



國立中山大學機械與機電工程研究所

碩士論文

Department of Mechanical and Electro-mechanical Engineering

National Sun Yat-sen University

Master Thesis

**3D 列印內嵌高分子電極卡匣整合二維紙層析及  
紙噴灑質譜法分析於生物樣本與食品安全檢測之應用**

3D Printed Cassette Embedded with Conductive Polymer  
Electrodes for Two-Dimensional Paper Chromatography and  
Paper Spray Mass Spectrometry (PS-MS) Detection in  
Bioanalysis and Food-safety Applications

研究生：鄭名栩 撰

Ming-Hsu Cheng

指導教授：林哲信 教授

Dr. Che-Hsin Lin

中華民國 107 年 7 月

July 2018

國立中山大學研究生學位論文審定書

本校機械與機電工程學系碩士班

研究生鄭名栩（學號：M053020106）所提論文

3D列印內嵌高分子電極卡匣整合二維紙層析及紙噴灑質譜法分析  
於生物樣本與食品安全檢測之應用

3D Printed Cassette Embedded with Conductive Polymer Electrodes  
for Two-Dimensional Paper Chromatography and Paper Spray Mass  
Spectrometry (PS-MS) Detection in Bioanalysis and Food-safety  
Applications

於中華民國 107 年 7 月 23 日經本委員會審查並舉行口試，  
符合碩士學位論文標準。

學位考試委員簽章：

召集人 傅龍明 傅龍明 委員 林哲信 林哲信

委員 曾韋龍 曾韋龍 委員 劉展岡 劉展岡

委員 莊承鑫 莊承鑫 委員 \_\_\_\_\_

指導教授(林哲信) 林哲信 (簽名)

# 國立中山大學博碩士論文公開授權書



etd-0725118-212646

2018-08-27 02:01:32

本授權書所授權之論文為授權人鄭名栩在國立中山大學 機械與機電工程學系研究所 106學年度第2學期取得碩士學位之論文。

論文題目： 3D列印內嵌高分子電極卡匣整合二維紙層析及紙噴灑質譜法分析於生物樣本與食品安全檢測之應用

指導教授：林哲信 教授

### 注意事項：

1. 依本校102年1月9日101學年度第1學期第10次行政會議通過，研究所畢業生可於上傳電子論文時自行選擇紙本及電子檔開放年限。
2. 因專利申請涉及論文公開時間，為避免因喪失新穎性而無法申請專利，請各位老師及同學上網參考「專利各項申請案件處理時限表」(網址路徑：經濟部智慧財產局→專利→專利情報通→專利處理時限)後再選定論文公開時間。  
另有關著作權相關資訊，請參考「經濟部著作權專區」(網址路徑：經濟部智慧財產局→著作權)。  
若尚有任何專利申請與著作權等相關問題，歡迎洽詢本校產學營運中心智財技轉組，分機2626。
3. 授權書一式兩份，經本人及指導教授共同簽名後，將論文公開授權書裝訂於審定書之後，辦理畢業離校時，除繳交一本論文至圖書館外，另一本繳交至教務處註冊組。

·**電子檔：** 此項授權同意以非專屬、無償方式授權予本校圖書館，不限地域、時間與次數，以微縮、光碟或數位化方式將論文全文(含摘要)進行重製，及公開傳輸。亦提供讀者非營利使用線上檢索、閱覽、下載或列印。

立即公開傳輸數位檔案。

因特殊原因，**校內請於5年後**公開、**校外(含國家圖書館)請於5年後**將論文公開或上載網路公開閱覽。

※ 論文電子檔公開日期：校內民國112年08月25日，校外(含國家圖書館)民國112年08月25日。

·**紙本論文：** 此項授權同意以非專屬、無償方式授權予本校圖書館，不限地域、時間與次數，以紙本方式將論文全文(含摘要)進行收錄、重製與利用；於著作權法合理使用範圍內，讀者得進行閱覽或列印。

同意立即公開。

因特殊原因，欲延後公開，**請於5年後**公開陳覽

※ 紙本論文公開日期：民國112年08月25日。

授權人：鄭名栩

學 號：M053020106

授權人： 鄭名栩 (簽章)

指導教授： 林哲信 (簽章)  
林哲信

中華民國 107年 8月 27日

※ 此授權書嚴禁塗改

- 若欲修改權限，請登入系統修改後重新列印此授權書。
- 若論文已審核通過，請聯繫etd@mail.nsysu.edu.tw或校內分機2452，修改後重新列印並簽章。
- 授權書將自動列印兩份。請於圖書館和教務處辦理離校手續時，裝訂於繳交的紙本論文內。

## 誌謝

研究所生涯瞬眼即過，不論在生活中或是研究上，皆有許多人的陪伴與幫助。首先，非常感謝我的指導教授林哲信老師，在我的研究生涯裡，不僅在學術有著充分的指導，給予我許多研究必備的知識，對於訂定研究方向到後續的實驗過程，老師皆給予我們許多獨立思考的空間，即使我們不斷經歷失敗與挫折，也會不厭其煩地給予我們建議及鼓勵，讓我們最終能夠完成實驗以及論文。此外，老師帶領我們出國的機會真的讓我們非常感激，讓我們有機會能夠到國際的大型研討會開拓視野，經歷未曾感受過的衝擊力，也帶領我們體會不同國家間文化的差異。同時也感謝口試委員傅龍明老師、劉展罔老師、莊承鑫老師、曾韋龍老師，願意予百忙之中蒞臨學生的口試擔任委員，給予我的研究及論文許多的指正與建議，使我的論文能夠更臻於完善。

感謝學長陳仲祥，不僅在畢業前教導我整個實驗的操作及概念，於畢業後還是非常熱心的解答我任何問題，對於我整個研究有著極大的幫助。感謝實驗室助理黃鈺珊，學長李政樺、翁國禎、方識傑、雷世勤，學姊高尉馨、翁琳凱、王君敏，指導我許多實驗儀器的操作，以及實驗室的事物，並且分享許多經驗與研究的技巧，讓我的實驗更加順利。其中特別感謝方識傑學長，不僅經常與我討論實驗的想法，對於生活中遇到的挫折與困難也多次開導我，尤其是在峽谷中的共同作戰，使我的研究生生活更加多姿多采。感謝同居的戰友李岱恩、嚴瑋星、呂維銘、白祥廷、陳子捷，一起窩在地下室的日子幫助我走過研究的挫折，對於我的研究生生活更增添了許多回憶。感謝學弟劉柏輝、許秩華、賴映榮、劉鎧豪、高嘉駿，在許多方面也給了我很多幫助，也同樣懷念共同在地下室度過的日子。感謝中華民國科技部，提供本研究資助及補助出國參與會議的費用。感謝家人的支持與鼓勵，讓我可以無後顧之憂的完成學業。最後感謝葉唐寬，在我研究生生活的最後這段時間裡，陪伴我走過人生中的低潮，在我受挫時給我鼓勵與幫助，成為我向前走的一大動力。

## 中文摘要

本研究提出利用低成本的濾紙片以及 3D 列印技術，製作一個整合式的卡匣系統，將二維紙層析分離濃縮與紙電噴灑游離法進行整合，將樣本經過第一維紙層析的簡易分離後，再透過第二維紙層析凝縮提升分離後的樣本濃度，最後再經由紙電噴灑游離法透過質譜進行偵測、分析，並將其應用於食品安全以及生物樣本的檢測。本研究選用市售的定性濾紙，做為二維紙層析分離濃縮以及紙電噴灑質譜法的基材，並且使用 ABS 以及基於 ABS 改質的導電高分子做為卡匣的材料，其成本相當低廉，且取得容易。卡匣主體是使用雙噴頭的 3D 列印機製造，由於卡匣使用的兩種材料皆是以 ABS 做為基底，因此可以在單一次的 3D 列印程序中，藉由兩個噴頭製造出含有內嵌高分子電極的卡匣，大幅降低製造的成本以及複雜度，並且使用二氧化碳雷射加工機切割紙片，定義出二維紙層析以及紙電噴灑游離法所需要的功能區域，因此，本實驗所需的製造及加工方式，可完全自動化進行，大幅降低人力成本以及社會資源的浪費。而本研究將二維紙層析及紙電噴灑游離整合，不需任何設備輔助即可在單一卡匣內完成，因此大幅提升檢測的自由度、方便性及易用性，使得普羅大眾可以輕易使用，大幅降低以往進行各項檢測的高門檻，間接提升社會安全。透過卡匣及紙片設計上的優化，解決了第一維層析分離時容易產生的拖尾現象，並且使樣本殘留降低了 10 倍，且透過節流閥以及犧牲翼的設計，使第一維層析時的理論板數分別提升了 3.9 倍以及 1.6 倍。樣本經過第二維層析濃縮後，質譜所偵測到的訊號強度相較於濃縮前，大幅提升了 100 倍，證實二維紙層析確實能將樣本濃縮於紙片尖端，提升質譜檢測的靈敏度。研究結果表明，本卡匣不僅可以量測到市售植物樣本中的微量農藥殘留，也能量測到人體體液(唾液、尿液)中的藥物殘留及藥物代謝，證明本卡匣系統於食品安全及生醫檢測的領域有著極大的潛力。

關鍵字：3D 列印、紙微流體、二維紙層析、紙電噴灑質譜法

# Abstract

This paper presents a novel paper-based microfluidic cassette integrated two-dimensional paper chromatography and paper spray mass spectrometry (PS-MS) detection in bioanalysis and food-safety applications. The cassette can be fabricated in a single-process through a dual-extrusion 3D printer equipped with ABS and ABS conductive polymers such that delicate fabrication processes can be excluded for producing the cassette. The sample injection, separation, concentration and electrospray ionization could be completed in the single microfluidic cassette through the specially designed cassette, paper-based microfluidic and the embedded polymer electrode. The liquid sample is directly applied to the sample trench and then separated and concentrated using a 2D paper chromatography technique. To further improve the performance of the paper-based microfluidic system, several special designs including a tip contact for uniform developing solution dispersion, several sacrificial wings for sample smear elimination and sculpted holes for electrical isolation during paper spray ionization. Results shows that the sacrificial wing and throttle valve can increase the number of theoretical plate to about 3.9 and 1.6 times respectively in the first-dimensional chromatography, and greatly reduce the sample residue on the paper tip. The second-dimensional chromatography has increased the signal strength by nearly a hundred times. The developed system can detect the residual pesticides in fresh grape, and the residual drug in body fluid.

Keywords: 3D-printing, Paper-based microfluidic, Paper spray mass spectrometry, Two-dimensional paper chromatography

# 目錄

論文審定書 .....	i
論文授權書 .....	ii
誌謝 .....	iii
中文摘要 .....	iv
Abstract .....	v
目錄 .....	vi
圖目錄 .....	viii
符號表 .....	x
簡寫表 .....	i
第一章 緒論 .....	1
1.1 研究背景 .....	1
1.2 微流體晶片系統 .....	2
1.2.1 微流體晶片 .....	2
1.2.2 紙基微流體晶片 .....	3
1.2.3 側流式微流體卡匣 .....	5
1.3 質譜檢測 .....	6
1.3.1 質譜分析系統簡介 .....	7
1.3.2 傳統質譜檢測方法 .....	8
1.3.3 新興質譜檢測方法 .....	8
1.4 電噴灑游離法 .....	9
1.4.1 電噴灑游離法之發展 .....	9
1.4.2 紙電噴灑質譜法 .....	10
1.4.3 3D 列印輔助紙電噴灑游離法 .....	12
1.5 研究動機與目的 .....	15
1.6 論文架構 .....	16
第二章 實驗原理與材料特性 .....	17
2.1 毛細現象 .....	17
2.2 層析法 .....	18
2.3 紙電噴灑游離法 .....	21

第三章 實驗設計與架構 .....	24
3.1 新型卡匣檢測系統的設計與製作.....	24
3.1.1 新型卡匣設計與製作.....	25
3.1.2 紙片設計與製作.....	28
3.1.3 卡匣與紙片的特殊設計.....	30
3.2 新型整合式二維紙層析卡匣系統.....	32
3.3 紙電噴灑游離質譜檢測系統.....	34
3.4 實驗系統架構.....	35
3.5 實驗設計與檢測目標.....	37
3.6 實驗溶液配製.....	39
第四章 實驗結果與討論 .....	40
4.1 樣本進樣口寬度分析.....	40
4.2 卡匣系統分離效能分析.....	41
4.2.1 犧牲翼效能分析.....	41
4.2.2 節流閥效能分析.....	43
4.3 卡匣系統濃縮效能分析.....	44
4.4 卡匣系統偵測極限分析.....	46
4.5 市售植物樣本檢測.....	47
4.6 生物樣本檢測.....	49
4.6.1 人體尿液中的藥物殘留分析.....	50
4.6.2 人體唾液中的藥物殘留分析.....	53
第五章 結論與未來展望 .....	56
5.1 結論.....	56
5.2 未來展望.....	57
參考文獻 .....	58
自述 .....	63

# 圖目錄

圖 1-1 改良型鈉玻璃微流體晶片製程示意圖。.....	3
圖 1-2 3D 堆疊紙微流體裝置示意圖。.....	4
圖 1-3 LFIA 應用三明治法檢測示意圖。.....	6
圖 1-4 紙電噴灑質譜法架構示意圖。.....	11
圖 1-5 葉片電噴灑質譜法式架構示意圖。.....	12
圖 1-6 3D 列印輔助紙電噴灑游離法架構示意圖。.....	13
圖 1-7 新型紙微流體電噴灑卡匣系統示意圖。.....	14
圖 1-8 論文架構圖。.....	16
圖 2-1 二維紙層析分離濃縮流程示意圖。.....	19
圖 2-2 電噴灑游離法之原理示意圖。.....	23
圖 3-1 本研究所使用的雙噴頭 3D 列印機。.....	26
圖 3-2 新型檢測卡匣設計圖。.....	27
圖 3-3 新型卡匣系統的紙片設計圖。.....	29
圖 3-4 新型卡匣系統的特殊設計。.....	31
圖 3-5 本研究之二維紙層析分離濃縮流程圖及實際影像。.....	33
圖 3-6 本實驗所使用的 LCQ Deca XP Plus 離子阱式質譜儀。.....	35
圖 3-7 本實驗之架構示意圖。.....	37
圖 4-1 樣本進樣口寬度分析。.....	40
圖 4-2 犧牲翼設計層析效能影像分析。.....	42
圖 4-3 犧牲翼設計層析效能理論板數分析。.....	43

