

# 芯片毛细管电泳-安培检测系统<sup>\*</sup>

王钰蓉 陈恒武<sup>\*\*</sup>

(浙江大学化学系 微分析系统研究所 杭州 310058)

**摘 要** 由于安培检测具有高灵敏度、低成本、低能耗、易集成化便携化、与微加工技术匹配等特点,芯片毛细管电泳-安培检测系统( $\mu$ CE-AD)的研究近年来得到人们广泛的关注。本文结合本课题组的研究工作,对近年来 $\mu$ CE-AD的研究进展进行评述;重点讨论了近年来在芯片的设计、集成化电极的制备、消除分离电压的干扰等方面的进展;同时介绍了利用分离电场拓展检测范围、阵列电极和阵列通道、化学修饰电极的应用、新型进样技术和试样预处理等方面的新成就;最后展望了未来 $\mu$ CE-AD的发展趋势。

**关键词** 安培检测 微流控芯片 芯片毛细管电泳

中图分类号: O657.1; O657.8 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2009)01-0200-10

## Microchip Capillary Electrophoresis with Amperometric Detection

Wang Yurong Chen Hengwu<sup>\*\*</sup>

(Institute of Micro Analytical Systems, Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection ( $\mu$ CE-AD) has attracted increasing interest due to the features offered by amperometric detection, such as high sensitivity, low cost and power consumption, inherent miniaturization and portability, and compatibility with microfabrication technologies. This article reviews on recent advances in  $\mu$ CE-AD systems, including microchip design, fabrication of integrated electrodes, elimination of high-voltage interference with the detection. Field-non-isolating detection, electrode array and channel array, application of chemically modified electrodes, novel approaches for sample injection, and on-chip sample preparation are also discussed. The future development of the  $\mu$ CE-AD is foreseen.

**Key words** amperometric detection; microfluidic chip; capillary electrophoresis chip

### Contents

- 1 Introduction
- 2 Design of  $\mu$ CE-AD chip
- 3 Fabrication of integrated electrodes
- 4 Elimination of high-voltage interference with the detection
- 5 Field-non-isolating detection
- 6 Electrode array and channel array
- 7 Chemically modified electrodes
- 8 Novel approaches for sample injection

9 On-chip sample preparation

10 Future prospects

### 1 引言

自从 20 世纪 90 年代初 Manz 等提出了微全分析系统( $\mu$ -TAS)这一概念以来<sup>[1]</sup>,分析仪器的发展就进入了一个以微型化为主要特征的、带有革命性的重要转折时期<sup>[2]</sup>。作为  $\mu$ -TAS 中的主流研究领域之一,芯片毛细管电泳(microchip capillary electrophoresis,  $\mu$ CE)在过去的十多年中取得了长足的发展。到目前为止,  $\mu$ CE 多采用激光诱导荧光检测和电化学

收稿: 2008 年 5 月, 收修改稿: 2008 年 7 月

\* 国家自然科学基金项目(No. 20475048)和浙江省自然科学基金项目(No. M203098)资助

\*\* 通讯联系人 e-mail: hwchen@zju.edu.cn

检测 (electrochemical detection, ED), 其中后者因传感电极体积小、易于集成化、许多化合物不需衍生就可在电极上产生信号、灵敏度不因通道几何尺度的缩小而降低、检测器的外围设备简单以及易于微型化等独特优势, 在  $\mu\text{CE}$  的发展过程中一直受到国内外学者的重视。到目前为止, 有关  $\mu\text{CE-ED}$  的 SCI 检索论文数已经超过 200 篇, 相关的综述也已经超过 10 篇<sup>[3-14]</sup>。

目前在微流控分析系统中所采用的电化学检测器主要有安培检测器 (amperometric detector, AD) 和电导检测器。比较而言, AD 因灵敏度高而更受到青睐。自 1998 年 Woolley 等<sup>[15]</sup> 首次报道集成于玻璃芯片上的毛细管电泳安培检测 ( $\mu\text{CE-AD}$ ) 系统以来,  $\mu\text{CE-AD}$  引起全球越来越多研究者的兴趣。所涉及的研究内容包括芯片通道和检测池的设计, 各种材料的芯片的制备, 通道的表面改性, 各种集成化微电极的制备, 分离电压干扰的消除, 微型安培检测器的研制, 以及在生命、环境、反恐等热点领域中的应用等。

本文结合本研究组近年来在  $\mu\text{CE-AD}$  领域中的研究工作, 重点评述  $\mu\text{CE-AD}$  研究中最为关键的芯片的设计、集成化电极的制备、分离电压干扰的消除等研究进展。同时介绍  $\mu\text{CE-AD}$  系统中的阵列电极和阵列通道、修饰电极、利用分离电场拓展检测范围、新型的进样技术等研究成果。

## 2 $\mu\text{CE-AD}$ 芯片的构成

根据工作电极在芯片上所处位置的不同, 可以将  $\mu\text{CE-AD}$  芯片分为两种模式: 电极外置式芯片和集成化芯片。电极外置式芯片的检测池绝大多数处于芯片外 (图 1a), 配合使用外置式工作电极, 用三维<sup>[16,17]</sup> 或二维调节平台<sup>[18]</sup>、电极定位槽<sup>[19,20]</sup> 或电极引导管<sup>[21]</sup> 来装配、对准可更换的圆盘电极或薄膜电极。采用外置式电极的最大优点就是, 电极一旦污染, 可以卸下电极重新打磨以形成新的电极端面, 甚至更换新的电极。但是, 与这种外置式工作电极配套的外置检测池以及额外的电极-通道对准装置使  $\mu\text{CE-AD}$  系统的集成化和微型化受到了限制。

集成化芯片的检测池与通道网络一起处在芯片上, 而且安培检测系统的一个或多个电极以膜电极的形式直接制备在芯片上。它无需额外的复杂电极对准和固定装置, 提高了芯片的集成化程度 (图 1b)。但是这种芯片的电极一旦污染就很难拆卸清洗。根据制作芯片材料的不同, 可以分为复合芯片、

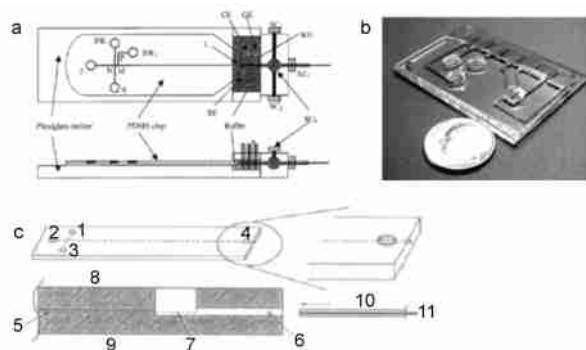


图 1  $\mu\text{CE-AD}$  芯片模式: (a) 外置式芯片<sup>[18]</sup>; (b) 集成化芯片<sup>[53]</sup>; (c) 半集成化芯片<sup>[31]</sup>

Fig. 1 (a) Chips with off-chip electrodes<sup>[18]</sup>; (b) chips with integrated electrodes<sup>[53]</sup>; (c) chips with quasi-self-aligned electrodes<sup>[31]</sup>

