



# 可丟棄式塑膠薄型電泳晶片之研究開發：

## 電化學偵測與質譜界面之製作

### The development of disposable polymeric thin-film electrophoresis microchips for electrochemical detection and mass spectrometry

計畫編號：NSC93-2113-M-040-005

執行期限：93年8月1日至94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：吳雅雪，湯家麟，李秉鐸

#### 一. 摘要

微小化的分析晶片已成為現今一重要的研究方向；微小化可使得分析物消耗量及分析時間大幅減少，對醫療檢驗、基因分析、新藥開發等分析可說是十分重要。本研究之塑膠薄層電泳晶片，採用切割的方式切割出微管道，再配合護貝技術做晶片接工作；將原來三度空間製程降低成二度空間，在製作晶片時完全不需要考慮到深度問題，有簡化製程、大幅縮短晶片製作時間、以及降低製作成本之優點。在本研究中，我們嘗試了塑膠薄層電泳晶片之微管道製作，以電腦切割與軌道式刀片切割方式，提升了微管道的精密度與再現性。接著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，大大的降低製作的難度。我們發展出具有極微小泰勒錐電噴灑之斜口尖型與側邊噴灑的斜口尖型質譜晶片；其中，側邊噴灑的斜口尖型質譜晶片，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。最後以上述的塑膠薄層質譜晶片，改裝成無接觸式電導與奈電灑游離法偵測，來進行直接分析於濫用藥物尿液之分析上。

**關鍵字：**毛細管電泳，塑膠電泳晶片，微電灑質譜晶片。

#### Abstract

The miniaturization of analysis chip has already become a new research trends; Indeed, such devices allow decreasing both the consumption of analytes and the duration of analyses for medical analysis, gene analysis, new medicine development etc, and also it is very important for the researches above-mentioned. In this study, we developed a novel process for polymeric thin-film electrophoresis microchip. The micro-channel is

fabricated by micro-blade, then sealed by lamination without considering the depth of micro channel. It reduces manufacture process from the 3-dimension to 2-dimension in CE chip fabrication. By this way, we take advantage of simply fabrication process and less fabricating time and cost. In addition, we have improved the fabrication of micro-channel. by used the computer assisted mechanical micro-blade. Then we make the nano-electrospray ionization (ESI) chip by directly cutting out 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. Two type nano-ESI chip: beveled edge and the side beveled edge were developed and showed more sensitivity. The side beveled edge of nano-ESI chip take advantage of simply fabrication process, only need to cut a sharp nozzle with the truncate channel end side. With above mentioned, we use the nano-ESI chip to develop the electrochemical, contactless conductivity and nano electrospray ionization. The application for drugs of abuse in urine were tested 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。

本研究利用本實驗室先前建立「非半導體」式塑膠薄層晶片之快速製程，以簡單的微機械切割技術，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。

## 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，導電銅箔膠帶購於大鋅企業有限公司，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。

本研究之薄層塑膠電泳晶片乃採用一般市面上之護貝膠模(PE/PET)作為晶片基材，採多層護貝膠模結合而成。首先以特製之刀片在第二層膠模上切割出微管道，在管道切割過程中，刀片切割的角度，以及薄膜的固定都會影響到管道的成形。接著以打孔機在第一及第二層膠模上打孔，最後以護貝機作接合將切割好管道之薄膜夾於兩片護貝膠膜之中，再送入護貝機中做護貝工作即完成。整個接合工作費時約 3 秒鐘。護貝完成之晶片再將剪裁後的塑膠微量吸管頭黏上孔洞，以便於施加電壓及存放樣品及緩衝液。

由於塑膠薄層晶片具有剪裁容易之優點，因此我們直接在微管道出口端作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美工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式內，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。目前我們發展有兩個製作的方法：塗碳法與不接觸導電法。塗碳法製程為：首先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，接著做護貝黏合，以裁切出電噴灑噴頭。