圖 4-4 節流閥效能理論板數分析。.....	44
圖 4-5 第二維紙層析濃縮效能分析。.....	45
圖 4-6 卡匣系統與傳統紙電噴灑效能分析。.....	47
圖 4-7 市售葡萄量測質譜圖。.....	49
圖 4-8 攝取市售黑咖啡後的人體尿液樣本量測質譜圖。.....	51
圖 4-9 攝取複合藥物的人體尿液樣本質譜圖。.....	52
圖 4-10 吸菸者的唾液樣本量測質譜圖。.....	54
圖 4-11 攝取市售喉糖的人體唾液樣本質譜圖。.....	55

## 符號表

A	安培
cm	公分
dB	分貝
$E$	電場強度
g	公克
ions	離子個數
$l$	毛細管有效長度
m	公尺
M	體積摩爾濃度
min	分鐘
mL	毫升
mM	毫體積摩爾濃度
mm	毫米
m/z	質荷比
mol	莫耳數
N	理論板數
nA	奈安培
$t$	分析物遷移時間
V	伏特
$W_{1/2}$	分析物訊號半高寬
$\mu\text{L}$	微升
$^{\circ}\text{C}$	攝氏溫度
$\epsilon_0$	真空介電常數
$u$	分析物移動速度

## 簡寫表

ABS	丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物(Acrylonitrile Butadiene Styrene)
CE	毛細管電泳(Capillary Electrophoresis)
CI	化學游離法(Chemical Ionization)
CRT	電荷殘留說(Charge Residue Theory)
CZE	毛細管區帶電泳(Capillary Zone Electrophoresis)
DA	原子質量單位(Atomic Mass Unit)
EI	電子游離法(Electron Ionization)
ELISA	酵素結合免疫吸附法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
EOF	電滲透流(Electroosmotic Flow)
EP	電泳分離法(Electrophoresis)
ESI	電噴灑游離法(Electrospray Ionization)
FT-ICR	傅立葉變換質譜儀(Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance)
HPLC	高效液相層析法(High Performance Liquid Chromatography)
ICP	感應耦合電漿(Inductively Coupled Plasma)
IET	離子揮發理論(Ion Evaporation Theory)
LFIA	側流式免疫分析(Lateral Flow Immunochromatographic Assays)
MEMS	微機電系統(Micro Electro Mechanical System)
MS	質譜儀(Mass Spectrometer)
PC	聚碳酸酯(Polycarbonate)
PCR	聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reactions)
PDMS	聚二甲基矽氧烷(Poly(Dimethylsiloxane))
PLA	聚乳酸(Polylactic Acid)
PMMA	聚甲基丙烯酸甲酯(Poly(Methyl Methacrylate))
PS	聚苯乙烯(Polystyrene)

PSI	紙電噴灑(Paper Spray Ionization)
SLD	軟性雷射脫附質譜法(Soft Laser Desorption)
SNR	訊雜比(Signal to Noise Ratio)
TIC	總離子濃度圖(Total Ion Chromatogram)
TLC	薄層層析法(Thin layer chromatography)
TOF	飛行時間式(Time-of-flight)

# 第一章 緒論

## 1.1 研究背景

近年來食品安全和藥物濫用所造成的社會問題日趨嚴重，以及人口高齡化使得醫療成本大幅增加，因此開發各式的檢測裝置變得至關重要。目前大部分產業如生物檢測、分析化學、食品安全、環境衛生等方面的準確分析，通常需要仰賴大型的儀器進行樣本的前處理[1]，然而這類大型儀器不僅價格高昂，處理時間較長，且需要經由專業人員進行操作[2]，需要耗費許多的時間以及社會資源，大幅增加檢測成本，造成相關檢測普及不易。為了改善這些問題，開發高性能、低成本、簡易的檢測裝置尤為重要。

質譜儀(Mass Spectrometry)為近年來廣泛用於各領域的檢測儀器，質譜擁有極高的檢測效能，能夠準確地對樣本進行分析。然而傳統的質譜偵測方法，通常需要在高真空的環境下進行檢測[3]，使得檢測的樣本種類受到相當大的限制，大幅增加檢測時間以及成本。而近年來發展了能夠在一大氣壓的環境下進行偵測的質譜儀，大幅提升了檢測的範圍以及便利性，使各領域的樣本分析得到了很大的進展，然而由於質譜儀極高的靈敏度，檢測複雜的樣本時通常需要經過大型儀器來進行樣本前處理，才能有效進行分析，使得檢測時間及成本大幅提升。

本研究欲開發一紙基微流體卡匣系統，取代以往所用的大型儀器，達成檢測所需的分離以及濃縮的效果，搭配質譜儀進行後續的分析，針對農產品以及人體體液的藥物殘留進行檢測。透過特殊的流道設計，將所需的功能部件整合於卡匣內部，包含二維紙層析的緩衝液儲液槽，以及電噴灑游離所需的電極，並且經由近年來蓬勃發展的 3D 列印進行製造，大幅降低操作難度、製造難度以及製造成本，使普羅大眾便於取得使用，達到檢測普及化的最終目的。

## 1.2 微流體晶片系統

微流體晶片系統一直都是近年來各項領域的發展重點，微流體裝置根據設計的不同，可以達成各式各樣的效果，由早期基本的樣本分離及混合，到近年來的食品安全及生物檢測，都是微流體裝置所能涵蓋的範圍。而微流體裝置的設計理念，便是為了縮小傳統大型的實驗設備，將以往需要在實驗室才能夠完成的樣本處理及分析檢測，縮小為方便攜帶的大小，實現即時檢驗的需求。本章節將介紹微流體晶片的簡介，以及各種類型的微流體晶片發展歷史、製作材料以及檢測特性做一個概略的介紹。

### 1.2.1 微流體晶片

微流體晶片最早是透過矽及玻璃所製造[4]，這兩種材料最主要的優點是其具有高度絕緣的特性，以及極高的有機溶劑化學耐性，對於實驗的穩定性有著絕佳的幫助，且由於兩者的表面化學結構皆是由烷醇基(Silanol Group)所組成，使其可以輕易地進行表面改質處理[5]。傳統的晶片製程主要可以分為三個步驟，分別為光刻微影(Photolithographic)、化學蝕刻(Cheical Etching)以及晶片接合(Bonding)[6]，透過結合兩片晶片形成微流道。玻璃材料由於其優異的電驅動特性及化學耐性，通常被用於毛細管電泳分離(Capillary Electrophoresis, CE)[7]，或是生醫相關用途，如聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reactions, PCR)[8]等。圖 1-1 便是改良型鈉玻璃微流體晶片製程示意圖，此製程經過多年發展已經非常穩定，然而最大的缺點在於其對環境的潔淨度有著絕對的要求，任何一粒塵埃皆會造成製程受到影響，且製程中所用的化學藥品不僅有著極高的毒性，且僅能於黃光下保持穩定，因此需在黃光無塵室才能進行製作，大幅提高其生產成本。而矽由於其材料不透光的特性，使其無法直接觀察內部液體的流動，需要依靠嵌入式結構來輔助，造成製程困難度大幅提升，因此矽通常不會用於製造微流體晶片，而是應用於製造微流體晶片內部的功能性裝置，如微型閥、微型幫浦[9]以及微型反應器[10]等。

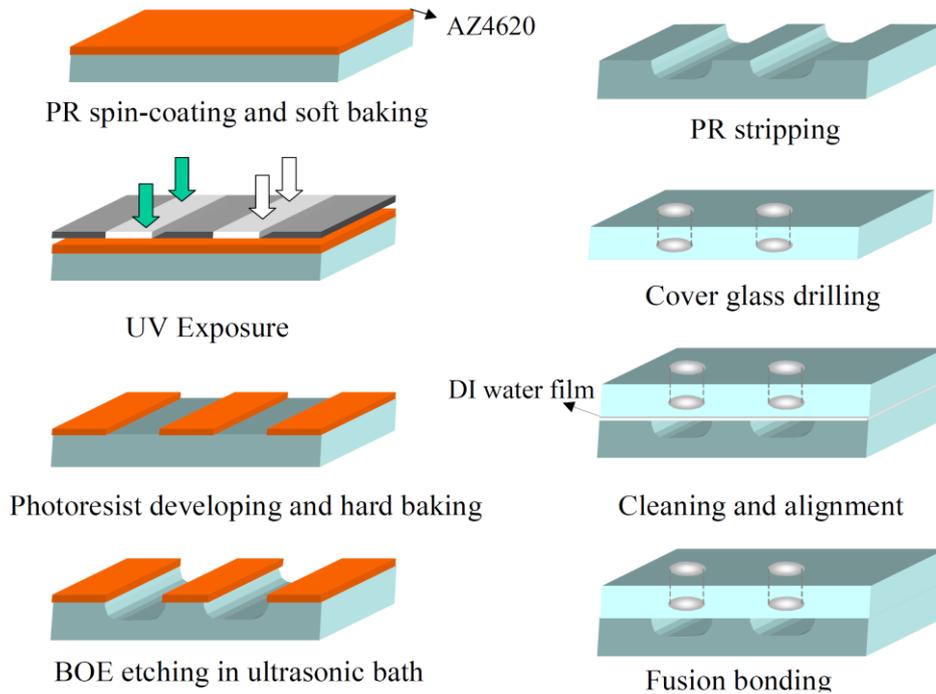


圖 1-1 改良型鋼玻璃微流體晶片製程示意圖[11]。透過更換光阻材料及改良晶片的接合方式，大幅降低生產成本及製程時間。

### 1.2.2 紙基微流體晶片

紙基微流體晶片(Paper-based Microfluidic)的概念始於 1949 年，Müller 與 Clegg 透過蠟於紙片上定義出簡易的流道，並且透過層析法進行樣本分離[12]。然而最初由於製程的限制，紙基微流體晶片僅有非常簡易的功能，並不受到科學家所重視，一直到 Whitesides 等人於 2007 年，以 SU-8 負光阻，透過光刻微影製程，在紙片上定義出微流道及反應區，透過呈色法(Colorimetric method)成功的檢測葡萄糖與蛋白質[13]，於微流體晶片的發展使上，寫下了嶄新的一頁，才讓紙基微流體晶片得以蓬勃的發展。然而最初的紙基微流體晶片製程中，定義微流道的光刻微影製程依然有著成本較高的缺陷，與紙基微流體低成本的主旨相違背，因此後續發展了許多成本更低的製造方法，如直接切割[14]、蠟印法[15]、噴墨印刷等[16]，雖然流道的精細度不如微影製程，但是大幅降低了製造的成本及時間，後續的發展便以這些製程為主。

相較於傳統的微流體晶片，紙基微流體晶片有著許多的優點，包括：

- (一) 可以利用本身的毛細作用作微流體的驅動力，而不須額外的設備輔助。
- (二) 可以透過本身材料的特性，直接經由呈色法對樣本做簡單的檢測。
- (三) 紙片是目前所有微流體晶片中成本最低的材料。
- (四) 可以透過3D堆疊的方式達到更多樣的功能性如圖 1-2。

然而紙基微流體晶片雖然成本極低，且擁有許多的功能特性，但是由於受限其材料性質，導致檢測靈敏度受到極大的限制，且無法像其他材料定義出微小的流道寬度，使得紙微流體晶片僅能進行初步的簡易判斷，無法作為最終的檢測結果[17]。而為了解決檢測靈敏度不佳的問題，便發展出了許多的配套裝置，用以輔助紙基微流體裝置進行檢測結果的判讀，如近年來所研發的攜帶式商業血糖機[18]，便是使用經由蠟印法(Wax Printing)定義出流道的紙基微流體晶片對血液進行簡易的處理後，再經由機器進行最終檢測，大幅增加紙基微流體晶片檢測的準確度。

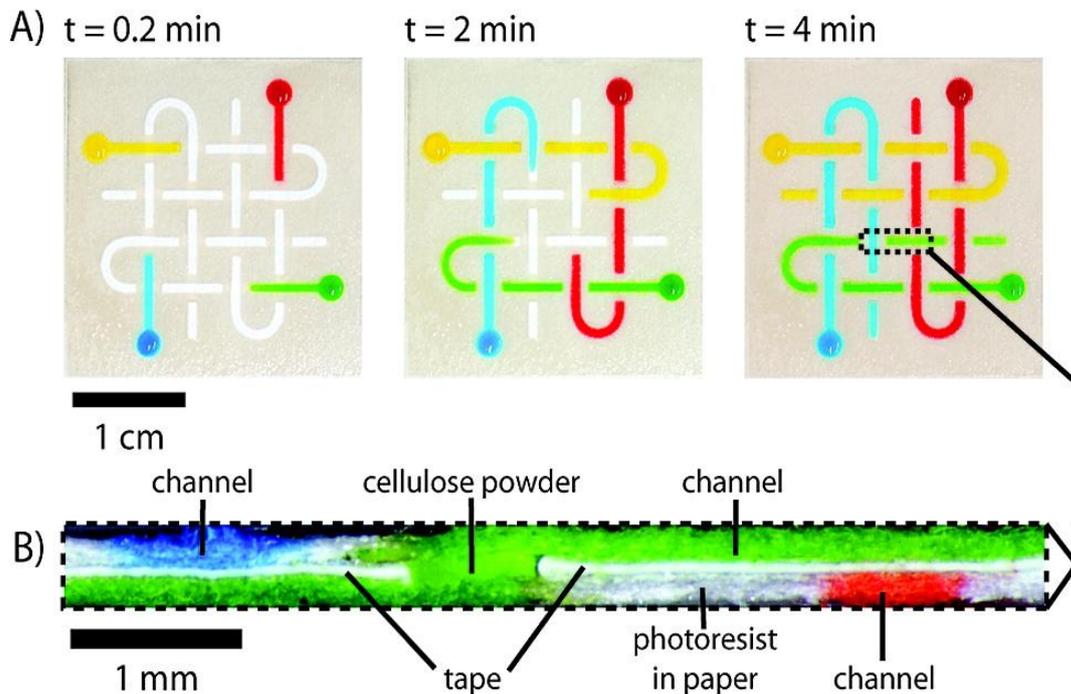


圖 1-2 3D 堆疊紙微流體裝置示意圖[19]。圖(A)為實際實驗時，液體進樣後隨時間變化的實際影像，可以看到液體隨著三維設計的流道流動，且不會影響到上下層的液體。圖(B)為實驗時的剖面示意圖，可以看到第三維的流道被膠帶定義出來。