全玻璃芯片和全塑料芯片。复合芯片一般是指带有通道结构的 PDMS 基片与集成有薄膜电极的玻璃盖片经可逆或不可逆封合而成的芯片。由于用 PDMS 浇注通道可以在普通实验室中进行, 而在玻璃上制备微电极又可以利用成熟的 MEMS 技术, 因此这类 PDMS/玻璃芯片容易普及, 在  $\mu\text{CE-AD}$  的研究中有相当数量的应用<sup>[22-24,35,36,40,56,61,96]</sup>。最近 Tsai 等<sup>[25]</sup> 制作了 PDMS 与 PMMA 杂交的芯片, 他们将 Pt 丝去耦电极和铜丝工作电极嵌在 PDMS 上, 利用干膜光胶在 PMMA 上加工通道, 最后将 PDMS 与覆有干膜光胶的 PMMA 贴合放入树脂芯片固定器中夹紧。复合式芯片加工相对简单, 封合容易, 但是由于材质不同, 易引起通道内壁电渗流的差异, 从而影响分离效果。而均一材料的芯片则不会有这个问题。Baldwin 等<sup>[26,53]</sup> 在玻璃盖片上利用先刻蚀 0.3  $\mu\text{m}$  深度的凹槽结构用于容纳薄膜电极, 然后再通过蒸发/沉积技术将 Pt 薄膜电极制备于凹槽之中, 避免了电极高出盖片平面给全玻璃芯片封合造成的困难, 成功地与带通道的玻璃基片封合 (图 1b)。但是这种全玻璃芯片加工繁琐, 成本较高, 而且当电极钝化或污染后, 无法进行机械清洗, 一旦化学或电化学清洗失败, 整块芯片只能报废, 使用成本高, 不适宜作为一次性芯片。高聚物芯片加工简单, 封合时对平整度的要求相对宽容, 制作成本低, 是作为一次性芯片进行批量生产的最佳之选。目前已经报道了多种全塑芯片, 如: 带有集成金属丝的 PDMS 芯片<sup>[33]</sup>, 带有碳墨水电极的 PET/PE/PET 三层结构芯片<sup>[60]</sup>, 带有 Pd 电极的 Plexiglas (其主要成分是 PMMA) 芯片<sup>[27]</sup>, 带有金膜电极的 PMMA 和 Topas (thermoplastic olefin polymer of

amorphous structure) 芯片<sup>[28]</sup>, 带有铜膜电极的 PMMA 芯片<sup>[29]</sup>, 带有金丝电极的 TPE 芯片<sup>[30]</sup>, 以及我们实验组的带有金膜工作电极<sup>[41]</sup>和三电极体系<sup>[55]</sup>的 PC 芯片。具体的加工制备电极的技术与方法在下节中介绍。

除上述集成化芯片之外, 也有在芯片上加工检测池和电极定位槽(孔), 然后将圆盘电极或金属丝电极固定(镶嵌)于定位槽(孔)上, 形成半集成化的芯片。例如, 最近我们实验组<sup>[31]</sup>研发了一种带有可更换圆盘工作电极的半集成化玻璃芯片。该芯片利用分离通道末端的废液池作为安培检测池。芯片封合后, 从废液池附近的芯片侧面向废液池钻一个水平的引导通孔, 用于引导、对准、固定圆盘工作电极(图 1c)。该  $\mu\text{CE-AD}$  系统无需任何离柱对准装置, 提高了整个检测系统的集成化程度。但与上述集成有薄膜微电极的芯片不同的是: 当所使用的圆盘电极钝化后, 可从芯片上卸下清洗甚至更换, 提高了芯片的使用寿命。Wu 等<sup>[32]</sup>通过两步湿法刻蚀的方法, 在玻璃芯片分离通道末端加工了引导管用于圆盘式工作电极的对准与固定, 工艺较为简单。但是无论哪种加工的方法, 都只将更换式工作电极固定于芯片上, 参比电极和对电极依然外置, 因而参比电极位置对检测性能的影响(见第 4 节)仍旧不能得到有效的控制。

### 3 集成化电极的制备

直接制备在芯片上的集成化电极可以分为金属电极和碳膜电极两大类。

金属电极包括嵌入式金属丝电极和镀膜电极, 嵌入式电极是将金属丝<sup>[25, 30, 33, 34]</sup>嵌入 PDMS 而得, 膜电极是在盖片上沉积金属膜而成的。金属膜电极的加工主要有真空沉积<sup>[15, 22, 35—37]</sup>和化学镀沉积两种方法。真空沉积需要用贵金属作靶, 经溅射/沉积或热蒸发/沉积后, 还要经过光刻-腐蚀等加工步骤, 价格昂贵, 且制作难度较大, 需要洁净实验室和复杂的设备。而化学镀方法灵活多样, 不需要外加电压即可将溶液中的金属沉积到盖片表面, 且盖片也不需要具有导电性, 更适合在一次性芯片的理想材料高聚物上制备集成化电极。Hilmi 等<sup>[38]</sup>首先报道了在玻璃芯片通道出口的侧面上化学镀金薄膜工作电极的技术。他们依次用二氯化锡和硝酸银溶液进行敏化和活化处理, 之后在镀金液中进行化学镀金膜, 制得金工作电极。Wang 等<sup>[39]</sup>用类似的先敏化后化学镀的方法在玻璃芯片侧面制作了镍电极。上述方法

的共同点是先在芯片侧面大面积镀上金属膜后, 再手工涂覆绝缘胶以限制电极响应面积, 因此难以保证微电极的精度。Yan 等<sup>[40]</sup>将镂空的 PDMS 模板贴在玻璃盖片上限定化学镀局部区域, 直接在玻璃盖片的限定区域内进行二氯化锡敏化和硝酸银活化处理, 并化学镀制得微铜、金的带状电极。但这种由 PDMS 镂空模板决定电极图形的化学镀法制得的电极精度仍不够高。最近我们实验组<sup>[41]</sup>在 Soper 等<sup>[42, 43]</sup>的工作基础上, 用光胶石英片作掩模在聚碳酸酯(PC)表面实现了光敏化选择性化学镀金属电极。简单地讲, 先用光胶石英片掩模<sup>[44]</sup>将 PC 盖片在低压汞灯下曝光以形成光敏化中心, 之后将光敏化的 PC 片依次经过胺化、氯金酸处理、硼氰化钠还原得到化学镀所需的纳米金催化中心, 最后在化学镀金液中化学镀金。这种方法图形转移精确, 可以加工宽度  $35\mu\text{m}$  以上的电极。我们采用类似的方法, 在聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)盖片上化学镀金膜电极的工作也已经获得成功。

也有一些实验组直接使用导电玻璃上的氧化铟锡(ITO)制作集成化电极。Kim 等<sup>[45, 46]</sup>采用在导电玻璃上涂光胶/光刻/ $\text{FeCl}_3/\text{HCl}$  腐蚀的方法制得了 ITO 多电极, 并用于多巴胺(DA)和儿茶酚(CA)的安培检测。Wang 等<sup>[47]</sup>则用凡士林保护的方法在 ITO 玻璃上成功刻蚀了集成化 ITO 电极, 该方法简单快速、无需光胶和复杂的设备, 在普通实验室就可以进行。

