

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

塑膠薄型 微電動層析質譜晶片之研究與開發

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2113-M-040-004-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學分子毒理學研究所

計畫主持人：張耀仁

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

塑膠薄型 微電動層析質譜晶片之研究與開發

※※※

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫  
計畫編號： NSC 94-2113-M-040-004  
執行期間： 93 年 8 月 1 日 至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人： 張耀仁  
計畫參與人員： 李秉鐸，江福仁，陳品彧

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中山醫學大學 分子醫學毒理學研究所

中 華 民 國 95 年 10 月 29 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

# 塑膠薄型 微電動層析質譜晶片之研究與開發

## The development and study of polymeric thin-film electrochromatography microchips for mass spectrometry

計畫編號：NSC93-2113-M-040-005

執行期限：94年8月1日至95年7月31日

主持人：張耀仁 中山醫學大學分子醫學毒理學研究所

計畫參與人員：李秉鐸，江福仁，陳品彧

### 一. 摘要

近年來微小化的裝置發展得極為迅速，特別是微電泳晶片，由於其基本原理和毛細管電泳極為相似，除了樣品與緩衝溶液消耗量更少外，最吸引人的是其分析的時間大幅縮短：由以分計時變成以秒計時。早期的微電泳晶片大多製作在玻璃或矽晶片上，利用精良的半導體製程技術來刻挖微流道，然而半導體技術製作耗時，成本昂貴，並不符合經濟效應；塑膠材質便宜，又可以大量製造，因此塑膠微電泳晶片成了當前發展的主角。

本研究發展塑膠薄型之微電動層析質譜晶片，地一部份為開發「塑膠微電灑晶片」。實驗中發展微電腦切割方式來製作微管道，以得到良好的再現性。隨後以護貝技術進行晶片接合，大幅縮短晶片製作複雜度。其次我們利用塑膠薄層晶片具有剪裁容易之優點，直接採取在微管道出口端作裁剪來製作一體成形之質譜微電灑界面。我們發展出具有極微小泰勒錐電噴灑之尖型與斜角尖型質譜晶片。最後嘗試以上述的塑膠薄層質譜晶片，直接分析安非他命類藥物，並嘗試製作微層析管道，進行安非他命類藥物之分析。

關鍵字：塑膠電泳晶片，微電灑質譜晶片。

### Abstract

Recently, the development of chip-based separation devices with increased speed and reliability at reduced sample consumption, particularly the analysis time from minute scale to second scale in microchip electrophoresis. Because the fundamental and application of microchip is almost the same of capillary

electrophoresis, it growing rapidly. Most techniques used for fabrication of microanalytical devices were originally developed by the semiconductor industry. A disadvantage of those techniques is the time-consuming and expensive processing. Plastic substrates are promising alternatives for microchip electrophoresis due to low-cost and easier to mass replication, has witnessed a rapid growth.

In this study, a capillary electro-chromatography (CEC) microchip system with an integrated nanoESI was developed. The micro-channel is fabricated by computer assisted micro-blade, and sealed by lamination. Our protocols take advantage of simply fabrication process and less fabricating time and cost. Then the nano-ESI ionization emitter was directly cutting from the micro-channel end easily. By the way, it seems to reduce the process difficulty, and the nano-ESI chip formed very stable micro-Taylor core. Tapering and beveled edge tapering nano-ESI chip were developed and showed more sensitivity. With above mentioned, we use the nano-ESI chip to develop the chromatography chip. The application was tested for drugs of abuse under LCQ ion trap mass spectrometry.

