 (新亚净化器件厂, 上海) 过滤。

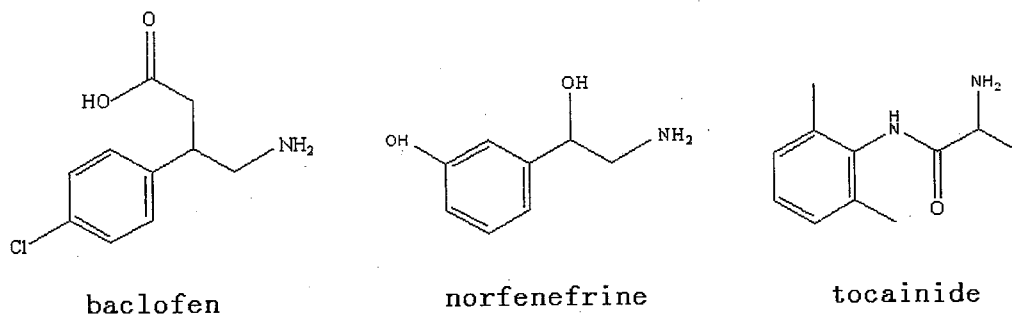


图 2-1 手性药物结构

Fig. 2-1 Schematic of the structure of the chiral drugs

2.2.2 芯片和仪器

实验所用微流控芯片为实验室自制单通道玻璃芯片 (图 2-2), 芯片制作采用标准的光刻蚀和湿法刻蚀技术[22]。芯片分离通道总长 5 cm, 其中从缓冲液储液池至十字交叉处为 0.5 cm, 十字交叉处至缓冲液废液池为 4.5 cm; 进样通道长 1.0 cm, 从十字交叉处至样品池和样品废液池均为 0.5 cm。通道横截面近似半椭圆形, 上宽 $60\ \mu\text{m}$, 下宽 $30\ \mu\text{m}$, 深 $15\ \mu\text{m}$ 。检测点距十字交叉处为 3.8 cm。

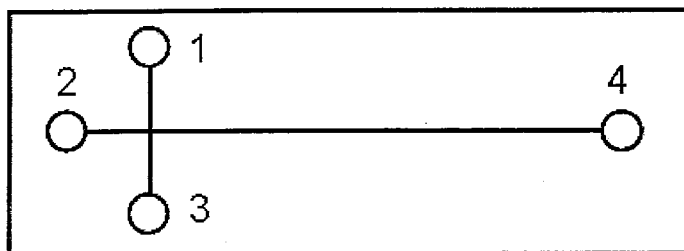


图 2-2 单通道玻璃芯片结构示意图。1, 样品池, 2, 缓冲液池, 3, 样品废液池, 4, 缓冲液废液池。

Fig. 2-2 Layout of the single channel glass microchip. 1, sample reservoir, 2, buffer reservoir, 3, sample waste reservoir, 4, buffer waste reservoir.

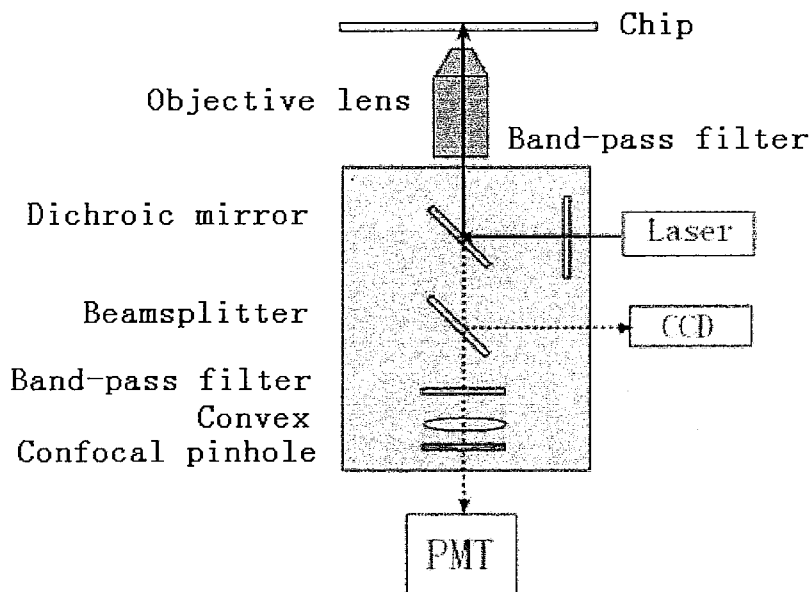


图 2-3 微流控芯片激光诱导荧光分析仪光路示意图^[21]

Fig. 2-3 Schematic diagram of the optical system of the LIF microfluidic analytical system

实验所用芯片分析仪为实验室自制激光诱导荧光微流控芯片分析仪[21]。主要部件包括：空气制冷半导体泵浦固体激光器（榜首科技，北京），输出功率为 10 mW，波长为 473 nm；黑白 CCD 摄像头（Watec, American）；电倍增管（滨松光子，日本）；程控线性平移台（卓立汉光有限公司，北京）；高压模块(EMCO, American)等。该系统检测波长为 520 nm，采用单点共聚焦检测，通过程控线性平移台三维调节激光聚焦点，并经 CCD 摄像头实时监控。仪器光路如图 2-3 所示。

2.2.3 实验过程

2.2.3.1 样品衍生

样品衍生过程参考文献[23]。三种手性药物分别用磷酸缓冲液（20 mM，pH 9.3）溶解成 10 mM 的样品溶液。FITC 用丙酮溶解成 20 mM 的溶液。取 20 μL FITC 溶液加入 80 μL 样品溶液中，混匀，室温避光反应 12 h，保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。分析前，将此反应液用磷酸缓冲液(20 mM，pH 9.3)稀释至 8×10^{-6} M。各环糊精分别用磷酸缓冲液(20 mM，pH 9.3)融解成浓度为 10 mM 储存液，保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用，运行前稀释至合适的浓度。

2.2.3.2 电泳过程

芯片使用前依次用 1 M HCl 洗 30 min, H_2O 洗 10 min, 1 M NaOH 洗 30 min, H_2O 洗 10 min。运行间隔用 1 M NaOH 洗 10 min, H_2O 洗 5 min，运行缓冲液平衡 3 min。然后向缓冲液池、样品废液池和缓冲液废液池各加 5 μL 运行缓冲液，样品池加 5 μL 样品。采用压缩进样，如图 2-4 所示。所施加电压见表 2-1。

对映体之间的分辨率(R_s)作为手性拆分指标进行了考察， R_s 的计算公式

为:

$$R_s = (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2) \quad (1)$$

t_1 和 t_2 是对映体的迁移时间, w_1 和 w_2 是对映体的半峰宽。迁移时间和半峰宽均由检测器自带程序计算。

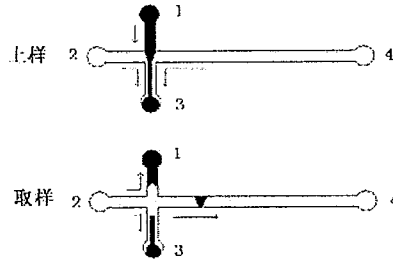


图 2-4 压缩进样示意图。1, 样品池, 2, 缓冲液池, 3, 样品废液池, 4, 缓冲液废液池。

Fig. 2-4 Schematic of the pinched injection mode. 1, sample reservoir, 2, buffer reservoir, 3, sample waste reservoir, 4, buffer waste reservoir.

表 2-1 单通道芯片电泳进样及分离电压分配表

Table 2-1 Voltages applied on the reservoirs for sample injection and separation on the single-channel microchip

	1	2	3	4
上样电压 (V)	400	300	—	900
分离电压 (V)	1200	1800	1200	—

—, 接地

2.3 结果与讨论

2.3.1 拆分条件考察

在如图 2-3 所示的十字交叉型单通道玻璃芯片上, 以手性药物 baclofen 为对象, γ -CD 为拆分剂对缓冲液 pH 值、浓度及手性拆分剂的浓度进行了条件考察, 结果见图 2-5。

2.3.1.1 运行缓冲液 pH 值

运行缓冲液的 pH 值影响分析对象所带电荷和电渗流的大小, 是影响手性拆分的重要因素。考虑到所选用的荧光染料 FITC 通常在 pH 5-10 范围内使用, 此处我们在固定运行缓冲液和拆分剂浓度的条件下, 在 pH 5-10 之间选取四个点考察 pH 值对拆分的影响, 结果如图 2-5 (a) 所示。从图中可以看出, 随着 pH 的增加, 分离度 (R_s) 增大。其中在 pH = 7.4, 8.3 和 9.3 时, $R_s > 1$, 即均可实现基线分离。这说明在偏碱性范围内, pH 值对经 FITC 标记的 baclofen 拆分影响不大。另一方面, 图 2-5 (a) 表明 pH 值对荧光信号强度有较大影响。pH = 5.5 和 7.4 时, 荧光信号很弱, 当 pH = 8.3 和 9.3 时, 荧光信号显著增强。综合考虑分离度和信号响应, 后续实验均在 pH 9.3 的介质中进行。

2.3.1.2 运行缓冲液浓度

运行缓冲液离子强度不仅影响电渗流, 也影响焦耳热的大小, 从而影响拆分剂和对映体的包合作用。图 2-5 (b) 显示了磷酸缓冲液的浓度对 γ -CD 拆分 baclofen 对映体的影响。从图中可以看出, 随着磷酸缓冲液浓度的增加, R_s 亦增大。其原因可能是磷酸浓度的增加降低了电渗流, 使 γ -CD 和 baclofen 对映体相互作用的时间增长, 增大了拆分剂和对映体形成的包合物的表观电

泳淌度的差异。继续增加磷酸浓度, 电流显示过大, 基线不稳, 因此, 以 20mM 的磷酸缓冲液作为运行缓冲液。

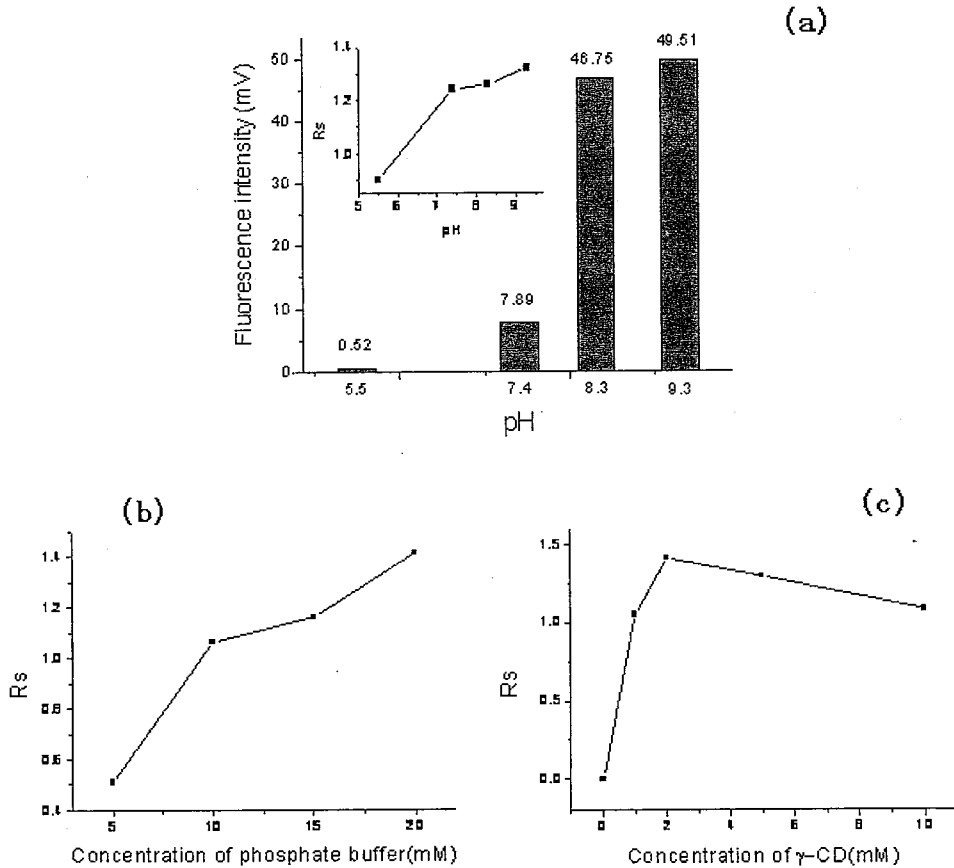


图 2-5 单通道芯片电泳手性拆分 FITC 标记的 baclofen 条件考察。(a) 运行缓冲液 pH 对拆分的影响; (b) 运行缓冲液浓度对拆分的影响; (c) 拆分剂浓度对拆分的影响。除特别指出, 样品: 8×10^{-6} M FITC 标记 baclofen; 运行缓冲液: 20mM 磷酸缓冲液, pH9.3; 拆分剂浓度: 2mM γ -CD。

Fig. 2-5 Optimization of conditions for chiral separation by single-channel

microchip electrophoresis. (a) Effects of pH value of running buffer on the separation of FITC labeled baclofen, (b) Effects of the concentration of running buffer on the separation of FITC labeled baclofen, (c) Effects of the concentration of CD on the separation of FITC labeled baclofen.