碳电极较金属电极更不易被污染、具有较低的过电位和背景噪音、稳定性好<sup>[3]</sup>, 因此人们也一直试图将碳电极应用于  $\mu\text{CE-AD}$  中。比较简单的方法是制备集束碳纤维<sup>[68]</sup>或石墨炭芯<sup>[48]</sup>圆盘电极, 采用图 1a 或 c 的形式组成  $\mu\text{CE-AD}$  芯片。然而, 在芯片上制备集成化碳膜微电极比制备金属膜电极更困难。Hebert 等<sup>[49, 50]</sup>和 Fischer 等<sup>[51]</sup>分别在熔融石英和玻璃片上用光胶裂解法制得了光胶裂解碳膜(PPF)电极。前者用 AZ4330 正光胶在合成气( $95\% \text{N}_2 + 5\% \text{H}_2$ )气氛中, 在  $1000^\circ\text{C}$  的高温下裂解 60min 制得 PPF 电极; 而后者用 AZ1518 正光胶, 在氮气气氛、 $925^\circ\text{C}$  下, 高温分解 60min, 制得了  $40\mu\text{m}$  宽  $0.5\mu\text{m}$  高的 PPF 电极。PPF 电极较碳纤维和碳糊电极更经久耐用, 并且电容低、检测信号稳定, 并能牢固地附着于石英和玻璃上, 但是制作 PPF 电极需要复杂的高温设备, 制作相对繁琐。Sun 等<sup>[52]</sup>通过用脉冲激光在玻璃盖片上打孔, 然后在孔中填充 sol-gel 碳复合材料作为

工作电极。该电极加工过程简单、造价低,无需超净设施和环境,得到的电极性质稳定,电化学信号重现性好。他们还对该复合材料电极通过电沉积得到铜修饰电极,用于葡萄糖的分析。

除将工作电极集成于芯片上以外,还可以将其其他电极如检测用的参比电极和对电极,施加电泳电压用的阳极和阴极集成于芯片上,提高整个芯片系统的集成化程度。集成化三电极系统(或三个传感电极加去耦电极)中,有的采用同种材料的多电极,如多个铂电极<sup>[53]</sup>、多个金电极<sup>[54]</sup>等。制作由不同材料组成的集成化三电极体系的方法是,一次制备同种金属材料的原电极阵列后,再通过对指定电极进行电镀将原电极转化成所需要的金属电极<sup>[36]</sup>。我们实验组<sup>[55]</sup>通过先采用光诱导选择性化学镀法在 PC 片上制备微金膜原电极,然后分别对设计用作参比电极和对电极的金膜电极电镀 Ag 和 Pt,分别制备了集成化的 Ag/AgCl 参比和 Pt 对电极。这样的制备工艺由于只使用一次掩模,电极宽度和电极间距完全由掩模的图形决定,所以精度高。另有采用二次掩模的工艺分别制备不同材料的微电极。Kovarik 等<sup>[56]</sup>首次报道了带有集成化碳墨水工作电极和钯去耦电极的玻璃芯片。他们先采用蒸发/沉积/光刻的 MEMS 技术(用第一片掩模)在玻璃片上制备得到钯去耦电极和钯连接膜,再用镂空 PDMS 模板限定工作电极区域,往该区域内浇注碳墨水,烘干得到碳墨水工作电极。Viridi 等<sup>[57]</sup>在 PC 片上两次涂光胶两次真空沉积,制得了金膜工作电极和钯膜去耦电极。这种分两次制备不同材料的电极,先后两次模板(掩模)的对准精度决定了电极间距的精确度。

#### 4 减小分离电压干扰的方法

在  $\mu\text{CE-AD}$  中,电泳电流一般在  $\mu\text{A}$  级水平,而安培检测电流在  $\text{nA}$  级甚至  $\text{pA}$  级。由于分离系统和检测系统电路的共地,分离电压的微小波动,都会对安培检测产生很大的影响。因此减小甚至消除分离电压对安培检测的干扰成为一个不可忽视的问题。根据隔离分离电压的方式, $\mu\text{CE-AD}$  系统的检测模式通常分为 3 种:在柱检测、离柱检测和柱端检测。

在柱检测模式使用电气上相互隔离的特殊高压电源或恒电位仪,例如独立供电(干电池供电)的高压电源<sup>[58]</sup>或电隔离的恒电位仪<sup>[59]</sup>。这样,分离电流和检测电流自成回路互不干扰,工作电极可以直接安置在分离通道上,故称之为在柱检测。这种检测

方式相对于柱端安培检测而言可以有效地减少谱带的扩张,提高柱效。但是使用独立供电的高压源或电化学分析系统增加了仪器的复杂性。

离柱检测是在工作电极前设置电压去耦器(高压电的地端),使分离电流提前旁路到地,检测器的工作电极置于去耦器下游与通道垂直交叉,因工作电极所处的通道内不再有分离电流通过,从而减小分离电压的干扰。Rossier 等<sup>[60]</sup>在分离通道尾部的通道壁上制作了直径  $5\mu\text{m}$  或  $10\mu\text{m}$  的微孔去耦器来实现对分离电场的隔离。Osborn 等<sup>[61]</sup>在直径为  $20\sim 30\mu\text{m}$  的微孔内填充醋酸纤维素制成去耦器。这种微孔去耦器去耦效果较好,使用寿命较长,但通道结构复杂,增加了芯片加工的复杂性。近年来,铂系金属尤其 Pd 成为了去耦器研究中的新宠<sup>[25,30,34-36,56,62-64]</sup>。这是因为铂系金属作为分离电压的阴极时,能有效吸附/收阴极产物  $\text{H}_2$ ,并使其在电极表面分散,从而避免氢气的产生,因此可以将阴极设置在分离通道内,使分离电压旁路到地。由于加工集成化 Pd、Pt 电极比加工微孔容易,因此目前有关离柱检测的去耦器大多采用 Pd 或 Pt 阴极。但是这类铂系金属去耦电极不能完全隔离分离电压<sup>[34]</sup>,同时吸氢具有饱和性,使用寿命较短。Wu 等<sup>[36]</sup>在金膜电极上电镀 Pt 作为去耦电极,电泳刚开始时背景噪音明显降低,但是经过 11 次分离之后,背景噪音又急剧升高。Lancher 等<sup>[35]</sup>优化了 Pd 膜去耦电极的宽度以及去耦电极与工作电极间距等参数,使去耦电极可以持续工作 6h 左右。

柱端检测是目前安培检测中应用最为广泛的一种检测模式,它在芯片构型和设备要求上比在柱和离柱检测模式简单得多。柱端检测是将工作电极放置于分离通道出口外几十微米处的检测池内。由于离开通道后分离电场迅速降低<sup>[65]</sup>,工作电极置于分离通道外一小段距离处,能在一定程度上减小分离高压的干扰,但离开分离通道带来的后果是谱带离柱后的扩张。所以工作电极与通道出口之间距离的选择就显得尤为重要。如果工作电极距离通道出口较远,虽然分离电压的干扰会基本消除,但是试样区带扩散会很严重,从而降低分离效率和检测灵敏度。如果工作电极距离通道出口较近,虽然可以减小试样区带扩张,但是分离电压的干扰会很严重。因此一个理想的柱端检测设计就要满足减小工作电极处残余电场的同时,又不至于造成大的谱带扩张。Erl 等<sup>[66]</sup>提出了鞘流支持的柱端检测模型。他们在通道末端的两侧对称的加工了两条通道,利用重力驱