### 二. 前言

毛細管電泳 (CE) <sup>1-2</sup>，具有進樣少、省溶劑、分離速度快與分離效率高的優點，再加上具有廣泛的應用性，近年將毛細管電泳微小化 <sup>3-4</sup>，成為微電泳晶片，也常常成為發展微縮實驗室晶片的初期目標。毛細管電泳微小化研究最初是利用半導體製程與微裝置 (microdevice) 技術，在玻璃、石英玻璃及塑膠等不同的材質上挖出毛細溝槽，發展為微電泳晶片，受到各界極大的重視。由於大多數的毛細管電泳本來就是在熔融石英 (fused-silica) 的毛細管中進行，對玻璃類材質的表面化學性質與電滲透流的掌控早就有充分的研究，再配合半導體微製程技術，挖出數十微米的毛細溝槽可說是水到渠成。早期的微電泳晶片都是在玻璃材質上，以濕蝕刻的方

式完成。而另一種不同於濕蝕刻的方式，稱之為「乾蝕刻」(dry etching)，相對化學性質的濕蝕刻，乾蝕刻雖花費較高，但其可得較具方正構形的管道。

微電泳晶片的基本原理和毛細管電泳極為相似，應用的層面也類似，除了其樣品與緩衝溶液消耗量大幅的減少外，最吸引人的是：其分析的時間大幅縮短：由以分計時變成以秒計時。以往的微電泳晶片大多是在玻璃材質上加工，藉由微影蝕刻等標準製程，進行光阻塗佈，烘烤，曝光，顯影，烘烤，蝕刻，去光阻等等製作。然而，玻璃材質昂貴，製作時複雜，除了需要精良的設備外，上下板黏合時需要極高的溫度與控制技術，可說是費工、費時、高經濟成本。

由於塑膠原料成本遠低於熔融石英材質，因此近年來已有許多研究選取塑膠作為晶片材質。在塑膠晶片的製程中，主要可分為微管道製作及晶片的接合塑膠材質成本低廉，挖製微管道容易，同時上下板黏合時，只需要攝氏 150 度以下低溫，又容易大量製造成為拋棄式晶片，因此成了當前微電泳晶片的發展重點<sup>5-9</sup>。然而這些方法普遍皆存有步驟煩複、時間冗長、以及所需器材較昂貴之缺點；特別在晶片測試階段，原型晶片的製作與改良十分不方便。

本研究將改進目前實驗室之塑膠薄層晶片製程，改以微機械切割方法，製作出更小尺寸的管道之塑膠微電泳晶片；接著利用薄層晶片「薄」與「易裁切」的特點，發展出微小泰勒錐之高效能微電泳質譜界面，最後嘗試進行微層析管道的製備。

## 二. 實驗方法：

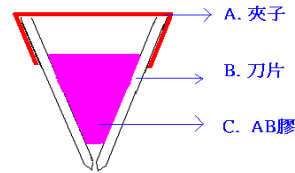
### 藥品及材料

本研究所用之護貝機購自台灣 L. A. Master 公司，打孔機由德國 KNOPEX 公司所生產，割膠刀片購自於美國 V. W. R 公司，單面護貝膠膜購自於台灣 MAS 公司，雙面 PE 護貝膠膜購自於日本 Lamin Card 公司，AB 膠購於台灣 G&Y 公司，電腦割字機來自於日本 Mimaki 公司，希得紙購於台灣永正公司，電源供應器購自於美國 EG&G 公司與美國 SPELLMAN 公司，methanol 購自於美國 Sigma 公司，測試染料為好比牌的藍色速乾油性筆，安非他命標準品購於美國 Cerilliant 公司，質譜儀為 LCQ ( Thermo Finnigan )離子阱式液相層析質譜儀。

### 管道製作技術

在塑膠薄層電泳晶片管道製作技術的研究，首先是採取刀片切割法，以特製刀片直接於薄膜上切割出微管道。特製刀片是由兩片厚約 100 μm 的生化實驗切膠之刀片粘合而成，首先用夾子將