### 1.2.3 側流式微流體卡匣

而側流式微流體卡匣，便是紙基微流體晶片後續發展的重點之一，該技術主要的重點在於將傳統的紙基微流體晶片，與化學標定互相結合，透過免疫測定的方式，改善紙基微流體晶片靈敏度低下的問題，同時保有其低成本、易用的檢測特性。側流式微流體卡匣對於未開發國家極為重要，由於醫療資源的匱乏，以側流式微流體卡匣進行初步的診斷，不僅可以大幅降低醫療資源的消耗，且能讓患者在第一時間接受正確的治療。

而最初的側流式微流體卡匣系統於 1957 年代被提出，當初僅將紙片結合化學標定，因此功能性相當侷限，僅針對尿液中的葡萄糖進行監測[20]。直到 1980 年，Ullman 等人將 Engvall 和 Perlman 於 1971 年提出的酵素結合免疫吸附法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)[21]，與側流式微流體卡匣相結合，提出了側流式免疫分析(Lateral Flow Immunochromatographic Assays, LFIA)[22]，發展出了劃時代的新型檢測裝置。ELISA 主要的原理，是透過抗體與抗原間互相作用的專一性，來針對特定樣本進行檢測。其分子作用力主要是由於以下幾點所產生：

- (一) 兩個帶負電的分子間的氫鍵作用力
- (二) 聚合時產生的疏水作用力
- (三) 帶正電的胺基酸與帶負電的羧基產生的凡德瓦力

此外，由於兩者皆是由蛋白質組成，因此任何會影響蛋白質結構之因素皆會對整體與抗原皆的結合造成影響[23]。而經過後續的發展，從 ELISA 發展出了三種檢測方式，分別為三明治、間接法、競爭法三種，主要是根據不同的用途進行區別。其中三明治法通常是用於檢測大分子的抗原，如大型蛋白質的定量檢測等[24]，其中圖 1-3 便是結合三明治法所製成的 LFIA 檢測卡匣；間接法則是目前最為普遍的檢測卡匣，用於檢測一般的抗體，如各種病毒及細菌等[25, 26]；競爭法則較少用到，通常是樣本無法用於上述兩種方法時，才會使用競爭法做為最終手段，且受限於其檢測機制，也僅適用於小分子抗原的檢測，如少數的病毒及細菌等[27, 28]。

而 ELISA 雖然有著極高的靈敏度及專一性，依然有其限制存在，其中偽陽性及偽陰性是導致檢測失準最重要的因素[29, 30]，因此通常需要搭配後續的分析輔助，如質譜檢測，來做為最終的判斷。

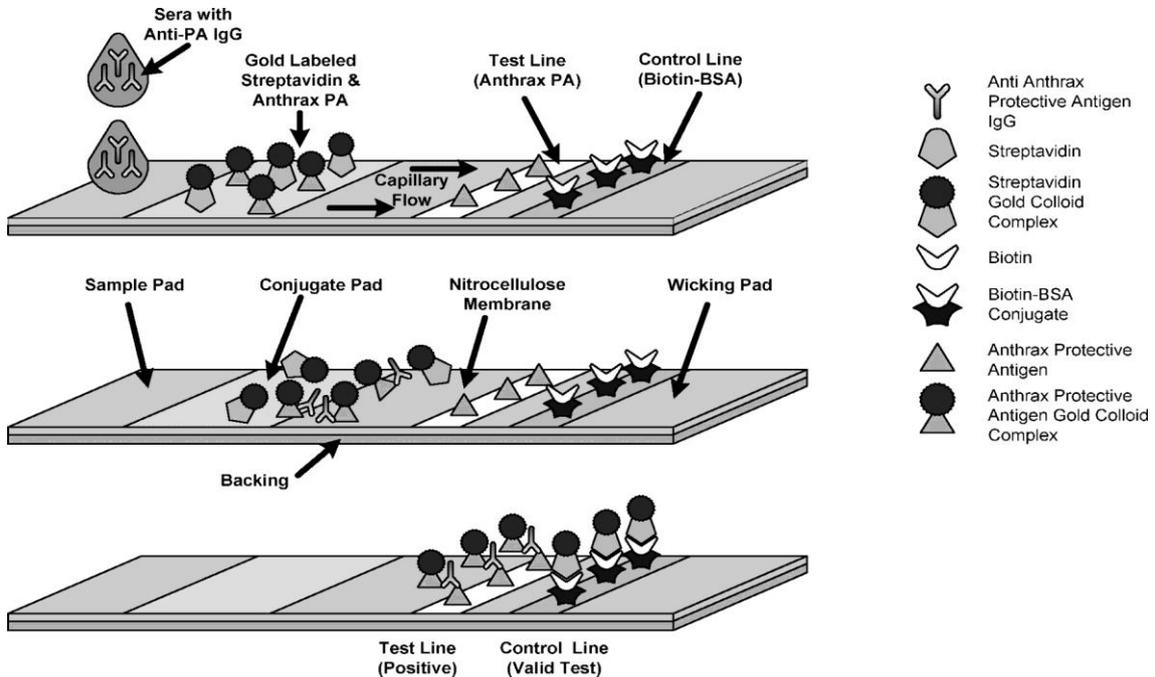


圖 1-3 LFIA 應用三明治法檢測示意圖[31]。其中以膠體金與抗原結合做為顯色劑，當檢測時抗體與抗原相結合，膠體便會聚集顯色，使檢測結果可以直接觀察，而不需要其他儀器輔助。

### 1.3 質譜檢測

質譜檢測是近代最為精確並廣泛使用的化學分析方法之一，其最大的特點就是擁有極高的偵測靈敏度及解析度，因此對於微量物質的分析上有著無法取代的重要性，藉此特性可以將其廣泛利用於各個領域。以近年較常發生的案件為例，由於農產品在種植過程中通常會使用多種農藥來保護作物，只要處理不當往往就會發生農藥殘留超標的問題，然而過多的農藥殘留如果進入人體將對健康產生相當大的危害，其中農藥的殘留就是使用質譜儀來進行檢測[32]。近年來藥物濫用也是造成社會安全的主要問題之一，其中質譜可以透過檢測人體體液中的成份來分析是否有藥物殘留，藉此判斷檢測對象是否有藥物濫用的情形[33]，對於國土安全有

著相當大的幫助。因此，質譜檢測系統已經是現今相當重要的分析儀器之一，對於各項檢測技術來說是不可或缺的一環。

### 1.3.1 質譜分析系統簡介

質譜分析的概念於 1897 年由英國物理學家 Thomson 所提出，他經由陰極射線管搭配電極板產生的電子射線偏折實驗中，發現物質由不同質量所組成，將電子受磁力及庫倫作用力影響而偏轉時，所產生的偏折角度，由向心力公式推導出了質荷比(Mass to Charge Ratio,  $m/z$ )的概念[34]，也因此於 1906 年獲得諾貝爾物理學獎。而在 1919 年，Aston 便成功發明出了世界第一台質譜儀，用其量測到了氦、溴等天然同位素[35]，並且於 1922 年獲得諾貝爾化學獎。

質譜系統主要由五大部分所組成：

- (一) 進樣系統(Inlet)：待測物經由一連串步驟如：層析分離、萃取濃縮等等，再依照不同方式進入游離單元進行游離。
- (二) 游離方法(Ionization Method)：將經過處理的待測物根據不同的游離方法，使其游離並且攜帶電荷後進入後端分析器，主要分為電噴灑游離法(Electrospray Ionization, ESI)、大氣壓力化學游離法(Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)兩大種類。
- (三) 質量分析器(Mass Analyzer)：利用磁場或電場，將帶電荷的待測物離子根據其不同的質荷比進行篩選，留下所設定的偵測範圍，目前較為使用的有四極柱(Quadrupole)、離子阱(Ion Trap)、飛行時間式(Time-of-Flight, TOF)、傅立葉變換式 (Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR)等等。
- (四) 偵測器(Detector)：將偵測到的離子電流訊號，轉譯並送至資料處理系統，其中電子倍增管及法拉第杯(Faraday Cup)為目前主流的離子偵測器。
- (五) 資料處理系統(Data Processing System)：由偵測器所獲得之結果，經程式處理轉換為較容易判讀的質譜圖。

### 1.3.2 傳統質譜檢測方法

對於質譜檢測方法的探討，通常是根據游離源的發展而定，主要分為傳統的真空游離技術，以及現代的大氣游離技術。其中傳統的質譜檢測方法最早可以追溯到1960年代，當時質譜儀主要使用的游離技術主要是以下兩種：電子游離法(Electron Ionization, EI)與化學游離法(Chemical Ionization, CI)，其中電子游離法的原理則是透過高能量電子束來轟擊樣本分子，使其產生自由基或者碎片離子，並且根據其產生的離子訊號來推測結構及其分子量，然而此方法常常因為電子束的能量太強，將樣本分子撞得支離破碎，導致難以直接觀察到樣本的離子訊號，使後續的分析受到相當大的影響。因此，後來發展出了化學游離法，通入大量的反應氣體，透過電子束轟擊反應氣體後，藉由離子-分子反應，使樣本游離帶電，且反應氣體可以起到保護樣本的作用，避免樣本被電子束直接轟擊導致碎裂，比起電子游離法更容易直接觀察到樣本的離子訊號[36]。然而，這兩種游離方式於實驗進行時，腔體皆需保持真空狀態，且樣本都是藉由加熱產生氣化，通常是具有熱穩定性且易揮發之化合物，使得應用的範圍相當侷限，由於其需要保持在真空下的操作環境，也導致檢測的時間及成本大幅增加。為了解決質譜檢測方法高度受限的問題，於1970年發展了一種新型的游離技術，與傳統直接轟擊使樣本游離的方式不同，是先將樣本脫附後再進行游離，簡稱為脫附游離法。脫附游離法的原理是透過瞬間的極大能量，使該區域的樣本分子產生相變化，由液態或固態轉換為氣態分子，再藉由離子-分子反應使樣本形成質子化離子[37]。然而，此方法雖然能夠解決以往需要高揮發、高熱穩定性的樣本限制，但是依然需要在高真空腔體下操作，並沒有解決檢測耗時及成本過高的問題。

### 1.3.3 新興質譜檢測方法

而質譜檢測直到近年來終於有了突破性的進展，Yamashita 和 Fenn 於1984年提出了電噴灑游離法(Electrospray Ionization, ESI)[38]，以及 Tanaka 等人於1988年

提出了軟性雷射脫附游離法(Soft Laser Desorption, SLD) [39]。這兩種游離方法的出現，使得質譜儀能夠於大氣中進行實驗，便是所謂的環境質譜法(Ambient Mass Spectrometry)，解決了高真空條件所帶來的各項限制，不僅大幅提升質譜量測的效率，更拓寬了質譜儀所能檢測的範圍，其中最重要的便是對於蛋白質的相關研究發展上，有著極大的貢獻。其中本研究的主軸，電噴灑游離法將於後面章節進行更詳細的介紹。

## 1.4 電噴灑游離法

電噴灑游離法是近代最為被廣泛使用於質譜檢測的游離技術，而電噴灑游離法最大的優勢在於其游離機制，可以使待測物游離後形成帶多價電荷的離子，便能使待測物的質荷比大幅降低，使以往質譜檢測難以分析的大分子樣本得以進行量測，讓質譜檢測的量測範圍大幅提升。本章節將對於電噴灑游離法的發展做一個概略的介紹，包含後續根據電噴灑游離法所發展出來的新型態游離方法，而關於電噴灑游離的原理會於第二章做更詳細的說明。

### 1.4.1 電噴灑游離法之發展

電噴灑現象的發現，最早是於 1914 年由 Zeleny 所提出，最初是將電壓賦予毛細管內的液滴後，觀察帶電液滴於毛細管尾端的現象，並且將帶電液滴的變化紀錄下來，便是最初的電噴灑現象研究[40]。而當時主要是以工業用途為主，如高電壓噴漆及內燃機之霧化點火系統等，尚未將電噴灑現象用於化學分析。

而最早將電噴灑游離法用於化學分析領域，是在 1968 年由 Dloe 等人所提出，當時是利用電噴灑游離法用於分子量極大的玉米胚成功的游離帶電，玉米胚的分子量高達 50k Da，在當時屬於非常難以檢測的超大分子物質，然而當時並沒有使用質譜儀做為後端的檢測儀器，僅使用了法拉第杯偵測帶電離子的電流訊號變化[41]。而到了 1985 年，Whitehouse 等人首次將電噴灑游離法與質譜進行結合，由

四極柱式質譜儀做為後端檢測儀器，接收樣本經由電噴灑產生的帶電離子流，成功於資料分析器的質譜圖上，觀察到帶有多價電荷的離子信號，證明了經由電噴灑產生的帶電離子流，確實可以使樣本游離後形成帶有多價電荷的狀態[42]。得到首次成功後，此研究團隊再度於同樣的架構下，針對具有超大分子量的聚乙二醇 (Polyethylene Glycol) 進行實驗，並且成功取得此樣本了帶有 23 個正電荷的離子訊號[43]，並且於同年度再度針對聚乙二醇所帶有的蛋白質進行分析，成功的觀察到帶有 45 個正電荷的蛋白質離子訊號[44]。得到以上成功後，電噴灑游離法搭配質譜的分析方式，便於各檢測領域中獲得高度重視，並且解決了以往大分子樣本難以檢測的問題，發展至今更延伸出了許多的游離方法，如紙電噴灑質譜法、脫附電噴灑游離法、極化誘導電噴灑游離法等。

#### 1.4.2 紙電噴灑質譜法

紙電噴灑質譜法為 Cooks 團隊於 2010 年所提出的新形態電噴灑游離搭配質譜儀的檢測方法[45]，此游離方法相當簡便，其架構如圖 1-4 所示，直接以三角形紙片做為電噴灑載體，並且將樣本置於紙片中央後，滴定電噴灑溶液並且於紙片後端施加高電壓，並且將接地端置於紙片尖端的前方，電噴灑溶液便會帶電，經由電壓持續推動，向著紙片尖端聚集，當尖端液滴間的庫倫斥力大於表面張力，便會飛散出去產生電噴灑現象。此游離方法有著許多的優勢，包含需要的樣本量極少、成本極低、分析時間極短且操作簡單，僅需將紙片接上質譜儀所提供的高壓電源即可進行，大幅減少檢測所需要的設備，且由於其低成本的特性，實驗結束後即可丟棄，避免了重複使用下可能發生的交叉污染，大幅提升檢測的可靠度，對於近代的質譜檢測發展，有著極高的重要性。