动鞘流,使从分离通道内流出的流体被鞘流夹在中间(图2),鞘流的存在限制了试样区带离开分离通道后所发生的扩散,使得工作电极可以远离分离通道出口至250 $\mu\text{m}$ ,仍能检出待测物(CA的检测限为4.1 $\mu\text{mol/L}$ 。但若没有鞘流支持,CA则无法检出)。他们在工作电极离通道出口150 $\mu\text{m}$ 处成功检测了DNA限制性片段和PCR扩增产物。

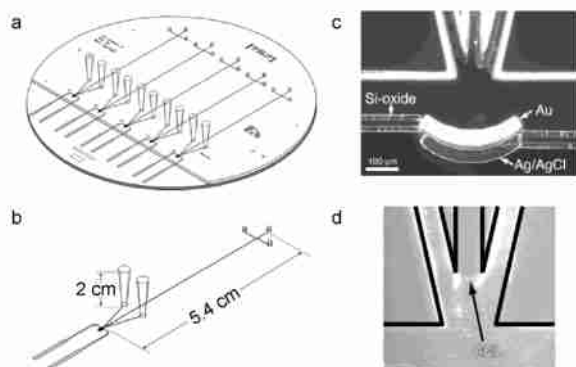


图2 (a) 带有鞘流的阵列通道芯片总体设计图; (b) 单个通道结构; (c) 电极在检测区域的位置; (d) 鞘流通道的结构。箭头指示分离通道内所充的筛分介质的边缘<sup>[66]</sup>

**Fig. 2** (a) Overall design of the assembled  $\mu\text{CE-EC}$  separation and detection device; (b) exploded view of a single channel from the device; (c) photo of the electrodes at the detection region; (d) separation/sheath flow channel after gel loading visualized with dark-field microscopy. The arrow indicates the boundary of the sieving matrix<sup>[66]</sup>

1991年Ewing等<sup>[67]</sup>在常规毛细管电泳研究中发现:当使用内径小于5 $\mu\text{m}$ 的毛细管时,分离电压对柱端检测的干扰可以忽略不计。最近我们实验组<sup>[68]</sup>研究发现,通道横截面积越小,在柱后检测区域内的残余电场越低,表现在工作电极的半波电位偏移就越小,对减小分离电压干扰的效果就越好。同时,芯片横截面积越小,改变通道与电极之间的间距引起的工作电极半波电位的偏移就越小,当通道截面积减小到312 $\mu\text{m}^2$  (38.9 $\mu\text{m}$ 上宽 $\times$ 8.9 $\mu\text{m}$ 深),即便工作电极置于通道出口20 $\mu\text{m}$ 处,所受到分离电压干扰也不大。因此在设计芯片时,采用小截面通道是减小分离电压干扰的一个简便而有效的措施。另外一个常被忽视的因素是参比电极与工作电极间的距离。Klett等<sup>[69]</sup>在常规 $\mu\text{CE-AD}$ 的研究和Woolley等<sup>[15]</sup>在 $\mu\text{CE-AD}$ 的研究中发现:工作与参比电极之间的相对位置,对消除高压电场的干扰有很大的作用。Klett等的理论计算和实验研究表明:高压电场对柱端检测的干扰,可以通过将工作电极和参比电

极放置在等电位上来达到完全去耦。最近我们实验组<sup>[55]</sup>的研究也发现:当工作电极距通道出口零微米时,使用外置的非集成化参比电极(远离工作电极),高压电场对安培检测产生非常大的干扰;而使用集成化参比电极,并使工作电极-参比电极间距从500 $\mu\text{m}$ 减小到100 $\mu\text{m}$ ,高压电场的干扰逐步减小。表明将参比电极尽可能靠近工作电极,可以缓解由于工作电极接触通道出口而遭受的高压电场干扰,从而使色谱峰的峰高增加而半峰宽减小。基于这样的观察,在初步优化的工作电极-参比电极间距下分离检测DA和CA,得到较同类柱端 $\mu\text{CE-AD}$ 的文献值都低的检测限。Chen等<sup>[70]</sup>根据工作电极和参比电极等电位的原理,设计了一种平行双通道结构,将参比电极与工作电极分别置于两条通道内离出口等距离处(图3),使工作电极与参比电极处于等电位,达到对分离电压去耦的目的。研究表明检测电位没有受到分离电压的干扰,未产生偏移。由此可见,借助于MEMS技术的优势,优化通道、工作电极、参比电极、电泳阴(阳)极间的相对位置,能够最大程度上消除分离电压对柱端检测的干扰。在这方面还有不少工作可做。

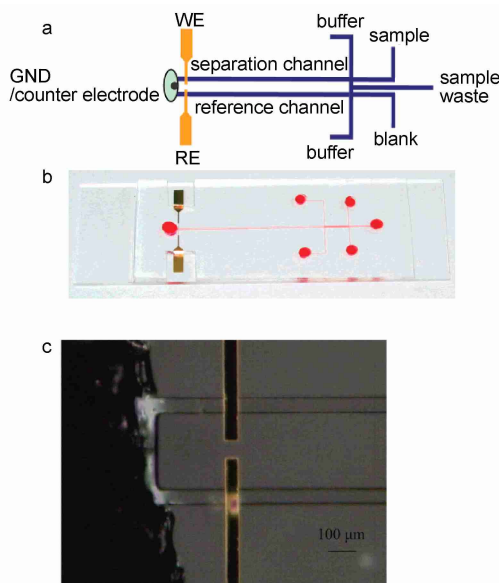


图3 (a) 利用辅助通道去耦的双通道芯片的通道结构示意图; (b) 芯片的照片; (c) 安置在通道内的金电极的CCD图像<sup>[70]</sup>

**Fig. 3** (a) Schematic of the microchannel network in the dual-channel CE microchip with an in-channel electrochemical detector; (b) photograph of the microchip; (c) CCD image of Au electrodes mounted in the exit of dual-channel<sup>[70]</sup>