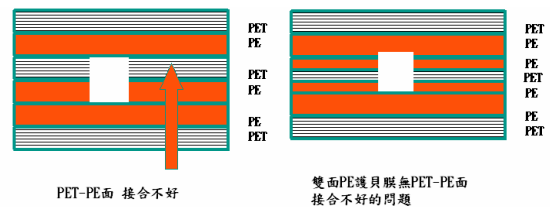
兩片割膠刀片做初步固定，再塞入 AB 膠，使兩刀片呈現一固定夾角，以拉近兩刀片尖端的間距，來達到縮小割出管道尺寸之目的，如圖 1 所示。切割出的管道寬度約在 80 至 90 μm 之間。



圖一 切割刀具之製備圖

### 塑膠晶片材質

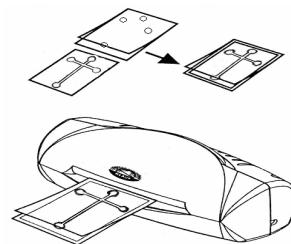
塑膠晶片採用之材料，其結構是由一層 PET (Polyethylene terephthalate) 加上一層 PE (Polyethylene) 所組合而成；由於在晶片接合時，是藉由膠 PE 材質在加溫的情形下溶解，造成年何的效果，而在兩層 PE 間形成緊密結合。實驗發現塑膠晶片的組合中，PE-PE 接面是緊密結合，但另一面為 PE-PET 接面則較不牢靠，在受到壓力時極易裂開。因此，改用了雙面 PE 之護貝膠膜 (PE + EVA + PET + EVA + PE) 來作為晶片基材，而解決了塑膠晶片接面不牢靠的問題，如圖 2 所示。



圖二 塑膠晶片多層式接合方法示意圖

### 晶片接合技術

在晶片接合則採取『護貝』接合法，將切割好管道之護貝膠膜夾於兩片護貝膠膜之中，再送入護貝機中重複進行兩次護貝即可，如圖 3 所示。整個接合工作費時約 10 秒鐘，十分簡單而無技術上之考量。



圖三 塑膠晶片之接合

## 管道切割之改良:電腦切割法

我們使用電腦切割機來改進微管道切割的再現性。有別於手動切割方法，以電腦切割機切割的特點在於有較好的精確度與定位能力。整個切割方法，是在繪圖軟體 CorelDraw 上繪製所需圖形，利用電腦連線，在機械操作面板上刀壓和刀速之調整，控制切割刀沿著微管道圖形的輪廓進行切割。

## 塑膠薄層質譜界面之製作:

由於塑膠薄層晶片具有剪裁容易之優點，因此我們可直接採取在微管道出口端進行裁剪，來製作質譜界面。製作步驟為：首先在雙層護貝膠模上切割出管道，再以打孔機製作出樣品儲存槽，接著套入上下兩層膠模進行護貝黏合，最後以銳利之剪刀或手術刀裁剪出尖頭，以作為電噴灑噴頭。

一般在微管道所需的導電電極，通常以真空金屬濺鍍或者為網板印刷等方式將金屬鍍於晶片上做為電極，然而這些方式通常都有製程繁瑣及價格昂貴的缺點。直接將電極置於樣品槽內，是以往電噴灑時常用的方式。然而，進行微電泳晶片電噴灑時，所需要的電極往往不止一個，因此需要製作導電電極於毛細管出口處。目前我們電泳晶片發展有兩個電極製作方法：塗碳法與不接觸導電法。塗碳法製程為：首先以在末端管道旁之膠膜上，以油漆筆塗佈（以便於碳層之沾附），接著利用碳筆塗佈作為導電之用，並在延伸一段鋁箔以便於電壓的施加。而若作為電泳晶片或電動層析晶片使用時，則要採低電阻電極之設計。

## 四. 結果與討論

由於塑膠薄層電泳晶片與一般傳統之塑膠電泳晶片在材質及製程上有相當大之差異，因此在研究過程中也遭遇到許多新的問題。在實驗室先前的研究中，已發展出薄層晶片大致製程。但在晶片的黏合與管道尺寸、再現性上仍還存在著問題。本研究進一步採取微機械切割技術去改良原本的手工切割方式，提升微管道製作的精密度，製作出更小的微管道，以提升分離的效率，並增進製成管道的再現性，朝向商業化的目標進行。