2.3.1.3 拆分剂浓度

拆分剂的种类对映体的拆分具有举足轻重的作用，其浓度的影响也不可轻视，通常认为拆分剂的浓度存在一最佳值。拆分剂浓度开始增加时，拆分剂和对映体的接触几率增大，形成包合物的趋势增加，达到某一浓度时，分离达到最大；但随拆分剂浓度的增加，溶液粘度也随之增加，迁移率减小，对映体的平均迁移率之差也随之减小，分离变差[24]。在毛细管电泳手性拆分中，拆分剂的浓度往往以几十毫摩尔为宜，考虑到微流控芯片上样量仅为皮升级，较毛细管电泳少一个数量级，拆分剂的用量应该相应有所减少。我们考察了 γ -CD浓度从1 mM到10 mM变化对FITC标记的baclofen拆分的影响。如图2-5(c)所示，芯片电泳中拆分剂的浓度对拆分的影响验证了上述存在最佳浓度的说法，对映体分离度先增大后减小，最佳拆分剂浓度为2 mM。

综上所述，根据不同条件下两对映体分离度的大小，本实验体系的优化条件为20mM磷酸2mM CD，pH9.3。

2.3.2 七种中性 CD 及 CD 衍生物拆分三种手性药物

2.3.2.1 芯片电泳拆分结果

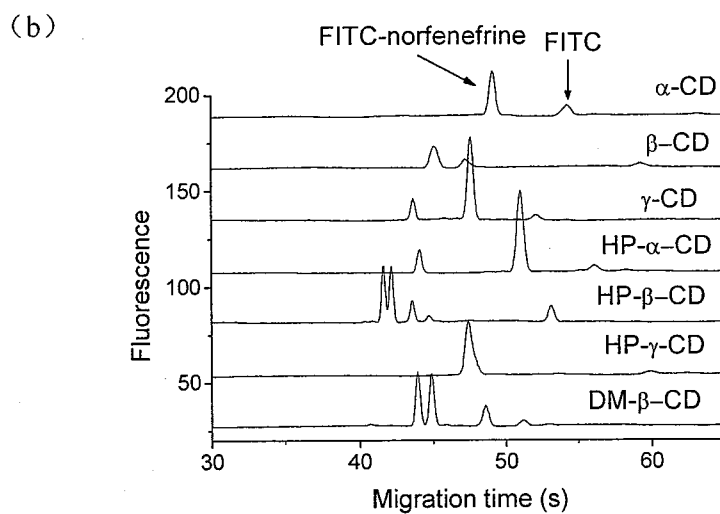
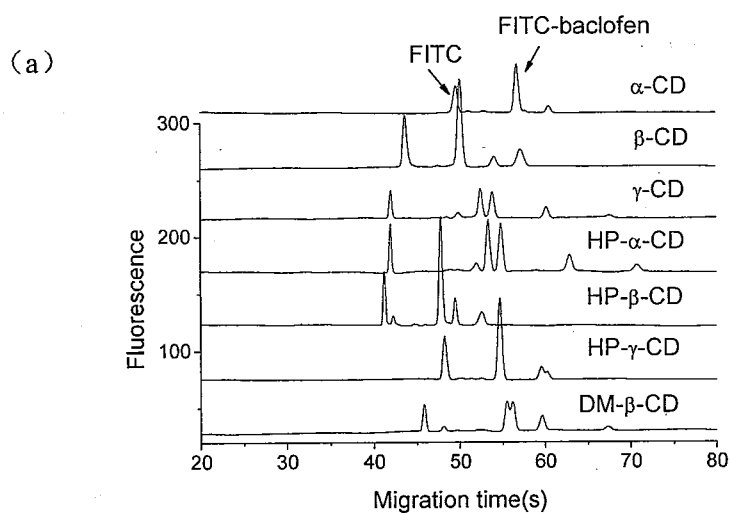
在上述优化条件下,考察了七种中性 CD 和 CD 衍生物对三种经 FITC 标记的手性药物对映体的拆分情况,拆分结果见图 2-6。对于这三种结构类似的药物,七种 CD 及 CD 其衍生物表现出了不同的选择性。其中, baclofen 对映体能够被 γ -CD 和 HP- α -CD 基线分离,而被 DM- β -CD 部分分离; norfenefrine 对映体能够被 DM- β -CD 完全分离,被 HP- γ -CD 部分分离;对于 tocinide 对映体七种 CD 及 CD 衍生物均未能将其拆分。根据三个药物的结构差异,我们认为药物分子与 CD 之间形成的氢键可能对对映体识别起重要作用。从图 2-1 可以看出, tocinide 分子的-NH-周围的空间位阻较大,难于和 CD 形成氢键,使对映体和 CD 形成的包合物淌度差异太小,不足以分来。

2.3.2.2 单通道芯片电泳手性拆分优缺点

在阴极检测模式下,每次电泳过程基本上都可以在 60s 内完成,其中包括 10 s 的进样时间。通过该平台对 CD 进行快速筛选,可以对其中表现出较强选择性的 CD 作进一步条件优化,这样更有针对性,节省分析时间。但是,在实验过程中我们感到,上述实验依然耗费不少时间和人工,尤其是每次电泳间隔的通道清洗所耗费的时间非常多,有必要开发更加省时省力的方法和平台。

与传统毛细管电泳对 baclofen 对映体的分离结果相比,微流控芯片的优势明显:尽管分离通道仅长 50 mm,不仅分析时间短($<1\text{min}$),分离效率高($R_s=1.4$),而且拆分剂的用量很少(2mM 10 μL)。同样采用 LIF 检测器,中性 CD 为手性选择剂,传统 CE 毛细管有效检测长度在 450 mm, CD 最佳浓

度为 7 mM, 最大分离度只有 1.11[25]。而以 UV 为检测器时, 在优化条件下, 中性环糊精 β -CD 的浓度为 10 mM, baclofen 对映体的最大分离度只有 1.06^[26]。因此, 微流控芯片是一种更高效, 快速, 经济的手性拆分平台。



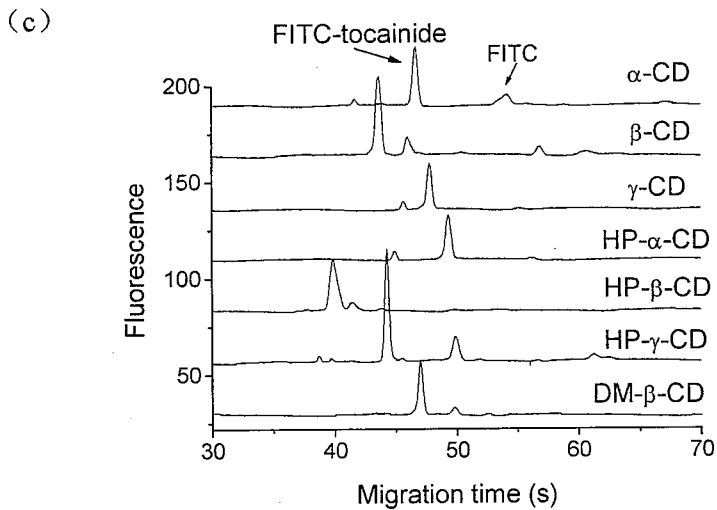


图 2-6 七种中性 CD 和 CD 衍生物拆分 FITC 标记的手性药物电泳图。(a) 拆分 FITC 标记的 baclofen; (b) 拆分 FITC 标记的 norfenefrine; (c) 拆分 FITC 标记的 tocainide。运行条件: 样品, 8×10^{-6} M FITC 标记的手性药物; 运行缓冲液, 20mM 磷酸缓冲液, pH9.3; 拆分剂浓度, 2mM。

Fig. 2-6 Electropherogram of chiral separations of FITC-labeled chiral drugs by seven kinds of CD and CD derivatives. (a) Chiral separation of FITC-baclofen, (b) chiral separation of FITC-norfenefrine, (c) chiral separation of FITC-tocainide.

2.4 结论

建立了以激光诱导荧光检测为基础的基于单通道芯片电泳的手性拆分平台,进行了七种 CD 和 CD 衍生物对三种经 FITC 标记的手性药物对映体的拆分,其中两种手性药物对映体得到基线分离。结果表明,单通道芯片电泳是

一种高效、快速和经济的手性拆分平台。

参考文献

- [1] Caner H, Groner E, Levy L, Agranat I. Trends in the development of chiral drugs. *Drug Discovery Today*, 2004, 9(3): 105-110
- [2] Ha P T T, Hoogmartens J, Van Schepdael A. Recent advances in pharmaceutical applications of chiral capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41(1): 1-11
- [3] Fanali S. Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1996, 735(1-2): 77-121
- [4] Zhu X F, Lin B C, Jakob A, Wuerthner S, Koppenhoefer B. Separation of drugs by capillary electrophoresis, Part 10. Permethy-alpha-cyclodextrin as chiral solvating agent. *Electrophoresis*, 1999, 20(9): 1878-1889
- [5] Koppenhoefer B, Epperlein U, Jakob A, Wuerthner S, Zhu X F, Lin B C. Separation of enantiomers of drugs by capillary electrophoresis, part 7: Gamma-cyclodextrin as chiral solvating agent. *Chirality*, 1998, 10(6): 548-554
- [6] Lin B C, Zhu X F, Koppenhoefer B, Epperlein U. Investigation of 123 chiral drugs by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *Lc Gc-Magazine of Separation Science*, 1997, 15(1): 40-&
- [7] Regnier F E, He B, Lin S, Busse J. Chromatography and electrophoresis on chips: critical elements of future integrated, microfluidic analytical systems for life science. *Trends in Biotechnology*, 1999, 17(3): 101-106
- [8] Effenhauser C S, Paulus A, Manz A, Widmer H M. High-Speed Separation

- of Antisense Oligonucleotides on a Micromachined Capillary Electrophoresis Device. *Analytical Chemistry*, 1994, 66(18): 2949-2953
- [9] Shi Y N. DNA sequencing and multiplex STR analysis on plastic microfluidic devices. *Electrophoresis*, 2006, 27(19): 3703-3711
- [10] Blazej R G, Kumaresan P, Mathies R A. Microfabricated bioprocessor for integrated nanoliter-scale Sanger DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(19): 7240-7245
- [11] Peng Y Y, Pallandre A, Tran N T, Taverna M. Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods. *Electrophoresis*, 2008, 29(1): 157-178
- [12] Huang H Q, Xu F, Dai Z P, Lin B C. On-line isotachophoretic preconcentration and gel electrophoretic separation of sodium dodecyl sulfate-proteins on a microchip. *Electrophoresis*, 2005, 26(11): 2254-2260
- [13] Suzuki S, Honda S. Miniaturization in carbohydrate analysis. *Electrophoresis*, 2003, 24(21): 3577-3582
- [14] Ma B, Zhou X M, Wang G, Huang H Q, Dai Z P, Qin J H, Lin B C. Integrated isotachophoretic reconcentration with zone electrophoresis separation on a quartz microchip for UV detection of flavonoids. *Electrophoresis*, 2006, 27(24): 4904-4909
- [15] Yu L F, Shen Z, Mo J K, Dong X L, Qin J H, Lin B C. Microfluidic chip-based cell electrophoresis with multipoint laser-induced fluorescence detection system. *Electrophoresis*, 2007, 28(24): 4741-4747
- [16] Wu H K, Wheeler A, Zare R N. Chemical cytometry on a picoliter-scale integrated microfluidic chip. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America, 2004, 101(35): 12809-12813
- [17] Liu X J, Liu X, Liang A Y, Shen Z, Zhang Y, Dai Z P, Xiong B H, Lin B C. Studying protein-drug interaction by microfluidic chip affinity capillary electrophoresis with indirect laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 2006, 27(15): 3125-3128
- [18] Mao X L, Wang K, Du Y G, Lin B C. Analysis of chicken and turkey ovalbumins by microchip electrophoresis combined with exoglycosidase digestion. *Electrophoresis*, 2003, 24(18): 3273-3278
- [19] Liu D Y, Zhou X M, Zhong R T, Ye N N, Chang G H, Xiong W, Mei X D, Lin B C. Analysis of multiplex PCR fragments with PMMA microchip. *Talanta*, 2006, 68(3): 616-622
- [20] Zhou X M, Dai Z P, Liu X, Luo Y, Wang H, Lin B C. Modification of a poly(methyl methacrylate) injection-molded microchip and its use for high performance analysis of DNA. *Journal of Separation Science*, 2005, 28(3): 225-233
- [21] 龙志成. 以纳孔膜为重要功能单元的集成化微流控分析系统研究. 中国科学院研究生院博士学位论文, 2007: 46—48
- [22] Woolley A T, Mathies R A. Ultra-High-Speed DNA Fragment Separations Using Microfabricated Capillary Array Electrophoresis Chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(24): 11348-11352
- [23] Wang H, Dai Z P, Wang L, Bai J L, Lin B C. Enantiomer separation of amino acids on microchip-based electrophoresis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2002, 30(6): 665-669
- [24] 林炳承. 毛细管电泳导论, 第一版, 北京:科学出版社, 1996, 205-224