## 5 利用残余电场进行检测

大多数的研究者进行  $\mu\text{CE-AD}$  研究时,考虑的是如何将分离电压的干扰减到最小,但是也有人另辟蹊径,利用分离电场在工作电极上的电压降拓展电化学检测的范围。Klett 等<sup>[71]</sup>在常规毛细管电泳安培检测系统的研究中,采用柱端检测模式,利用分离电场在毛细管外带状微电极上的电压降,实现了无源安培检测的目的。在  $\mu\text{CE-AD}$  的研究中,Xu 等<sup>[72]</sup>将单根碳纤维工作电极从分离通道末端插入通道内  $40\mu\text{m}$ ,研究了分离电场对在柱电化学检测的影响。他们发现在正电场模式下(缓冲液池施加正电压,检测池接地),工作电极上发生还原反应时,其还原电位和分离电场会发生耦合,使实际还原电位发生变化;而当工作电极上发生氧化反应时,则不与分离电场耦合。基于这一原理,利用运行缓冲液中溶解氧的安培响应可以间接检测非电活性物质,而电活性物质可以通过安培检测直接进行。他们通过对非电活性的阳离子、电活性的生物物质以及电渗流标志峰的检测证明了这一方法的可行性。利用这一原理,他们成功检测了  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$  等非电活性阳离子<sup>[72]</sup>,  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  等重金属离子<sup>[73]</sup>,精氨酸、苏氨酸、谷氨酸和半胱氨酸等天然氨基酸<sup>[74]</sup>,并通过改变检测电位,从一批非电活性氨基酸的峰中确定了电活性氨基酸的峰位。相反的,在负电场模式下(缓冲液池施加负电压,检测池接地),当工作电极上发生氧化反应时,其氧化电位与分离电场发生耦合,工作电极上的电位就随着被分析组分电阻的变化而改变,从而引起碳纤维电极上氧化电流的变化。由此可以利用这一特性来检测  $\text{F}^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{CH}_3\text{COO}^-$  和  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  等非电活性的阴离子<sup>[75]</sup>。这一重要的发现,不仅具有重要的学术价值,而且也大大拓展了  $\mu\text{CE-AD}$  的应用范围。

## 6 阵列电极和阵列通道

在  $\mu\text{CE-ED}$  系统中,采用双工作电极(氧化-还原电极对)检测可以通过追踪具有电化学可逆氧化还原特性的物质,提高对复杂样品的选择性,实现对混合物峰的鉴定,提高电化学检测的能力。近年来,已有不少研究小组进行了芯片毛细管电泳-双工作电极检测的研究。2000 年 Martin 等<sup>[76]</sup>首次报道了基于 PDMS/玻璃复合芯片的  $\mu\text{CE-AD}$  双工作电极的检测技术。他们在玻璃上加工了阵列金膜工作电极,并采用柱端检测的模式,对两条紧密相邻工作电极

的上游(靠近通道出口)电极施加氧化电位、下游电极施加还原电位,分别对抗坏血酸(AA)和 CA 的混合物进行了分离鉴定。由于 CA 的电极反应可逆,它可被上游的阳极氧化,其氧化产物又可在下游的阴极上还原,因此在两个检测回路中均可得到色谱峰。但是 AA 只能在上游的阳极上产生信号,据此可以确定色谱峰的归属。Lunte 实验组分别用双碳纤维电极<sup>[77]</sup>和双碳糊电极<sup>[78]</sup>全 PDMS 芯片,成功地检测了 des-Tyr-leu-enkephalin- $\text{Cu}^{2+}$  配合物<sup>[77]</sup>,及 leu-脑啡肽的两种代谢物——Tyr-Gly-Gly 和 des-Tyr-leu-enkephalin<sup>[78]</sup>。采用双电极的柱端安培检测模式时,位于下游的第二条工作电极距离通道出口更远,由此引起的谱带扩张更严重,所检出的信号就比较弱,文献报道的下游电极对 CA 的最高收集率(collection efficiencies, Ne)仅为 36.0%—43.7%<sup>[77]</sup>。采用离柱检测模式在一定程度上可以解决柱端双工作电极的这一困难。2004 年 Lai 等<sup>[62]</sup>制作了带有 Pd 薄膜去耦器的双金膜工作电极的 PDMS/玻璃安培检测芯片,他们实验发现,CA 的氧化电流在双电极检测模式下比单电极检测模式下提高了 1.9—3.8 倍。之后 Mecher 等<sup>[79]</sup>报道了带有钯薄膜去耦器的双碳墨水工作电极的 PDMS/玻璃安培检测芯片,并应用于 DA、CA 和 AA 的分离测定。

在  $\mu\text{CE-AD}$  芯片上构建高密度的平行通道阵列可以极大地提高试样通量。Mathies 研究小组<sup>[80]</sup>将  $\mu\text{CE}$  与扫描型激光诱导荧光检测(LIF)相结合,在一片光盘大小的芯片上建立了 384 个平行通道的  $\mu\text{CE-LIF}$  阵列,应用于 DNA 片段的分离分析。因电化学检测需要靠电极传感,对平行通道阵列的检测需要平行的电极阵列来实现,相对于光学检测,构建  $\mu\text{CE-ED}$  阵列的难度较大。Soper 研究小组<sup>[81]</sup>首次报道了多通道毛细管电泳-电导检测芯片。最近 Pozo-Ayuso 等<sup>[82]</sup>首次报道了双通道  $\mu\text{CE-AD}$  的工作。他们采用 型通道设计,用柱端双电极安培检测模式(图 4),以 DA、对-氨基苯酚和氢醌为模型待测物,实现了双通道  $\mu\text{CE-AD}$  对两个试样的同时分离测定。由于采用柱端检测模式,两工作电极对准各自的通道会有细微差异,因此两通道的分离和检测性能上也会有一定的不同,需要分别校正。

## 7 修饰电极

在金属和碳电极上具有电活性的物质并不多,尤其一些生物分子在此类电极上或因电势过高或因缺乏电活性而难以检测。通过对电极进行化学修



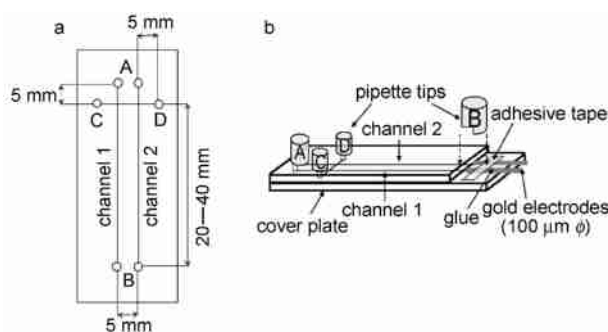


图 4 (a) 双通道芯片的设计; (b) 贮液池和检测电极的示意图<sup>[82]</sup>

Fig. 4 (a) Design of dual-channel microchip design; (b) illustration of reservoirs and electrochemical detector<sup>[82]</sup>

饰,可有效降低过电位,提高分析的选择性和灵敏度,扩大安培检测的范围。碳纳米管(CNT)是一种很好的用于电极修饰的材料,CNT修饰电极较常规碳电极更不易被污染,它具有更好的稳定性、灵敏度,能降低检测电位、提高信噪比。Pumera等<sup>[83]</sup>在不同电极基底(玻碳电极、金电极和铂电极)的电极表面修饰了不同CNT(单壁和多壁)及普通石墨粉,并对所得到的修饰电极的性能作了系统的比较。多