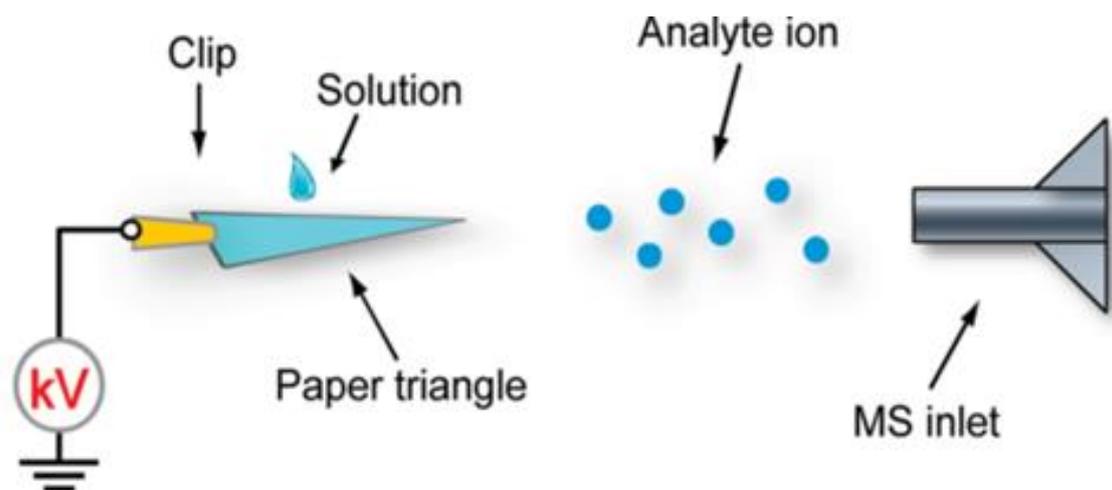


圖 1-4 紙電噴灑質譜法架構示意圖[45]。其架構組成非常簡單，僅需將紙片與質譜提供支高壓電源進行連接，於紙片上滴定電噴灑溶液，即可透過紙電噴灑游離法，產生帶電離子，進入質譜進行檢測分析。

而紙電噴灑游離法經過多年發展，由最初僅能測量液體樣本，到後來可以直接測量生物組織切片，以及直接使用樣本代替紙片，這些衍生的變化型電噴灑游離方法大幅提升了紙電噴灑所能檢測的範圍，如 Cooks 團隊將各種紙電噴灑游離方法用於檢測血液中的藥物[46]、食品添加物[47]、以及生物組織切片[48]的直接檢測。然而，由於紙電噴灑質譜法的檢測特性，樣本與紙片間的關係會大幅影響檢測的結果，因此如何提升紙電噴灑質譜法的穩定性及檢測靈敏度，便是首要的目標。其中 Cooks 團隊於 2011 年，針對血液中的藥物殘留進行質譜檢測時，提出了以紙片的預處理做為提升檢測靈敏度的方法，透過預處理，先在紙片上的進樣區域，加工一層矽膠(Silica Gel)薄膜，提升紙片對於血液的附著能力，使得後續進行紙電噴灑游離時，血液的主要成分被留在原地，僅有包含目標物的少數成分能夠被電噴灑溶液帶走，達到簡易的分離效果，使檢測靈敏度大幅提升[49]。而 Zhang 等人於 2014 年，透過蒸鍍的方式，根據樣本的種類將紙片鍍上不同的材料，成功增加了檢測藥物、蛋白質及揮發性化合物的靈敏度，證明了紙電噴灑質譜法可以透過各種方式增加檢測的效能，發展潛力不言而喻[50]。而為了提升檢測效率，Ouyang 團隊於 2013

年提出了自動化的檢測系統，將紙片與電控平台進行結合，將電極及進樣裝置固定，並且將紙片置於電控平台上，透過陣列式的紙片設計，便能於單軸的移動間分別檢測不同紙尖上的樣本，最大可於 84 秒間分別檢測 12 個不同種類的樣本，大幅提升紙電噴灑質譜檢測的效率[51]。

而關於前面所提到的變化型紙電噴灑游離法，其中之一是由 Liu 等人於 2011 年所提出[52]，以植物葉片取代紙片，直接接上高壓電源進行電噴灑游離，如圖 1-5 所示。此方法不僅省去了需要將樣本處理後施加於紙片上的動作，由於透過樣本直接產生帶電離子流，免去了紙片所帶來的影響，可以得到更純粹的檢測結果。

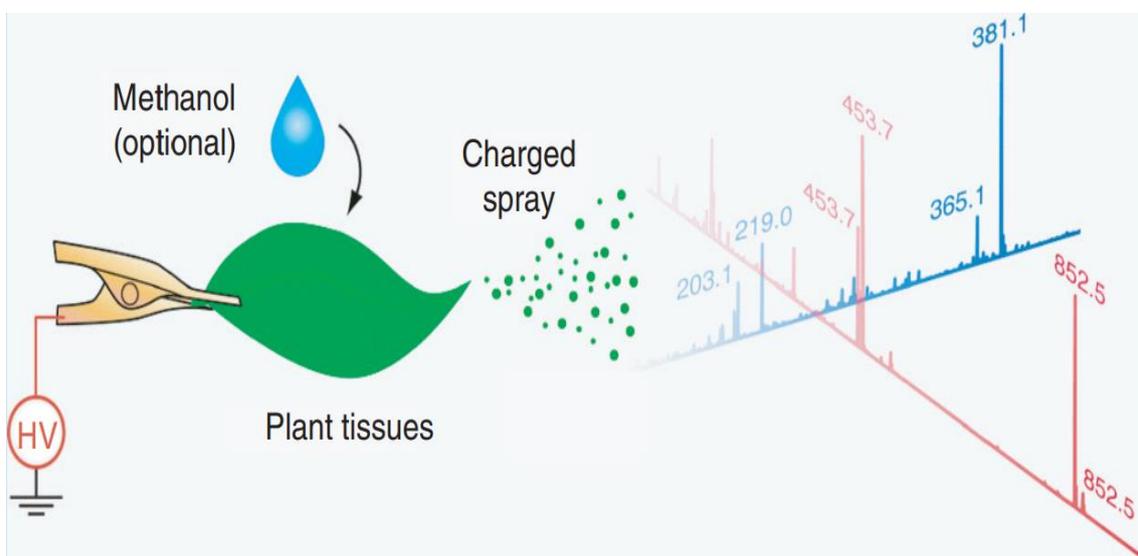


圖 1-5 葉片電噴灑質譜法式架構示意圖[52]。與紙電噴灑質譜法相似，以葉片取代紙片，直接透過葉片進行電噴灑質譜法。

### 1.4.3 3D 列印輔助紙電噴灑游離法

然而，紙電噴灑游離法雖然有著許多的優點，由於是使用紙片做為載體，其穩定度會受到非常多因素的影響，不僅電噴灑的持續時間會受限於紙片所能承載的液體面積，紙電噴灑游離法所產生的離子訊號相對來說也較不穩定，因此如何提升紙電噴灑游離法的穩定度，又不會因此喪失其優勢，便是目前最重要的發展目標。

近年來積層製造技術蓬勃發展，許多實驗室都以此製造實驗所需的輔助設備，而積層製造的優點不外乎方便、易用、低成本，與紙電噴灑游離法的訴求完全符合，因此於2016年，Duarte等人提出了以積層製造技術來列印紙電噴灑游離法的輔助裝置，設計一個夾持器將紙片固定於前端，僅將一部份的尖端露出，並且於夾持器的內部設計了一個儲液槽，用以供給電噴灑溶液如圖1-6示。此設計透過後方的儲液槽，不僅解決了電噴灑持續時間受限的問題，也大幅提升了電噴灑時的穩定性，對於紙電噴灑游離法的發展創造了新的方向。

而Salentijn等人則於2017年延伸了這個概念，設計了一個新型的紙電噴灑卡匣，不僅透過儲液槽增加穩定度，且透過了兩種不同的聚焦設計來提升檢測的靈敏度，結合氣流通道以及環形電極來達到聚集帶電離子流的效果。最初的設計是使用於卡匣內部設計流道供氣體流通，並且將出口設定於紙片尖端旁，以惰性氣體的氣流來限制帶電離子流的擴散，藉此達到提升離子濃度的方法；而經過實驗確認氣流通道確實可以增加偵測靈敏度後，再於卡匣上加入一個環性的聚焦環，透過在卡匣內嵌入一個環形電極，並且於電極上施加電壓，透過電場輔助，來加強對於帶電離子流的控制，藉此提升聚焦的效果。結果表明，藉由抑制帶電離子流的擴散，確實可以有效提升檢測時的離子強度，大幅提升了紙電噴灑質譜法的檢測效能[53]。

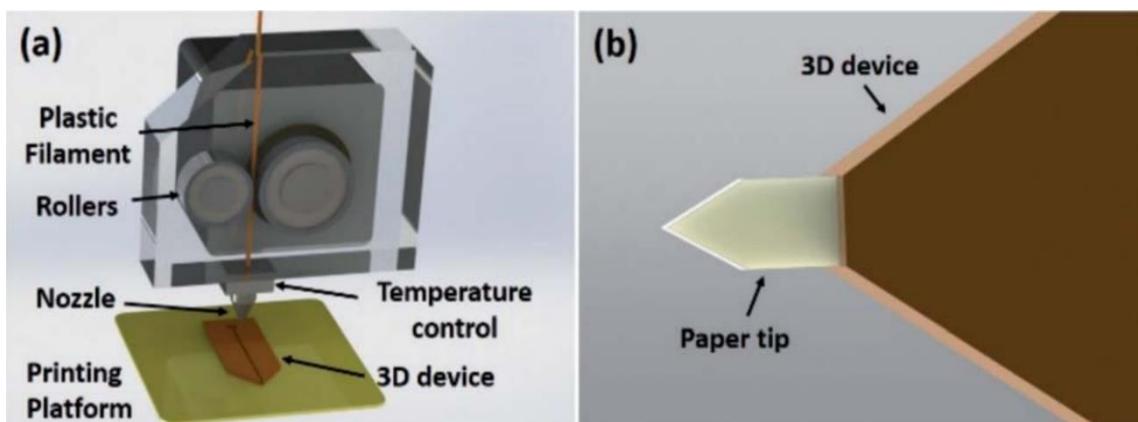


圖 1-6 3D 列印輔助紙電噴灑游離法架構示意圖[54]。圖(A)為其製程，圖(B)為輔助裝置夾持紙片時的剖面圖。

而本研究室於 2016 年，由陳仲祥提出了新型的紙微流體電噴灑卡匣系統，透過結合二維紙層析分離濃縮與質譜分析的概念，大幅簡化樣本的前處理，並且有效的提升紙電噴灑質譜法的檢測效能[55]。其架構如圖 1-7 所示，透過一個經由 3D 列印製造的卡匣夾持紙片，於卡匣內部完成二維紙層析後，再將外接的電極板插入卡匣內，並且透過後端的插拔式插槽傳導電噴灑所需的高壓電至紙片上，進行紙電噴灑質譜偵測。然而，此卡匣系統雖然可以做為有效的檢測工具，但是由於其進行第二維紙層析及電噴灑質譜法時，皆需要透過外接的物件來進行輔助，而無法於一個卡匣上完成，使得實驗的複雜度提升，且由於此卡匣預留了電噴灑質譜法所需要的紙片尖端，使得層析分離時容易產生拖尾及樣本殘留的現象，導致分離效能低落，嚴重影響檢測的性能。

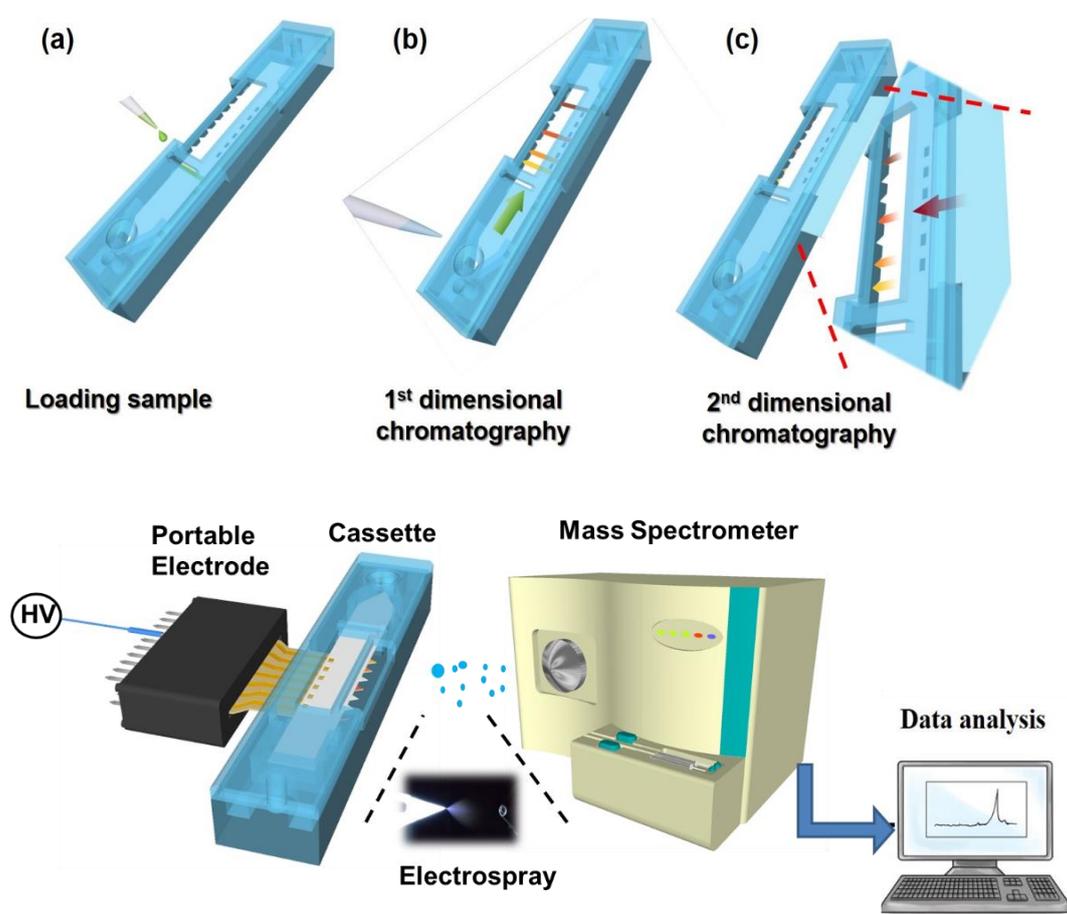


圖 1-7 新型紙微流體電噴灑卡匣系統示意圖[55]。樣本進樣後於經過二維的紙層析分離凝縮處理，再經由後端插入的電極傳導質譜儀提供之高壓電源至紙片上，進行紙電噴灑質譜法。