- [25] Chiang M T, Chang S Y, Whang C W. Chiral analysis of baclofen by alpha-cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 2001, 22(1): 123-127
- [26] Ali I, Aboul-Enein H Y. Optimization of the chiral resolution of baclofen by capillary electrophoresis using beta-cyclodextrin as the chiral selector. *Electrophoresis*, 2003, 24(12-13): 2064-2069

第三章 多通道芯片电泳手性拆分研究

目前多通道芯片电泳主要应用于核酸分析，其手性拆分领域的应用尚未见报导。本章工作着眼点在于，在第一章单通道芯片电泳手性拆分的基础上，设计制作缓冲液池公用的四通道电泳芯片和缓冲液池独立的四通道电泳芯片，考察多通道芯片电泳用于手性拆分的可行性，并且建立对多个手性样品和手性选择剂体系的快速分析方法。

3.1 公用缓冲液池四通道芯片电泳手性拆分

3.1.1 引言

微流控芯片在手性拆分领域的优势，如分析时间短，试剂消耗少等已经在单通道芯片电泳上得以初步展示[1-4]。减少单次分析时间，发展超快速的手性拆分是发展高通量手性拆分的方式之一[4]。2004年 Belder 研究组在“十字”交叉型单通道石英芯片上对九种丹磺酰化氨基酸进行了区带电泳拆分，其中丹磺酰化正亮氨酸对映体在 800 ms 内实现了拆分，这是迄今为止各种拆分技术中最快速的手性拆分结果[3]。单通道芯片电泳手性拆分的不足之处在于每次分析后需要清洗芯片通道，清洗不充分则会对随后的分离分析产生影响，充分清洗又往往耗时。另一种发展高通量手性分析的方式是增加单次分析的样品量，即多通道平行分析[5]。这种方式增加了芯片尺寸，但批处理的操作模式有效节省了各步骤的时间；通道之间也可避免交叉污染。

多通道芯片电泳的制作、控制和检测较单通道芯片而言有较大差别和难度，目前世界范围内只有在少数几个研究组从事这方面的研究，且多以核酸为研究对象，如分析 DNA 限制性酶切片段，PCR 产物和基因分型等[6-9]。作者所在实验室设计搭建了一台阵列微流控芯片分析仪，内置六路高压控制

系统和激光诱导荧光检测系统，激发波长为 473 nm，为进行多通道芯片电泳手性拆分创造了条件。

本节工作是以第一章单通道芯片电泳手性拆分结果为基础，设计并制作双通道电泳芯片和公用缓冲液池的四通道电泳芯片，并将其用于手性药物对映体的拆分，证明多通道芯片电泳手性拆分的可行性。

3.1.2 实验部分

3.1.2.1 试剂

碱性手性药物(Baclofen, norfenefrine and tocainide)由德国 Tuebingen 大学提供。荧光素异硫氰酸酯(FITC)购自 Amresco (Solon, Ohio), 中性环糊精 α -CD, β -CD, γ -CD, HP- α -CD, HP- β -CD, HP- γ -CD, DM- β -CD 购自 Wacker Chemie(Munich, Germany), 其它试剂均为分析纯。溶液使用前经 0.22 μm 的滤膜(新亚净化器件厂, 上海)过滤。

3.1.2.2 芯片和仪器

实验所用微流控芯片为实验室自制多通道玻璃芯片，芯片制作采用标准的光刻蚀和湿法刻蚀技术[11]。芯片结构见图 3-1, (a) 为双通道芯片，该芯片含有两个彼此独立的十字交叉型电泳通道，进样通道 10 mm 长，分离通道 59 mm 长，所有通道均为 60 μm 宽；(b)为四通道芯片，四个分离通道均为 40 μm 宽，50 mm 长，分离通道共用一个缓冲液池和一个缓冲液废液池，每个通道连有一个独立的 40 μm 宽，3 mm 长的进样通道。

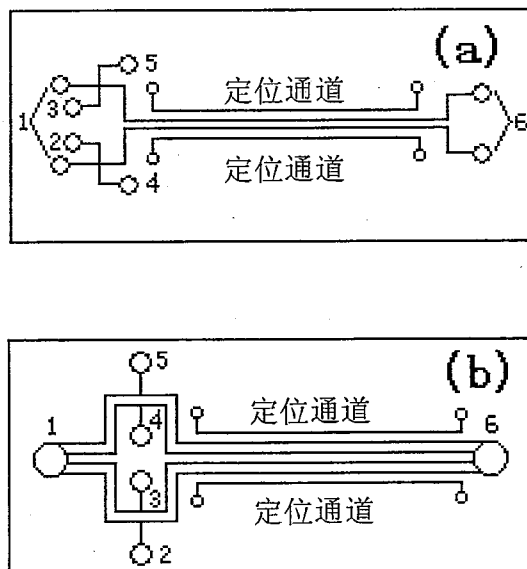


图 3-1 多通道玻璃芯片结构示意图。1, 缓冲液池, 2, 3, 4, 5, 样品池或样品废液池, 6, 缓冲液废液池。

Fig. 3-1 Layout of the multi-channel glass microchip. 1, buffer reservoir, 2, 3, 4, 5, sample reservoir or sample waste reservoir, 6, buffer waste reservoir.

实验所用芯片分析仪为实验室自制激光诱导荧光微流控芯片阵列分析仪, 仪器装置图见图 3-2[10]。高压电路由六路独立输出的高压模块组成 (EMCO, Sutter Creek, CA, USA), 输出电压经 D/A 输出由计算机控制。由空气制冷半导体泵浦固体激光器 (473 nm, 20 mW, 榜首科技, 北京) 发出的激光束, 通过凹面镜和棱镜等一系列光学元件聚焦成一条线 (4 mm 长, 50 μm 宽), 该激光线相对芯片垂直面成 30° 角入射, 并经 470 nm 带通滤光片滤去低于该波长的光。荧光信号经 520 nm 带通滤光片滤去杂散光, 最后由 12 bit CCD 摄像头 (重庆港宇高科技开发公司) 以 25 帧/秒的频率检测。

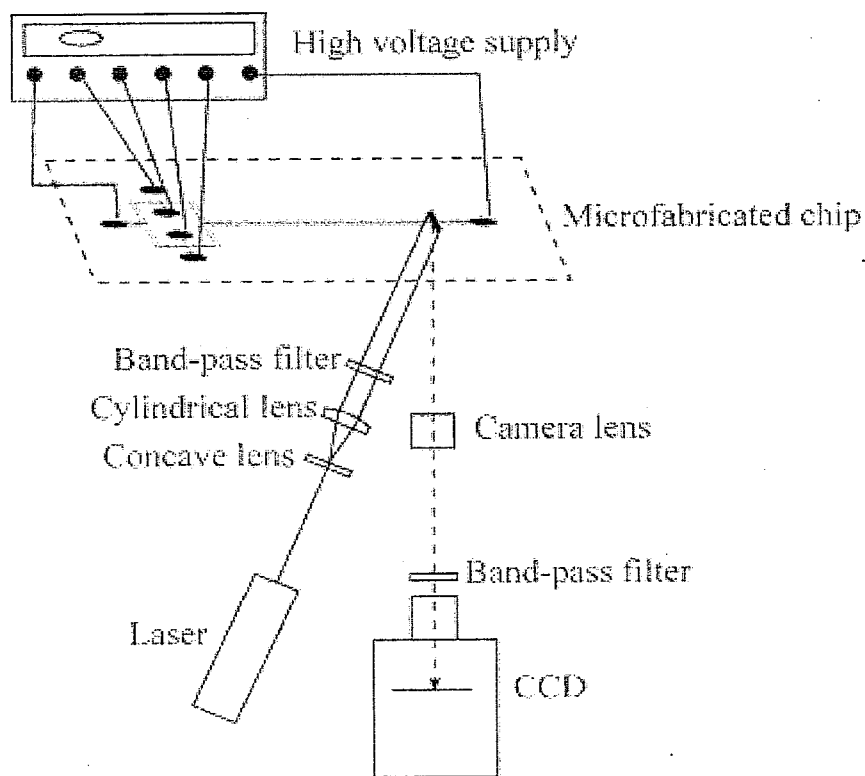


图 3-2 激光诱导荧光阵列微流控芯片分析仪光路示意图[10]

Fig. 3-2 Schematic of the optical system of microfluidic array chip analyzer

2.1.2.3 实验过程

样品衍生过程同 2.2.3。三种手性药物分别用磷酸缓冲液 (20 mM, pH 9.3) 溶解成 10 mM 的样品溶液。FITC 用丙酮溶解成 20 mM 的溶液。取 20 μ L FITC 溶液加入 80 μ L 样品溶液中, 混匀, 室温避光反应 12 h, 保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱。分析前, 经 FITC 标记后的药物溶液用磷酸缓冲液(20mM, pH 9.3)稀

释至 8×10^{-5} M 用于多通道分析。各环糊精分别用磷酸缓冲液(20 mM, pH 9.3)溶解成浓度为 10 mM 储存液, 保存于 4 °C 冰箱备用, 运行前稀释至合适的浓度。

表 3-1 双通道和四通道芯片电泳进样及分离电压分配表配表

Table 3-1 Voltages applied on the reservoirs for sample injection and

电极编号	上样电压 (V)						分离电压 (V)					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
两通道芯片	280	-	-	400	400	1000	1800	900	900	900	900	-
四通道芯片	1230	1350	1350	1350	1350	-	1920	1000	1000	1000	1000	-

separation on the two and four-channel microchips

一, 接地

芯片使用前依次用 1 M HCl 洗 30 min, H₂O 洗 10 min, 1 M NaOH 洗 30 min, H₂O 洗 10 min。运行间隔用 1 M NaOH 洗 10 min, H₂O 洗 5 min, 运行缓冲液平衡 3 min。然后向缓冲液池、样品废液池和缓冲液废液池各加 5 μ L 运行缓冲液, 样品池加 5 μ L 样品。所施加电压见表 3-1。

3.1.3 结果与讨论

3.1.3.1 双通道芯片电泳手性拆分

首先设计了双通道型芯片, 芯片结构见图 3-2 (a)。根据论文第二章的拆

分结果, 选择 baclofen 和 norfenefrine 两个手性药物以及 γ -CD 和 DM- β -CD 为模型体系, 在双通道芯片上进行了多种条件下的手性拆分考察。

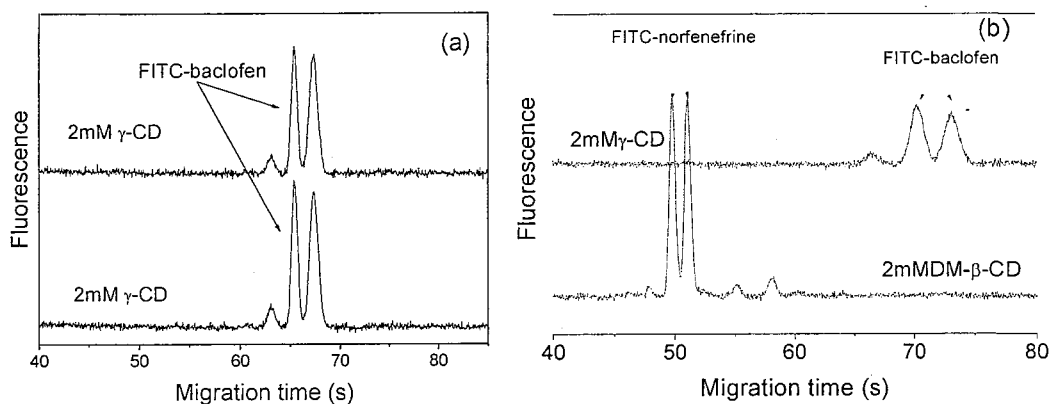


图 3-3 双通道芯片电泳手性拆分 FITC 标记 baclofen 和 norfenefrine。(a) 双通道芯片电泳同时拆分 FITC 标记的 baclofen, 2mM γ -CD 作拆分剂; (b) 双通道芯片电泳分别拆分 FITC 标记的 baclofen (2mM γ -CD 作拆分剂) 和 norfenefrine (2mM DM- β -CD 作拆分剂)。

Fig. 3-3 Chiral separations of FITC-baclofen and FITC-norfenefrine on the two-channel chip. (a) parallel analyses of FITC-baclofen by using γ -CD (2mM) as chiral selector; (b) chiral separations of FITC-baclofen and FITC-norfenefrine by using γ -CD (2mM) and DM- β -CD (2 mM) as chiral selector, respectively.

