

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 6 月 11 日 (11.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/114344 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 30/02 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/122343

(22) 国际申请日: 2019 年 12 月 2 日 (02.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811478061.3 2018 年 12 月 5 日 (05.12.2018) CN

(71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。

(72) 发明人: 方群(FANG, Qun); 中国浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。金迪琼(JIN, Di Qiong); 中国浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。潘建章(PAN, Jian Zhang); 中国浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。杜冠生(DU, Guan Sheng); 中国浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号, Zhejiang 310027 (CN)。

(74) 代理人: 杭州知闲专利代理事务所(特殊普通合伙)(HANGZHOU ZHIXIAN PATENT AGENCY); 中国浙江省杭州市西湖区同人精华大厦 1 号楼 1246 室, Zhejiang 310000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS DEVICE EMPLOYING MULTI-FUNCTION INTEGRATED PROBE, AND USE METHOD

(54) 发明名称: 基于多功能集成化探针的色谱分析装置及使用方法

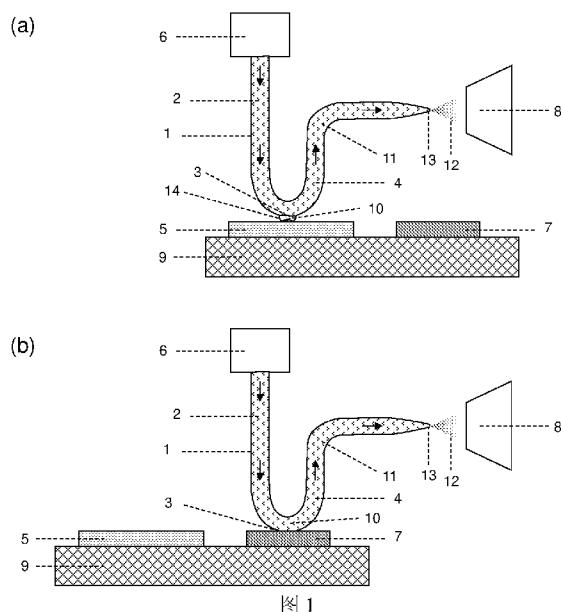


图 1

(57) Abstract: A chromatographic analysis device employing a multi-function integrated probe (1), and a use method. The chromatographic analysis device integrates functions of chromatographic sampling, sample loading, and separation, and achieves the same in the multi-function integrated probe (1). Also disclosed is a method for analyzing a small sample by using the chromatographic analysis device employing the multi-function integrated probe (1). Main advantages of the chromatographic analysis device employing the multi-function integrated probe (1) and the use method include: a high level of device integration, a small dead volume within the device, structural simplicity, convenient use, and high applicability to sample analysis of a small sample amount. The invention provides a novel chromatographic sample loading mode for chromatographic analysis, as well as an ideal platform for chromatographic analysis of small samples and on-site chromatographic analysis, and has broad application potential in fields such as high-throughput screening and analysis, single-cell/single-particle analysis, analysis of small complex samples, bioimaging analysis, and on-site analysis.

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要：一种基于多功能集成化探针(1)的色谱分析装置及使用方法，色谱分析装置将色谱取样、进样、分离功能集成于多功能集成化探针(1)内完成。同时也公开了一种采用基于多功能集成化探针(1)的色谱分析装置进行微量样品分析的方法。这种基于多功能集成化探针(1)的色谱分析装置及使用方法的主要优点包括：装置集成度高，装置内死体积小，结构简单，使用方便，尤其适合进行样品量微小的微量样品分析，并且为色谱分析提供了一种新的色谱进样模式，为微量样品的色谱分析和现场色谱分析提供了理想的平台，在高通量筛选和分析、单细胞/单颗粒分析、微量复杂样品分析、生物成像分析、现场分析等领域有广阔的应用前景。

基于多功能集成化探针的色谱分析装置及使用方法

技术领域

本发明属于色谱分析领域，特别涉及一种用于微量样品的基于多功能集成化探针的色谱分析装置及使用方法。

背景技术

在具有复杂组成的样品分析中，色谱分析技术以其强大的分离能力得到了广泛的应用。其中，高效液相色谱法和气相色谱法已成为化学、生物医学、农学、环境、食品、商检等领域中重要的分离分析技术。

通常一个典型的色谱分离分析过程包括：将样品通过进样阀注入载有固定相的色谱柱中，以液体或气体为流动相，采用高压驱动系统，将流动相泵入色谱柱内，样品中不同性质的组分在柱内被分离后，进入检测器进行检测，从而实现对样品的分离分析。

目前，与色谱系统联用最多的是质谱检测器。质谱检测技术具有高特异性和高灵敏度的特点。其中，电喷雾质谱检测技术是与色谱系统联用最多的质谱分析技术。电喷雾质谱检测技术，具有灵敏度高、分析速度快、分子结构解析能力强等特点。文献曾报道多种基于电喷雾质谱技术的原位样品直接分析方法。如Cooks研究组(Takats, Z.; Wiseman, J.; Cooks, R. J. *Mass. Spectrom.* 2005, 40, 1261-1275.)发展了解吸电喷雾离子化(DESI)技术，在高压气流辅助下利用高速带电液滴流进行表面样品的解吸和电离，并直接进入质谱中检测。Laskin研究组(Roach, P.; Laskin, J.; Laskin, A. *Analyst* 2010, 135, 2233-2236.)发展了纳升级解吸电喷雾电离(nano-DESI)技术，利用液桥连接缓冲液系统和纳喷针，并从待分析表面萃取样品分子，可进行样品分子的连续提取和直接离子化。Wang等(Wang, H.; Liu, J.; Cooks, R.; Ouyang, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 877-880.)发展的纸喷雾技术，将纸色谱和电喷雾技术结合，使样品在溶剂和高压电的共同作用下通过多孔隙纸的尖端进行喷雾。但由于实际生物样品的组成复杂且丰度差异大，其样品中的高浓度基质尤其是金属盐离子的存在，会严重制约质谱检测的灵敏度和准确性。为降低样品中基体组分对质谱检测的影响，需在质谱检测前对样品进行前处理，如固相萃取或色谱分离等，然后再将处理后的样品通过接口转移至质谱中。但在常规分析体系内，上述过程繁琐耗时、样品消耗量大，且易造成样品损失和污染，不适宜进行微量样品的处理。

针对微量复杂样品的色谱分析方法的研究是当前色谱分析（尤其是色谱-质谱联用分析）领域的研究热点之一。经典的色谱分析系统虽具有分离能力强、可靠性高等优点，但也存在仪器成本高、样品用量大、柱外效应显著等局限性。在从进样阀到检测器之间，在进样阀内、柱接头、连接管和检测器流通池中，都存在较大的死体积，

造成被分离物质的扩散和滞留，导致色谱峰的展宽，色谱柱分离效率下降。因此，实现微量复杂样品的色谱分析面临着重大的挑战。

有部分文献报道了应用于微量样品的色谱分析方法。如 Ovchinnikova 等 (Ovchinnikova, O.; Kertesz, V.; Van Berkel, G. Anal. Chem. 2011, 83, 1874-1878.) 利用激光将表面样品解吸后通过 PEEK 管的开口引至内部溶剂中，通过六通阀的切换进入色谱-质谱分析系统中，实现了生物切片表面的直接微区取样和色谱分析。但该方法仪器成本昂贵且使用成本过高。Kertesz 等 (Kertesz, V.; Van Berkel, G. Anal. Chem. 2010, 82, 5917-5921.) 利用微液桥表面取样探针 (LMJ-SSP) 技术对生物切片或液滴进行取样，样品通过三通或六通阀的切换进入 HPLC-MS 分析系统中，经分离后的组分依次进行常规电喷雾质谱检测。但上述方法在系统集成度、操作方便性、接口死体积、样品损失率等方面仍存在诸多不足。

发明内容

本发明提供了一种用于微量样品的基于多功能集成化探针的色谱分析装置及使用方法，该色谱分析装置将色谱取样、进样、分离功能集成于集成化探针内完成。

同时本发明也提供了一种采用上述基于多功能集成化探针的色谱分析装置进行微量样品分析的方法。

本发明的主要优点包括：装置集成度高，装置内死体积小，结构简单，使用方便，尤其适合进行样品量微小的微量样品分析，并且为色谱分析提供了一种新的色谱进样模式，为微量样品的色谱分析和现场色谱分析提供了理想的平台。

本发明在高通量筛选和分析、单细胞/单颗粒分析、微量复杂样品分析、生物成像分析、现场分析等领域有广阔的应用前景。

一种基于多功能集成化探针的色谱分析装置，包括流体驱动装置以及检测装置，还包括：

用于承载样品的样品芯片；

具有流动相引入通道、取样通道口、色谱柱通道以及色谱柱通道出口的探针；流动相引入通道的出口与色谱柱通道的进口相连通，该连通处设有所述的取样通道口，其同时作为完成取样探针功能的取样通道口；

调整样品芯片与多功能集成化探针之间相对位置的移动台；

所述流动相引入通道入口与所述流体驱动装置相连，所述色谱柱通道出口与所述检测装置位置对应。

本发明的探针既可以是整体结构，也可以拆卸的分体结构，可以作为模块化设计。

作为优选，所述探针为集成流动相引入通道、取样通道口、色谱柱通道以及色谱柱通道出口于一体的结构。作为进一步优选，所述的探针为由毛细管弯折而成。

作为优选，所述的探针为由毛细管弯折而成的 U 型结构、V 型结构、类似 U 型结构或者类似 V 型结构，该 U 型结构或 V 型结构的底部设有所述取样通道口，取样通道口两侧的毛细管部分分别为所述的流动相引入通道和色谱柱通道，色谱柱通道的流