表 1 修饰电极在芯片毛细管电泳安培检测系统的应用

Table 1 The modified electrodes applied in  $\mu$ CE-AD systems

modifier	electrode base	analyte	ref.
CNT	gold wire	catecholamines, their <i>O</i> -methoxylated metabolites	88
CNT	screenprinted carbon	hydrazine, phenol, purine, amino acid compounds	89
palladium		hydrazine compounds	90
cellulose-ssDNA		neurotransmitters	84
cellulose-dsDNA		phenolic compounds	91
CoPc	carbon paste	thiols, cysteine, penicillamine	78
		hydrazine compounds	92
Cu-MPS		nitrate, nitrite	85
boron	diamond	phenols, nerve agents, explosives	93
		purines, purine-containing compounds	94
		aromatic amines	95
MWCNT/copper composite	copper powder	carbohydrates	96
prussian blue	ITO	dopamine, catechol	97
pTTCA/AuNP	platinum	DNA	86

## 8 进样技术

芯片毛细管电泳一般都采用电动进样。Wang等<sup>[98]</sup>研究了利用流体静压力进样的可能性。他们先将芯片以其边缘为轴倾斜,使样品池高于样品废液池,靠溶液静压力驱动流体进样后,再将芯片放平进行电泳分离检测。他们通过理论推导和实验观察,详细考察芯片倾斜角度、试样溶液在储液池内的

液面高度(芯片水平放置时)和充样时间对形成稳定试样区带的影响,得到了使试样区带不扩张的充/进样条件。Zhai等<sup>[99]</sup>将常规毛细管电泳中利用毛细管折缝作为离子通道而实现电压去耦的原理,用于短毛细管芯片的进样。他们用1根80mm长的石英毛细管作为分离通道,在毛细管前端8mm处割出一裂缝作为样品入口,整根毛细管嵌在带有缓冲液池、试样池和检测池的PDMS芯片内,其中裂缝与试样池

壁CNT修饰的玻碳电极明显降低了DA和CA的检测电位;各种CNT修饰的金电极都较裸金电极体现了电催化性能,降低了检测电位,其中石墨粉修饰金电极引起的半波电位的偏移最大。研究较多的是用各种材料对碳(墨水)筛印电极和碳糊电极进行修饰。Johirul等<sup>[84]</sup>将cellulose-ssDNA修饰到碳筛印电极上,用于检测神经递质,灵敏度较裸碳筛印电极提高了12倍。Shiddiky等<sup>[85]</sup>将Cu-巯基丙酸配合物修饰到碳糊电极上,用于同时检测硝酸盐和亚硝酸盐。金刚石电极掺杂硼后,可以有效提高灵敏度、降低噪音水平、提高电极抗污能力、减小分离电压的干扰程度<sup>[93]</sup>。Shiddiky等<sup>[86]</sup>在Pt微电极表面修饰了pTTCA/金纳米粒子,用于芯片凝胶电泳-电化学检测测定痕量的DNA,修饰电极比裸电极提高了灵敏度和重现性,具有电催化活性和抗污染性。Dawoud等<sup>[87]</sup>通过在蒸发-沉积法制备的原金电极上电镀金的方法,提高金电极表面的粗糙度,从而提高了检测DA和CA的库伦效率( $C_{eff}$ )和灵敏度,检测限分别降低到60nmol/L和110nmol/L。表1总结了近年发表的在 $\mu$ CE-AD系统中采用修饰电极的研究工作。

对准(图 5),在不使用任何外置进样设备的情况下,实现了电动进样和分离,并用铜圆盘电极成功分离检测了海藻糖、蔗糖、乳糖等 8 种糖。

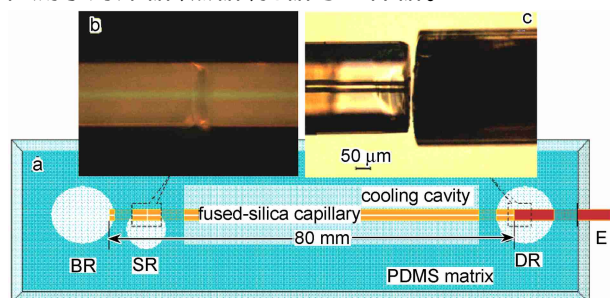


图 5 (a) 带有集成化柱端安培检测器的硅树脂石英毛细管芯片示意图; (b) 进样折缝毛细管的荧光照片; (c) 检测池中与毛细管出口相对的工作电极<sup>[99]</sup>

Fig. 5 (a) Scheme of SQCM with integrated end column amperometric detection; (b) fluorescence photograph of the fractured capillary; (c) working electrode opposite to the exit of the separation channel<sup>[99]</sup>

## 9 试样预处理系统

目前的  $\mu\text{CE-AD}$  芯片普遍实现了进样、分离、检测多种功能的集成化,但是离理想意义上的  $\mu\text{-TAS}$  系统还有一定的距离,主要是缺少应对实际复杂试样的试样预处理单元。到目前为止,仅有极少量涉及到在  $\mu\text{CE-AD}$  芯片集成试样预处理单元的报道。Wang 研究小组<sup>[100]</sup>利用氨基酸与邻苯二甲醛/2-巯基乙醇反应生成电活性物质的衍生反应为模型,最先报道了带有柱前衍生化反应器的  $\mu\text{CE-AD}$  系统。该系统的集成化反应器实际上是一个“T”型的采样通道。在采样阶段,由电驱动,氨基酸试样、邻苯二甲醛/2-巯基乙醇混合试剂分别从“T”型通道的两条支通道引入中间的混合反应通道进行衍生反应,所生成的电活性产物流经与分离通道交叉的十字形采样口,完成采样和进样步骤,进而进行分离、检测。显然,在线衍生反应的效率对于系统的分析性能具有重要影响。他们还采用相似的芯片,根据多酶催化葡萄糖和乙醇时所生成的产物带有不同电荷,实现了  $\mu\text{CE-AD}$  同时测定葡萄糖和乙醇<sup>[101]</sup>。Shiddiky 等设计了一种集成了在线预富集、分离和电化学检测的  $\mu\text{CE-AD}$  系统(图 6)。他们首先利用场放大堆积效应进行预富集,再利用场放大进样,实现了两次预富集,之后利用胶束毛细管电泳技术分离检测了痕量的酚类物质<sup>[91]</sup>和痕量的 DNA<sup>[86]</sup>,灵敏度分别提高了 5 200 和 25 000 倍,检测限分别达到 100—150 pM 和

5.7 aM。利用场放大堆积效应无须在芯片上集成特殊的浓缩器件(如液液萃取、固相萃取)就可以将待测组分浓缩很高的倍率,但它难以应用于基体稍复杂的实际试样。迄今为止,尚未有集成化学浓缩单元的  $\mu\text{CE-AD}$  的报道。