实验结果如图 3-3 所示。其中图 3-3 (a) 显示了 FITC-baclofen 对映体在相同条件下的分离情况。可以看到 FITC-baclofen 对映体在两个通道中的分离结果是基本一致的, 尽管出峰时间略有偏差。出峰时间的偏差可能主要由于钻储液池孔时的微小偏差导致分离通道的长度有微小差异, 从而引起出峰时间的偏差。改进诸如打孔等芯片制作工艺, 这种偏差是可以减小的。该图表

明我们建立的阵列式芯片分析系统和双通道芯片设计用于手性分离分析的可行性。图 3-3 (b) 展示了不同样品在不同条件下的拆分情况。从图 3-3 中可以看到,除了因检测点位置的选择不同导致出峰时间变化以外,双通道上的拆分结果和单通道上基本一致。所以在双通道芯片上进行手性选择剂的筛选和条件优化,不仅电泳时间成倍减少,而且两个通道可以同时清洗,大大缩短了电泳间隔的时间,使手性分析的总时间大幅减少。此外,双通道分析显示的结果更为直观,不同手性选择剂或不同条件的分离结果可以直接比较。这一点对于分析那些易受环境影响或不稳定的样品或试剂更为有利。以上结果证实了在多通道上实现手性分析的可行性,更高的通量只需要设计更多的通道以及更加合理的使用电极。

3.1.3.2 公用缓冲液池四通道芯片电泳手性拆分

对于多个样品以及多种手性选择剂的体系,两种途径可以提高分析速度:一次使用多种手性拆分剂对一个手性样品进行拆分,从中选择合适的拆分剂;或者一次使用同一种手性选择剂对多个样品进行拆分,选择与拆分剂匹配的手性样品。我们根据后一种思想设计了如图 3-2 (b) 所示的四通道芯片,并在此芯片上完成了在同一条件下对四个样品的同时分析。由于只有三个手性药物,所以以荧光染料 FITC 作为第四个样品,在对三个药物进行手性拆分的同时对 FITC 进行电泳。实验结果见图 3-4。在 γ -CD 作为手性拆分剂的条件下,三个手性药物中,只有 FITC 标记的 baclofen 对映体能够被拆分,这与在单通道上得到的实验结果一致。这一结果也进一步验证了多通道微流控芯片用于手性拆分的可行性。该芯片不仅可以同时测定多个样品,清洗起来也很方便,使用泵清洗时只需一个接口即可对四个通道同时清洗。如果电泳通道制作成 $40\ \mu\text{m}$ 宽,通道间隔 $20\ \mu\text{m}$ 时,4 mm 的激光可以覆盖 60 根通道,在区带电泳的操作模式下,单次运行时间只需几十秒,其理论日分析通量可

达上万次。目前这种芯片设计的不足之处在于进样通道很短，因打孔造成的液池边缘缺陷影响进样通道的实际长度，进而影响场强的分布，使电渗驱动的进样量不易控制。

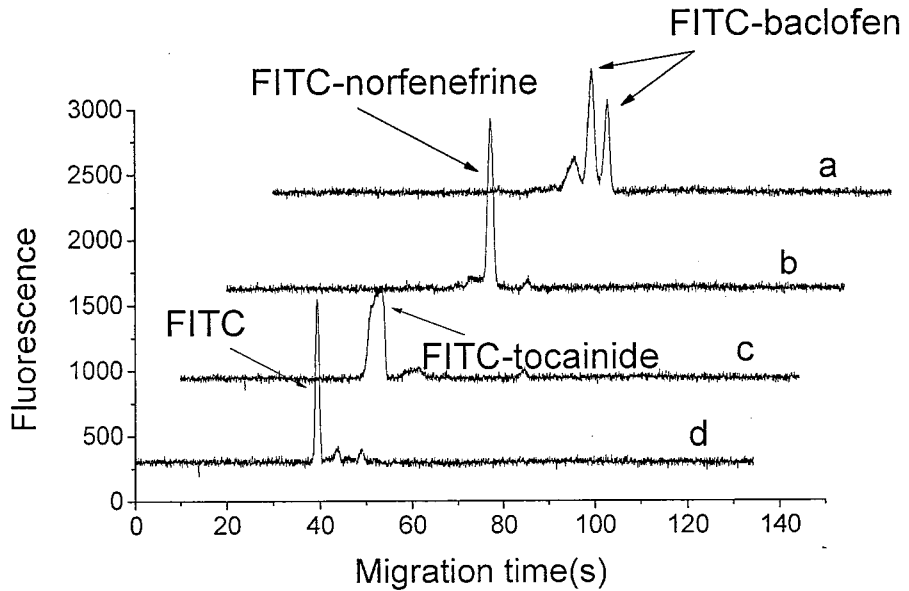


图 3-4 四通道芯片电泳手性拆分(a) FITC 标记的 baclofen, (b) FITC 标记的 norfenefrine, (c) FITC 标记的 tocainide, 及(d)区带电泳 FITC 电泳谱图。电泳条件, 20 mM 磷酸缓冲液, pH 9.3, 2 mM γ -CD 作拆分剂。

Fig. 3-4 Electropherogram of chiral separations of (a) FITC-baclofen, (b) FITC-norfenefrine, (c) FITC-tocainide and electrophoresis of (d) FITC on the four-channel chip using 20 mM phosphate buffer containing 2 mM γ -CD pH 9.3.

此外，我们所建立的手性分析平台成本低廉，易于操作。已报道的阵列

式芯片主要用于 DNA 分析，以 Mathies 小组的工作最为突出[6, 12]。他们通常采用两种方式实现阵列式芯片上的激光诱导荧光检测：一种方式是将激光和采集器同步绕轴旋转，依次扫描每一条通道；另一种是将芯片固定于一个迁移平台，来回往复移动迁移平台，使通道依次通过检测点。这两种方式均需要较为复杂的实验装置。而我们所用的阵列式芯片分析平台，无论芯片还是激光都不需要移动，因此操作起来更为方便，也更为经济。

3.1.4 结论

本节工作完成了双通道和四通道微流控芯片上的手性分离。在双通道芯片上完成了对同一样品在相同条件下的同时拆分及两个手性药物在不同条件下的同时拆分。并且考察了公用缓冲液池的四通道电泳芯片用于手性拆分的可行性，结果与单通道的分析结果一致。这些实验结果表明，多通道微流控芯片电泳用于手性分离分析快速、便利、通量高，有可能成为制药工业中高通量手性分析工具。

3.2 独立缓冲液池四通道芯片电泳手性拆分

3.2.1 引言

众所周知,对映体性质具有高度相似性,对其的拆分是一项富有挑战性的工作。经过多年努力,研究工作者们已经发现并总结了一些关于拆分对映体的规律和经验[13, 14],但拆分机理尚未得到完全认识,而且影响拆分的因素众多,在具体实验和实际工作中,对映体的拆分在参照前人经验的基础上往往仍需进行大量的实验以筛选合适的拆分剂或拆分条件。就毛细管电泳而言,需要考察包括拆分剂的种类和浓度、缓冲液的 pH 值、添加剂、电场强度、温度等在内的多个条件。因此发展高通量的电泳平台以提高筛选效率很有必要。阵列毛细管电泳曾被用于拆分和分析不对称反应产物,用以筛选高效的催化剂[15]。

微流控芯片作为一项新兴技术,具有操作单元规模集成、灵活组合的优势,受到生物、化学、医学、物理等多学科的关注。多通道电泳单元在一定程度上可以看做相同操作单元的集成,利用成熟的精细加工技术可以达到很高的通量,并已经用于核酸分析。在论文 3.1 中,作者首次将四通道芯片电泳用于手性拆分,考察了在同一拆分条件下对不同对象的拆分。

本节中,作者设计制作了具有独立缓冲液池的四通道电泳芯片,缓冲液池的独立增加了运行条件如缓冲液、拆分剂和添加剂等的选择性。此处将其用于条件优化和拆分剂的筛选。由于采用了旁路辅助静压力进样模式,四个独立的电泳过程仅需要两路高压和五个电极即可控制。针对 FITC 标记的手性药物 baclofen 和 norfenefrine 为对象的模型体系,八种中性 CD 或 CD 衍生物拆分剂的筛选在 2 min 内即可完成。

3.2.2 实验部分

3.2.2.1 试剂

手性药物 baclofen, norfenefrine 由德国吐宾根大学赠送。荧光染料 fluorescein isothiocyanate(FITC)购自 Amresco (Solon, OH, USA), 中性环糊精 α -CD, β -CD, γ -CD, hydroxypropyl- α -CD (HP- α -CD), hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD), dimethyl- β -CD₍₁₎(DM- β -CD₍₁₎)和 hydroxypropyl- γ -CD (HP- γ -CD) 购自 Wacker Chemie(Munich, Germany)。Dimethyl- β -CD₍₂₎ 购自 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)。Dimethyl- β -CD₍₁₎和 dimethyl- β -CD₍₂₎具有不同取代度。四硼酸钠购自开源化学试剂厂, Tris 购自辽宁沈阳生物公司。丙酮购自天津恒兴化学试剂公司。所有试剂均为分析纯。

3.2.2.2 芯片和仪器

实验所用芯片为实验室自制玻璃芯片, 制作过程采用标准光刻和化学蚀刻技术[16]。芯片实物图及局部结构放大示意图见图 3-5。从图 3-5 (A) 可以看出, 芯片由四组相对独立的进样单元和分离单元组成。四组通道公用一个缓冲液废液池。在分离单元的外侧各有一根参比通道, 其中灌满荧光染料, 用于确定检测点的位置。图 3-5 (B) 为芯片局部放大示意图, 从中可以看出, 分离通道的旁边增加了一根平行的通道作为控制通道。分离通道、控制通道和进样通道形成双“十”字交叉结构, 以适应旁路辅助的静压力进样模式。所有通道约为 15 μm 深, 50 μm 宽。分离通道与控制通道的间隔约为 30 μm 宽。分离通道长为 3 或 6.5 cm。

实验所用检测器为实验室自制激光诱导荧光微流控芯片阵列分析仪, 同 3.1.2.2。

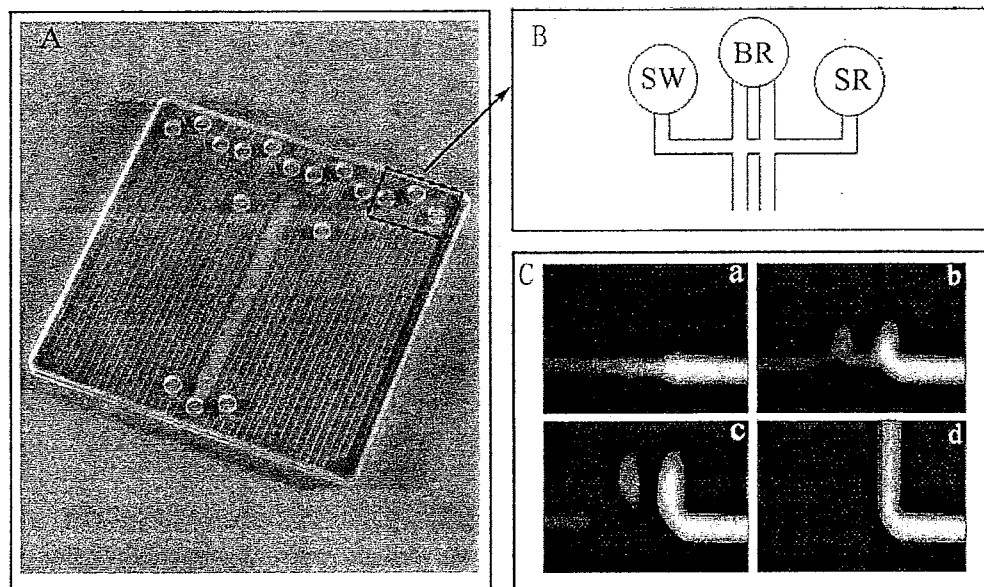


图 3-5 旁路辅助进样四通道电泳芯片。(A) 四通道电泳芯片实物图；(B) 局部结构放大示意图；(C) 旁路辅助静压力进样过程荧光照片

Fig. 3-5 Four-channel electrophoresis chip with double-cross hydrostatic pressure sample injection. (A) Photograph of the four-channel electrophoresis chip used in this work, (B) schematic of the enlarged partial channel structure, (C) fluorescence images of double-cross sample injection