动相出口为所述的色谱柱通道出口。

本发明中，所述毛细管可以毛细玻璃管、毛细金属管或者其他材料的毛细管。

作为优选，位于探针内的色谱固定相充满部分流动相引入通道，全部的取样通道口和色谱柱通道；或者色谱固定相充满全部的色谱柱通道。

作为优选，所述探针包括：

带有流动相引入通道、取样通道口以及色谱柱通道的探针本体；

以及一端置入所述色谱柱通道内的色谱柱，该色谱柱的流动相出口为所述的色谱柱通道出口。

作为优选，所述流动相引入通道以及色谱柱通道呈 U 型或 V 型布置，所述取样通道口位于 U 型或 V 型的底部。

作为优选，包括可用于密封所述取样通道口的密封片。采用密封片既可以实现对取样通道口密封；也可以在密封片上滴加洗涤液，用于多功能集成化探针的取样通道口的清洗，以及取样液滴的稳定形成。

当然，本发明也可以不设置密封片，直接通过样品芯片进行样品的承载、溶解、洗涤等。此时可以直接通过经过取样通道口的流动相实现对样品的溶解和取样；或者也可以通过形成于取样通道口的取样液滴实现对样品的溶解和取样。取样液滴可以由流动相形成，也可以是洗涤液或者其他组成的液滴。

作为优选，所述样品芯片顶面具有弹性。选择该技术方案，可以进一步提高取样通道口与样品芯片之间的密封性。

作为优选，所述检测装置为电喷雾质谱仪检测装置，所述色谱柱通道出口作为电喷雾质谱检测装置的喷针。

一种样品分析的方法，在密封探针的取样通道口的条件下，利用流体驱动装置实现对探针内流动相的驱动；利用位于取样通道口处的液体溶解样品芯片的上承载的样品，进入色谱柱通道实现样品的进样；在密封探针取样通道口的条件下，利用流体驱动装置驱动流动相对进入色谱柱通道的样品进行分离；利用所述检测装置实现对分离后样品的检测。

一种样品分析的方法，采用上述任一项技术方案所述的色谱分析装置进行分析：利用流体驱动装置在密封探针的取样通道口的条件下实现对探针内流动相的驱动；在常压条件下利用位于取样通道口处的液体或者在样品芯片密封探针取样通道口的条件下利用流经取样通道口的液体，溶解样品芯片的上承载的样品，进入色谱柱通道实现样品的进样；在利用密封片或样品芯片密封探针取样通道口的条件下，利用流体驱动装置驱动流动相对进入色谱柱通道的样品进行分离；利用所述检测装置实现对分离后样品的检测。

下面对本发明做进一步说明：

一种用于微量样品的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，包括：用于承载样品的样品芯片；

集成有流动相引入通道、取样通道和色谱柱通道的多功能集成化探针；

用于提供液相色谱流动相的流体驱动装置，该流体驱动装置与流动相引入通道的进口相连；

用于密封多功能集成化探针的取样通道口的密封片；

液相色谱的检测装置；

用于控制和调节样品芯片和多功能集成化探针之间相对位置的移动台。

根据本发明，所述的多功能集成化探针上加工有具有进口和出口的流动相引入通道，和具有进口和出口的色谱柱通道，流动相引入通道的出口与色谱柱通道的进口相连通，该连通处同时作为完成取样探针功能的取样通道口；进行取样操作时，取样通道口与样品芯片上的用于承载样品的微结构或微区域相通或相接触。

根据本发明，所述的多功能集成化探针的材质为无机材料（包括玻璃、石英、硅或金属等），有机材料，或高分子聚合物材料，或以上材料组成的复合材料。

根据本发明，所述的多功能集成化探针内的流动相引入通道、色谱柱通道和取样口的横截面的形状为圆形、或椭圆形、或方形、或梯形、或其他多边形，所述的多功能集成化探针内的流动相引入通道、色谱柱通道和取样口的内径（直径）或内边长范围为 0.05 微米至 1 厘米，所述的多功能集成化探针内的取样口的外径（直径）或外边长为 0.1 微米至 10 厘米。

根据本发明，所述的多功能集成化探针可基于一根毛细管进行加工。加工时，先将除结构外，先将毛细管进行弯折，弯折部位的形状为 U 形，或圆弧形，或方形，或 V 形，或其它形状。其加工方法可根据毛细管材料的不同，选取高温法、或机械法、或模具法等。取样通道口加工于毛细管弯折部分的突出区域，其加工方法可根据毛细管材料的不同选取研磨法、或腐蚀法、或激光加工、或钻孔、或切割、或针刺法等。为增加基于毛细管的多功能集成化探针的强度，以提高探针与密封片或样品芯片之间密闭接口的耐压能力，在毛细管外涂覆或填充能够增加其结构强度的材料，如固体胶，或金属，或聚合物材料，或其它材料等。

根据本发明，所述的多功能集成化探针（或者探针本体）还可由固体材料整体加工而成，或由微流控芯片整体加工而成。作为优选，采用硬质固体材料加工多功能集成化探针，如不锈钢、或玻璃、或石英、或聚醚醚酮（PEEK）材料、或其它材料等。为方便加工，整体型多功能集成化探针可采用商品化的三通或四通装置改装而成。

根据本发明，所述的用于微量样品的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，所述的用于承载样品的样品芯片上，加工有用于承载样品的微结构或微区域，包括凹形微坑、或者凸形微柱、或者表面进行过选择性亲水或疏水处理后的特定区域，或者依靠芯片材料本身的亲疏水性而不经表面处理直接利用芯片表面承载样品。所述的用于承载样品的样品芯片的材质为无机材料（包括玻璃、石英、硅或金属等），有机材料，或高分子聚合物材料，或以上材料组成的复合材料。

根据本发明，所述的多功能集成化探针的材质、用于承载样品的样品芯片的材质、所述的密封片的材料可分别独立的选择无机材料（包括玻璃、石英、硅或金属等），有机材料，或高分子聚合物材料，或以上材料组成的复合材料。为简化系统，直接将样

品芯片作为密封片使用，利用样品芯片上承载样品的部分密封集成化探针装置的取样通道口完成直接取样操作，或者利用样品芯片上没有承载样品的部分密封集成化探针装置的取样通道口完成流动相引入操作。

为提高多功能集成化探针的取样通道口的密封的可靠性和耐压性，作为优选，所述的密封片材料或样品芯片材料，与集成化探针装置的取样通道口的材料有硬度差异，或者两种材料之一或全部是具有弹性的材料，有利于实现更可靠、更耐压的密封。此外，还可在密封片或样品芯片与集成化探针装置的取样通道口接触的部分加装弹性密封材料，或者将弹性密封材料加装于集成化探针装置的取样通道口处。

根据本发明，所述的样品芯片上所承载样品的种类为液体样品或者固体样品。所述的液体样品体积范围为 1×10^{-20} 升至 1×10^{-3} 升，固体样品质量范围为 1×10^{-22} 克至 1×10^{-3} 克。

进行样品分析时，所述的液体样品或者固体样品上述样品加到样品芯片上用于承载样品的微结构或微区域后，直接利用多功能集成化探针进行样品分析，或者加到样品芯片的微结构或微区域的样品先经过一系列样品预处理和反应步骤后，再利用多功能集成化探针进行样品分析，或者所述的液体样品或者固体样品在加到样品芯片之前在其他装置上进行样品预处理和反应。作为优选，对于微量样品，如单细胞、或单颗粒、或亚细胞器、或微量生物组织样品等微量样品，采用将样品加到样品芯片上后再进行样品预处理和反应的方法，有利于减少微量样品在样品传输、预处理和反应过程中的损失，提高检测灵敏度。

根据本发明，所述的样品的初始状态为液体样品，或者固体样品，或液固混合物样品，或者液体样品蒸发干燥后形成的固体样品。

在样品预处理、反应和分析过程中，采用盖油、或者控制湿度、或者其他防液体蒸发措施，防止液体样品的蒸发；或者在样品预处理和反应的中间或结束阶段，使得液体样品蒸发干燥成固体样品；或者在样品预处理和反应的中间阶段，样品蒸发干燥成固体样品后，再加入溶剂，使得固体样品复溶为液体样品。

根据本发明，所述的色谱分析装置中的多功能集成化探针中所使用的具有色谱固定相的色谱柱构型为填充柱、或者开口管柱、或者化学合成整体柱、或者微加工整体柱、或者上述构型的复合构型。色谱柱的加工方法是利于多功能集成化探针中的色谱柱通道直接加工色谱柱，或者预先在装置外加工色谱柱，然后将该加工色谱柱安装于多功能集成化探针上，与其上的色谱柱通道相联通。作为优选，在多功能集成化探针中的色谱柱通道直接加工色谱柱时，尽量减小色谱柱固定相到取样通道口之间的距离和死体积，有利于降低样品的传输损失和样品被稀释的效应。作为优选，在多功能集成化探针中安装预先在装置外加工的色谱柱时，尽量减小外加工色谱柱进口到色谱柱通道入口及取样口之间的距离和死体积，有利于降低样品的传输损失和样品被稀释的效应。需要说明的是，如有需要（如加工方便或减小接口死体积等原因），色谱柱的固定相可加工或填充至流动相引入通道和取样通道口的部分或全部空间。