## 1.5 研究動機與目的

開發低成本、易用、高效能的微型化檢測裝置，是目前各項檢測領域所追求的目標，其主要目的便是取代目前實驗室的大型儀器，使得檢測不再受限於專業的檢測中心才能進行，達成全面普及的最終目標。本實驗室多年來致力於微流體晶片系統研究，近年來研究利用紙基微流體卡匣系統，搭配質譜儀進行樣本的分析檢測，但目前已發表的二維紙層析微流體卡匣，不僅設計上沒有針對各項部件進行最佳化，造成樣本前處理的分離效果低落，且整體的加工製程以及實驗步驟也相對複雜，再再與本研究的訴求相違背。

因此本研究欲提出一改良式的紙基微流體卡匣系統，實驗目的如下：

1. 將整體卡匣系統重新設計
  - a. 簡化卡匣的加工製程及實驗步驟。
  - b. 將檢測所需的功能部件整合於卡匣內部。
  - c. 解決分離效能低落的問題。
2. 將紙基微流體卡匣系統用於紙電噴灑質譜偵測
  - a. 透過內嵌的高分子電極做為電噴灑所需電流的導體。
  - b. 將卡匣實際上機進行電噴灑可行性測試。
3. 將本微流體卡匣系統進行廣泛性測試
  - a. 針對植物樣本進行農藥殘留的檢測。
  - b. 針對生物樣本進行藥物殘留的檢測。

本研究不僅保有紙微流體系統的低成本、易於製造、容易操作、可拋棄的優點，並且透過二維紙層析分離濃縮與質譜偵測的搭配，開發出高泛用性的整合式高效能檢測系統。

## 1.6 論文架構

本論文第一章將先簡介研究相關背景與目前技術，第二章說明實驗原理與材料，接下來第三章是實驗的架構、設計與操作的介紹，第四章會呈現出實驗的結果與討論，最後第五章將會針對本研究做完整的總結。完整的架構如圖 1-8 所示。



圖 1-8 論文架構圖。

## 第二章 實驗原理與材料特性

本研究最主要的檢測技術，總共分為紙層析、紙電噴灑游離、質譜分析三個部分，紙層析主要是用於質譜量測的前處理，將樣本進行分離，達到質譜偵測所需的基本條件，並且更進一步的濃縮樣本，得以大幅提升偵測的靈敏度以及準確性。質譜檢測技術主要是透過分析待測物的質量，以及經過游離帶電後所帶之電荷數目的比值，依照其荷值比大小的不同，造成其通過質量分析器的時間以及路徑會有所差異，並且依此作為偵測的標準，可以做定性分析得知待測物的成分，也可以做定量分析得知待測物的質量以及特性。

### 2.1 毛細現象

毛細現象與我們的生活息息相關，是很常見的物理現象，任何與液體有接觸的事物，都能夠看到它的存在。毛細現象是指液體在微細的管狀物體中，由於附著力與內聚力不同，造成液體流向管狀物體的現象，甚至能夠使液體無視重力而向上爬升，常見的現象如土壤中液體的流動、紙片能夠吸水等，都是因為液體與固體間的附著力大於液體的本身之內聚力，所產生的毛細現象。

毛細現象的由來最早是在 1662 年由波以耳所提出的波以耳定律。根據其實驗結果表示，在含有定量氣體的密閉容器中，並且於恆溫條件下，氣體的體積會與壓力成反比。此呼吸時身體的變化為例，吸氣時，橫膈膜收縮而下降，肺部體積增加使得壓力降低，因此空氣得以進入肺部；吐氣時，橫膈膜放鬆而上升，肺部體積縮小使得內部壓力增加，當內部壓力大於外界壓力時，氣體向外釋放。其壓力間一來一往的相互動作，便是波以耳定律(Boyle's law)的體現。而後續發現的連通管以及虹吸等原理，便是波以耳定律的延伸。

毛細現象最常被拿來說明的例子，就是在液體中插入管柱，液面與管壁間會根據液體種類的不同，形成一個向下凹陷或者是向上凸起的圓弧狀，而這個現象主要就是液體與管壁間的附著力與內聚力的差異所造成，當液體的附著力大於內聚力

時，受到附著力的影響，靠近管壁處的液面高度會較管柱中央更高，當液體附著力小於內聚力時則反之。然而液體本身的表面張力為了讓液面保持平衡，使得傾斜的液面沿著切線方向產生了力分量，造成管柱內的液體被表面張力所牽引，當牽引的力與液體重量達到平衡後，便會達到平衡而停止，其中管柱直徑與牽引力成反比，因此管柱直徑越大所造成的高度變化越小。

## 2.2 層析法

根據化合物在流動相與固定相之間的分配差異來分離樣本的方法便稱之為層析法。根據流動相與固定相的差異，分為氣相層析、管柱層析及薄層層析等。本實驗所使用的紙層析，便是薄層層析的一種，透過紙片作為層析固定相，將待測物點附在紙上，並請以展開液作為流動相透過毛細作用力移動，由於混合物內各項物質與固定相以及流動相的親和力不同，造成遷移速率的差異，藉此達到分離的效果。本卡匣系統分離濃縮之示意圖如圖 2-1 所示，首先將 2.0  $\mu\text{L}$  之樣本滴定於卡匣進樣口，樣本會經由進樣口的流道設計於紙片上產生均勻的矩形樣本塊，待其自然乾燥後便能開始第一次的層析分離，將 80.0  $\mu\text{L}$  的展開液滴定於第一維層析溶液進樣口，透過與儲液槽接觸的紙片尖端，藉由毛細作用力將展開液牽引於紙片上，並且透過展開液與紙纖維的附著力前進，根據樣本內部各物質與展開液以及紙片的親和力不同，使其移動的距離造成差異，達到第一維層析分離的效果。第一維層析分離完成後，待其展開液揮發，便能夠進行第二維的層析濃縮，將 8.0  $\mu\text{L}$  的展開液滴定於第二維層析溶液進樣口，透過插入儲液槽的紙片側翼同樣藉由毛細作用力將展開液牽引於紙片上，並且將分離過後的樣本塊往紙片尖端聚集，達到樣本濃縮的效果。此方法用於顏色較深的樣本時就能夠直接以肉眼進行觀察，不僅簡單有效，而且不需要任何的儀器進行補助，只需將樣本萃取為溶液便能使用，大幅降低了前處理的複雜度、時間以及成本，可以顯著提升檢驗效率。

最早期的色層分析法是在 1906 年被提出，當時將植物萃取液溶於石油醚後，將其倒入含有許多碳酸鈣顆粒的管柱中，將碳酸鈣作為固定相，石油醚作為展開液進行層析，由於植物中富含帶有顏色的葉綠素以及胡蘿蔔素，使得分離時會形成不同的色帶，就是色層分析法的起源[56]。而紙層析最早則是被應用於針對天然植物中所特有的色素成分進行分離，並且將分離過後的色素用於染色用途[57]。此外，經過了長時間的發展，於 1953 年提出了第二維層析的概念，與第一維層析的做法相同，差別在於第一維層析完成後，將固定相做 90° 的旋轉，再進行一次紙層析，主要是為了將分離過後的混合物進行濃縮，提升各別成分之濃度，Levy 將此法用於胺基酸之層析檢測[58]。

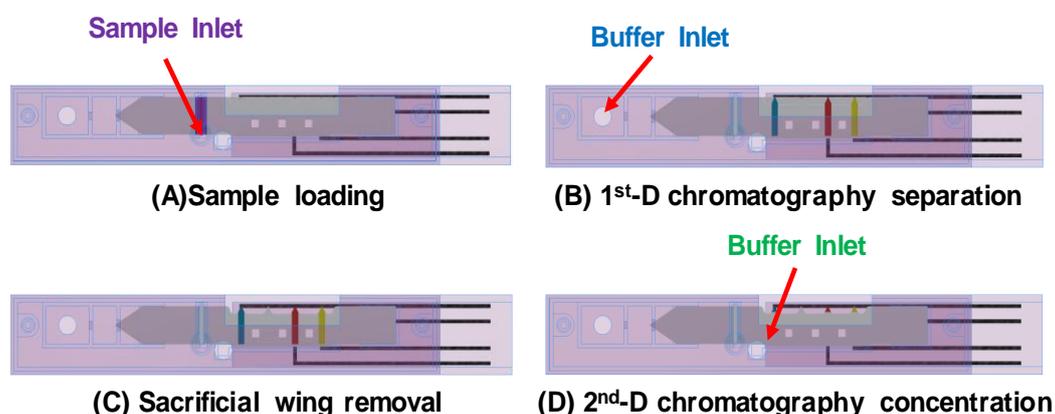


圖 2-1 二維紙層析分離濃縮流程示意圖。圖(A)為進樣示意圖，樣本於紙片上展開為矩形樣本帶，圖(B)為展開液進樣進行第一維層析分離示意圖，可以看到混合物樣本已經被分離為三個的樣本帶，圖(C)為移除犧牲翼示意圖，可以看到紙片側邊已經出現用於紙電噴灑游離法的尖端，圖(D)為展開液進樣進行第二維層析濃縮示意圖，可以看到分離後的三個樣本帶已經往紙片尖端聚集，完成濃縮的效果。

由於並非所有的樣本都具有顏色，通常無色的樣本都會加上染色劑，例如甲基藍、甲基紫、蘇丹紅等。透過染色的效果，可以直接目視觀察樣本得知初步的分離效果，而不需透過其他檢測儀器，可以大幅降低檢測所需要的時間，然而詳細的檢測結果還是需要搭配其他儀器來進行分析。

一般影響樣本在紙層析時的遷移速率主要有以下幾點：

#### (一) 基材

紙片的材質對於展開液以及樣本的親和性都有相當大的影響，不同的纖維、厚度、孔徑等，都會影響層析時樣本以及展開液的流動情形，因此根據混合物的種類來選擇所使用的濾紙至關重要。

#### (二) 極性

混合物內各種物質的極性對於層析分離的效果有著絕對影響力，根據展開液的不同，物質極性的高低會大幅影響層析展開時的遷移速率，因此需要根據混合物的種類與分離的需求來選擇適當的基材以及展開液

#### (三) 展開液

通常會根據混合物的極性來選擇展開液的種類，一般來說如果是對於未知的混合物進行層析分離時，都會選用高極性的展開液如甲醇、乙醇等，高極性溶液對於大部分的物質都有親和力，因此有較高的泛用度。然而如果要針對混合物內的某些低極性物質進行針對性分離時，則會使用低極性的展開液如己烷、丙酮等，因為此類展開液通常只對少數的物質有親和力。

#### (四) 分子量

混合物中不同物質的分子量會影響其遷移速率，單就分子量大小討論的話，通常分子量較大者移動得比較慢，分子量較小者則反之，故混合物所含有的物質中，分子量差異越大可以得到越好的層析效果。

#### (五) 電荷

若混合物中的物質在層析過程中，得到電子形成帶電離子，則遷移速率將會受到展開液的酸鹼度所影響。

為了量化層析的分離效能，於 1941 年提出了板塔理論，其中以理論板數 (Theoretical Plate,  $N$ ) 作為衡量層析效能的指標，其主要計算公式如下：

$$N = 5.54 \left( \frac{t}{W_{1/2}} \right)^2 \dots\dots\dots(1)$$

N：理論板數

t：分析物遷移時間(Migration Time of Analytes)，單位為 s

W<sub>1/2</sub>：分析物訊號之半高寬(Full Width at Half Maximum)，單位為 mm

層析分離技術經過多年的演進，近幾年發展出了氣相層析法(GC)、高效液相層析法(HPLC)、薄層層析法(Thin layer chromatography, TLC)等各式各樣的層析技術。雖然大部分的層析方法都比紙層析擁有更高的分離效能，有著非常優異的理論板數，但是其大部分過程繁雜，耗費時間較長，且使用的儀器較為昂貴，通常需要專業的人員進行操作，造成整體的成本大幅提升，是不容易普及的最大原因。因此，本研究預計開發之卡匣系統，透過特殊的流道設計，將二維紙層析分離、濃縮整合於單一卡匣內，並且使用 3D 列印進行製造，大幅降低實驗複雜度、成本及檢測時間。透過第二維的濃縮，改善紙層析法先天上訊號強度不足的缺陷，達成在單一卡匣系統內完成混合物的成分分離，並且濃縮分離後的成分，增加系統的偵測靈敏度，然後再將濃縮後的樣本搭配質譜檢測，取得最後的分析結果。

## 2.3 紙電噴灑游離法

紙電噴灑游離法是根據電噴灑游離法發展而來，而兩種游離方式最主要的差異，在於使用的基材以及進樣方式，紙電噴灑游離法的基材是使用帶有尖端的紙片，而進樣方式則是將樣本及電噴灑溶液直接滴定於紙片；而電噴灑游離法則是使用毛細管作為載體，並且透過進樣幫浦進樣，兩者間有著非常明顯的差異，然而在游離的機制上，兩者並無差別，如圖 2-2 所示，主要的游離步驟有四個部分，(一)形成泰勒錐(Taylor cone)、(二)、形成氣膠(Aerosols)、(三)揮發、(四)游離[59]

### (一) 形成泰勒錐

將高電壓施加在含有電噴灑溶液的紙片後端，施加的高電壓則會推動溶液，使

得溶液往尖端靠近。由於施加的電壓為正電壓，導致帶有正電荷的離子，會因為電極斥力的作用而往尖端移動。由於受到液體表面張力的影響，會在紙片尖端形成圓錐狀，便是所謂的泰勒錐。

## (二) 形成氣膠

形成泰勒錐後持續的施加高電壓，尖端帶有正電荷的離子持續累積，液滴間的不斷增加的電荷導致庫倫斥力加大，當庫倫斥力大於表面張力的臨界值，泰勒錐前端的液滴將會開始爆裂，製造出大量的帶電液珠，即是所謂的氣膠。

## (三) 揮發

在氣膠的飛行過程中，其內部的溶劑將不斷揮發，使得帶電液珠的體積逐漸縮小，但是電荷卻不會喪失，造成液珠中的電荷密度上升，而當液珠中的庫倫斥力與表面張力大於雷力極限時，帶電液珠將會再次爆裂，形成更大量的微小帶電液珠，此過程會反覆不斷地在飛行過程中發生，使帶電液珠的體積大幅縮小。

## (四) 游離

電噴灑的過程中，為了要讓帶電液珠轉變為帶單價或多價電荷的氣相離子，目前學界中關於此轉變為氣相離子的游離機制存在於兩種解釋。分別為 1968 年 Dole 等人所提出之電荷殘留說(Charge Residue Theory)，以及 1976 年由 Thompson 和 Iribarne 所提出之離子揮發理論(Ion Evaporation Theory)。