2.2.2.3 实验过程

20 mM 荧光染料 FITC 先用 DMSO 溶解, 再用丙酮稀释至浓度为 20 mM, 保存于 -20°C , 除特殊注明, 作为电泳样品使用前经 Tris-HCl 缓冲液 (10 mM pH 9.2) 稀释至 5×10^{-5} M。

手性药物荧光标记过程如下[17]: 手性药物 baclofen 和 norfenefrine 分别

用硼砂缓冲液 (20 mM, pH 9.2)溶解, 形成浓度为 10 mM 的储存液。将 80 μL 20 mM FITC 溶液分别加入 160 μL 手性药物储存液。混合均匀后室温避光放置约 12 h 后, 保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。使用前, 用 Tris-HCl 缓冲液(10 mM, pH 9.2)稀释至 6.7×10^{-5} M。缓冲液使用前均经 0.22 μm 滤膜过滤。

芯片使用前, 通道首先通过真空泵依次经 1 M NaOH、 H_2O 、1 M HCl 和 H_2O 各清洗 30 min。各次电泳运行间, 通道经 1 M NaOH 洗 10 min, H_2O 洗 5 min, 运行缓冲液平衡 3 min。平衡完成后, 用真空泵吸出各储液池中的溶液, 再分别向各缓冲液池和缓冲液废液池加入 10 μL 运行缓冲液, 然后向样品池中加入 7 μL 样品溶液。向样品废液池施加瞬间真空之后, 放置芯片于检测器上, 稳定 20 s 后, 在各缓冲液池和缓冲液废液池间施加 630 V/cm 电压 (FITC 作样品) 或 490 V/cm 电压 (FITC 标记的手性药物作样品)。检测点位置在距双“十”字处 20 mm (FITC 为样品)或 53 mm (FITC 标记的手性药物为样品)。

旁路辅助静压力进样原理见文献[18], 进样过程见图 3-5 (C)。即运行前, 缓冲液池, 缓冲液废液池里加入运行缓冲液, 样品池中加入样品溶液, 而样品废液池空置。在静压力的驱动下, 样品由样品池流经“双十”字处并流向样品废液池, 缓冲液池和缓冲液废液池中的运行缓冲液也流向样品废液池, 形成图 3-5 (C) -a 中所示的夹流进样。当向缓冲液池和缓冲液废液池施加电压后, 一段样品区带被电渗流带入分离通道, 见图 3-5 (C) -b, 而样品池和“双十”通道间被电渗流推动的持续样品流则在随着电渗流进入控制通道, 如图 3-5 (C) -c 和 3-5 (C) -d 所示。因而避免了单根分离通道采用静压力进样时出现的样品泄漏和基线升高问题。此处, 我们采用了一根主电极下分四根并联电极的模式, 通过一路高压控制四个缓冲液池的电压。这样, 对四组独立电泳单元的电泳过程的控制仅需两路高压, 五根电极。

3.2.3 结果与讨论

3.2.3.1 独立式四通道芯片电泳平台性能考察

在进行手性拆分剂筛选前，首先以荧光染料 FITC 为样品评估了此四通道芯片电泳平台的性能。首先以同一 FITC 溶液为样品，考察了同一块芯片上四组通道之间的重复性。四组通道的电泳结果见图 3-6 (A)，FITC 迁移时间和峰高的相对标准偏差分别为 0.96%和 4.58%。多次运行间的重复性通过四次重复操作进行考察，各次电泳间隔，芯片经 NaOH 和 H₂O 清洗以及运行缓冲液平衡，并重新调整激光聚焦。四次电泳结果见图 3-6 (B)，FITC 迁移时间和峰高的相对标准偏差分别为 3.91%和 4.39%。以上结果表明此多通道芯片电泳系统具有较好的重现性，具有在其上开展手性拆分剂筛选的可行性。

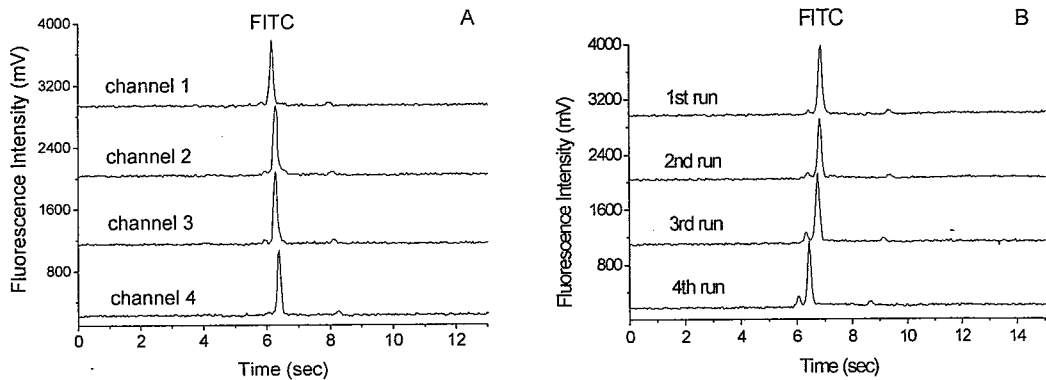


图 3-6 多通道芯片电泳平台性能评估。(A) 四个平行通道之间的重复性，同一 FITC 样品在相同条件下进行区带电泳；(B) 同一通道连续四同次运行

间的重复性, 各次运行间, 通道经清洗和平衡, 激光聚焦经重新调整。样品, FITC, 5×10^{-5} M; 运行缓冲液, Tris-HCl 缓冲液 (10 mM, pH 9.2); 分离长度, 3 cm; 电压, 630 V/cm。

Fig. 3-6 Validation of the performance of the multiple channel microchip electrophoresis platform

3.2.3.2 拆分条件考察

本节所设计的独立缓冲液池四通道电泳芯片的一个优点在于, 四个电泳单元彼此相对独立, 因此可以进行四个条件的同时考察, 用于拆分条件的快速优化。这里, 作者利用此芯片对三个影响手性拆分的重要因素进行了考察, 包括分离通道的宽度, 运行缓冲液的 pH 值和手性拆分剂的浓度。以 FITC 标记的 norfenefrine, DM- β -CD 作为优化过程的模型对象。

首先对分离通道的宽度进行了优化。根据经验, 分离通道的宽度对分离效率具有重要影响。此处, 在一块芯片上刻蚀了具有不同宽度的分离通道 (100、80、60 和 50 μm), 因此在一次电泳运行过程中即可对这四种宽度进行考察。如图 3-7 (A) 所示, 拆分剂 DM- β -CD 拆分 FITC 标记的 norfenefrine 对映体的结果表明, 随着分离通道宽度由 50 μm 增加至 100 μm , 对映体分离度 R_s 从 1.6 下降至 1.0。因此, 以下实验中均采用 50 μm 宽的分离通道。

接着对运行缓冲液的 pH 进行了优化。运行缓冲液的 pH 不仅影响手性分子和拆分剂所带电荷, 也影响电渗流的大小。特别是对于一些尚不知道 pK 值的化合物, pH 的优化对对映体的拆分大有裨益。在本试验中, pH 在 7.5—9.2 的范围内进行了考察。利用四通道芯片, 一次电泳运行中四个 pH 得到同时考察。如图 3-7 (B) 所示, 在当前的运行条件下, pH 对对映体拆分的影

响很小。在所考察的四个 pH 条件下, FITC 标记的 norfenefrine 对映体均能得到基线分离。从图中亦可看出, pH 主要影响荧光信号的强度和迁移时间, pH 越高, 迁移时间越短, 荧光信号越强。因此, 以下实验均采用 pH 9.2 的 Tris-HCl 缓冲液作为运行缓冲液。

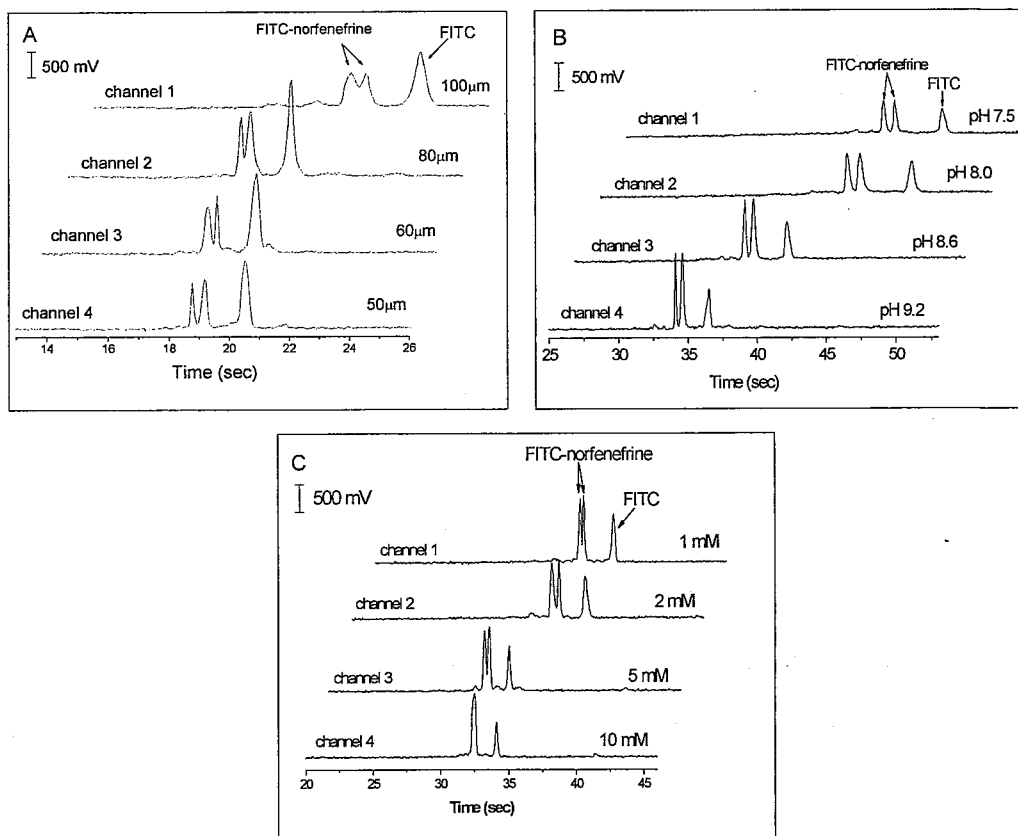


图 3-7 拆分剂筛选实验条件考察。(A) 分离通道宽度对拆分 FITC 标记的 norfenefrine 的影响;(B)运行缓冲液 pH 值对拆分 FITC 标记的 norfenefrine 的影响;(C) 手性拆分剂浓度对拆分 FITC 标记的 norfenefrine 的影响。样品, 6.7×10^{-5} M FITC 标记的 norfenefrine; 运行缓冲液, 10 mM Tris-HCl, pH 9.2

含 2 mM DM- β -CD; 分离长度, 6.5 cm; 电压, 490 V/cm。

Fig. 3-7 Optimization of experimental conditions for the screening of chiral selectors. (A) Effects of dimension of channel on the separation of FITC-norfenefrine enantiomers. (B) Effects of pH value of running buffer on the separation of FITC-norfenefrine enantiomers. (C) Effects of concentration of chiral selector on the separation of FITC-norfenefrine enantiomers. Sample, 6.7×10^{-5} M FITC labeled norfenefrine; running buffer, 10 mM Tris-HCl containing 2 mM DM- β -CD(1), pH 9.2; separation length, 6.5 cm; voltage, 490V/cm.