根据本发明，所述的用于微量样品的基于多功能集成化探针的色谱分析装置的使用

用方法，其特征在于，包括以下步骤：

(a) 将待分析样品加入到的样品芯片的上用于承载样品的微结构或微区域；

(b) 对样品芯片上的样品进行预处理和反应操作；

(c) 将样品芯片固定到移动台上，或者将多功能集成化探针固定到移动台上，或者将样品芯片和多功能集成化探针分别固定到不同的移动台上；

(d) 控制移动台移动使多功能集成化探针上的取样通道口与密封片相接触并实现密封；启动流体驱动装置，将色谱流动相从多功能集成化探针的流动相引入通道的进口注入，经过取样通道口，进入色谱柱通道，由色谱柱通道的出口流出；启动色谱系统的检测装置，获得稳定的检测信号；

(e) 暂停流体驱动装置，控制移动台移动使多功能集成化探针上的取样通道口与密封片脱离接触，并使取样通道口外形成的取样液滴与承载于样品芯片上的微结构或微区域的样品相接触，样品溶入取样液滴，利用取样液滴的表面张力、或者色谱柱通道内的毛细作用力、或者来自色谱柱通道出口的抽吸力或者色谱柱通道内的其他类型的抽吸力，将溶有样品的取样液滴通过取样通道口引入色谱柱通道及其中的色谱固定相内；控制移动台移动使多功能集成化探针上的取样通道口的取样液滴与样品芯片脱离接触；

(f) 控制移动台移动使多功能集成化探针上的取样通道口与密封片相接触并实现密封；启动流体驱动装置，将流动相从多功能集成化探针的流动相引入通道的进口注入，经过取样通道口，携带样品进入色谱柱通道及其中的色谱固定相中，对样品中的组分进行分离，样品中被分离的组分由色谱柱通道口流出；启动色谱系统的检测装置，获得被分离的样品组分的检测信号；

(g) 重复以上(a)至(f)的操作步骤，完成芯片上不同样品，或者同一样品的不同空间位置，或者不同芯片上样品的取样与分析。

根据本发明，省略上述操作步骤中的(d)操作，以简化操作，缩短操作和分析时间。

根据本发明，将上述操作步骤中的(e)和(f)操作合并进行，即不利用取样通道口外形成的取样液滴对样品芯片上的样品进行接触取样，而是控制移动台移动使多功能集成化探针上的取样通道口与样品芯片上承载样品微结构或微区域相接触或相联通，并实现取样通道口与样品芯片的之间密封；启动流体驱动装置，将流动相从多功能集成化探针的流动相引入通道的进口注入，经过取样通道口，携带载于样品芯片上微结构或微区域的样品进入色谱柱通道及其中的色谱固定相中，对样品中的组分进行分离，样品中被分离的组分由色谱柱通道口流出；启动色谱系统的检测装置，获得被分离的样品组分的检测信号。

根据本发明，所述的多功能集成化探针上的取样通道口与密封片接触并实现密封的方法是，通过控制移动台产生上述两者之间的相互按压操作，或者相互插入操作，或者相互平移操作，或者螺口旋拧操作，或者其它移动或旋转操作，实现多功能集成化探针的取样通道口与密封片的耐压力密封。

根据本发明，所述多功能集成化探针的取样通道口与密封片之间的密封处耐压的程度或能力，需达到在取样过程中或者引入流动相进入色谱柱过程中，在两者的密封处没有或者无明显的液体渗漏。

根据本发明，作为优选，在实现多功能集成化探针的取样通道口与密封片之间的密封时，缩小多功能集成化探针的取样通道口与密封片之间的接触面积有利于提高密封接口处的耐压能力。而提高多功能集成化探针的取样通道口与密封片之间的密封接口处的耐压能力，有利于提高色谱系统内的压力，有利于采用更长或更细内径的色谱柱，或更细粒度的固定相填充色谱柱，以提高色谱分离的分离效率、分离度和检测灵敏度等。

根据本发明，根据取样样品溶液的性质，对取样通道口周围的表面进行区域选择性表面改性，使该表面与样品溶液具有亲和作用，以提高取样的稳定性。作为优选，所述的取样通道口的外壁表面经过疏水性处理，以降低交叉污染。所述的疏水化处理，包括硅烷化、或氟烷化、或聚合物涂层、或其它疏水化表面处理方法。

根据本发明，在取样过程中，所述的流动相携带承载于样品芯片上微结构或微区域的样品进入色谱柱通道，是指流动相一次性携带全部或大部分样品进入色谱柱通道进行分离分析，或者流动相逐步洗脱承载于样品芯片上微结构或微区域的样品进入色谱柱通道进行分离分析，或者通过改变流动相的组成和浓度逐步洗脱承载于样品芯片上微结构或微区域的样品中的不同性质的组分进入色谱柱通道进行分离分析。

根据本发明，所述的携带或洗脱样品进入色谱柱通道进行分离分析的流动相的组成和流量，可以与后续使用的色谱分离时所用的流动相条件相同，也可以不同。主要考虑的因素是如何有利于取样和进样操作的进行。如果需要，还可使用气体流动相完成取样和进样操作，然后再采用液体流动相进行色谱分离操作。

根据本发明，在进行多个样品的取样分析时，在完成一个样品的取样分析后，在进行下一个样品的取样分析之前，在密封片或样品芯片上加清洗液，将多功能集成化探针的取样口部分浸入清洗液内进行清洗，以降低不同样品之间的交叉污染。同时取样通道口与清洗液脱离时携带出的液体还可作为取样液滴。

根据本发明，所述的色谱系统的检测装置所采用的检测方法为光学分析法，或者电化学分析法，或者质谱分析法，或其它种类的分析方法（如冷冻电镜分析法），或者上述两种或两种以上检测方法的联用。其中光学分析法中包括紫外可见分光光度法、荧光光谱法、红外光谱法、拉曼光谱法、核磁共振波谱法、光学成像分析、光学传感分析、原子光谱法等。电化学分析法包括电位分析法、电解和库仑分析法、伏安法、电导法、电化学传感分析法等。质谱分析法包括电子轰击质谱、场解吸附质谱、快原子轰击质谱、基质辅助激光解吸附质谱，电喷雾质谱、原位电离质谱、电感耦合等离子体质谱等。

根据本发明，采用多个多功能集成化探针，构成探针阵列，并行进行样品芯片多个样品的多通道进样和色谱分析操作，有利于提高系统的分析通量。

根据本发明，所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，可用于微量样品液

相色谱分析, 或者气相色谱分析, 或者超临界流体色谱分析。作为优选, 在应用于液相色谱分析中, 使用梯度洗脱模式进行复杂样品的分析, 有利于提高色谱柱的分离效果和峰容量。在应用于气相色谱分析中, 使用程序升温模式进行复杂样品的分析, 有利于提高色谱柱的分离效果和峰容量。

需要说明的是, 所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置的领域并不仅限于色谱分析领域, 还可应用于连续流动分析、或者气泡间隔流动分析、或者流动注射分析、或者毛细管电泳分析等流动分析领域, 或者与这些流动分析系统联用进行分析。

本发明的主要优点在于: (1) 装置集成度高, 将色谱取样、进样、分离功能集成于集成化探针内完成, 装置结构简单、体积小、加工成本低、使用操作方便; (2) 将色谱取样、进样、分离功能集成于集成化探针内, 可实现微量样品的在线预处理和色谱分离, 节约了样品的预处理时间, 显著提高分析速度和通量; 同时, 上述操作容易实现自动化, 也适合进行多样品的快速分离分析和高通量筛选分析; (3) 采用一体化的进样方法, 经预处理的样品直接进入色谱和后续的检测系统中进行分析, 显著降低了装置的死体积, 减少了样品转移和输送过程中的损失, 提高了分析灵敏度和改善了分析结果, 使其尤其适合进行样品量微小的微量样品或单细胞/单颗粒样品的分析; (4) 该集成化探针尺寸较小, 进样量小, 如进一步减小取样通道口的尺寸, 还可应用于高空间分辨率的生物成像分析; (5) 本发明对色谱分析领域的基础和应用研究均具有重要意义, 采用简单的方法巧妙解决了常压取样-预处理-进样与高压进样-色谱分离操作之间的矛盾, 提出了一种新的色谱进样模式, 为微量样品的色谱分析和现场色谱分析提供了理想的平台, 同时也为色谱系统的微型化提供了新的途径。(6) 采用本发明的系统有广阔的应用前景, 预期将在高通量筛选和分析、单细胞/单颗粒分析、微量复杂样品分析、生物成像分析、现场分析等领域获得重要的应用。