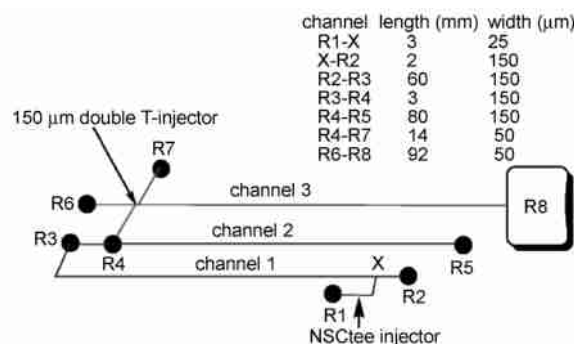


图 6 预富集、分离、电化学检测芯片系统示意图<sup>[91]</sup>

Fig. 6 Schematic diagram of the microfluidic device<sup>[91]</sup>

## 10 展望

经过 10 余年的快速发展,以简单十字通道网络为基础的  $\mu\text{CE-AD}$  技术已逐步趋于成熟。从  $\mu\text{-TAS}$  的概念出发,以 AD 作为检测手段的  $\mu\text{CE-AD}$  系统具有微型化、集成化的优势。因此,我们没有理由怀疑以  $\mu\text{CE-AD}$  芯片为核心的微型分析仪器在临床检验、环境检测、食品安全、反恐安检等领域的应用前景。然而,综观所发表的文献不难发现,迄今为止  $\mu\text{CE-AD}$  芯片应用于实际试样的分析却十分有限。这显然与目前  $\mu\text{CE-AD}$  研究中尚未解决好的一些理论和技术问题有关。我们认为,以下几个方面的问题值得在今后的研究中加以关注: (1) 解决  $\mu\text{CE-AD}$  系统存在的分离与检测系统的耦合干扰问题。目前  $\mu\text{CE-AD}$  解决电压耦合干扰的手段多沿用了常规毛细管电泳安培检测系统的研究成果。因此,如何根据微流控芯片的特点、发挥 MEMS 技术的优势,设计出适合于  $\mu\text{CE-AD}$  芯片的去耦装置,是值得研究的方向。(2) 提高  $\mu\text{CE-AD}$  芯片制备的重现性、改善  $\mu\text{CE-AD}$  分离分析的可靠性,还有很大空间。比如,在集成化柱端检测芯片中,电极与通道出口的对准与间隙控制,完全靠集成有电极的盖片与刻有通道的基片封合来实现。由于封合过程中的许多不可控因素,导致芯片与芯片间的分析性能差异较大,这一问题目前还没有好的解决办法。(3) 正如上述第 9 节中已经提到的那样,目前绝大多数  $\mu\text{CE-AD}$  芯片还不具备分析复杂试样的能力。因此,在  $\mu\text{CE-AD}$  芯片上集成包括净化、浓缩、稀释、衍生等试样预处理



理单元,将是今后的一个重要研究方向。(4)要将 $\mu\text{CE-AD}$ 芯片推向实际应用,发展类似于血糖测定所用“一次性”电极条那样的专用(而非通用)、可靠、价廉的“一次性”芯片是一个方向。因此,研究以高聚物为材料的专用集成化 $\mu\text{CE-AD}$ 芯片、批量制备“一次性”高聚物芯片的工艺、以及与芯片配套的便携式智能化仪器,是将 $\mu\text{CE-AD}$ 芯片推向实用的关键。

相信,经过分析化学工作者与相关学科的科技工作者的共同努力,有关 $\mu\text{CE-AD}$ 分析系统研究将会不断得到新的突破,功能全、性能可靠、价格低廉的 $\mu\text{CE-AD}$ 芯片和与之配套的微型驱动和检测设备将会不断涌现,以 $\mu\text{CE-AD}$ 芯片为核心的、能被非专业分析工作者使用的微型分析仪器将在不久的将来进入家庭、病房和各种检测现场。

### 参 考 文 献

- [1] Manz A, Graber N, Widmer H M. *Sensors and Actuators B*, 1990, 1: 244—248
- [2] 方肇伦 (Fang Z L). *大学化学 (Univ. Chem.)*, 2001, 16(2): 1—6
- [3] Lacher N A, Garrison K E, Martin R S, et al. *Electrophoresis*, 2001, 22: 2526—2536
- [4] Wang J. *Talanta*, 2002, 56: 223—231
- [5] Vandaveer W R, Pasas-Farmer S A, Fischer D J, et al. *Electrophoresis*, 2004, 25: 3528—3549
- [6] Vandaveer W R, Pasas S A, Martin R S, et al. *Electrophoresis*, 2002, 23: 3667—3677
- [7] Wang J. *Electroanalysis*, 2005, 17: 1133—1140
- [8] Du Y, Wang E K. *J. Sep. Sci.*, 2007, 30: 875—890
- [9] Xu J J, Wang A J, Chen H Y. *Trends Anal. Chem.*, 2007, 26: 125—132
- [10] 孟斐 (Meng F), 陈恒武 (Chen H W). *理化检验-化学分册 (Physical Testing and Chemical Analysis, Part B: Chem. Anal.)*, 2003, 39(1): 63—68
- [11] 吴友谊 (Wu Y Y), 林金明 (Lin J M). *化学通报 (Chem. Online)*, 2004, 3: 170—177
- [12] 张旭 (Zhang X), 高俊雄 (Gao J X), 王耕波 (Wang G B) 等. *分析科学学报 (J. Anal. Sci.)*, 2004, 20(4): 426—428
- [13] 徐溢 (Xu Y), 兰宇卫 (Lan W Y), 熊开生 (Xiong K S) 等. *分析科学学报 (J. Anal. Sci.)*, 2005, 21(6): 682—686
- [14] 翟海云 (Zhai H Y), 陈缙光 (Chen Z G), 蔡沛祥 (Cai P X) 等. *分析测试学报 (J. Instr. Anal.)*, 2005, 24(1): 111—116
- [15] Woolley A T, Lao K Q, Glazer A N, et al. *Anal. Chem.*, 1998, 70: 684—688
- [16] Fanguy J C, Henry C S. *Electrophoresis*, 2002, 23: 767—773
- [17] Chen G, Bao H M, Yang P Y. *Electrophoresis*, 2005, 26: 4632—4640
- [18] Dou Y H, Bao N, Xu J J, et al. *Electrophoresis*, 2002, 23: 3558—3566
- [19] Wang J, Tian B M, Sahlin E. *Anal. Chem.*, 1999, 71: 5436—5440
- [20] Much A, Wang J, Jacobs M, et al. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 2290—2297
- [21] Zeng Y, Chen H, Pang D W, et al. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 2441—2445
- [22] Schöninga M J, Jacobsa M, Mucke A, et al. *Sensors and Actuators B*, 2005, 108: 688—694
- [23] Manica D P, Mitsumori Y, Ewing A G. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 4572—4577
- [24] Dawoud A A, Kawaguchi T, Markushin Y, et al. *Sensors and Actuators B*, 2006, 120: 42—50
- [25] Tsai Y C, Jen H P, Lin K W, et al. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1111: 267—271
- [26] Keynton R S, Roussel T J, Crain M M, Baldwin R P, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 507: 95—105
- [27] Chen D C, Hsu F L, Zhan D Z, et al. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 758—762
- [28] Castañón-Alvarez M, Fernández-Abedul M T, Costa-García A. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1109: 291—299
- [29] 刘军山 (Liu J S), 罗怡 (Luo Y), 杜艳 (Du Y) 等. *分析化学 (Chinese J. Anal. Chem.)*, 2005, 33: 584—587
- [30] Vickers J A, Dressen B M, Weston M C, et al. *Electrophoresis*, 2007, 28: 1123—1129
- [31] 孟斐 (Meng F), 陈恒武 (Chen H W), 窦跃华 (Dou Y H) 等. *高等学校化学学报 (Chem. J. Chinese Univ.)*, 2004, 25(5): 844—846
- [32] Wu Y Y, Lin J M, Su R G, et al. *Talanta*, 2004, 64: 338—344
- [33] Liu Y, Vickers J A, Henry C S. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 1513—1517
- [34] Vickers J A, Henry C S. *Electrophoresis*, 2005, 26: 4641—4647
- [35] Lacher N A, Lunte S M. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 2482—2491
- [36] Wu C C, Wu R G, Huang J G, et al. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 947—952
- [37] Jackson D J, Naber J F, Roussel T J, et al. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 3643—3649
- [38] Hilmi A, Luong J H T. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 4677—4682
- [39] Wang J, Chen G, Chatrathi M P. *Electroanalysis*, 2004, 16: 1603—1608
- [40] Yan J L, Du Y, Liu J F, et al. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 5406—5412
- [41] Kong Y, Chen H W, Wang Y R, et al. *Electrophoresis*, 2006, 27: 2940—2950
- [42] Soper S A, McCarley R L, Vaidya B. *US 20040191703*, 2004
- [43] McCarley R L, Vaidya B, Wei S Y, Soper S A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 842—843
- [44] 孔泳 (Kong Y), 陈恒武 (Chen H W), 云晓 (Yun X) 等. *分析化学 (Chinese J. Anal. Chem.)*, 2007, 35(5): 623—627
- [45] Kim J H, Kang C J, Kim Y S. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20: 2314—2317
- [46] Kim J H, Kang C J, Jeon D, et al. *Microelectronics Engineering*, 2005, 78/79: 563—570