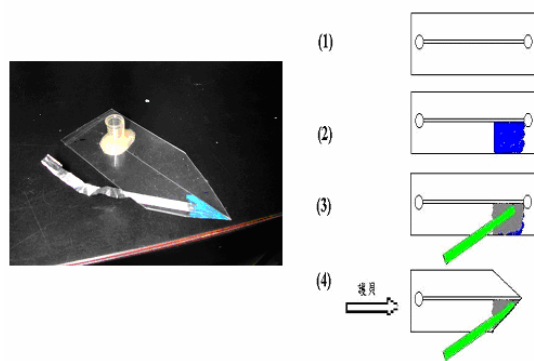


圖 1 塗碳電極晶片(左)為塗碳電極晶片成品圖(右)為製作流程圖

不接觸導電法製程為：利用 40  $\mu\text{m}$  銅箔或鋁箔金屬膠帶，直接貼於製成的質譜晶片出口上端，在加高電壓時利用薄壁的特點，讓電壓通過薄層形成通路，與真空界面形成一相對電極，如圖 2 所示。我們以分子量 478 之藍色染料做電噴灑質譜試驗，與原先的電噴灑方式去做比較，在相同電壓下，整體信號強度並沒有敏顯的落差。



圖 2 非接觸式電極之微電噴灑電泳晶片

## 四. 結果與討論

### 塑膠薄層電泳晶片之研發

90 年代末期，微電灑法界面蓬勃的發展<sup>12-15</sup>，帶來了許多新的發展，除了可提供高靈敏度的超低流速微量分析外，銜接毛細管電泳無鞘流界面與微電泳晶片，則是另一類重要的發展。然而，要成為一個實用且可信賴的界面，還需要在許多的考量，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。

電灑噴頭的末端與電灑的穩定度有很大的關係；一般而言，目前商業化的電灑法噴頭大多使用外徑之 100 至 200 微米的毛細管，以避免放電現象，增加使用的範圍。而近年來蓬勃發展的微電灑法，例如：Microspray、Nanospray、Picospray，則需使用數十微米左右的拉尖毛細管針頭。本研究發展出的塑膠薄層電泳晶片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作裁剪的方式來製作質譜界面，大大的降低製作的難度。

### 尖型塑膠薄層質譜界面之製作

在目前的文獻中，插入微電灑針頭與一體成形之尖型的電灑法質譜界面是最常見的<sup>16-18</sup>。不過插入微電灑針頭的設計易產生滯留體積，因此一體成形之尖型的電灑法質譜界面漸漸受到重視。在我們的塑膠薄層電泳晶片，製作尖型的電灑法質譜界面是十分容易的：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美工刀裁剪出尖頭以作為電噴灑噴頭。

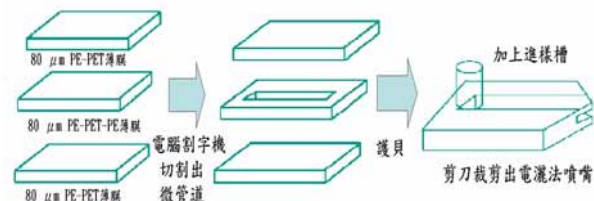


圖 3 尖型塑膠薄層質譜界面晶片製作流程圖

在進行質譜儀測試前，我們想先觀察其泰勒錐的產生情形。觀測微電灑法之泰勒錐變化是一件極重要的事，觀察泰勒錐變化的中，除了可以使我們更深刻的瞭解微電灑法原理，更可以推測噴頭在質譜測量時的靈敏度。我們在顯微鏡下架設了一個微電灑噴灑裝置，來觀察泰勒錐的產生情形。雖然此微裝置和真實的質譜儀取樣孔是有些差異的，但已能幫助我們了解泰勒錐的形成，從而判斷我們製作的塑膠薄層晶片的微電灑界面之優缺點。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。我們以空氣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。

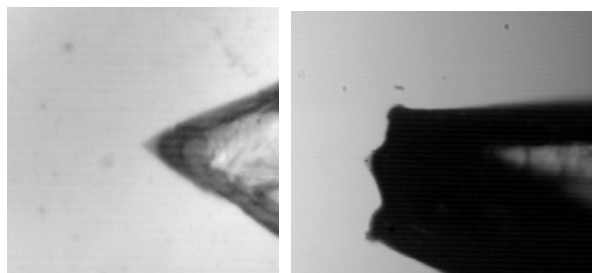


圖 4 尖型塑膠薄層質譜界面晶片電噴灑圖(左) 電噴灑俯視圖 (右) 電噴灑側視圖

### 斜口之尖型塑膠薄層質譜界面

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泳質譜分析時，其穩定度與靈敏度將會較差，一般而言需具有 20  $\mu\text{m}$  外徑的噴頭出口，才有足夠的性能。

除了割製出更小毛細管道外，利用斜口

(bevel angle)<sup>19</sup>之微電灑噴嘴設計似乎是另一可行的方法。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泳質譜，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。