為了增加切割的再現性，我們嘗試使用電腦切割機來切割製作微管道，我們發現日本 Mimaki 公司所生產的 CG-160FX 電腦切割機有小巧與高精密度的優點。整個切割方式，是先繪圖軟體 CorelDraw 上繪製所需圖形，隨後在機械操作面

板上調整刀壓和刀速，啟動電腦連線，切割刀即沿著圖形的輪廓進行切割，整個切割的定位，是靠著機械平台上方的步進馬達驅動切割刀做 X 軸的左右移動；靠著平台底部的滾輪和其上方小滾輪將切割的紙張夾緊固定，並由機械底部步進馬達的輸出，驅使底端滾輪做轉動，藉此將切割紙張做 Y 軸的前後移動藉由這 X 軸與 Y 軸兩個馬達的傳動，切割刀就可沿著電腦繪出圖形輪廓做精準定位切割，整個切割過程約只需幾十秒鐘。

我們以繪圖軟體 CorelDraw 繪製出微管道圖形，為了評估切割出微管道尺寸，實驗先設定 100  $\mu\text{m}$  微管道為切割目標，累積經驗後，再去嘗試更小的微管道切割。我們先切割的 100  $\mu\text{m}$  寬，5cm 微管道，在管道的 0.5、2.5、4.5 公分處進行寬度測量，評估其平均值與相對標準偏差。隨後再切割四次評估其再現性。我們首先直接將雙面 PE 護貝膜夾緊固定於切割機上做切割，但發現護貝膜太薄太軟，無法承受刀切的力量，造成切割失敗，無法切割出圖形。因此，實驗朝向加強固定護貝膜，以承受刀切割的力量來加以改進。

我們以有較有黏性的希得貼紙（永正 series 5000），來固定塑膠晶片，實驗發現因為希得貼紙太黏，PE 膜雖然切割良好，但割完不易撕下。單面固定不可行後，我們改用雙面固定的方法，以較不黏的希得貼紙（永正 series 3000）將 PE 膜包覆做雙面固定，藉由上下兩層黏力增加固定的力量。測試結果發現，可得到管道寬度分別為 103.3 $\pm$ 12.5  $\mu\text{m}$ 、101.6 $\pm$ 7.5  $\mu\text{m}$ 、95.5 $\pm$ 8.5  $\mu\text{m}$ 、102.5 $\pm$ 10.75  $\mu\text{m}$ 、97.5 $\pm$ 11.5  $\mu\text{m}$ ，再現性在 5% 內，但寬度差異並不佳。

寬度差異可能來自以手工黏合，為了減低三層間不易平整的問題，我們將下層的希得紙利用雙面膠再多黏上一片材質較硬的 PET 薄板，將整體膠膜平整化。實驗結果發現：管道寬度差異不但更小，寬度也下降，為 87.5 $\pm$ 5  $\mu\text{m}$ 、87.5 $\pm$ 5  $\mu\text{m}$ 、85 $\pm$ 6.25  $\mu\text{m}$ 、89.1 $\pm$ 0.1  $\mu\text{m}$ 、88 $\pm$ 2.5  $\mu\text{m}$ ，管道的寬度偏差約在 3%，而切割 5 次管道之再現性誤差約為 3% 左右。

因此我們找到理想的固定模式後，得到不錯的精密度與再現性後，隨即朝著切割出更小微管道的目標邁進。我們發現軟體設定 100  $\mu\text{m}$  微管道的切割圖形，會切割出約 87  $\mu\text{m}$  的微管道。而當設定 80  $\mu\text{m}$  微管道做切割，得到的微管道分別為 54.1 $\pm$ 6.25  $\mu\text{m}$ 、50 $\pm$ 1.5、51.6 $\pm$ 2.5、49.1 $\pm$ 1.25、53.3 $\pm$ 1，可切割出大約為 50  $\mu\text{m}$  的微管道，管道的誤差約在 5%。而當於繪圖軟體上繪製 50  $\mu\text{m}$  微管道，切割結果約為 38  $\mu\text{m}$  的微管道，但切割失敗的比率很高，因此 50  $\mu\text{m}$  的微管道似乎是該機種之機械切割法的極限。