附图说明

图 1 是实施例 1 的采用毛细管多功能集成化探针的色谱-电喷雾质谱分析系统的示意图。(a) 为进行取样操作时系统示意图; (b) 为进行进样操作时系统示意图。

图 2 是采用实施例 1 的分析装置及其使用方法, 对含有不同盐含量的血管紧张素 II (Ang II) 样品干点在梯度洗脱模式下的电喷雾质谱检测结果。

图 3 是采用实施例 1 的分析装置及其使用方法, 对细胞色素 C 蛋白在液滴中进行胰蛋白酶酶解后的产物, 在梯度洗脱模式下进行原位质谱分析的结果。

图 4 是实施例 3 的将取样操作和进样操作合并进行的采用毛细管多功能集成化探针和整体色谱柱的色谱-电喷雾质谱分析系统的示意图。

图 5 是实施例 3 的将取样操作和进样操作合并进行的采用毛细管多功能集成化探针和填充色谱柱的色谱-电喷雾质谱分析系统的示意图。

图 6 是实施例 4 的采用整体模块加工以及填充色谱柱的多功能集成化探针的色谱-电喷雾质谱分析装置系统的示意图。

上述附图中, 1-多功能集成化探针, 2-流动相引入通道, 3-取样通道口, 4-色谱柱

通道, 5-样品芯片, 6-流体驱动装置, 7-密封片, 8-检测装置, 9-移动台, 10-样品, 11-色谱固定相, 12-色谱流动相, 13-色谱柱通道出口, 14-取样液滴, 15-外加工色谱柱。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明的技术方案作进一步说明, 但本发明的保护范围不限于此。

参照附图, 以下将详细描述根据本发明的优选实施例。

实施例 1

图1是根据本发明所建立的采用毛细管加工的多功能集成化探针的色谱-电喷雾质谱分析系统的示意图。(a)为进行取样操作时系统示意图;(b)为进行进样操作时系统示意图。该系统由一个基于毛细管的多功能集成化探针1, 一套可移动的样品芯片5和密封片7, 一个固定有样品芯片5和密封片7的移动台9, 一套注射泵流体驱动装置6、以及一台质谱仪检测装置8组成。图1中箭头表示色谱流动相流动方向。

多功能集成化探针1由毛细管加工而成, 外观呈U型, 包括流动相引入通道2, 取样通道口3和色谱柱通道4。取样通道口3位于U型弯折的底部外侧壁。毛细管腔体采用整体柱方法加工有色谱柱, 为方便色谱柱加工操作, 色谱固定相11充满部分流动相引入通道2, 全部的取样通道口3和色谱柱通道4。

加工探针的毛细管的材料为熔融石英玻璃, 横截面为圆形, 内径为100微米, 外径为365微米, 其具体加工步骤如下:(1)通过火焰加热对毛细管进行拉伸处理, 得到一沙漏状结构段, 其内径最小处为30-50微米;(2)通过火焰加热对毛细管进行弯折处理, 得到U型的取样通道口3的雏形, 沙漏状结构端内径最小处与U型取样通道口3底部之间的毛细管长度为2厘米;(3)在毛细管内通过原位热引发聚合的方法合成整体柱;(4)通过对毛细管沙漏状结构段最小内径处的切割, 得到毛细管色谱柱通道出口13, 这一出口也作为电喷雾质谱检测装置8的喷针;切割毛细管使多功能集成化探针1的流动相引入通道2的注入口与U型取样通道口3底部的距离为9厘米;(5)对毛细管外壁进行硅烷化处理, 使其具有疏水性;(6)通过对取样通道口3的U型突出区域的顶端毛细管壁进行研磨得到完整连通的取样通道口3, 取样通道口3的形状为椭圆形, 长直径200微米, 短直径100微米。在用于亲油性样品的检测时, 取样通道口3周围研磨形成的具有亲水性的亲水圈, 可有效降低交叉污染。在用于亲水性样品的检测时, 可对取样通道口3周围研磨形成的具有亲水性的亲水圈进行疏水性处理, 以有效降低交叉污染。

实施例1装置的具体使用方法如下:(1)通过有样品芯片5和密封片7的移动台9在x、y和z轴三个维度上的移动, 使多功能集成化探针1的取样通道口3与密封片7的紧密接触并密封, 防止流动相12从取样通道口3中漏出;(2)保持多功能集成化探针1的取样通道口3与密封片7之间的紧密接触并密封的状态, 启动流体驱动装置6注射泵, 将色谱流动相12从多功能集成化探针1的流动相引入通道2的注入口连续

注入, 经过取样通道口 3 和色谱柱通道 4, 到达色谱柱通道 4 的出口, 并启动检测装置 8 质谱仪的高压电源, 使色谱流动相 12 由多功能集成化探针 1 的色谱柱通道出口 13 喷出形成稳定的电喷雾; (3) 暂停流体驱动装置 6, 通过移动台 9 在 x、y 和 z 轴三个维度上的移动, 使多功能集成化探针 1 的取样通道口 3 与密封片 7 脱离, 取样通道口 3 由色谱流动相 12 形成取样液滴, 使多功能集成化探针的取样通道口 3 通过取样液滴与样品芯片 5 上的固体或液滴样品 10 接触, 并利用取样液滴 14 溶解样品 10, 利用电喷雾过程对多功能集成化探针 1 通道内中液体的抽吸作用, 将溶解有样品 10 的取样液滴 14 通过取样通道口 3 取样进入多功能集成化探针 1 内的色谱柱通道 4 内(图 1a), 然后样品芯片 5 与取样通道口 3 脱离; (4) 通过移动台 9 在 x、y 和 z 轴三个维度上的移动, 使多功能集成化探针 1 的取样通道口 3 与密封片 7 紧密接触并密封, 启动流体驱动装置 6 提供液相色谱流动相 12, 使进入多功能集成化探针 1 的色谱柱通道内的样品在液相色谱流动相 12 的驱动下进行分离, 并经由多功能集成化探针 1 色谱柱通道出口 13 喷出, 在电场作用下离子化, 进入质谱仪进行检测(图 1b); (5) 重复以上 (3) 和 (4) 的步骤, 完成样品芯片 5 上不同样品 10 的取样、进样与分析, 或不同样品芯片 5 上样品 10 的取样、进样与分析。

多功能集成化探针 1 的加工和使用过程中, 采用显微观察装置观察多功能集成化探针 1 和样品芯片 5 的情况。

图 2 是采用实施例 1 的分析装置及其使用方法, 对含有不同盐含量的血管紧缩素 II (Ang II) 样品干点在梯度洗脱模式下的电喷雾质谱检测结果。

具体的, 血管紧缩素 II 样品 10 液滴中的氯化钠浓度分别为 0 M (mol/L)、0.2 M 和 1.0 M, 样品 10 液滴原始大小为 20 纳升, 于样品芯片 5 上进行自然蒸发形成肉眼可见的白色圆点, 每种浓度的样品液滴三个; 其取样用的色谱流动相 12 为 10% 甲醇 0.1% 甲酸溶液 (即流动相由 10% 的溶液 B 和 90% 的溶液 A 组成), 取样液滴大小为 30 纳升; 取样时间为 3 分钟 (即取样液滴 14 溶解样品的时间); 色谱流动相 12 梯度为: 第 0-0.3 分钟, 10-80% 的溶液 B (其余 90~20% 为溶液 A); 第 0.3-0.5 分钟, 80% 的溶液 B (其余为 20% 的溶液 A); 第 0.5 分钟开始为 10% 的溶液 B (其余为 90% 的溶液 A)。其中溶液 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 溶液 B 为 0.1% 甲酸甲醇溶液; 检测装置 8 质谱仪的电喷雾流速为 1.1 微升每分钟, 喷雾电压为 1.7 千伏。

利用本实施例中的方法测得的含盐样品中目标信号峰面积随着盐浓度的增大而无显著变化, 由于含有氯化钠的样品在无前处理直接电喷雾实验中无法获得有效目标信号, 证明该系统具有良好的除盐能力, 适应于高盐样品的直接取样-进样-电喷雾质谱检测。同时三个浓度的样品信号峰面积的相对标准偏差分别为 17.7%, 18.4% 和 14.8%, 在质谱检测的可接受范围内, 说明该系统具有良好的稳定性。

图 3 是采用本发明实施例 1 的分析装置及其使用方法, 对细胞色素 C 蛋白在液滴中进行胰蛋白酶酶解后的产物, 在梯度洗脱模式下进行原位质谱分析的结果。

具体的, 细胞色素 C 蛋白 (Cyt. C) 在油覆盖下的样品芯片 5 上以液滴形式进行胰蛋白酶酶解反应, 反应液滴大小为 100 纳升, 液滴中的蛋白量为 100 纳克; 反应后

的液滴经除油除溶剂处理，反应产物作为测定样品 10 以固体形式留存于样品芯片 5 上；利用本分析装置对该反应产物进行原位取样分析，其取样用的色谱流动相 12 为 5% 甲醇 0.1% 甲酸溶液（即流动相由 5% 的溶液 B 和 95% 的溶液 A 组成），取样液滴大小为 30 纳升；取样时间为 3 分钟；色谱梯度为：第 0-10 分钟，5-95% 的溶液 B（其余 95~5% 为溶液 A）；第 10-15 分钟，95% 的溶液 B（其余 5% 为溶液 A）；第 15 分钟开始为 5% B（其余 95% 为溶液 A）。其中溶液 A 为 0.1% 甲酸水溶液，溶液 B 为 0.1% 甲酸甲醇溶液；检测装置 8 质谱仪电喷雾流速为 200 纳升每分钟，喷雾电压为 2.3 千伏。

上述结果证明本系统应用于微量反应体系的复杂样品的分离分析。

实施例 2

实施例 2 是利用优选实施例 1 中的多功能集成化探针和使用方法，在密封片 7 上添加洗涤液用于多功能集成化探针 1 取样通道口 3 的清洗，以及取样液滴的稳定形成。