首先關於電荷殘留理論，由 Dole 等人首先提出，之後再由 Rollgen 等人做後續的補充，此理論主要是根據不同分子間的表面活性進行探討，由於不同分子各自擁有相異的表面活性，因此，帶電液珠爆裂出許多微小帶電液珠時，表面活性較大的分子則會比較容易跑進較小的帶電液珠，此特性造成爆裂後的帶電液珠容易形成單一離子的狀態。而當帶電液珠中的溶劑持續揮發，使得帶電液珠中的電荷殘留分析物之離子，形成帶單價或多價電荷的氣相離子，始完成游離的步驟，然而此理論僅適合做為大分子分析時解釋，因此後續提出了離子揮發理論來解釋小分子分析時的游離現象。

離子揮發理論中，則認為並非所有帶多價電荷的氣相離子都是在液珠揮發時造成的電荷累積形成的，而是在帶電液珠的飛行過程中，由於持續發生的液珠爆裂，使得帶電液珠的表面電場無法保持穩定，使分析物離子在液珠爆裂的過程中，一起被電荷所帶走，而在帶電液珠飛行的過程中，將會不斷地重複這個過程，最終將使得分析物的氣相離子能夠帶電，此理論用於解釋小分子分析時的游離現象。

關於揮發過程中所提到的雷力極限(Rayleigh Limit)，可以根據下列的雷力方程式(Rayleigh Equation)進行計算，得知帶電液珠中的電荷數以及液珠間的表面張力之相對關係

$$Q_R^2 = 64 \pi^2 \epsilon_0 \gamma R_R^3 \dots\dots\dots(2)$$

$Q_R$ ：液滴所攜帶電荷之庫倫數

$\epsilon_0$ ：真空介電常數(Permittivity of Vacuum) ，單位為 F/m

$\gamma$ ：溶液之表面張力

$R_R$ ：液滴半徑，單位為 m

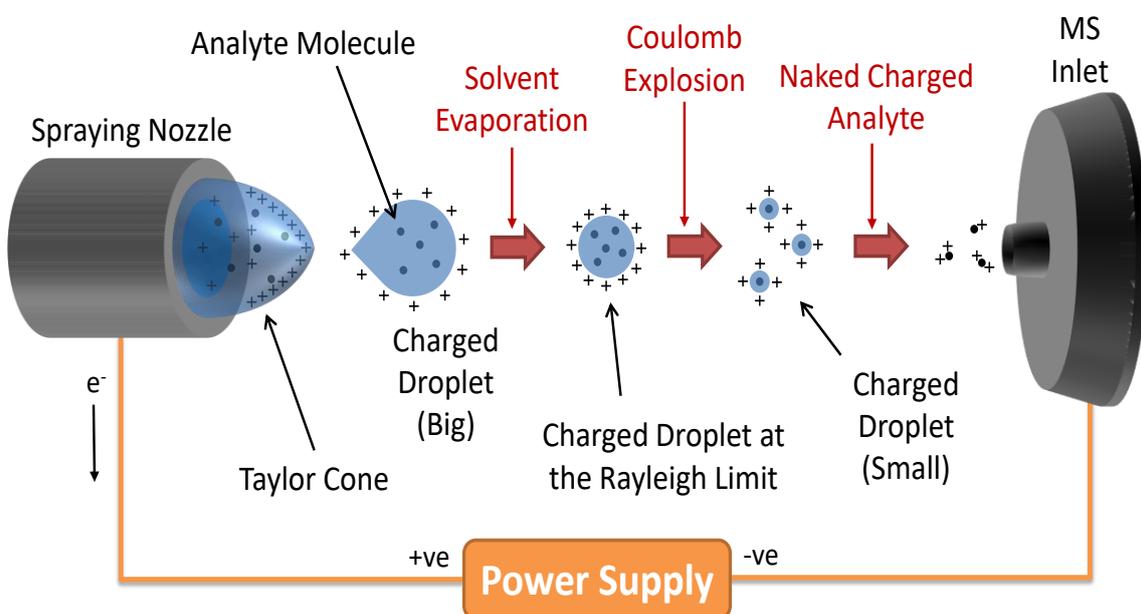


圖 2-2 電噴灑游離法之原理示意圖[60]。分為形成帶電液滴、形成氣膠、帶電液滴揮發及爆裂、形成帶電離子流。

## 第三章 實驗設計與架構

本章節首先將於第一小節介紹本檢測系統的卡匣以及內部的紙片設計與製作；第二小節則對於本檢測系統中，二維紙層析分離濃縮之設計概念與實驗流程進行介紹；第三小節則對於後續的質譜檢測進行詳細的介紹，包含紙電噴灑質譜法的游離及偵測系統，其中主要說明電噴灑參數以及質譜內部之設定；第四小節則是對於整體架構進行完整的說明，包含設計、製造、以及實際上機操作的詳細介紹；第五小節則會對於整體實驗的設計與檢測目標，作完整的結論以及敘述，將本研究的構想與架構作一個完整的呈現；最後於第六小節將介紹本研究如何製備所需的樣本以及展開液。

### 3.1 新型卡匣檢測系統的設計與製作

在新型卡匣檢測系統中，卡匣與內部的紙片設計，是本研究最核心的部分，包含樣本進樣、第一維層析分離、第二維層析濃縮、紙電噴灑游離，皆在此卡匣上完成，而不需要其他裝置進行輔助，有著絕佳的使用性、便利性。然而，與傳統的檢測卡匣不同，本研究將檢測卡匣透過紙電噴灑游離法，與質譜檢測進行結合，得到極高的檢測靈敏度，解決傳統檢測卡匣效能低下的問題。並且透過與不同層析溶液的搭配，使得檢測範圍得以大幅提升，包含現今特別重視的食品安全、生醫檢測以及環境衛生等，都是此檢測卡匣系統所能涵蓋的範圍，不再像傳統的檢測卡匣，僅能針對特定領域的樣本進行分析。

而本研究所開發之卡匣檢測系統，將會以生醫檢測以及食品安全為主要檢測領域，證明此卡匣檢測系統的泛用性。近年來世界各國食品安全問題頻傳，以及藥物濫用所造成的社會問題也日趨嚴重，不僅如此，人口高齡化的問題也使得醫療成本大幅增加，導致各領域的檢驗需求都大幅提升，然而現今能夠跨領域檢測的儀器通常價格高而且操作不易，因此本研究希望開發一個適用於跨領域檢測，但是卻擁有低成本、易用、高靈敏度特性的檢測工具。

### 3.1.1 新型卡匣設計與製作

卡匣使用商用的立體製圖軟體(Autodesk Inventor, Autodesk, USA)進行設計，定義出卡匣外型後再將圖檔匯入切片軟體(Cura, Ultimaker, USA)中，將檔案轉換成 3D 列印機使用的.gcode 檔案，最後再將檔案匯入雙噴頭 3D 列印機(Ultimaker 3 Extended, Ultimaker, USA)如圖 3-1，來進行最終的製造。3D 列印機的其中一個噴頭加載無法導電的高分子材料，用以列印不需導電的部分；而另一個噴頭則加載混有導電成分的導電高分子，用以列印需要導電的部分。藉由兩種材料搭配，可以直接在卡匣分別由兩個噴頭加載不同材料，定義出卡匣的外型以及內部用於紙電噴灑所需要的高分子電極。由於 3D 列印機的基層製造特性，兩種材料需要基於同一種基材才能同時進行列印，否則無法互相黏附導致列印的失敗。實驗初期使用聚乳酸(Polylactic Acid, PLA)高分子(PLA Filament 3.0 mm, Ultimaker, USA)搭配 PLA 混合石墨稀製造而成的 PLA 導電高分子(Conductive Graphene PLA Filament 1.75 mm, Black Magic 3D, USA)，作為列印材料，噴頭的溫度分別設定為 210 °C 與 220 °C，加熱板溫度設定為 60 °C，列印速度設定為 40 mm/s，層厚設定為 0.1 mm，使用此參數可以將兩個材料完整的列印於單一卡匣內。然而在進行層析時，發現 PLA 的化學耐性不佳，容易遭到有機溶劑破壞，溶解卡匣因而導致層析失敗，使得實驗的廣泛度受到相當大的影響。因此，製造卡匣所使用的基材便是設計的優先考量項目。最後以現有的 3D 列印材料進行挑選，使用了 ABS 高分子(ABS Filament 3.0mm, Ultimaker, USA)搭配 ABS 混合導電碳黑製造而成的 ABS 導電高分子(Conductive ABS Filament 3.0mm, ALIEN 3D, China)，作為最後的列印材料，其中 ABS 混合碳黑後雖然可以導電，但是其電阻值極高，列印出來的成品電阻大約在 10 k $\Omega$ ，而本實驗之基礎為電噴灑游離法，而進行電噴灑時，所傳導之電流電流僅 600 nA，即使電阻值極高也不會產生壓降而發熱，剛好可用於此種導電材料。為了配合材料的改變，將噴頭溫度提升至 250 °C 與 260 °C，加熱板溫度提升至 80 °C，並且將列印速度提升到 60 mm/s，層厚設定一樣為 0.1 mm。由於兩種材料都是基於 ABS 進行

製造，因此可以確保能夠同時在單一的 3D 列印程序上，可以同時被擠出並且互相黏附，製造出含有內嵌高分子電極的卡匣。會選取 ABS 作為材料的主要原因除了其為少數含有導電合成材料的 3D 列印基材，更重要的是 ABS 具有很強的化學耐性，不會受有機溶劑破壞，因此可以使層析展開液的選擇更為全面，大幅增加實驗的廣泛度，並且其高穩定、高強度的特性，非常適合用於製造卡匣載體，因此最終選擇 ABS 高分子樹脂作為本卡匣的材料。



圖 3-1 本研究所使用的雙噴頭 3D 列印機。為龍門式的設計，具有兩個擠出頭以及加熱板，可以在單次的列印過程中，同時列印兩種材料。

在結構設計上如圖 3-2 所示，為了將樣本進樣、第一維紙層析分離、第二維紙層析濃縮、紙電噴灑游離法都結合於單一卡匣中，因此需要設計一個樣本進樣口、兩個儲液槽以及傳輸電壓所需要的電極。首先，樣本帶的形成會影響到第一維層析時展開液的流動情形，當樣本帶形狀不規則時，則層析時可能會因為展開液的等效液面無法維持，產生嚴重的拖尾現象，不僅會降低分離效能，也可能使層析失敗，因此進樣時是否能夠形成完整且平整的樣本塊至關重要。所以在卡匣進樣口的設計上，將進樣口設計為一個細長的區域，使進樣時樣本會先經由毛細作用充滿進樣口，最後再由漏斗狀的進樣結構使樣品向下流動，均勻的接觸紙片，在紙片上形成一個平整的樣本帶，使得後續的層析可以順利的進行。而第一維層析分離所需要的展開液較多，因此設計了一個較大的儲液槽，並且為了控制展開液的流動速度，採

用了雙槽式的設計，第一槽的大小為  $6.5 \times 5.5 \times 2.5 \text{ mm}^3$  可以容納  $80 \mu\text{L}$  的展開液，並且透過一個  $1.0 \times 0.4 \times 0.5 \text{ mm}^3$  的矩形孔洞連接第二個儲液槽，第二槽的大小為  $5.0 \times 3.4 \times 2.5 \text{ mm}^3$  僅做為緩衝用途，因此不需要容納所有的展開液，並且紙片透過第二槽側邊一個  $1.50 \times 0.38 \times 0.50 \text{ mm}^3$  的矩形孔洞進入第二儲液槽吸取展開液。而第二維層析溶液的儲液槽則由一個  $1.50 \times 1.50 \times 2.50 \text{ mm}^3$  與一個  $15.00 \times 0.50 \times 2.50 \text{ mm}^3$  的矩形所組成，可以容納第二維層析所需的  $8.0 \mu\text{L}$  展開液，儲液槽前方的正方形區域是為了方便進樣而加大，後方的矩形區域則是為了跟插入的紙片配合。而為了使電噴灑順利進行，在卡匣的左側則設計了嵌入式的電極，並且為了避免紙電噴灑游離的液珠受到影響，在卡匣的右側保留了較大的開口。而整體卡匣系統中，對於紙電噴灑游離影響最大的因素便是電極的設計，本系統藉由內嵌的高分子電極，將質譜儀內部提供之高壓電源傳遞至紙片上，進行紙電噴灑游離。游離的效果將是整個系統最重要的環節，如果電極設計不良造成游離效果不佳，即使紙層析分離濃縮的效果再好，也無法量測到良好的訊號，導致整體實驗失敗。因此，電極的設計需要經過完整的考量，不論是電極與紙片的相對位置，以及電極間的間距，都是設計電極時非常重要的因素。

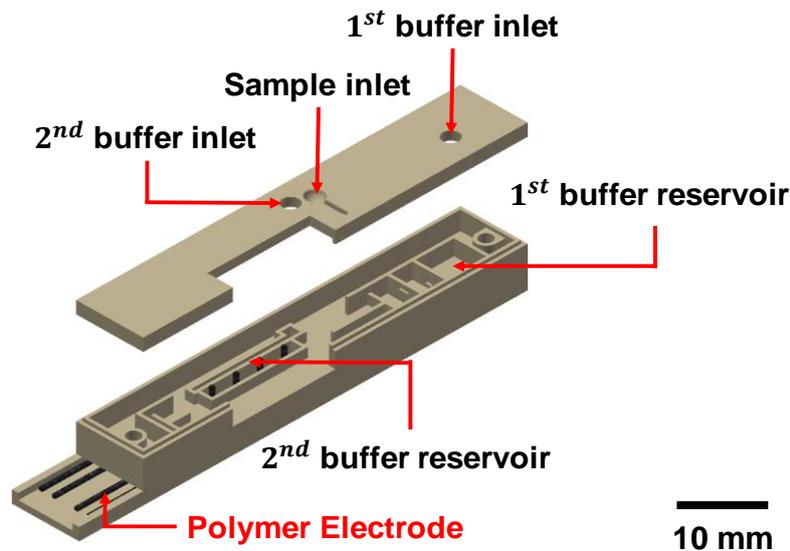


圖 3-2 新型檢測卡匣設計圖。分為上蓋及本體，其中上蓋含有樣本進樣口、第一維層析展開液進樣口及第二維層析展開液進樣口，本體中則含有第一維層析展開液儲液槽、第二維層析展開液儲液槽，以及用於紙電噴灑游離法的高分子電極。