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。

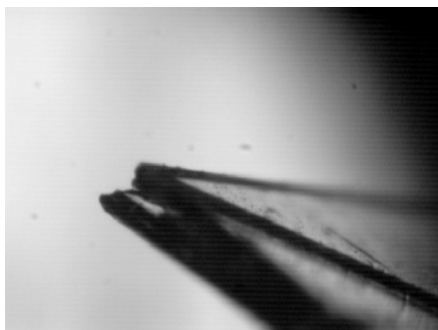


圖 5 剪裁成斜口尖型之電灑晶片

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、 $60$  度皆可產生  $5\ \mu\text{m}$  左右的泰勒錐的微電灑現象。

為何會產生這種極小泰勒錐的微電灑現象，我們推測：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。

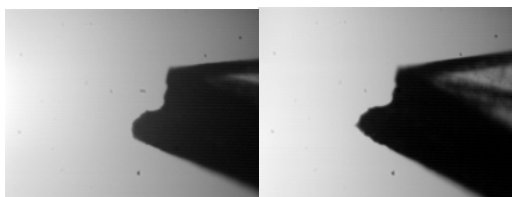


圖 6 斜口尖型噴灑側視圖  
(a)未噴灑情形 (b)尖端形成微小泰勒錐電噴灑

#### 側邊噴灑之斜口尖型塑膠薄層質譜界面

在製作尖型質譜晶片噴頭時，雖然裁剪容易，然而常因不易對準毛細管道而裁剪失敗。我們曾利用放大鏡與電腦切割方法來改進，不過失敗率仍然很高，成效極為有限。

為了比較各種形態之一體成形晶片質譜界面，我們曾製作過薄層平頭型質譜界面；雖然早已由文獻所知，其微電噴灑狀態並不穩定，流出的液體雖會聚集於管口，並不易形成泰勒錐噴灑。然而在觀察平頭型時，由於平頭型質譜界面會卡到顯微鏡鏡頭，我們就將晶片裁剪成長型。幸運的是：我們發現似乎有電噴灑現象，但影像並不清楚，於是我們以俯視角度觀察，發現電噴灑的形成並非在管口，而是在裁剪的尖端處形成泰勒錐，從而產生微電噴灑現象，如圖 7 所示。

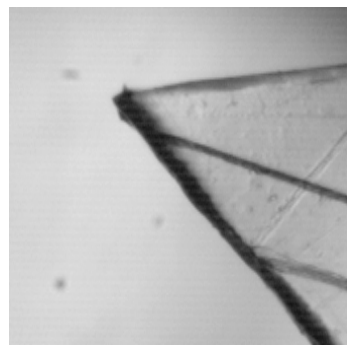


圖 7 側邊尖端噴灑俯視圖

我們認為其原理與斜口尖型的噴嘴類似，液滴藉由毛細現象沿著薄壁擴散至尖端，進而形成微電噴灑；因此當我們將尖端裁剪得更尖，發現所產生的泰勒錐也隨著變小，所形成的最小泰勒錐底部約為  $30\ \mu\text{m}$ ，如圖 8 所示。

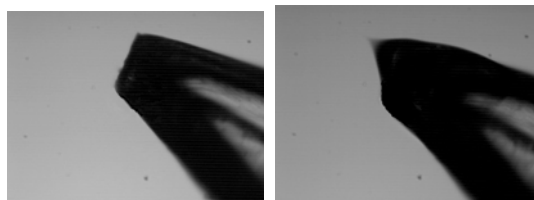


圖 8 側邊之尖端噴灑側視圖  
(左)未噴灑(右)尖端形成微小泰勒錐電噴灑

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，因此應將尖端進行斜切。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，如圖 9 所示。

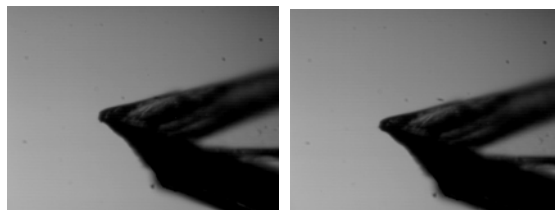


圖 9 側邊之斜口尖端噴灑側視圖  
(a)未噴灑 (b) 尖端形成微小泰勒錐電噴灑

雖然在側邊進行微電灑，使得製作的成功率大大的提升，然而我們發現：在離接地電極1 mm下，施加 1.2 kv 的電壓，液滴最遠能擴散至0.5 mm 遠的尖端形成泰勒錐電噴灑。換句話說：也就是只要在離出口端 0.5mm 以內，裁剪出一尖端既可形成電灑噴嘴，不一定需要在毛細管道出口中央。