实施例 2 所示分析装置的具体使用方法如下：（1）在具有超疏水性的密封片 7 上添加定量与色谱流动相 12 组成一致的清洗液，清洗液在密封片 7 上以大液滴的形式存在；（2）通过固定有样品芯片 5 和密封片 7 的移动台 9 在 x、y 和 z 轴三个维度上的移动，使多功能集成化探针 1 的取样通道口 3 与密封片 7 紧密接触，防止色谱流动相 12 从取样通道口 3 中漏出；取样通道口 3 的外壁浸没于清洗液大液滴中；（3）保持多功能集成化探针 1 的取样通道口 3 与密封片 7 的紧密接触状态，启动流体驱动装置 6，将色谱流动相 12 从多功能集成化探针 1 的流动相引入通道 2 连续注入，经过取样通道口 3，到达多功能集成化探针 1 的色谱柱通道出口 13，并启动质谱仪高压电源，使电喷雾缓冲液由多功能集成化探针 1 的色谱柱通道出口 13 喷出形成稳定的电喷雾；（4）暂停流体驱动装置 6，通过移动台 9 在 x、y 和 z 轴三个维度上的移动，使多功能集成化探针 1 的取样通道口 3 与密封片 7 脱离，取样通道口 3 携带由清洗液形成的取样液滴 14，使多功能集成化探针 1 的取样通道口 5 通过取样液滴 14 与样品芯片上的样品 10 接触，并利用取样液滴 14 溶解样品，利用电喷雾过程对多功能集成化探针 1 通道内液体的抽吸作用，将溶解有样品 10 的取样液滴 14 通过取样通道口 5 取样进入多功能集成化探针 1 内的色谱柱通道 4 内，样品芯片 5 与取样通道口 3 自然脱离；（5）通过移动台 9 在 x、y 和 z 轴三个维度上的移动，使多功能集成化探针 1 的取样通道口 3 与密封片 7 紧密接触，取样通道口 3 浸没于清洗液大液滴中用于清洗；启动流体驱动装置 6 提供液相色谱流动相 12，使进入多功能集成化探针 1 内色谱柱通道 4 内的样品 10 在液相色谱流动相 12 的洗脱下进行分离，并经由多功能集成化探针 1 的色谱柱通道出口 13 喷出，在电场作用下离子化，进入质谱仪 8 进行分析；（6）重复以上（4）和（5）的步骤，完成不同样品的取样与分析。

具体的，三种多肽样品分别为 YL-5、血管紧缩素 II（Ang II）和血管紧缩素 I（Ang I），其浓度均为 200 飞摩尔每升；对照样品为不含多肽的空白缓冲液；样品 10 液滴原始大小为 20 纳升，于样品芯片 5 上进行自然蒸发形成干点；其清洗液、色谱流动相均为 20% 乙腈 0.1% 甲酸溶液（即由 20% 的 0.1% 甲酸乙腈溶液和 80% 的 0.1% 甲酸水溶液

组成), 清洗液体积为 200 微升, 取样液滴 14 体积为 30 纳升; 取样时间为 1.3 分钟; 电喷雾流速为 480 纳升每分钟, 喷雾电压为 2.5 千伏。依次对三个样品 10 液滴干点和一个对照组液滴干点进行取样分析, 三个样品 10 的交叉污染信号强度均低于样品信号的 6%, 在质谱检测的可接受范围内。

本分析结果表明该系统的交叉污染较低, 可用于多种样品的连续检测, 具有实际应用的可能。

采用实施例 2 的多功能集成化探针和分析方法, 实现了对小鼠的脑、肝、肾切片进行等度洗脱模式下的取样和药物及其两种同分异构代谢物的分析。

利用本系统对小鼠的脑、肝、肾切片各取样检测 5 个点, 取样液滴大小为 30 纳升, 取样口与切片间距离为 0.02 毫米, 取样区域直径约为 0.5 毫米, 取样点间距为 1 毫米, 取样时间为 1.5 分钟, 检测时间为 3.5 分钟; 其清洗液、缓冲液和色谱等度洗脱液均为 15% 甲醇 0.1% 甲酸溶液, 清洗液体积为 200 微升, 取样液滴大小为 30 纳升; 电喷雾流速为 240 纳升每分钟, 喷雾电压为 2.4 千伏。

在小鼠的脑、肝和肾切片中均检测处药物及其两种同分异构体代谢物的信号, 脑切片中药物分子的质谱信号强度显著高于代谢物的质谱信号强度, 而肝和肾切片中的代谢物质谱信号强度显著高于药物的质谱信号强度, 表明肝脏和肾脏对心得安的代谢能力显著高于大脑。并且心得安的代谢具有选择性, 代谢成芳香族羟基普萘洛尔葡萄糖醛酸苷 (Aromatic hydroxypropranolol glucuronide) 的量高于代谢成脂肪族羟基普萘洛尔葡萄糖醛酸苷 (Aliphatic hydroxypropranolol glucuronide) 的量。

本实施例证明该系统适用于实际生物切片的免前处理高通量代谢组分析和基于液相色谱-质谱技术的成像分析的应用。

实施例 3

图 4 是实施例 3 的在压力下将取样操作和进样操作合并进行的采用毛细管多功能集成化探针和整体色谱柱的色谱-电喷雾质谱分析系统的示意图。

图 5 是实施例 3 的在压力下将取样操作和进样操作合并进行的采用毛细管多功能集成化探针和填充色谱柱的色谱-电喷雾质谱分析系统的示意图。

该系统由一个基于毛细管的多功能集成化探针 1, 一套可移动的样品芯片 5 和密封片 7, 一个固定有样品芯片 5 的移动台 9, 一套具有梯度洗脱功能的流体驱动装置 6, 以及一台质谱仪检测装置 8 组成。图中箭头表示色谱流动相 12 的流动方向。采用具有弹性的材料, 如聚二甲基硅氧烷 (PDMS), 加工样品芯片 5, 使得样品芯片 5 可直接作为密封片 7 使用, 能够与多功能集成化探针 1 上的取样通道口 3 紧密接触并密封, 完成将原位取样操作和原位进样操作合并进行的操作。

多功能集成化探针 1 由毛细管加工而成, 外观呈 U 型, 包括流动相引入通道 2, 取样通道口 3 和色谱柱通道 4。取样通道口 3 位于 U 型弯折的底部外侧壁。毛细管内部腔体采用整体柱方法加工有色谱柱, 为方便色谱柱加工操作, 色谱固定相充满部分流动相引入通道 2, 全部的取样通道口 3 和色谱柱通道 4。

加工探针的毛细管的材料为熔融石英玻璃，横截面为圆形，内径为 75 微米，外径为 365 微米，其具体加工步骤如下：（1）首先在样品通过火焰加热对毛细管进行拉伸处理，得到一沙漏状结构段，其内径最小处为 20-40 微米；（2）通过火焰加热对毛细管进行弯折处理，得到 U 型的取样通道口 3 的雏形，沙漏状结构端内径最小处与 U 型取样通道口 3 底部的距离为 2 厘米；（3）在毛细管内通过原位热引发聚合的方法合成整体柱（图 4），或者采用在毛细管的色谱柱通道部分填充色谱固定相 11 的方法加工色谱柱（图 5）；（4）通过对毛细管沙漏状结构段最小内径处的切割，得到色谱柱通道出口 13，该出口作为电喷雾质谱检测装置 8 的喷针口使用；切割毛细管使毛细管探针 1 的流动相引入通道 2 的注入口与 U 型取样通道口 3 底部的距离为 9 厘米；（5）对毛细管外壁进行硅烷化处理，使其具有疏水性；（6）通过对取样通道口 3 的 U 型突出区域的顶端毛细管壁进行研磨得到完整连通的取样通道口 3，取样口 3 的形状为椭圆形，长直径 150 微米，短直径 75 微米。在毛细管探针 1 的 U 型取样通道口的外壁或者毛细管探针 1 的全部外壁涂覆或添加硬质胶黏剂，待胶黏剂固化后增加毛细管探针 1 的机械强度，以实现毛细管探针 1 与样品芯片 5 之间更高耐压的密封。

实施例 3 装置的具体使用方法如下：（1）首先在样品芯片 5 的样品 10 的区域加入液体样品 10，在样品 10 中加入试剂与其进行反应，反应后的样品反应液使其溶剂挥发，变为固体干点。（2）在 x、y 和 z 轴三个维度上的移动固定有样品芯片 5 的移动台 9，使多功能集成化探针 1 的取样通道口 3 与样品芯片 5 的样品 10 的区域紧密接触并密封；（3）保持多功能集成化探针 1 的取样通道口 3 与样品芯片 5 之间的紧密接触状态，启动流体驱动装置 6，将低洗脱能力的色谱流动相 12（如水或低浓度的甲醇或乙腈水溶液）从多功能集成化探针 1 的流动相引入通道 2 的注入口连续注入，经过取样通道口 3，流动相 12 溶解样品芯片 5 上样品 10 位置的固体样品 10，进入取样通道口 3 和色谱柱通道 4 内的色谱固定相 11 中，即样品 10 在取样通道口 3 的色谱固定相 11 上实现浓缩和富集；上述操作即为在压力下将原位取样操作和原位进样操作合并进行；（4）调节流体驱动装置 6，逐步使用洗脱能力更高的色谱流动相（如更高浓度的甲醇或乙腈水溶液），将进入色谱柱通道 4 内的样品 10 逐步洗脱分离，并经由多功能集成化探针 1 的色谱柱通道出口 13 喷出，在电场作用下离子化，进入质谱仪进行检测；（5）重复以上（2），（3）和（4）的步骤，完成样品芯片 5 上不同样品 10 的取样、进样与分析，或不同样品芯片 5 上样品 10 的取样、进样与分析。