### 3.1.2 紙片設計與製作

本研究使用定性分析專用濾紙(Whatman, No.42 90 mm, GE healthcare life sciences, UK)作為卡匣內部紙片的材料，定性分析濾紙對於粒徑及液體的流速控制有絕佳的效果，因此相當適合用於紙層析。首先於工程製圖軟體將紙片的圖形定義出來，再將圖面傳輸至波長 10.8  $\mu\text{m}$  的二氧化碳雷射雕刻機進行加工，透過這個方式加工，可以使用自動化進行批次的大量製造，大幅降低加工成本，並且免去了人為可能造成的影響，間接降低檢測失敗的風險。而在二氧化碳雷射加工參數的設定上，將解析度(Dots per Inch, DPI)固定為 1000、使用 1.2 W 功率的雷射以及 203.2 mm/s 的加工速率針對濾紙上的功能部件進行加工，包含犧牲翼以及與第二維層析溶液儲液槽配合的側翼，進行低功率的切割，由於使用的功率較小，加工速率也較快，因此濾紙不會被直接切斷，僅會留下一個切割線。後續使用 2.4 W 功率的雷射以及 101.6 mm/s 加工速度，對於紙片需要切斷的部分進行加工，包括紙片的外型以及內部的絕緣孔。

紙片的設計上，根據層析理論的影響因子，需要考量紙片的寬度以及層析分離時所需要的流道長度，而紙電噴灑游離法的部分，主要是考量紙片上的電噴灑尖端角度。紙片的寬度會大幅影響樣品進樣後所展開的範圍，如果寬度過小則會造成展開區域過大，影響層析效能，而寬度過大的話則需要更大量的樣本量才能夠形成完整的樣本塊，因此如何在兩者間取得平衡相當重要。

因此，紙片的尺寸設計，首先需要考慮紙片的長度與寬度，為了讓後續的紙電噴灑游離以及質譜檢測能夠順利完成，需要讓系統在樣本進樣以及後續的二維紙層析分離濃縮時能夠保持穩定，才能夠得到最佳的檢測效果。紙片的設計是參考 Cooks 團隊用於紙電噴灑質譜法的紙片尺寸[45]，配合本系統的需求進行修改，最終調整為 40.0 x 5.0  $\text{mm}^2$ 。而紙電噴灑質譜法所使用的紙片尖端角度則根據文獻，使用電噴灑效果最佳的 60°[55]，並且紙片尖端長度為 1.3 mm 如圖 3-3 所示，而紙片側邊包含了插入卡匣第二維層析溶液儲液槽，並且與其配合的側翼，側翼的大

小為  $13.5 \times 2.0 \text{ mm}^2$ ，在側翼的前方，則設計了一排  $1.0 \times 1.0 \text{ mm}^2$  的方形絕緣孔，此絕緣孔是為了防止電噴灑時，電流在兩個紙片尖端之間流通[55]，造成非檢測之尖端，也產生紙電噴灑游離的現象，導致質譜量測到兩個尖端的物質，造成檢測上的錯誤，因此透過此絕緣孔將尖端之間隔絕開來，留下相對應的電流通路，電流便會選擇最短路徑通過，使電極可以針對所需檢測的尖端傳導電流，避免同時產生噴灑現象，干擾最終的檢測結果。

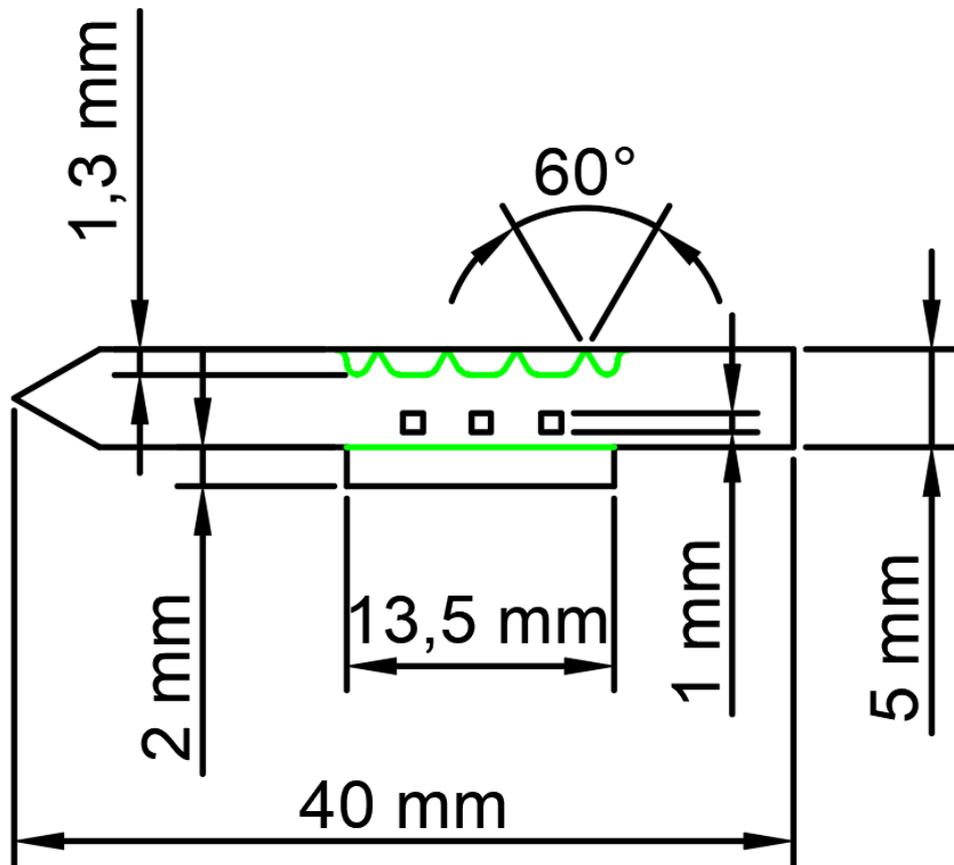


圖 3-3 新型卡匣系統的紙片設計圖。紙片上含有用於防止第一維層析分離時產生拖尾現象及樣本殘留的犧牲翼、用於方便折彎紙片側翼，並插入第二維層析濃縮展開液儲液槽切割線、用於紙電噴灑質譜法的四個尖端，以及防止電噴灑遭到干擾的三個絕緣孔。

### 3.1.3 卡匣與紙片的特殊設計

為了進一步提升本卡匣檢測系統的性能，設計了一些特殊功能，包括雙槽式的第一維層析展開液儲液槽、犧牲翼和絕緣孔以提高系統性能。如圖 3-4 所示，敘述了功能設計的細節和工作原理。

紙張的尖端透過儲液槽邊的矩形孔洞插入儲液槽，並且藉由毛細作用力吸取展開液。此外，在第一維層析分離的過程中，展開液的流動速度會大幅影響層析的效能，當展開液流速過快時，展開液可能會由紙片上方通過，而不是經過紙片內部，將會使得紙片內部的混合物無法有效分離，導致層析效能大幅下降。然而，經由外部輔助來控制展開液的流動速度，違反了本研究的宗旨，因此需要透過內部設計，達到被動控制展開液的效果。

本研究最終採用了雙槽式的儲液槽來減緩展液體的流速，展開液注入第一槽後，將會透過一個矩形孔洞流向第二個儲液槽，與插入第二儲液槽的紙片接觸，矩形孔洞等於是一個節流閥的設計，可以有效的控制展開液流向第二儲液槽的速度，直接減緩了展開液與紙片接觸時的流速，大幅提升第一維層析的分離效能，並且保留了卡匣整體的易用性以及方便性。

然而，為了達到以紙電噴灑質譜法作為最終檢測的需求，需要在紙片的側邊留下尖端用於進行電噴灑游離，導致第一維層析分離時，因兩側的毛細作用力不相等，產生嚴重的拖尾現象以及樣本殘留，導致層析分離的效能大幅受到影響，為了解決這個問題，設計了犧牲翼來消除兩側毛細作用力的差異，將尖端兩旁原先去除的部分，以低功率雷射加工的方式，使其僅留下一個較淺的割痕，保留紙片側邊的完整性，此設計不僅達到了平衡兩側毛細作用力的效果，更由於犧牲翼的存在，原本容易發生的樣本殘留，會從低功率加工後留下的部分，經由毛細作用力而從紙尖進入犧牲翼，最後失去展開液的牽引力，使樣本殘留停留於犧牲翼內部，大幅提升層析分離的效果。

由於經過低功率雷射加工，犧牲翼在第一維紙層析分離結束後就可以輕易的撕下，不需要再靠其他裝置輔助。而為了將第二維紙層析濃縮整合於卡匣中，設計了一個側翼結構，並且透過低功率雷射加工的折疊線，可以輕易的折疊並插入第二維層析溶液儲液槽中，然後直接將第二維層析溶液注入儲液槽前方的注入口，這邊為了使展開液能夠均勻的吸附於紙片，避免紙片的前端較早接觸到展開液，導致展開液的流動方向歪斜，使分離後的樣本塊無法有效的被推擠到紙片尖端，導致第二維層析濃縮失敗，因此在紙片的側翼插入儲液槽時，紙片與儲液槽底部間留下了一個 0.5 mm 的間隙，當展開液進入儲液槽後，會先由槽內的毛細作用力充滿整個儲液槽底部，最後再被紙片均勻的吸附上去，大幅提升第二維層析濃縮的穩定性。最後，設計了幾個用於提升紙電噴灑游離法性能的絕緣孔，防止進行紙電噴灑質譜法時，電流導向非檢測之尖端，造成同時有兩個以上的尖端發生電噴灑現象，透過此設計可以大幅提升電噴灑游離的穩定性。

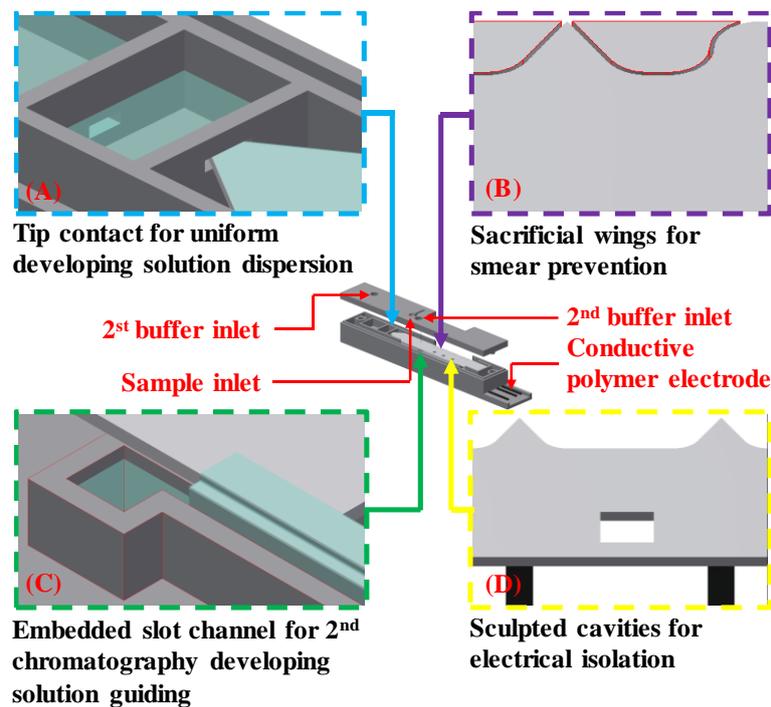


圖 3-4 新型卡匣系統的特殊設計。包含圖(A)用於控制第一維層析分離展開液流速的雙槽式儲液槽，以及槽間的矩形節流閥、圖(B)用於防止第一維層析分離時產生拖尾現象及樣本殘留的犧牲翼、圖(C)用於第二維層析展開液進樣的儲液槽及紙片的側翼、圖(D)用於防止電噴灑受到干擾的絕緣孔。

## 3.2 新型整合式二維紙層析卡匣系統

本節將詳細介紹本卡匣系統之二維紙層析實驗架構及整體流程，實驗步驟如圖 3-5 所示，僅需使用本卡匣系統，包含卡匣本體、內部紙片、移液器(Pipette)，以及液體樣本與展開液。首先透過移液器吸取 2.0  $\mu\text{L}$  的樣本溶液，於卡匣上蓋的樣本進樣口，由於進樣口經過特殊結構設計，樣本會先經由毛細作用力於進樣孔中形成一均勻的直線形液滴，再往下流動接觸紙片，經過擴散後於紙片上形成一均勻的矩形樣本帶。此設計可以避免形成不平均的樣本帶，導致第一維層析時產生嚴重的拖尾現象，大幅降低層析分離的效率。

待紙片上的樣本乾燥後，即可開始第一維的層析分離，假設未乾燥就繼續進行實驗，當展開液流動至樣本區域時，將會使得展開液與未乾的液體形成溶液，將使展開液帶有樣本內部的成分，導致後續的層析僅是將樣本擴散於紙片整體，而沒有任何分離效果，因此等待樣本完全乾燥，是這個步驟最需要注意的部分。確定樣本完全乾燥後，使用移液器吸取 80.0  $\mu\text{L}$  的展開液，滴定於卡匣上蓋的第一維層析溶液進樣孔，展開液會直接進入卡匣內部的第一維層析溶液儲液槽，為了避免展開液流速過快導致層析失敗，採用了雙槽式的儲液槽設計，並且於兩個儲液槽間設計了一個節流閥，用以控制層析液的流動速度，大幅增加第一維紙層析時的穩定性，紙片會經由儲液槽側壁上的矩形孔接觸節流過後的展開液，並且透過毛細作用力吸取展開液，開始進行第一維層析分離。

完成第一維層析分離後，一樣需要等待紙片上的展開液乾燥，才能開始進行第二維的層析，與第一維層析的步驟相仿，使用移液器吸取 8.0  $\mu\text{L}$  的展開液，滴定於卡匣上蓋的第二維層析溶液進樣孔，展開液會直接進入卡匣內部的第二維層析溶液儲液槽，當展開液進入儲液槽後，會先經過透過毛細作用力充滿槽後方較窄的空間，再被槽上方的紙片側翼吸取，均勻進入插入槽內的紙片，進而將分離過後的樣本塊，由紙片的側邊往另一端的紙片尖端推動，進而達到濃縮的效果，大幅提升質譜檢測時的訊號強度。當二維紙層析分離濃縮完成後，便可將質譜的高壓電電源

根據需要檢測的尖端，接上卡匣前端相對應的高分子電極。當質譜檢測開啟後，施加高壓電的同時於檢測的尖端上滴定 30.0  $\mu\text{L}$  的電噴灑溶液，便可以於尖端進行紙電噴灑游離，透過質譜接收游離的帶電離子流，於後端檢視產生的訊號，對樣本進行最終的成分分析。