## 質譜界面之研發

要成為一個實用且可信賴的微電灑質譜界面，需要許多的考量，例如：如何在毛細管末端形成良好堅固的導電界面、如何最佳化毛細管末端的針尖與改變毛細管的內部表面性質，使得流速能同時符合穩定的電灑及有效率的分離。

置入微電灑針頭與一體成形之尖型的電灑法質譜界面是電灑晶片是目前較常見的兩種設計<sup>16-18</sup>。置入微電灑針頭的設計需放入數十微米左右的拉尖毛細管針頭，雖其自拉針頭的難度雖較高，但目前極易買到商業化之拉製針頭；然而，其易產生滯留體積，仍不易克服。

一體成形之尖型的電灑法質譜界面，近年來逐漸受到重視。由於塑膠薄層晶片具有剪裁容易之優點，因此我們採取直接在微管道出口端作裁剪的方式來製作質譜界面，以銳利之剪刀或手術刀裁剪出尖頭，即可進行電噴灑噴頭的測試。

測試分成兩方面，首先我們在顯微鏡下觀察，利用架設了一個模擬的微電灑噴灑裝置，來觀察泰勒錐的產生情形。雖然此模擬裝置和真實的質譜儀是有些差異的，但已能幫助我們觀察泰勒錐的形成，從而改進我們製作的塑膠薄層晶片的微電灑界面。微拍照系統的架構如下：整個裝置放置於顯微鏡平台上，在距離晶片尖端1-2mm處有一接地之金屬微片作為相對電極，上方裝有顯微鏡拍攝系統，來紀錄晶片尖端泰勒錐變化的情形。我們使用小型CCD (Charged Coupled Device)攝影鏡頭裝置於顯微鏡上，所得到的訊號則傳送到電腦中的影像卡，透過影像處理程式作適當的處理，並加以觀察、拍攝與分析。

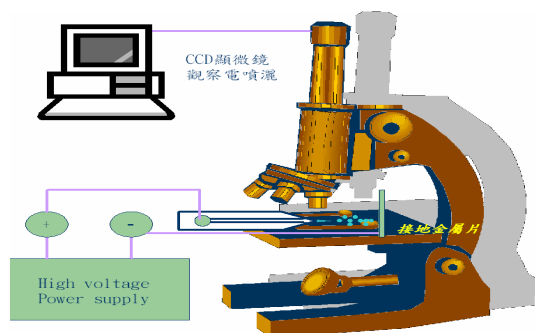
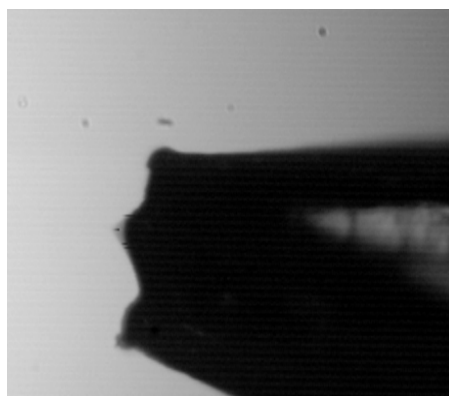


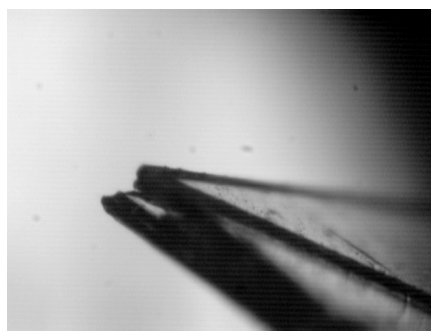
圖4 微電灑觀測之顯微裝置

我們以針筒將溶液推送並充滿著整個管道中後，慢慢加高電壓以開始進行電噴灑。在電噴灑過程中，隨著電壓的逐漸增加，噴嘴之尖端也漸漸出現泰勒錐；當電壓加至1.2 kv時，開始出現電噴灑現象，形成微電灑泰勒錐底部約為 $50\mu\text{m}$ 左右，如圖4所示。