最后对手性拆分剂的浓度进行了优化。手性拆分过程主要通过拆分剂与对映体分子之间的包合作用实现, 实践表明, 并不是拆分剂的浓度越高包合作用及手性识别越好, 拆分剂的浓度往往存在一最佳值。这里, 我们考察了拆分剂 DM- β -CD 浓度从 1—10mM 之间四个浓度对拆分的影响。如图 3-7 (C) 所示, DM- β -CD 浓度为 2 mM 时拆分效果最好。随着拆分剂浓度的增加, 对映体的分离度显著下降。尤其当拆分剂 DM- β -CD 浓度增加到 10 mM 时, FITC 标记的 norfenefrine 对映体完全重合。

基于以上结果, 确定以 Tris-HCl 缓冲液(10mM, pH 9.2), 拆分剂浓度为 2mM, 宽 50 μ m 的芯片进行拆分剂筛选。所取得的结果与利用单通道芯片电泳进行条件考察的结果一致, 但利用四通道芯片电泳一次运行即可考察四个条件, 分析速度明显加快。

3.2.3.3 独立缓冲液池四通道芯片电泳筛选拆分剂

众所周知, 环糊精具有多个手性中心, 可以在不同位点上与对映体发生

相互作用，形成暂时的不同空间构型的包合物。除了天然环糊精，许多带有不同取代基的环糊精衍生物被合成出来，用作手性拆分剂。环糊精及其衍生物已经在毛细管电泳和芯片电泳手性拆分中得到广泛应用[5, 19]。本节中，八种中性环糊精或环糊精衍生物作为手性拆分剂，针对两种手性药物对映体的拆分性能进行筛选。中性环糊精不带电荷，不影响运行缓冲液的离子强度。根据所设计的四通道芯片结构，每次筛选四种拆分剂。

手性药物 *norfenefrine* 是一种刺激 α -肾上腺素活性的交感神经类化合物，用作治疗低血压的药物[20]。八种中性环糊精或环糊精衍生物针对荧光染料 FITC 标记的 *norfenefrine* 对映体的拆分性能的筛选结果见图 3-8 (A-B)。八种环糊精类拆分剂中，DM- β -CD₍₁₎、DM- β -CD₍₂₎和 HP- β -CD 三种拆分剂表现出旋光选择性（对映选择性）。其中 DM- β -CD₍₁₎对 FITC 标记的 *norfenefrine* 对映体的拆分性能最好，能将对映体基线分离，见图 3-8 (A)；而另外两种拆分剂只能将其部分分开，见图 3-8 (B)。

手性药物 *baclofen* 是一种肌肉松弛剂和抗痉挛剂，用于治疗多种因神经麻痹或脑损伤引起的肌肉硬化或痉挛[21]。八种中性环糊精或其衍生物针对 FITC 标记的 *baclofen* 对映体的拆分性能的筛选结果见图 3-8 (C-D)。三种拆分剂 DM- β -CD₍₁₎、HP- α -CD 和 DM- β -CD₍₂₎表现出 FITC 标记的 *baclofen* 对映体的旋光选择性。其中，DM- β -CD₍₁₎只能将 FITC 标记的 *baclofen* 对映体部分分离，而 HP- α -CD 和 DM- β -CD₍₂₎则可以将 FITC 标记的 *baclofen* 对映体基线分离。

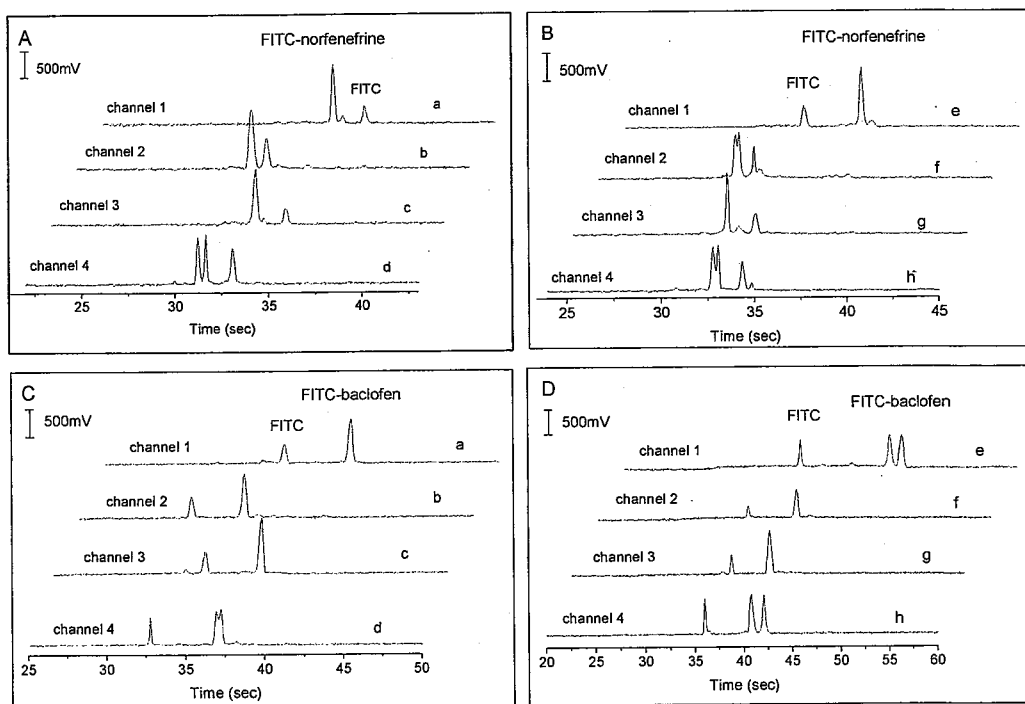


图 3-8 手性拆分剂筛选。(A-B) 手性拆分剂拆分 FITC 标记的 norfenefrine 对映体性能筛选；(C-D) 手性拆分剂拆分 FITC 标记的 baclofen 对映体性能筛选。环糊精及其衍生物分别溶解在运行缓冲液中，并稀释至 2 mM，每种拆分剂对应芯片上的一组电泳单元，公用缓冲液废液池内加不含拆分剂的缓冲液，同时施加电压进行芯片电泳手性拆分。各通道所对应的拆分剂为 (a) α -CD，(b) β -CD，(c) γ -CD，(d) DM- β -CD₍₁₎，(e) HP- α -CD，(f) HP- β -CD，(g) HP- γ -CD 和 (h) DM- β -CD₍₂₎。其它条件同图 3-7。

Fig. 3-8 Screening of chiral selectors. (A-B) Chiral selector screening towards FITC labeled norfenefrine. (C-D) Chiral selector screening towards FITC labeled baclofen. CDs or CD derivatives were respectively dissolved in the running buffer and the final concentration was 2 mM. Each CD or CD derivative

solution was added to one channel on the multi-channel microchip, and chiral separations were performed at same time. Each chiral selector used in the corresponding channel was indicated by the lowercase including a) α -CD, b) β -CD, c) γ -CD, d) DM- β -CD₍₁₎, e) HP- α -CD, f) HP- β -CD g) HP- γ -CD and h) DM- β -CD₍₂₎. Other experimental conditions were the same as in Fig. 3-8.

对于上述筛选过程, 八种拆分剂可经两次电泳过程在不到 2 min 内完成。以上结果表明, 多通道平行分析可明显提高芯片电泳分析速度, 并且芯片电泳用作手性拆分剂筛选操作简单, 只需将拆分剂添加到运行缓冲液中即可。文献报道的 HPLC 法则需要制备固定相[22], 微孔板法在孔板内孵育完成后还需要后续的如毛细管电泳分析[23]。在此芯片平台上进行手性拆分剂的筛选仅需消耗微升级毫摩尔浓度的拆分剂。此外, 采用旁路辅助静压力进样, 使电进样需要的 $(2N+1)$ 个电极(N , 分离通道数目)减少至 $(N+1)$ 个[12]。如此设计有效简化了实验操作, 并降低了仪器成本。具有开发成为简单、快速和经济的高通量手性拆分剂筛选平台的潜力。

3.2.4 结论

本节工作, 将具有独立缓冲液池的四通道芯片电泳平台应用于手性拆分剂筛选。旁路辅助静压力进样的采用降低了芯片电泳所需控制电极的数量。在 2 min 内即可完成所考察的八种环糊精或环糊精衍生物拆分剂的筛选, 其中 DM- β -CD₍₁₎和 HP- α -CD 分别可以基线分离 FITC 标记的 norfenefrine 对映体和 FITC 标记的 baclofen 对映体。本节工作所建立的多通道芯片电泳平台操作简单、消耗少、速度快, 有望成为高通量手性拆分剂筛选平台。

3.3 本章小结

3.3.1 公用和独立缓冲液池四通道芯片电泳手性拆分比较

如前所述,对于多个样品以及多个手性选择剂的体系,两种途径可以提高分析速度:一次使用多个手性拆分剂对一个手性样品进行拆分,从中选择合适的拆分剂;或者一次使用同一种手性拆分剂对多个样品进行拆分,选择与拆分剂匹配的手性样品。本章设计了公用缓冲液池和独立缓冲液池两种四通道电泳芯片,可分别实现上述两种提高手性拆分速度的方式。

公用缓冲液池四通道电泳芯片结构相对简单,芯片尺寸小,因缓冲液液池和缓冲液废液池均公用,所以拆分剂用量很少,电泳过程操作也相对简单,在有限空间内的平行电泳单元集成度高。但是,这种四通道芯片电泳因缓冲液池公用,所以只能一次考察一种拆分剂或一种拆分条件,适合拆分剂种类少,手性化合物样品多的情形。

独立缓冲液池四通道电泳芯片结构相对复杂,所以占用空间尺寸较大,缓冲液池较多,对其操作时需格外小心,以避免溶液相互污染。但这种具有独立电泳单元结构的四通道芯片可以改变各个电泳单元的拆分条件,如拆分剂、手性化合物样品、缓冲液浓度等,如使用独立电极进行电泳控制,还可以同时改变操作电压,灵活度较高。

简言之,上述两种四通道电泳芯片对手性拆分而言互为补充,二者均在一定程度上体现了多通道手性拆分的优势。

3.3.2 多通道芯片电泳作为高通量手性拆分平台的发展前景

本章所开展的公用缓冲液池和独立缓冲液池四通道芯片电泳手性拆分验证了多通道芯片电泳手性拆分的可行性,并体现出多通道平行拆分省时省力

的优点。当然，目前的芯片设计尚有待改进以进一步提高分析通量。随着通量的不断提高，加之微流控芯片微量的试剂消耗，灵活的结构设计，多通道微流控芯片电泳平台有可能成为组合化学手性合成中筛选催化剂和对映体分析的理想平台。

参考文献

- [1] Rodriguez I, Jin L J, Li S F Y. High-speed chiral separations on microchip electrophoresis devices. *Electrophoresis*, 2000, 21(1): 211-219
- [2] Ro K W, Hahn J H. Precolumn diastereomerization and micellar electrokinetic chromatography on a plastic microchip: Rapid chiral analysis of amino acids. *Electrophoresis*, 2005, 26(24): 4767-4773
- [3] Piehl N, Ludwig M, Belder D. Subsecond chiral separations on a microchip. *Electrophoresis*, 2004, 25(21-22): 3848-3852
- [4] Ludwig M, Kohler F, Belder D. High-speed chiral separations on a microchip with UV detection. *Electrophoresis*, 2003, 24(18): 3233-3238
- [5] Belder D, Ludwig M. Microchip electrophoresis for chiral separations. *Electrophoresis*, 2003, 24(15): 2422-2430
- [6] Woolley A T, Sensabaugh G F, Mathies R A. High-speed DNA genotyping using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(11): 2181-2186
- [7] Simpson P C, Roach D, Woolley A T, Thorsen T, Johnston R, Sensabaugh G F, Mathies R A. High-throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998,

- 95(5): 2256-2261
- [8] Emrich C A, Tian H J, Medintz I L, Mathies R A. Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(19): 5076-5083
- [9] Aborn J H, El-Difrawy S A, Novotny M, Gismondi E A, Lam R, Matsudaira P, McKenna B K, O'Neil T, Streechon P, Ehrlich D J. A 768-lane microfabricated system for high-throughput DNA sequencing. *Lab on a Chip*, 2005, 5(6): 669-674
- [10] Liu X J, Liu X, Liang A Y, Shen Z, Zhang Y, Dai Z P, Xiong B H, Lin B C. Studying protein-drug interaction by microfluidic chip affinity capillary electrophoresis with indirect laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 2006, 27(15): 3125-3128
- [11] Woolley A T, Mathies R A. Ultra-High-Speed DNA Fragment Separations Using Microfabricated Capillary Array Electrophoresis Chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(24): 11348-11352
- [12] Shi Y N, Simpson P C, Scherer J R, Wexler D, Skibola C, Smith M T, Mathies R A. Radial capillary array electrophoresis microplate and scanner for high-performance nucleic acid analysis. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(23): 5354-5361
- [13] Ali I, Kumerer K, Aboul-Enein H Y. Mechanistic principles in chiral separations using liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 2006, 63(7-8): 295-307
- [14] Chankvetadze B, Burjanadze N, Pintore G, Bergenthal D, Bergander K,