多功能集成化探针 1 的加工和使用过程中，采用显微观察装置观察多功能集成化探针 1 和样品芯片 5 的情况。

实施例 4

图 6 是实施例 4 的采用整体模块加工以及填充色谱柱的多功能集成化探针的色谱-电喷雾质谱分析系统的示意图。

该系统由一个由硬质材料加工的多功能集成化探针 1，一个可移动的样品芯片 5，一个固定有样品芯片 5 的移动台 9，一套具有梯度洗脱功能的流体驱动装置 6，以及一

台质谱仪检测装置 8 组成。图中箭头表示色谱流动相 12 的流动方向。采用具有弹性的材料，如聚二甲基硅氧烷（PDMS）或聚四氟乙烯（PTFE）等，加工样品芯片 5，使得样品芯片 5 可直接作为密封片 7 使用，能够与多功能集成化探针 1 上的取样通道口 3 紧密接触并密封，完成将原位取样操作和原位进样操作合并进行的操作。

多功能集成化探针 1 由硬质材料，如聚醚醚酮（PEEK）材料或不锈钢材料，整体加工而成，外观接近倒三角形，包括流动相引入通道 2，取样通道口 3 和色谱柱通道 4。取样通道口 3 位于倒三角形的底部，取样通道口宽度为 100-200 微米。为方便加工，实施例 4 中的整体型多功能集成化探针 1 采用商品化的三通或四通装置改装而成。色谱柱 15 采用在 50 微米内径毛细管内填充 C18 色谱固定相 11 的方法预先在外部加工。外加工色谱柱 15 的出口做拉尖处理，以作为电喷雾质谱检测装置 8 的喷针。色谱柱 15 通过耐高压的小死体积接口固定在多功能集成化探针 1 上集成为一体，色谱柱 15 的通道与多功能集成化探针 1 的色谱柱通道 4 相连通，共同构成完整集成的色谱柱通道 4。

实施例 4 装置的具体使用方法如下：（1）首先在样品芯片 5 的样品 10 的区域加入液体样品 10，在样品 10 中加入试剂与其进行反应，反应后的样品反应液使其溶剂挥发，变为固体干点。（2）在 x、y 和 z 轴三个维度上的移动固定有样品芯片 5 的移动台 9，使多功能集成化探针 1 的取样通道口 3 与样品芯片 5 的样品 10 的区域紧密接触并密封；（3）保持多功能集成化探针 1 的取样通道口 3 与样品芯片 5 之间的紧密接触状态，启动流体驱动装置 6，将低洗脱能力的色谱流动相 12（如水或低浓度的甲醇或乙腈水溶液）从多功能集成化探针 1 的流动相引入通道 2 的注入口连续注入，经过取样通道口 3，流动相 12 溶解样品芯片 5 上样品 10 位置的固体样品 10，被溶解的样品进入取样通道口 3 和色谱柱通道 4 内的外加工色谱柱 15 内进口端的色谱固定相 11 中，样品 10 在外加工色谱柱 15 内进口端的色谱固定相 11 上实现浓缩和富集；上述操作即为在压力下将原位取样操作和原位进样操作合并进行；（4）调节流体驱动装置 6，逐步使用洗脱能力更高的色谱流动相（如更高浓度的甲醇或乙腈水溶液），将进入色谱柱通道 4 内的样品 10 逐步洗脱分离，并经由多功能集成化探针 1 的外加工色谱柱 15 的出口 13 喷出，在电场作用下离子化，进入质谱仪进行检测；（5）重复以上（2），（3）和（4）的步骤，完成样品芯片 5 上不同样品 10 的取样、进样与分析，或不同样品芯片 5 上样品 10 的取样、进样与分析。

权利要求书

1、一种基于多功能集成化探针的色谱分析装置，包括流体驱动装置以及检测装置，其特征在于，还包括：

用于承载样品的样品芯片；

具有流动相引入通道、取样通道口、色谱柱通道以及色谱柱通道出口的探针；流动相引入通道的出口与色谱柱通道的进口相连通，该连通处同时设有所述的取样通道口；

调整样品芯片与多功能集成化探针之间相对位置的移动台；

所述流动相引入通道入口与所述流体驱动装置相连，所述色谱柱通道出口与所述检测装置位置对应。

2、根据权利要求1所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，其特征在于，所述探针为集成流动相引入通道、取样通道口、色谱柱通道以及色谱柱通道出口于一体的结构。

3、根据权利要求2所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，其特征在于，所述的探针为由毛细管弯折而成的U型结构、V型结构、类似U型结构或者类似V型结构，该U型结构或V型结构的底部设有所述取样通道口，取样通道口两侧的毛细管部分分别为所述的流动相引入通道和色谱柱通道，色谱柱通道的流动相出口为所述的色谱柱通道出口。

4、根据权利要求2所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，其特征在于，位于探针内的色谱固定相充满部分流动相引入通道，全部的取样通道口和色谱柱通道；或者色谱固定相充满全部的色谱柱通道。

5、根据权利要求1所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，其特征在于，所述探针包括：

带有流动相引入通道、取样通道口以及色谱柱通道的探针本体；

以及一端置入所述色谱柱通道内的色谱柱，该色谱柱的流动相出口为所述的色谱柱通道出口。

6、根据权利要求1所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，其特征在于，所述流动相引入通道以及色谱柱通道呈U型、V型、近似U型、近似V型布置，所述取样通道口位于U型或V型的底部。

7、根据权利要求1~5任一权利要求所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，其特征在于，包括可用于密封所述取样通道口的密封片。

8、根据权利要求1~5任一权利要求所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，其特征在于，所述样品芯片顶面具有弹性或者将弹性密封材料加装于集成化探针装置的取样通道口处。

9、根据权利要求1~5任一权利要求所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，其特征在于，所述检测装置采用光学分析法，或者电化学分析法，或者质谱分析法，

或其它种类的分析方法，或者上述两种或两种以上检测方法的联用。

10、根据权利要求 1 或 2 所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，其特征在于，所述的探针为由毛细管弯折而成，在毛细管外涂覆或填充能够增加其结构强度的材料；或者所述的探针由固体材料或由微流控芯片整体加工而成。

11、根据权利要求 1~5 任一权利要求所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，其特征在于，所述流动相引入通道、色谱柱通道和取样口的内径或内边长范围为 0.05 微米至 1 厘米。

12、根据权利要求 1~5 任一权利要求所述的基于多功能集成化探针的色谱分析装置，其特征在于，采用多个多功能集成化探针，构成探针阵列。

13、一种样品分析的方法，其特征在于，采用权利要求 1~12 任一项所述的色谱分析装置进行分析：利用流体驱动装置在密封探针的取样通道口的条件下实现对探针内流动相的驱动；在常压条件下利用位于取样通道口处的液体或者在样品芯片密封探针取样通道口的条件下利用流经取样通道口的液体，溶解样品芯片的上承载的样品，进入色谱柱通道实现样品的进样；在密封探针取样通道口的条件下，利用流体驱动装置驱动流动相进入色谱柱通道的样品进行分离；利用所述检测装置实现对分离后样品的检测。

14、根据权利要求 13 所述的样品分析的方法，其特征在于，包括以下步骤：

(a) 将待分析样品加入到的样品芯片的上用于承载样品的微结构或微区域；

(b) 对样品芯片上的样品进行预处理和反应操作；

(c) 将样品芯片固定到移动台上，或者将多功能集成化探针固定到移动台上，或者将样品芯片和多功能集成化探针分别固定到不同的移动台上；

(d) 控制移动台移动使多功能集成化探针上的取样通道口与密封片相接触并实现密封；启动流体驱动装置，将色谱流动相从多功能集成化探针的流动相引入通道的进口注入，经过取样通道口，进入色谱柱通道，由色谱柱通道的出口流出；启动色谱系统的检测装置，获得稳定的检测信号；

(e) 暂停流体驱动装置，控制移动台移动使多功能集成化探针上的取样通道口与密封片脱离接触，并使取样通道口外形成的取样液滴与承载于样品芯片上的微结构或微区域的样品相接触，样品溶入取样液滴，利用取样液滴的表面张力、或者色谱柱通道内的毛细作用力、或者来自色谱柱通道出口的抽吸力或者色谱柱通道内的其他类型的抽吸力，将溶有样品的取样液滴通过取样通道口引入色谱柱通道及其中的色谱固定相内；控制移动台移动使多功能集成化探针上的取样通道口的取样液滴与样品芯片脱离接触；

(f) 控制移动台移动使多功能集成化探针上的取样通道口与密封片相接触并实现密封；启动流体驱动装置，将流动相从多功能集成化探针的流动相引入通道的进口注入，经过取样通道口，携带样品进入色谱柱通道及其中的色谱固定相中，对样品中的组分进行分离，样品中被分离的组分由色谱柱通道口流出；启动色谱系统的检测装置，获得被分离的样品组分的检测信号；

(g) 重复以上 (a) 至 (f) 的操作步骤, 完成芯片上不同样品, 或者同一样品的不同空间位置, 或者不同芯片上样品的取样与分析;

其中步骤 (b) 可省略。

15、根据权利要求 14 所述的样品分析的方法, 其特征在于, 包括以下步骤: 将上述操作步骤中的 (e) 和 (f) 操作替换为:

控制移动台移动使多功能集成化探针上的取样通道口与样品芯片上承载样品微结构或微区域相接触或相联通, 并实现取样通道口与样品芯片的之间密封; 启动流体驱动装置, 将流动相从多功能集成化探针的流动相引入通道的进口注入, 过取样通道口, 携带载于样品芯片上微结构或微区域的样品进入色谱柱通道及其中的色谱固定相中, 对样品中的组分进行分离, 样品中被分离的组分由色谱柱通道口流出; 启动色谱系统的检测装置, 获得被分离的样品组分的检测信号。

16、根据权利要求 13 所述的样品分析的方法, 其特征在于, 所述的样品芯片上所承载样品的种类为液体样品或者固体样品。

17、根据权利要求 13 所述的样品分析的方法, 其特征在于, 进行样品分析时, 所述的液体样品或者固体样品上述样品加到样品芯片上用于承载样品的微结构或微区域后, 直接利用多功能集成化探针进行样品分析, 或者加到样品芯片的微结构或微区域的样品先经过一系列样品预处理和反应步骤后, 再利用多功能集成化探针进行样品分析, 或者所述的液体样品或者固体样品在加到样品芯片之前在其他装置上进行样品预处理和反应。

18、根据权利要求 14 所述的样品分析的方法, 其特征在于, 减小色谱柱固定相到取样通道口之间的距离和死体积, 或者色谱柱的固定相加工或填充至流动相引入通道和取样通道口的部分或全部空间。

19、根据权利要求 14 所述的样品分析的方法, 其特征在于, 所述的携带或洗脱样品进入色谱柱通道进行分离分析的流动相的组成和流量, 与后续使用的色谱分离时所用的流动相条件相同或者不同, 或者使用气体流动相完成取样和进样操作, 然后再采用液体流动相进行色谱分离操作。