圖五 尖型塑膠薄層質譜晶片之電灑側視圖。

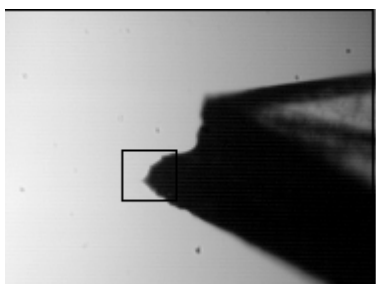
雖然尖型微電灑法質譜界面可產生電噴灑現象，然而所生成的泰勒錐底部卻有 $50\mu\text{m}$ 大小。一般而言，在進行低流量的微電灑質譜分析時，其穩定度與靈敏度將會較差；通常需具有 $20\mu\text{m}$ 外徑的噴頭出口，才有足夠的性能。由文獻可知，以較為粗壯的「斜口」毛細管噴頭(其噴頭外徑約為 $100\mu\text{m}$ ，內徑約為 $70\mu\text{m}$ ，尖端呈現45度的削角)來進行無鞘流毛細管電灑質譜，其靈敏度與外徑 $20\mu\text{m}$ 毛細管尖端口徑的效果極為相似。因此在無法割製出更小毛細管道情形下，我們進行斜口(bevel angle)<sup>19</sup>之微電灑噴嘴設計。相較於在融溶石英毛細管尖端，削切出所需要的角度的不易，我們可以極輕易的利用刀片，在尖型塑膠薄層微電灑法質譜界面上裁出所需要的角度，如圖5。



圖六 剪裁成斜角尖型之電灑晶片

我們利用微拍攝系統，觀察其微電噴灑情形，我們發現：甲醇液體會於斜口尖端形成極小的微電灑現象，其泰勒錐底部約 $5\mu\text{m}$ 。而我們更發現在不同斜口角度，如15度、30度、45度、60度差異不大，皆可產生 $5\mu\text{m}$ 左右的泰勒錐的微電灑現象。當塑膠微電噴晶片切出斜口時，與先前文獻所使用的毛細管尖端一樣，在微小流量下，在出口處尚無法累積產生泰勒錐及電噴灑時，液面即流至斜角尖端；由於斜角提供極尖的角度，其表面張力較小，液滴順著斜角產生極小的泰勒錐，進而形成穩

定的微電噴灑。



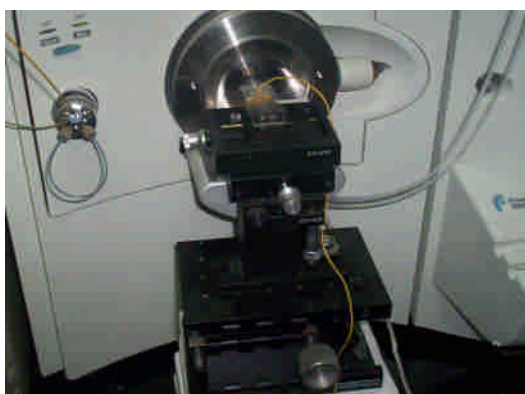
圖七 斜角尖型晶片之電噴灑側視圖。

越尖的尖端因可產生越微小泰勒錐電噴灑，但整個尖端的厚度也影響著泰勒錐的大小，因此將尖端進行斜切，可製造更小的泰勒錐。我們使用刮膠刀片去削切出更銳的尖端面，果然如預期的，在更小更尖銳的斜角尖端形成了約  $5\mu\text{m}$  的微小泰勒錐之微電噴灑現象。