- Muhlenbrock C, Breitzkreuz J, Blaschke G. Separation of brompheniramine enantiomers by capillary electrophoresis and study of chiral recognition mechanisms of cyclodextrins using NMR-spectroscopy, UV spectrometry, electrospray ionization mass spectrometry and X-ray crystallography. *Journal of Chromatography A*, 2000, 875(1-2): 471-484
- [15] Reetz M T, Kuhling K M, Deege A, Hinrichs H, Belder D. Super-high-throughput screening of enantioselective catalysts by using capillary array electrophoresis. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2000, 39(21): 3891-3893
- [16] Zhou Z M, Liu D Y, Zhong R T, Dai Z P, Wu D P, Wang H, Du Y G, Xia Z N, Zhang L P, Mei X D, Lin B C. Determination of SARS-coronavirus by a microfluidic chip system. *Electrophoresis*, 2004, 25(17): 3032-3039
- [17] Hutt L D, Glavin D P, Bada J L, Mathies R A. Microfabricated capillary electrophoresis amino acid chirality analyzer for extraterrestrial exploration. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(18): 4000-4006
- [18] Luo Y, Wu D P, Zeng S J, Gai H W, Long Z C, Shen Z, Dai Z P, Qin J H, Lin B C. Double-cross hydrostatic pressure sample injection for chip CE: Variable sample plug volume and minimum number of electrodes. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(17): 6074-6080
- [19] Vespalec R, Bocek P. Chiral separations in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 1999, 20(13): 2579-2591
- [20] Klosa W, Wilhelm C, Schillinger H, Hillemanns H G. Treatment of Hypotension in Pregnancy with Norfenefrinehydrochloride Specially under Monitoring the Fetal Circulation - Preliminary-Results. *Zeitschrift Fur Geburtshilfe Und Perinatologie*, 1992, 196(1): 21-25

- [21] Goda R, Murayama N, Fujimaki Y, Sudo K. Simple and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of the S(+)- and R(-)-enantiomers of baclofen in human plasma and cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2004, 801(2): 257-264
- [22] Ravelet C, Peyrin E. Recent developments in the HPLC enantiomeric separation using chiral selectors identified by a combinatorial strategy. *Journal of Separation Science*, 2006, 29(10): 1322-1331
- [23] Chen Z, Yang Y H, Werner S, Wipf P, Weber S G. A screening method for chiral selectors that does not require covalent attachment. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(7): 2208-2209

第四章 微流控芯片固定化酯酶催化选择性水解消旋酯研究

酶法拆分是获得光学纯化合物的有效方法之一，其中酶催化选择性水解消旋体被广泛使用。本章于微流控芯片平台上构建了固定化酯酶反应器，并将其用于消旋醋酸 α -苯乙酯(α -methylbenzyl acetate)的选择性水解。酯酶通过戊二醛固定在经过硅烷化的玻璃通道表面。在此平台上，酯水解进行 30 min 时，产物 R-1-苯乙醇产率达 20%，ee 值达 95%。所制作的微流控芯片固定化酯酶反应器在重复使用 8 次的过程中，酯酶的活性未见明显降低。

4.1 引言

手性前体或中间体在制药工业和农业中均有较高的需求量[1-3]，开发不同的获得手性化合物的方法一直受到关注。在目前所建立的各种获得手性化合物的方法中，基于酶催化的手性合成和选择性拆分是其中非常有效的方法之一，因为酶可以在温和的条件下高效地催化反应，并具有较高的化学、区域和旋光选择性[3, 4]。通常，根据酶在反应体系中的存在形式分为游离酶催化和固定化酶催化两类。与游离酶催化相比较，固定在一些材料表面的酶更加稳定，也易于重复使用[5, 6]，是酶催化领域的研究热点。

固定化酶的研究无论在传统反应器内还是微型化的反应器内均有开展[7-12]。就我们所知，目前在微流控芯片反应器内进行固定化酶催化的不对称反应或外消旋体拆分均未见报道。微型化反应器例如微流控芯片反应器，因具有高效的传质和传热，大表面体积比的特点，已经在化学合成领域显示出其潜力[13, 14]。一方面通过累积式或阵列反应器实现精细化学品的批量生产；另一方面微流控芯片反应器微量的试剂消耗量使其在实验模拟和条件优化方面独具优势。

最近, Belder 等[15]开展了游离环氧化酶催化的旋光选择性合成, 并在线电泳检测产物邻二醇对映体的研究。Hong 等[16]在微流控芯片上利用层流效应形成中间为离子液体的三层液流, 使上样相中的假丝酵母酯酶选择性酯化 S-ibuprofen, 形成的酯进入离子液体, 接触到接收相中的猪肝酯酶后, 酯被水解还原为 S-ibuprofen。这些研究均集中在游离酶催化, 而利用微流控芯片反应器平台开展固定化酶旋光选择性水解反应尚未见报道。本章工作即是 将固定化酶与微流控芯片反应器相结合, 以 *Burkholderia cepacia* lipase 催化旋光选择性水解醋酸 α -苯乙酯生成 R-1-苯乙醇为模型 (图 4-1), 建立固定化酶反应器。

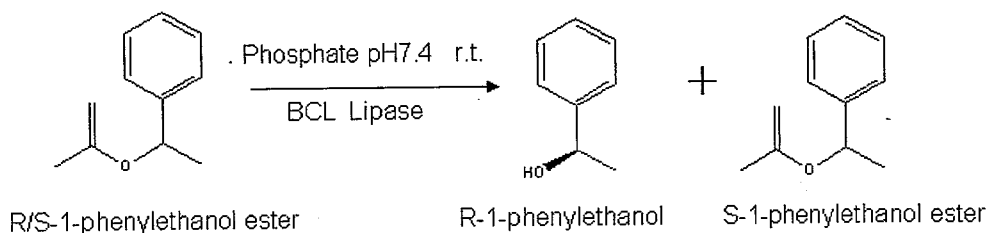


图 4-1 洋葱博克霍尔德菌酯酶催化旋光选择性水解消旋醋酸 α -苯乙酯反应示意图

Fig. 4-1 BCL catalyzed enantioselective hydrolysis of rac- α -methylbenzyl acetate

4.2 实验部分

4.2.1 试剂

洋葱博克霍尔德菌酯酶(Lipase from *Burkholderia cepacia*)(~12 units/mg),

消旋醋酸 α -苯乙酯(rac- α -methylbenzyl acetate)($\geq 98\%$)和氨丙基三甲氧基硅烷 (aminopropyltrimethoxysilane, APTS) 购自 Sigma-Aldrich (北京)。消旋 1-苯乙醇 (Rac-1-phenylethanol) ($\geq 97.0\%$) 购自 Alfa Aesar。甲醇购自山东禹王试剂厂, 乙醇购自沈阳化学试剂厂。其他试剂均为分析醇, 实验用水均为娃哈哈纯净水。

4.2.2 芯片和仪器

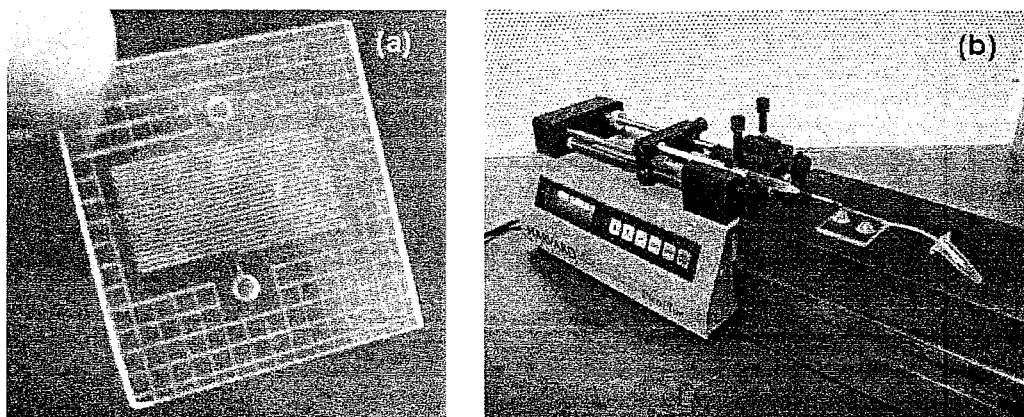


图 4-2 微流控芯片固定化酶反应器。(a) 微流控芯片; (b) 微流控芯片固定化酶反应器实验装置

Fig. 4-2 Immobilized enzyme microfluidic reactor. (a) photograph of the microfluidic chip, (b) Setup of the immobilized enzyme microfluidic reaction system

微流控芯片反应器由硼砂玻璃经标准光刻和湿法刻蚀技术制成, 制作过程见文献[17]。芯片大小为 $3\text{ cm} \times 2.5\text{ cm} \times 2.3\text{ mm}$, 如图 4-2 (a) 所示。反应通道设计为蜿蜒形单通道 (41 cm 长, $200\text{ }\mu\text{m}$ 宽, $50\text{ }\mu\text{m}$ 深)。实验所用微流控芯片反应器系统如图 4-2 (b) 所示。该系统主要包括三个组成部分, 分

别是注射泵 (Harvard Apparatus, USA), 微流控芯片反应器和收集管。微流控芯片封接完成后, 用硅橡胶和不锈钢针做成接口, 用环氧胶将接口密封。注射器和微流控芯片之间由四氟乙烯管相连。

4.2.3 酶的固定化

酯酶预处理过程如下[18]: 将 2 mg 粗酶加入 1 mL 磷酸缓冲液 (20 mM, pH 8.0) 中, 室温下轻微旋转 30 min 使其充分溶解后, 于 4 °C 离心 (20,000 转, 10 min), 弃去不溶物, 上清保存于 4 °C 待用。

酯酶经戊二醛共价固定到微流控芯片反应器通道表面[19, 20]。固定化过程如下: 首先将微流控芯片反应器通道用 2.5 M NaOH 冲洗 2.5 h, 水洗至中性后, 用甲醇充分洗涤, 抽干通道; 接着用经过干燥的甲醇配制 10% 的氨丙基三甲氧基硅烷, 持续通入通道 10 min, 密封通道两端, 室温放置约 12 h; 依次用甲醇和水充分洗涤通道。然后, 戊二醛用磷酸缓冲液 (20 mM, pH 8.0) 配置成 10% (V/V) 的溶液室温下持续通入微流控芯片反应器通道 3 h, 用磷酸缓冲液 (20 mM, pH 8.0) 充分冲洗; 最后, 将 4 °C 保存的酶溶液以 0.6 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度通入芯片通道, 持续约 24 h, 用磷酸缓冲液 (20 mM, pH 7.4) 冲洗掉未反应的酯酶, 保持通道内充满磷酸缓冲液 (20 mM, pH 7.4), 两端以硅橡胶密封, 保存于 4 °C 冰箱待用。

为了评估通道内固定的酶量, 根据 Lee 等[21] 报道的方法, 我们使用 Micro-BCA 法测量了玻璃片表面固定的酯酶量。将 1 mL 酯酶溶液 (2 mg/mL) 4 °C 离心 (20,000 转, 10 min), 弃去不溶物, 上清保存于 4 °C 待用。将 1 \times 1 cm^2 的玻璃片用 10% (V/V) 的氨丙基三甲氧基硅烷/甲醇溶液浸泡 12 h, 甲醇和水洗涤后, 浸入 10% (V/V) 的戊二醛用磷酸缓冲液 (20 mM, pH 8.0) 3 h, 磷酸缓冲液 (20 mM, pH 8.0) 洗涤后, 浸入酯酶溶液 24 h。分别吸取

25 μL 反应前和反应后的酯酶溶液于微孔板内，加入 200 μL micro-BCA 工作试剂，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，用酶标仪（Labsystems 公司，芬兰）570 nm 检测吸光度。酯酶量经 micro-BCA 试剂盒提供的 BSA 标准品绘制的标准曲线计算得到。

4.2.4 固定化酯酶催化水解反应

进行酯水解反应之前，微流控芯片反应器先经磷酸缓冲液（20 mM，pH 7.4）平衡 20 min。消旋的醋酸 α -苯乙酯先用乙醇溶解成 100 mM，再经磷酸缓冲液（20 mM，pH 7.4）稀释至 10 mM。然后将 10 mM 醋酸 α -苯乙酯溶液吸入 1 mL 注射器内并连接到微流控芯片反应器上。通过注射泵设定流速将反应物醋酸 α -苯乙酯通入微流控芯片反应器。产物收集到密闭管内。