- [47] Wang W, Xu X Q, Bin Q, et al. *Electrophoresis*, 2006, 27: 4174—4181
- [48] He F Y, Liu A L, Yuan J H, et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 382: 192—197
- [49] Hebert N E, Snyder B, McCreery R L, et al. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 4265—4271
- [50] Hebert N E, Brazill S A. *Lab on a Chip*, 2003, 3: 241—247
- [51] Fischer D A, Vandaveer W R, Grigsby R J, et al. *Electroanalysis*, 2005, 17: 1153—1159
- [52] Sun X H, Yan J L, Yang X R, et al. *Electrophoresis*, 2004, 25: 3455—3460
- [53] Baldwin R P, Roussel T J, Crain M M, et al. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 3690—3697
- [54] Wilke R, Bürgenbach S. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, 19: 149—153
- [55] Wang Y R, Chen H W, He Q H, et al. *Electrophoresis*, 2008, 29: 1881—1888
- [56] Kovarik M L, Li M W, Martin R S. *Electrophoresis*, 2005, 26: 202—210
- [57] Virdi G S, Chutani R K, Rao P K, et al. *Sensors and Actuators B*, 2008, 128: 422—426
- [58] Hebert N E, Kuhr W G, Brazill S A. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 3301—3307
- [59] Martin R S, Ratzlaff K L, Huynh B H, et al. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 1136—1143
- [60] Rossier J S, Ferrigna R, Grault H H. *J. Electroanal. Chem.*, 2000, 492: 15—22
- [61] Osbourn D M, Lunte C E. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 2710—2714
- [62] Lai C C J, Chen C H, Ko F H. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1023: 143—150
- [63] Du Y, Yan J L, Zhou W H, et al. *Electrophoresis*, 2004, 25: 3853—3859
- [64] Mecher L C, Martin R S. *Electrophoresis*, 2006, 27: 5032—5042
- [65] Wang K, He F Y, Liu A L, et al. *Langmuir*, 2006, 22: 7052—7058
- [66] Ertl P, Enrich C A, Singhal P, et al. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 3749—3755
- [67] Huang X H, Zare R N, Sloss S, Ewing A G. *Anal. Chem.*, 1991, 63: 189—192
- [68] Wang Y R, Chen H W. *J. Chromatogr. A*, 2005, 1080: 192—198
- [69] Klett O, Björefors F, Nyholm L. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 1909—1915
- [70] Chen C C, Hahn J H. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 7182—7186
- [71] Klett O, Nyholm L. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 1245—1250
- [72] Xu J J, Bao N, Xia X H, et al. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 6902—6907
- [73] Li X A, Zhou D M, Xu J J, et al. *Talanta*, 2007, 71: 1130—1135
- [74] Xu J J, Peng Y, Bao N, et al. *J. Chromatogr. A*, 2005, 1095: 193—196
- [75] Xu J J, Peng Y, Bao N, et al. *Electrophoresis*, 2005, 26: 3615—3621
- [76] Martin R S, Gawron A J, Lunte S A. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 3196—3202
- [77] Gawron A J, Martin R S, Lunte S M. *Electrophoresis*, 2001, 22: 242—248
- [78] Martin R S, Gawron A J, Fogarty B A, Lunte S M, et al. *Analyst*, 2001, 126: 277—280
- [79] Mecker L C, Martin R S. *Electrophoresis*, 2006, 27: 5032—5042
- [80] Enrich C A, Tian H, Medintz I L, Mathies R A. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 5076—5083
- [81] Shadpour H, Hupert M L, Patterson D, Soper S A, et al. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 870—878
- [82] Pozo-Ayuso D F, Castañón-Álvarez M, Fernández-la-Villa A, et al. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1180: 193—202
- [83] Pumera M, Merkoci A, Alegret S. *Electrophoresis*, 2007, 28: 1274—1280
- [84] Johirul M, Shiddiky A, Kim R E, et al. *Electrophoresis*, 2005, 26: 3043—3052
- [85] Shiddiky M J A, Won M S, Shim Y B. *Electrophoresis*, 2006, 27: 4545—4554
- [86] Shiddiky M J A, Shim Y B. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 3724—3733
- [87] Dawoud A A, Kawaguchi T, Jankowiak R. *Electrochemistry Communication*, 2007, 9: 1536—1541
- [88] Vlček AM, Schwarz M A. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1142: 214—221
- [89] Wang J, Chen G, Chatrathi M P, et al. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 298—302
- [90] Wang J, Chatrathi M P, Tian B, et al. *Electroanalysis*, 2000, 12: 691—694
- [91] Shiddiky M J A, Park H, Shim Y B. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 6809—6817
- [92] Siangproh W, Chailapakul O, Laocharoensuk R, et al. *Talanta*, 2005, 67: 903—907
- [93] Wang J, Chen G, Chatrathi M P, et al. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 935—939
- [94] Wang J, Chen G, Muck A, et al. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1022: 207—212
- [95] Shin D C, Tryk D A, Fujishima A, et al. *Electrophoresis*, 2004, 25: 3017—3023
- [96] Wang J, Chen G, Wang M, et al. *Analyst*, 2004, 129: 512—515
- [97] Yi I J, Kim J H, Choi Y J, et al. *Microelectronic Engineering*, 2006, 83: 1594—1597
- [98] Wang W, Zhou F, Zhao L, et al. *Electrophoresis*, 2008, 29: 561—566
- [99] Zhai C, Li C, Qiang W, et al. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 9427—9432
- [100] Wang J, Chatrathi M P, Tian B. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 5774—5778
- [101] Wang J, Chatrathi M P, Tian B. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 1296—1300