總之，尖型和斜口尖型晶片噴嘴所皆可產生極小的泰勒錐電噴灑，側邊噴灑的斜口尖型晶片噴嘴，在製作上較簡單方便，只需在平頭管道旁做裁尖和斜切，便可製作出微電灑法噴嘴，在管道旁製作出微電噴灑噴嘴大大的減低製作上的難度。

#### 塑膠薄層質譜界面之測試

在完成了電噴灑泰勒錐的觀察後，我們將微電灑晶片實際應用於質譜分析上；首先我們將LCQ質譜儀之ESI裝置拆除，隨後將測試的微電噴灑晶片固定於XYZ三度空間微調器上，貼近於加熱毛細管(取樣孔)，如圖10所示；接著在晶片進樣槽加入高電壓，以取樣孔做為相對電極，形成電噴灑，藉由微調器做最適距離的調整，產生最佳的信號強度。



圖八 (上)微電噴灑晶片架設於LCQ質譜儀前(下)晶片與加熱毛細管(取樣孔)處之放大圖

我們以藍色染料溶液( $m/z$ 為478)做為測試標準品，我們發現斜口的噴頭，其訊號強度較尖形界面高了3倍左右，而與LCQ質譜儀之標準ESI裝置相比，訊號高了近10倍左右。

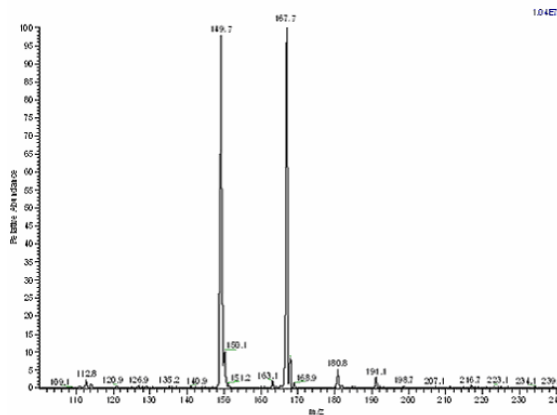
微電灑晶片可直接進行藥物分析，透過MS/MS和MS/MS/MS之偵測，分別得到的裂解離子訊號，並提高靈敏度。例如：濫用藥物之尿液分析一般是使用氣相層析質譜儀(GC/MS)進行確認檢驗，當使用液相層析串聯質譜儀，可減少氣相層析質譜儀所需的衍生化等繁瑣前處理，節省時間，並能得到可靠的結果。實驗發現直接分析甲基安非他命的偵測靈敏度，即可達到  $1\text{ng/ml}$ ，而若以MS/MS和MS/MS/MS方式偵測將比氣相層析質譜儀更為靈敏。

#### 塑膠層析質譜晶片之發展

結合層析與質譜界面，對於實際應用有極大的幫助，因此我們進一步發展微層析管柱於目前之微電灑晶片上。一般而言，插入式微電灑晶片由於其針頭為只有數十微米左右的拉尖毛細管針頭，因此可利用針筒加壓式製備法，小心加壓填充C18粉末溶液。然而，述本研究發展的一體成形之微電灑質譜界面，由於出口較大，製作電動層析管柱，反而不如「插入微電灑針頭」晶片。

我們仍是嘗試以注入高分子單體溶液(牙科材料)後以UV光照射來製成管柱，或只是以高分子單體照UV光後，製成frit後灌入C18溶液，來製作層析管柱。

不過，注入高分子單體溶液(牙科材料)後以UV光照射來製成管柱方式，在實驗中極易產生氣泡。製成frit後灌入C18溶液，來製作層析管柱，成功率較佳，但有frit與晶片易破裂的缺點。