總之，斜口尖型和側邊噴灑的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10 (左)微電噴灑晶片架設於LCQ質譜儀前(右)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，我們發現凡是斜口的噴頭，如斜口尖型噴頭或側邊噴灑之具斜口尖型噴頭，其訊號強度十分相近，約為 $5.27 \times 10^7$ 。而不具斜口的噴頭訊號強度較差，約差了10倍左右，與LCQ質譜儀之標準ESI裝置訊號相近。

### 塑膠薄層質譜界面之應用-濫用藥物尿液檢測

微電灑晶片於質譜分析上實際應用極廣，除了作為微電泳晶片之質譜界面外，直接分析亦是極佳的方式。由於實驗室與本校附設醫院之藥物檢測中心一直有良好的合作關係，因此我們嘗試應用於濫用藥物之尿液分析。

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，由文獻所知<sup>20</sup>，若以液相層析質譜儀進行濫用藥物尿液檢測，通常

需將尿液檢體先經由固相萃取管萃取後，打入C18層析分離管，以二次質譜方式分析。其定量的結果，與一般用於確認檢驗的GC/MS的檢測數值相近。一般而言，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並能得到相似的結果。

我們希望嘗試：在無前處理的情況下，直接將尿液檢體利用高靈敏度的電噴灑質譜晶片進行分析。我們以法定陽性濃度值之甲基安非他命尿液(每1毫升空白尿液添加 500ng 的甲基安非他命標準品)來進行測試。如圖11 所示，我們發現甲基安非他命(m/z 149.7)受到極大的抑制，幾乎會被忽視，其訊號強度約為主訊號的10%左右。而最大訊號 m/z 216.9 為尿液之原有成分，其強度達 $1.58 \times 10^5$ ，其在空白尿液之分析中亦呈現最大訊號。

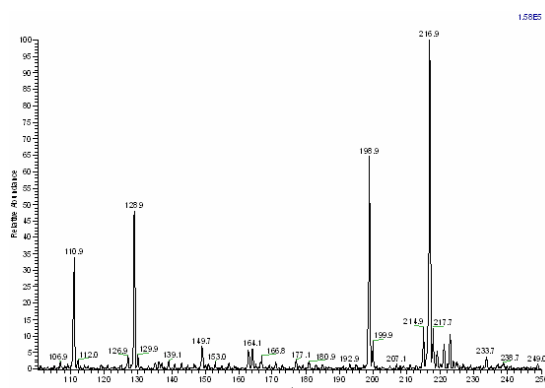


圖11 500ng/ml 甲基安非他命之尿液質譜圖

直接分析尿液的方式顯然受到尿液中物質的極大干擾，甲基安非他命的信號幾乎被抑制掉；在不使用SPE 進行前處理下，我們嘗試利用甲醇進行稀釋，希望能減少尿液中的抑制現象。我們分別以甲醇進行不同比例的稀釋。實驗結果發現：稀釋約八倍後，可以得最好的偵測效果。如圖12 所示，幾乎以甲基安非他命(m/z 149.7)和加一個水分子的甲基安非他命(m/z 167.7)為主，所呈現的質譜信號強度為 $1.04 \times 10^7$ ，而尿液中干擾訊號極小。

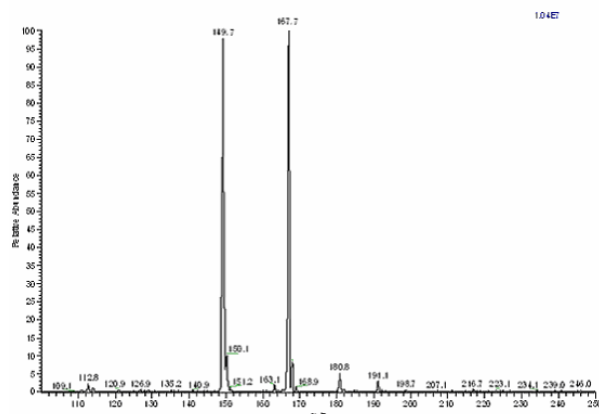


圖12 稀釋八倍之500ng/ml 甲基安非他命之尿液質譜圖

我們亦進行 MS/MS 和MS/MS/MS 之偵測，分別得到極佳的裂解離子訊號，我們推測甲基安非他命的偵測靈敏度，在稀釋八倍下至少可達到 1 ng/ml，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。