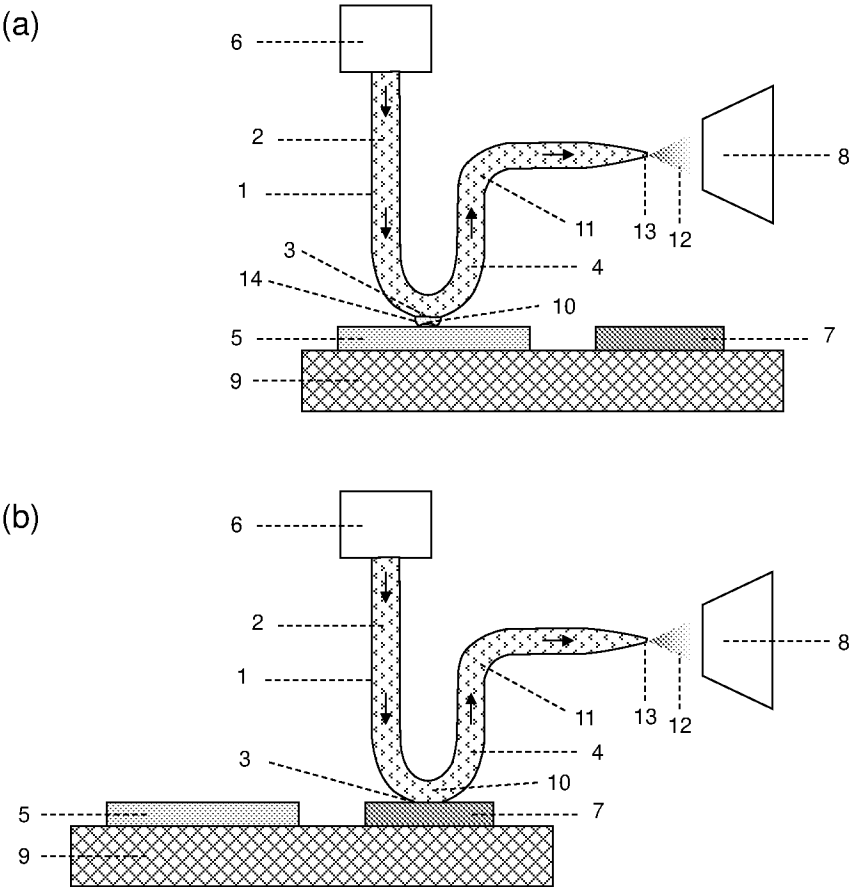


图 1

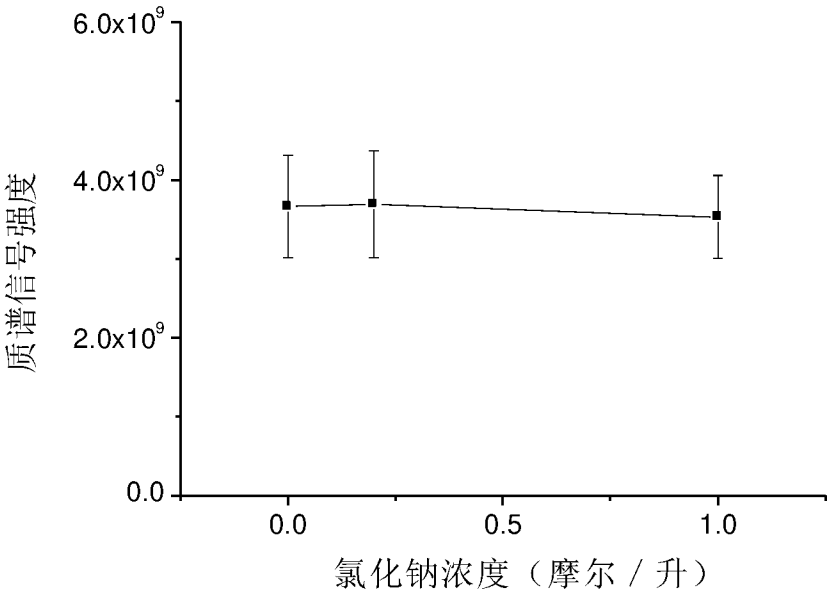


图 2

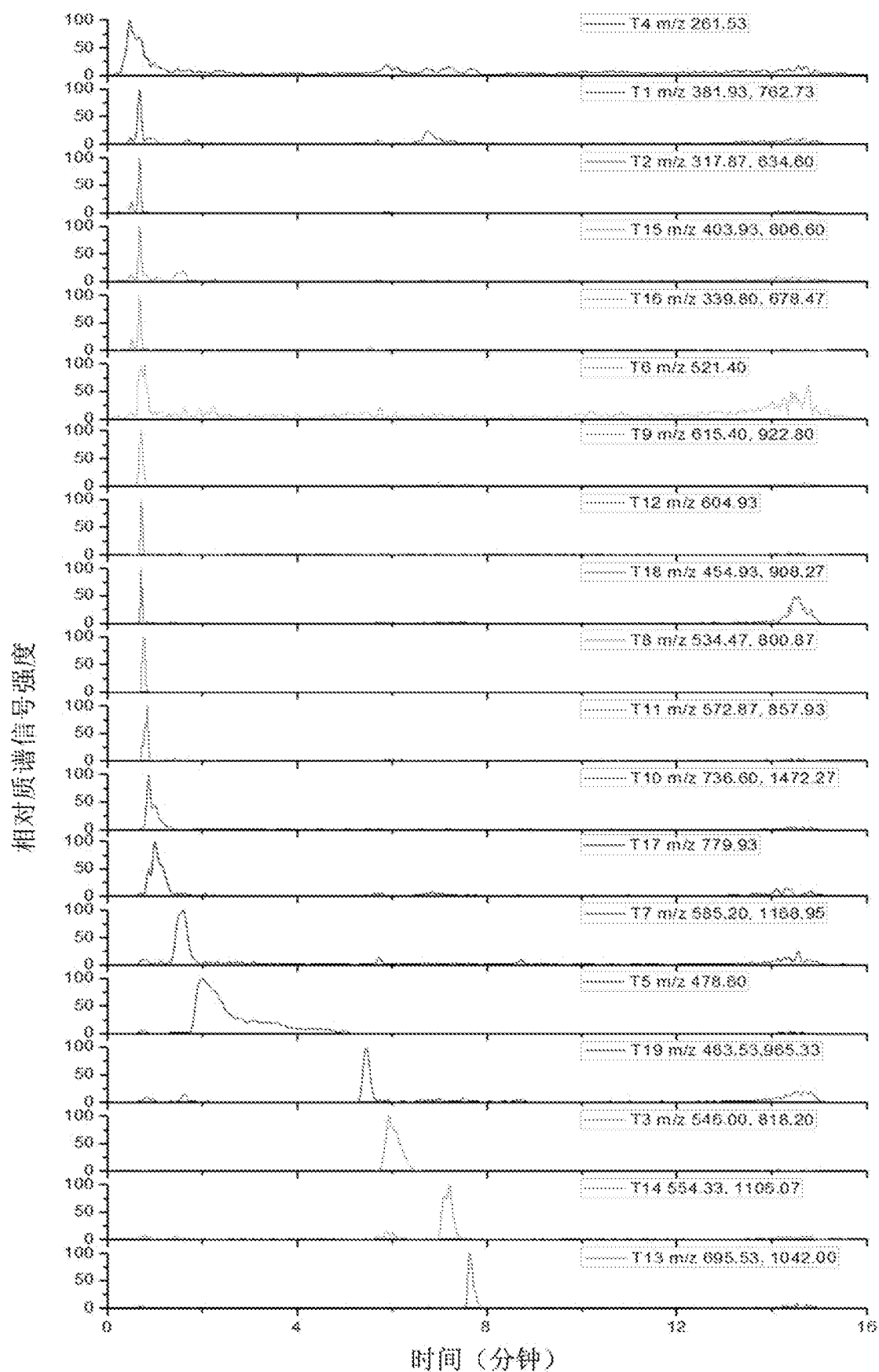


图 3

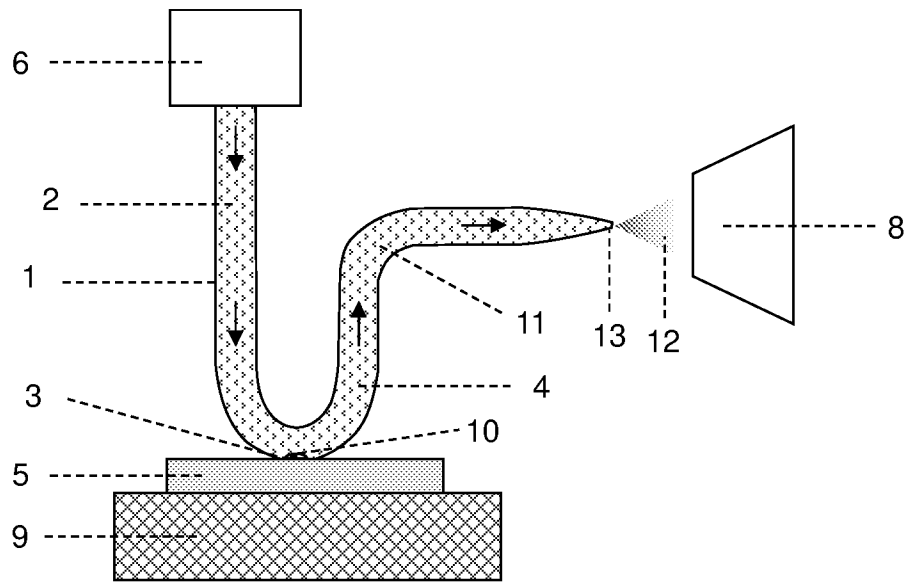


图 4

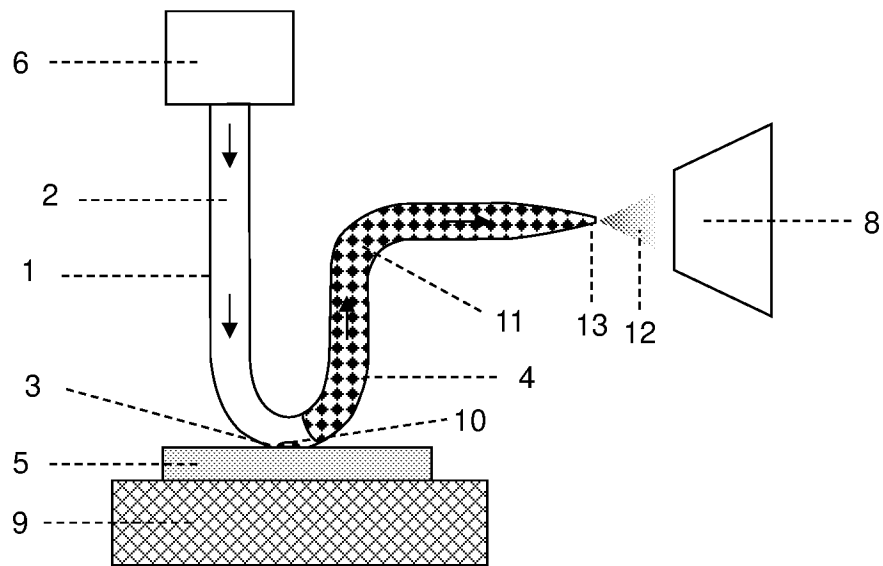


图 5

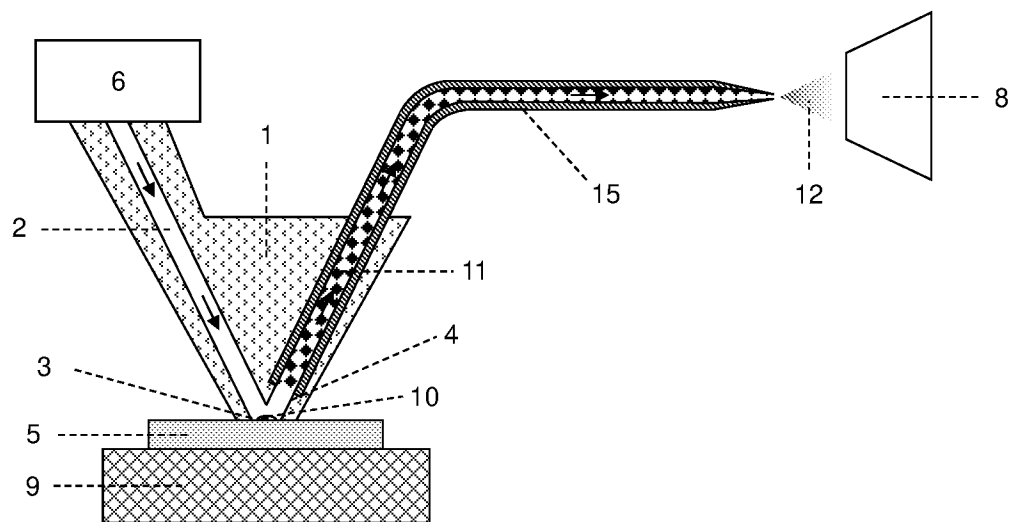


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/122343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI: 方群, 探针, 喷针, 毛细管, U形, U型, V形, V型, 弯折, 天鹅, 微流体, 微流控, 集成, 一体化, 色谱, 固定相, fangqun, qunfang, probe, needle, capillary, microfluidic, chromatogra+, stationary phase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 104392886 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 04 March 2015 (2015-03-04) description, paragraphs [0043]-[0046], claims 6-10, and figures 1-2	1-19
Y	CN 101666786 A (INSTITUTE OF RADIATION MEDICINE, ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES OF P.L.A.) 10 March 2010 (2010-03-10) description, page 6, claims 1-12, and figure 2	1-19
A	CN 108593755 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 28 September 2018 (2018-09-28) entire document	1-19
A	CN 107422059 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 01 December 2017 (2017-12-01) entire document	1-19
A	CN 1740779 A (FUDAN UNIVERSITY) 01 March 2006 (2006-03-01) entire document	1-19
A	US 2011220784 A1 (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 15 September 2011 (2011-09-15) entire document	1-19
A	JP 2005190767 A (MASUJIMA, T.) 14 July 2005 (2005-07-14) entire document	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 2020

Date of mailing of the international search report

26 February 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/122343

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104392886	A	04 March 2015	CN	104393886	B	04 January 2017
CN	101666786	A	10 March 2010	None			
CN	108593755	A	28 September 2018	None			
CN	107422059	A	01 December 2017	None			
CN	1740779	A	01 March 2006	None			
US	2011220784	A1	15 September 2011	EP	2545581	A1	16 January 2013
				WO	2011112268	A1	15 September 2011
				CA	2791047	A1	15 September 2011
				CA	2791047	C	02 January 2018
				US	8097845	B2	17 January 2012
JP	2005190767	A	14 July 2005	JP	4370510	B2	25 November 2009

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/122343

A. 主题的分类

G01N 30/02 (2006.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

WPI, EPDOC, CNPAT, CNKI: 方群, 探针, 喷针, 毛细管, U形, U型, V形, V型, 弯折, 天鹅, 微流体, 微流控, 集成, 一体化, 色谱, 固定相, fangqun, qunfang, probe, needle, capillary, microfluidic, chromatogra+, stationary phase

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 104392886 A (浙江大学) 2015年 3月 4日 (2015 - 03 - 04) 说明书第[0043]-[0046]段, 权利要求6-10, 附图1-2	1-19
Y	CN 101666786 A (中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所) 2010年 3月 10日 (2010 - 03 - 10) 说明书第6页, 权利要求1-12, 附图2	1-19
A	CN 108593755 A (清华大学) 2018年 9月 28日 (2018 - 09 - 28) 全文	1-19
A	CN 107422059 A (浙江大学) 2017年 12月 1日 (2017 - 12 - 01) 全文	1-19
A	CN 1740779 A (复旦大学) 2006年 3月 1日 (2006 - 03 - 01) 全文	1-19
A	US 2011220784 A1 (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 2011年 9月 15日 (2011 - 09 - 15) 全文	1-19
A	JP 2005190767 A (MASUJIMA, Tsutomu) 2005年 7月 14日 (2005 - 07 - 14) 全文	1-19

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 2月 19日

国际检索报告邮寄日期

2020年 2月 26日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

董春艳

电话号码 86-(10)-53962623

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/122343

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104392886	A	2015年 3月 4日	CN	104393886	B	2017年 1月 4日
CN	101666786	A	2010年 3月 10日	无			
CN	108593755	A	2018年 9月 28日	无			
CN	107422059	A	2017年 12月 1日	无			
CN	1740779	A	2006年 3月 1日	无			
US	2011220784	A1	2011年 9月 15日	EP	2545581	A1	2013年 1月 16日
				WO	2011112268	A1	2011年 9月 15日
				CA	2791047	A1	2011年 9月 15日
				CA	2791047	C	2018年 1月 2日
				US	8097845	B2	2012年 1月 17日
JP	2005190767	A	2005年 7月 14日	JP	4370510	B2	2009年 11月 25日