圖九 500ng/ml安非他命與甲基安非他命之質譜晶片之分析圖

## 5. 結論

為了突破傳統晶片製作繁瑣之缺點，本研究採用塑膠薄膜為微電泳晶片材料，輔以機械刀具切割出微管道，及簡易操控之護貝技術作晶片接合工作。與其他塑膠晶片製程相比，薄層塑膠晶片具有以下特點：管道製程難度低，由原來三度空間降低成兩度空間的製程，其次，整個製程十分快速，切割與熱護貝只需數分鐘即可完成。

在薄層塑膠微電灑質譜界面晶片之發展上，我們利用了薄層「薄」與「易裁切」的特性，以簡單的剪裁，發展了高效能，具有極微小泰勒錐電噴灑之尖型與斜口尖型質譜晶片，最後嘗試進行微層析管道的製備，並進行安非他命類藥物之分析。

## 參考文獻

- J.W.Jorgenson, K.D.LuKacs *Anal. Chem.*, 1981, 53, 1298-1304.
- Li, S. G.Y. *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*. Elsevier: Amsterdam, 1992.
- H. Fan, D. J. Harrison, *Anal. Chem*, 1994, 66, 177-184
- L. E. Locascio, C. E. Perso, C. S. Lee, J. *Chromatography. A*, 1999, 857, 275-284
- L.Martynova, L. E. Locascio, M. Gaitan, G. W. Kramer, R.G. Christensen, W.A. MacCrehan, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4783-478
- R. M. McCormick, R. J. Nelson, M. G. Alonso-Amigo, D. J. Benvegna, H. Hooper, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2626-2630
- C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, G.M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 4974-4984.
- J. C. McDonald, M. L. Chabiny, S. J Metallo, J. R. Anderson, A. D. Stroock, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 1537-1545.
- M. A. Roberts, J. S. Rossier, P. Bercier, H. Girault, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2035-2042
- M.Galloway, W.Stryjewski, A. Henry, S.M. Ford, S. Llopis, R.L. McCarley, S.A. Soper, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2407-2415
- J.S. Kim, D. R. Knapp, *Electrophoresis* 2001, 22, 3993-3999
- S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B. Coutny, R.J. Warmack, J.M. Ramsey, *Anal.Chem.*, 1994, 66, 1107-113
- J.H. Wahl, D.C. Gate, R.D. Smith, *J. Chromatogr.*, 1994, 659, 217-222.
- D. Figeys, I.V. Ostveen, A. Ducr, R. Aebersold, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 1822-1828
- M.S. Kriger, K.D. Cook, Durable G *Anal. Chem.*, 1995, 67, 385-389.
- J. C. Severs, R.D. Smith, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2154-2158
- J.N. Alexander, G.A. Schultz, J.B. Poli, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1998, 12, 1187-1191
- D.R. Barnidge, S. Nilsson, K.E. Markides, H. Rapp, K. Hjort, *Metallized, Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1999, 13, 994-1002
- Y.Z.Chang, Y. R. Chen, and G. R. Her, *Anal.Chem.*, 2001, 73, 5083-5087
- T.Y. Wu, M.R. Fuh, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005; 19: 775-780
- Yu, C., Davey, M. H., Svec, F., Frechet, J. M. *Anal. Chem.* 2001, 73, 5088-5096.
- Lazar I.M. Li L.Yang Y. Karger B. *Electrophoresis* 2003, 24, 3655-3662
- Slentz B.E, Penner N.A, Regnier F.E. *J Chromatogr A*. 2003 10;984(1):97-107.
- Lapos, J. A.; Manica, D.P.; Ewing A.G. *Anal. Chem.* 2002, 74, 3348-3353
- Figeys, D.; Aebersold, R. *Anal. Chem.* **1998**, 71, 3721-3727.
- Hayes, J. D., Malik, A., *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4090-4099
- Ishizuka, N., Kobayashi, H., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Hirao, K., Hosoya, K., Ikegami, T., Tanaka, N., *J. Chromatogr. A* 2002, 960, 85-96.
- Zhang, S., Huang, X., Zhang, J., Horvath, C., *J. Chromatogr. A* **2000**, 887, 465-477