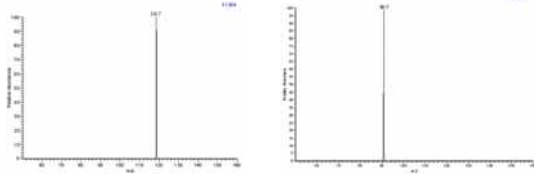


圖13 稀釋八倍之500ng/ml 甲基安非他命尿液之(左)二次質譜與(右)三次質譜圖

當稀釋至16 倍與32倍，雖然還是以甲基安非他命為主要訊號，然而整體強度比稀釋八倍下約低了十倍。當稀釋60倍時，主要訊號又變為 m/z216，甲基安非他命訊號更低至主信號20%左右，如圖4-24所示。而當稀釋6000倍測試，此時已看不到甲基安非他命的信號。

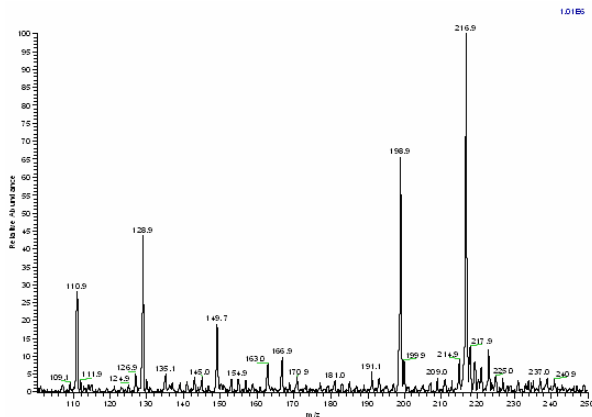


圖14 稀釋60倍之500ng/ml 甲基安非他命之尿液質譜圖

## 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：降低管道製程難度，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斜口尖型與側邊噴灑的斜口尖型質譜晶片；其中側邊噴灑的斜口尖型質譜晶片，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。

## 參考文獻

1. J.W.Jorgenson, K.D.LuKacs *Anal. Chem.*, 1981, 53, 1298-1304.
2. Li, S. G.Y. *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*. Elsevier: Amsterdam, 1992.
3. H. Fan, D. J. Harrison, *Anal. Chem.*, 1994, 66, 177-184
4. L. E. Locascio, C. E. Perso ,C. S. Lee, J. *Chromatography. A*, 1999, 857, 275-284
5. L.Martynova, L. E. Locascio, M. Gaitan, G. W. Kramer, R.G. Christensen, W.A. MacCrehan, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4783-478
6. R. M. McCormick, R. J. Nelson, M. G. Alonso-Amigo, D. J. Benvegnu, H. Hooper, *Anal. Chem.*,1997, 69, 2626-2630
7. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, G.M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 4974-4984.
8. J. C. McDonald, M. L. Chabynec, S. J Metallo, J. R. Anderson, A. D. Stroock, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 1537-1545.
9. M. A. Roberts, J. S. Rossier, P. Bercier, H. Girault, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2035-2042
10. M.Galloway, W.Stryjewski, A. Henry, S.M. Ford, S. Llopis, R.L. McCarley, S.A. Soper, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2407-2415
11. J.S. Kim, D. R. Knapp, *Electrophoresis* 2001, 22, 3993-3999
12. S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B. Coutny, R.J. Warmack, J.M. Ramsey, *Anal.Chem.*, 1994, 66, 1107-1113
13. J.H. Wahl, D.C. Gate, R.D. Smith, *J. Chromatogr.*, 1994, 659, 217-222.
14. D. Figeys, I.V. Ostveen, A. Ducr, R. Aebersold, *Anal. Chem.*,1996, 68, 1822-1828
15. M.S. Kriger, K.D. Cook, *Durable G Anal. Chem.*, 1995, 67, 385-389.
16. J. C. Severs, R.D. Smith, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2154-2158
17. J.N. Alexander, G.A. Schultz, J.B. Poli, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1998,12, 1187-1191
18. D.R. Barnidge, S. Nilsson, K.E. Markides, H. Rapp, K. Hjort, *Metallized, Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1999, 13, 994-1002
19. Y. Z. Chang, Y. R. Chen, and G. R. Her, , *Anal.Chem.*, 2001, 73, 5083-5087
20. T.Y. Wu , M.R. Fuh, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005; 19: 775-780