4.2.5 游离酯酶催化水解反应

游离酯酶催化水解消旋的醋酸 α -苯乙酯与固定化酯酶水解过程酶用量一致，即酯：酶=2.34：1（mg：mg）。详细过程如下：取 200 μL 乙醇配制的 100 mM 消旋醋酸 α -苯乙酯，加入 1100 μL 磷酸缓冲液（20 mM，pH 7.4）和 700 μL 酯酶（2mg/mL），加入磁子，室温慢速搅拌 30 min 后，加入 1 mL 饱和 NaCl 终止反应。反应液经 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心（20,000 转，10min），取 500 μL 上清液用磷酸缓冲液（20 mM，pH 7.4）稀释至合适的浓度用于 HPLC 分析。

4.2.6 产物分析

反应产物由 Waters 高效液相色谱分析。

4.3 结果和讨论

4.3.1 微流控芯片固定化酯酶反应器性能考察

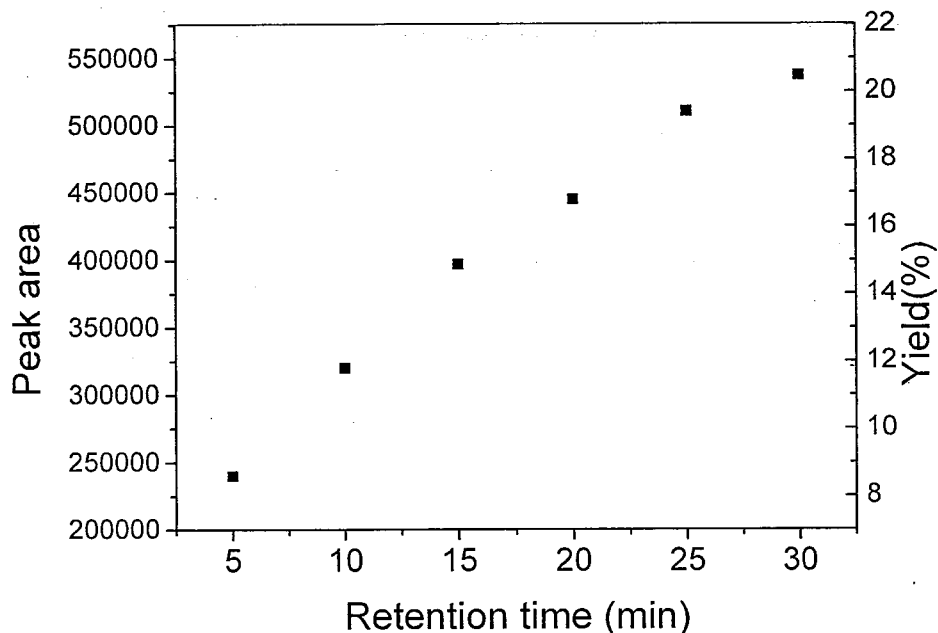


图 4-3 保留时间对水解醋酸 α -苯乙酯的影响。10 mM 消旋醋酸 α -苯乙酯用作反应底物，反应介质为 20 mM pH7.4 的磷酸缓冲液

Fig. 4-3 The effect of the retention time to the continuous hydrolysis of the rac- α -methylbenzyl acetate. 10 mM rac- α -Methylbenzyl acetate was used as a substrate in a reaction medium (20 mM phosphate buffer, pH 7.4).

为了验证该固定化酯酶微流控芯片反应器持续反应的性能，同时优化流速（即保留时间）对水解消旋醋酸 α -苯乙酯的影响，我们考察了反应物在通道内的保留时间和产物 R-1-苯乙醇产率的关系。如图 4-3 所示，即使在保

留时间仅为 5 min 时, 在产物中也能够检测到 R-1-苯乙醇。这说明我们制作的固定化酶微流控芯片反应器是有效的。图 4-3 也显示, 随着保留时间的增加, 产物 R-1-苯乙醇的产率也随之增加。

图 4-4 为保留时间为 30 min 时, 反应产物的 HPLC 分析结果。产物 1-phenylethanol 的 ee 值为 95%, 这一结果说明固定于微流控芯片通道表面的酯酶保留了较高的旋光选择性。

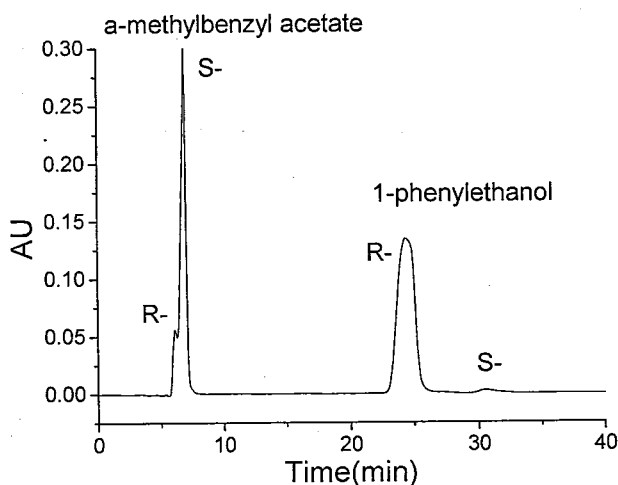


图 4-4 反应产物 HPLC 分析色谱图。色谱分析条件: 色谱柱, 250×4.6 mm I.D., 填充有纤维素三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)涂覆的手性固定相; 流动相为正己烷/异丙醇 (98/2, V/V), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 254 nm。

Fig. 4-4 Chromatogram of the enantioselective HPLC analysis of reaction mixtures. Chromatographic conditions: column, 250×4.6 mm I.D. packed with cellulose tris-(3,5-dimethylphenyl carbamate) coated chiral stationary phase; mobile phase, n-hexane/2-propanol 98/2 (v/v); flow rate, 1 mL/min; detection wavelength, 254 nm.

4.3.2 微流控芯片反应器与常规反应器

与常规反应器相比，微流控芯片反应器传质传热较快，于对反应条件如温度或 pH 更容易控制。就本章所涉及的模型反应体系，反应介质通常保持在近中性以保持酶的活性[22, 23]。由于酯水解过程中生成产物 R-1-苯乙醇的同时也产生乙酸，使反应介质的 pH 改变。为解决这一问题，保持反应介质的 pH 稳定，常规反应通常通过一个自动滴定仪实时检测反应液 pH，并根据设定的 pH 向反应液中自动滴加低浓度的 NaOH 以维持稳定的 pH[23]。使用固定化酶微流控芯片反应器进行该反应时，反应在持续流动中进行，反应产物不断地被推出反应区域，进入收集管，因此反应过程中产生的酸对反应体系影响很小。

微流控芯片反应器内通道表面固定化酯酶的量通过 micro-BCA 方法进行了测量。根据计算得知，大约 14 μg 的酯酶经戊二醛共价反应固定到微流控芯片反应器通道表面。据此，我们比较了微流控芯片反应器固定化酶和常规试管内游离酶水解消旋醋酸 α -苯乙酯反应的性能。实验结果列于表 4-1。从表中可以看出，在相同的反应时间，相同比例的酯和酶量下，微流控芯片固定化酶反应器和游离酶反应器产生 R-1-苯乙醇的产率和 ee 值均相当。说明在芯片通道内通过戊二醛共价固定的酯酶未因为酶构象的固定，空间结构的局限对酯酶的活性产生不良影响。此外，游离酶与反应物和产物混合在一起，检测产物前需使酶失活并从产物和未反应物中分离出来，且不易循环使用；而固定化酶反应器由于酶的固定化，不进入收集管，产物可以直接分析，并且酶经固定化后稳定性增加，可以多次使用。此外，微流控芯片反应器内固定化酶量甚微。微量消耗，重复使用的特点对于试验那些价格昂贵的酶尤为有利。

表 4-1 固定化酶和游离酶的比较

Table 1 Comparison of the immobilized lipase and free lipase

Lot number	Enzyme	Enzyme dosage (μg)	Ester dosage (μg)	Yield %	Product ee %
1	Immobilized lipase	14	33	20	95
2	Free lipase	1400	3284	18	91

4.3.3 微流控芯片固定化酶反应器与游离酶反应器

对于微流控芯片游离酶反应器，酶需要源源不断地导入通道以维持反应 [16, 24, 25]。采用固定化酶的方式可以进一步降低酶的用量，如在本章所制作的固定化酯酶反应器，仅有约 14 μg 的酯酶固定到微通道管壁即可进行酯的水解反应，并可重复使用。

4.3.4 微流控芯片固定化酶反应器稳定性考察

最后，我们对所制作的固定化酯酶微流控芯片反应器的稳定性进行了考察。图 4-5 所示即为多次应用该固定化酯酶微流控芯片反应器进行水解消旋醋酸 α -苯乙酯的结果。每次实验完成后，微流控芯片反应器通道经磷酸缓冲液 (20 mM, pH 7.4) 充分清洗，并在充满磷酸缓冲液 (20 mM, pH 7.4) 状态下，保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。从图 4-5 可以看出，在 8 次循环使用中，产物 R-1-苯乙醇的产率分布在 19~25% 的区间内，比较一致。在 8 次循环使用后，

微流控芯片固定化酯酶反应器的性能没有明显下降。实际上，我们在实验中发现，所制作的微流控芯片固定化酯酶反应器在使用 3 个月之后，水解醋酸 α -苯乙酯的性能也没有明显下降。其原因可能是酯酶固定到微流控芯片反应器通道表面上，稳定性较游离状态增加，加之微流控芯片反应器内反应液流型为层流，依靠扩散作用进行传质，没有常规反应搅拌时磁子等对酯酶产生的机械损伤，进一步增加了酶的稳定性。

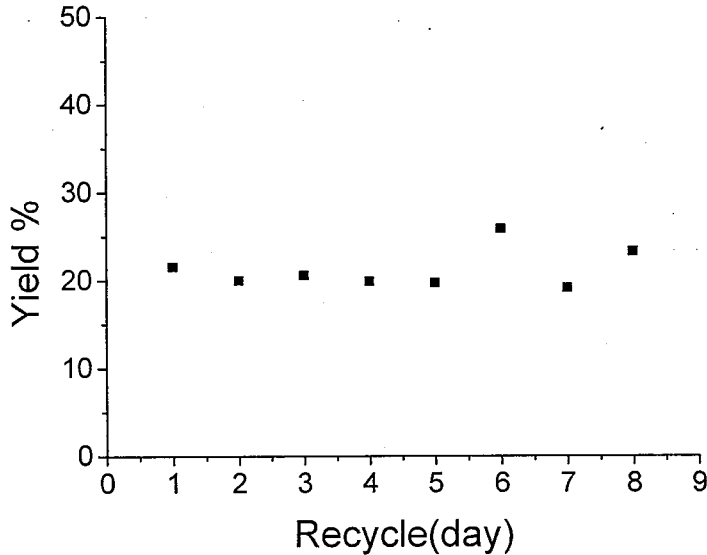


图 4-5 固定化酯酶微流控芯片反应器水解消旋醋酸 α -苯乙酯重复使用结果

Fig. 4-5 Recycle results of the immobilized lipase on a microfluidic reactor for enantioselective hydrolysis of the rac- α -Methylbenzyl acetate

4.4 结论

首次在微流控芯片固定化酶反应器上实现了旋光选择性水解酯的反应。

与传统反应器相比,微流控芯片固定化酯酶反应器显著简化了实验装置,酯酶在进行固定化之前无需预纯化。且微流控芯片固定化酯酶反应器显示了与游离酶水解消旋醋酸 α -苯乙酯反应一致的性能,但是前者所需要的酶量远小于后者。在微流控芯片固定化酶反应器上,实验条件能够进行快速优化,且仅需微升级试剂。此外,微流控芯片固定化酯酶反应器具有很好的稳定性,能够使用数月。简言之,微流控芯片固定化酶反应器显示了其作为一种装置简单、易于加工、消耗很少的用于实验模拟或进行底物/酶筛选的实验平台的潜力。

参考文献

- [1] Iida T, Mase T. Scalable enantioselective processes for chiral pharmaceutical intermediates. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 2002, 5(6): 834-851
- [2] Farina V, Reeves J T, Senanayake C H, Song J H J. Asymmetric synthesis of active pharmaceutical ingredients. *Chemical Reviews*, 2006, 106(7): 2734-2793
- [3] Patel R N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31(6): 804-826
- [4] Patel R N. Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(6): 587-604
- [5] Cao L Q. Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9(2): 217-226
- [6] Mateo C, Palomo J M, Fernandez-Lorente G, Guisan J M,