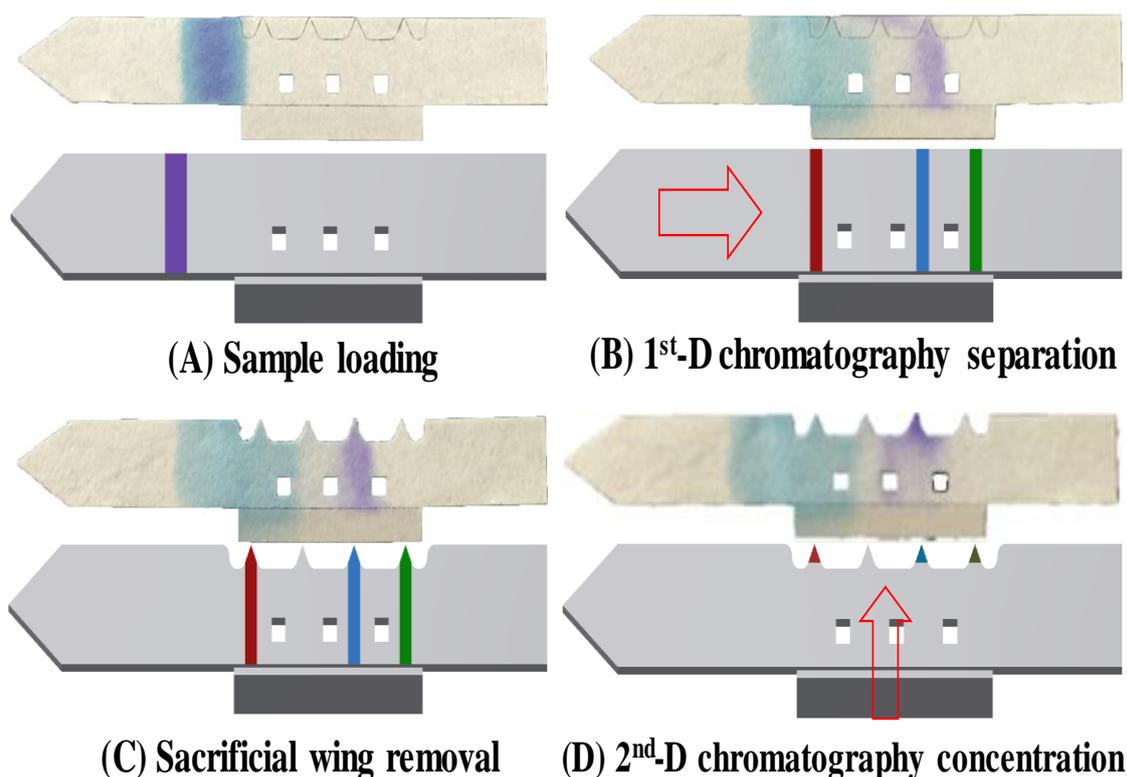


圖 3-5 本研究之二維紙層析分離濃縮流程圖及實際影像。包括圖(A)樣本進樣後產生之矩形樣本塊，圖(B)樣本經過第一維層析後分離為兩條樣本帶，值得注意的是，樣本殘留僅發生於犧牲翼，且沒有拖尾現象的產生，圖(C)為犧牲翼移除後的紙片，用於紙電噴灑游離的尖端已經出現，圖(D)為樣本進行的二維紙層析濃縮後，匯聚至紙片尖端達到濃縮效果。

### 3.3 紙電噴灑游離質譜檢測系統

本研究的最後一個實驗步驟，便是經由紙電噴灑游離法進行質譜檢測，負責將經過二維紙層析分離濃縮好之樣本，透過紙電噴灑游離法，使樣本脫附、游離，形成帶電離子流後，由質譜入口的負壓吸引進入質譜儀中，經過後端的質量分析器時，由於不同樣本離子的質荷比有所差異，導致其受到相同電場牽引時，會產生不同的加速度，透過這個特性，將樣本離子篩選出所需的分子量區間，而偵測器則是根據不同樣本離子，偵測其到達時間以及位置產生的相異電流訊號，將其分析並轉譯後將數據傳遞至後端處的數據處理裝置，得到最終的質譜訊號圖。

本研究使用離子阱式質譜儀(LCQ DECA XP Plus, Thermo Fisher Scientific, USA)做為檢測端，如圖 3-6 所示。離子阱相較於其他種類的分析器，有著相對較小的體積以及較廣泛的功能性，因為離子阱本身的特性，可以於單一的質譜儀進行二次質譜，不像四極柱式需要經由串聯才能使用，大幅增加其功能性，對於確認樣本的成分有著絕佳的幫助。離子阱式質譜儀的原理與四極柱式相似，都是藉由直流電與交流電的切換，將帶電離子根據質荷比的不同，篩選出設定範圍內的帶電離子進行偵測。其中本研究所使用的離子阱質譜，屬於三維四極柱式，主要是由一個環狀電極、離子源、離子偵測器，三個部分所組成。

在一般檢測流程下，是將樣本放置於離子源中，加熱燈絲產生電子，透過電子游離法或化學游離法等方式使樣本游離。而本研究使用卡匣系統來取代離子源，並且使用紙電噴灑游離法作為游離方式。當帶電離子進入質譜後，首先會先被離子阱內部產生的電場聚集，而透過射頻交流電改變離子阱內的電場，可以根據改變的電場控制不同質荷比的帶電離子，並且將電場隨時間改變，便可以使不同質荷比的帶電離子，先後進入後端的偵測器，再根據時間差進行訊號分析。



圖 3-6 本實驗所使用的 LCQ Deca XP Plus 離子阱式質譜儀。

本實驗所使用的實驗參數如下：質譜提供的電噴灑電壓設定為 6.0 kV、紙片尖端距離質譜入口 5.0 mm、以甲醇溶液 1：1 體積比(v/v)30.0  $\mu$ L 作為電噴灑溶液，並且將質譜入口的毛細管溫度設定為 250 $^{\circ}$ C、質譜入口的毛細管電壓設定為 6.0 V、質譜通道的偏移電壓設定為 20.0 V。一般進行紙電噴灑質譜法時，通常將電噴灑電壓設為 3.0~4.0 kV，即可產生電噴灑羽流(Electrospray Plumb)，使樣本脫附、游離帶電。但是根據本研究測試，更高的電壓可以使游離狀況更佳，進而提升質譜偵測的訊號強度，因此最終將電噴灑電壓設定為 6.0 kV 可以得到更好的檢測效能。然而，當電噴灑電壓提高時，便需要特別注意紙片尖端與質譜入口的距離，當距離太近導致電場梯度過高，可能會產生放電現象，導致電極直接對質譜入口進行放電，造成質譜內部的感測器發生錯誤，嚴重時將可能損壞內部的電子元件，因此將紙片尖端的與質譜入口的距離固定為 5.0 mm，使其在安全的狀態下進行實驗，也能夠接收到足夠的帶電離子流，達到檢測所要求的離子強度。

### 3.4 實驗系統架構

本研究所開發之整合式二維紙層析卡匣系統，將樣本進樣、第一維紙層析分離、第二維紙層析濃縮、紙電噴灑游離，整合於一個卡匣系統內，創造一個簡單易用、方便攜帶、製造容易、性能優異的檢測裝置，且基於紙層析的原理以及質譜儀的檢測特性，使得樣本的檢測範圍相當廣泛，包含生物檢測、分析化學、食品安全、環

境衛生等。對比傳統的質譜檢測方式，本卡匣系統將整個檢測包含樣本前處理以及後續的質譜分析，將以往動輒數小時的檢測時間，縮短到十分鐘即可完成整個檢測流程，並且檢測結束後可以直接將卡匣丟棄，省去了後續設備的清洗以及保養，更免去了交叉汙染的可能性，間接提升實驗的可靠度，並且將實驗的複雜度大幅降低，使普羅大眾也能輕易使用，節省了人力上的消耗，間接節省了許多的社會成本。

本研究之實驗系統架構如圖 3-7 所示，便是結合前兩個小節，首先將雷射加工製成的紙片與 3D 列印製作之內嵌高分子電極卡匣進行組裝後，將檢測所需的液體樣本以移液器吸取 2.0  $\mu\text{L}$ ，滴定於卡匣上蓋的樣本進樣口，使樣本於紙片上形成一個完整的矩形樣本塊，待其完全乾燥後，便以移液器吸取 80.0  $\mu\text{L}$  的展開液，滴定於卡匣上蓋的第一維層析展開液進樣口，展開液便會直接進入到卡匣內部的第一維層析展開液儲液槽，並且透過雙槽結構間的矩形節流閥進入第二槽，再與插入槽內的紙片尖端接觸，藉由毛細作用力吸取展開液，帶動樣本移動，開始第一維的層析分離，展開液停止流動後，即完成第一維層析分離。

待其自然乾燥後，將紙片尖端旁的犧牲翼取下，避免第二維紙層析濃縮受到影響，取下犧牲翼後，以移液器吸取 8.0  $\mu\text{L}$  的展開液，滴定於卡匣上蓋的第二維層析展開液進樣口，展開液便會直接進入到卡匣內部的第二維層析展開液儲液槽，由於第二維層析溶液儲液槽是由兩個矩形所組成，前方為了方便展開液的進樣，將其設計為較寬大的矩形，後方則是為了與插入的紙片進行配合，設計為細長的矩形，並且儲液槽底部與紙片有著 0.5 mm 的間隙，因此當展開液進入儲液槽時，會先受到儲液槽後方窄部的毛細作用力影響，充滿儲液槽底部，待液面高度上升後，才會被紙片的毛細作用力均勻吸取，並且將分離後的樣本塊推擠至紙片尖端，完成第二維紙層析濃縮。本卡匣系統透過特殊的卡匣與紙片設計，將整個實驗流程所容易造成影響的不確定因素大幅減少，同時將第一維層析分離以及第二維層析濃縮大幅優化，使得可靠度、易用性及整體效能大幅提升，是本研究的最大特點。

二維紙層析分離濃縮完成後，最後便是將質譜提供的高壓電電源，接上卡匣前端，與所要檢測的紙片尖端相對應的高分子電極，並且藉由移液器，吸取 30.0  $\mu\text{L}$

的電噴灑溶液，將其直接滴定於檢測的紙片尖端，透過質譜提供的 6.0kv 高壓電，進行紙電噴灑游離，使樣本脫附、游離形成帶電離子，進入質譜入口進行檢測分析，經過分析器轉譯後，以電腦做為後端的接收裝置，最後再由電腦中的 Xcalibur 2.0 圖譜分析軟體進行檢測結果的判讀。

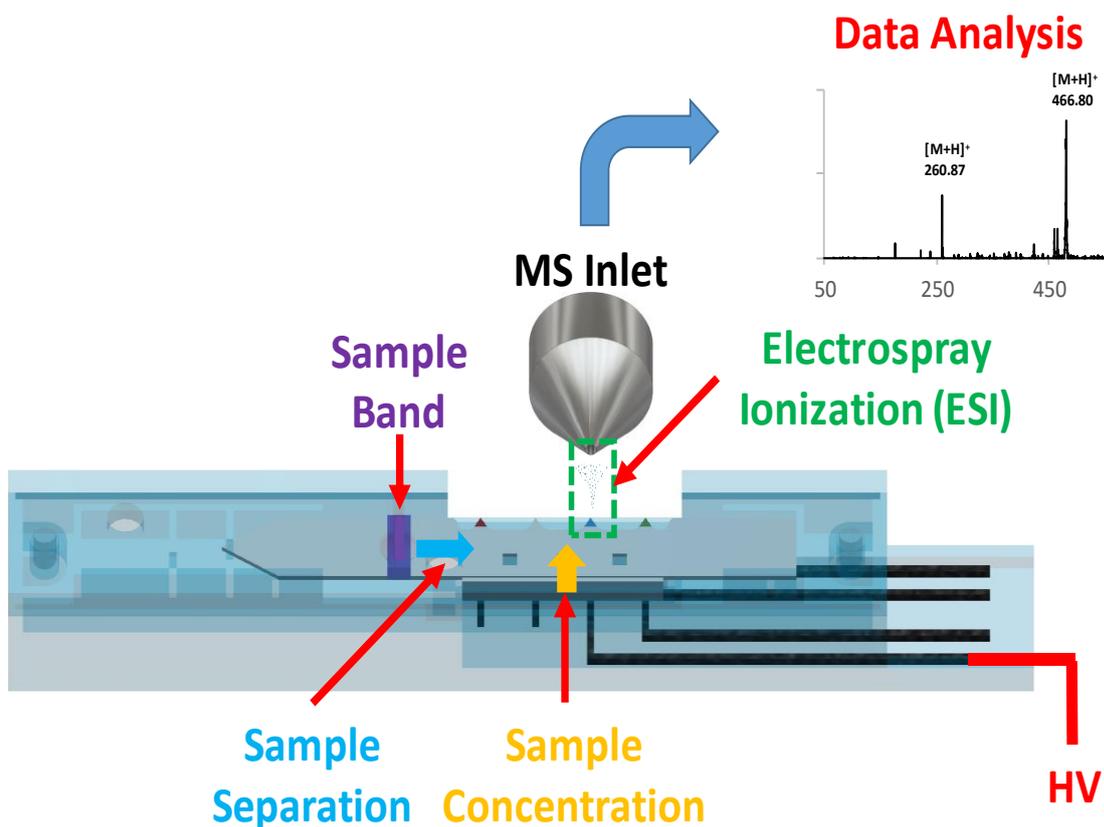


圖 3-7 本實驗之架構示意圖。樣本進樣後，經過二維紙層析分離濃縮後，接上質譜提供之高壓電源，進行紙電噴灑游離，使樣本脫附、游離帶電後進入質譜內部進行偵測，最後轉譯為圖譜進行後續分析。

### 3.5 實驗設計與檢測目標

現今最為廣泛的檢測方式，大多是以高效液相層析儀搭配質譜進行高精度的檢測，然而這種方法雖然有著極佳的靈敏度及準確度，但是由於其檢測機制，不僅需要經過繁複的樣本前處理，較長檢測時間以及後續檢測結束後的儀器清理，造成整個檢測流程的限制及成本大幅增加，然而現行的檢測項目，大多不需要這麼高的

效能，間接導致不須要的浪費，也因為效益不佳的問題，導致檢測的意願大幅降低。而本研究所開發的整合是卡匣系統，則在這之間取得了絕佳的平衡，不僅有著高靈敏度、準確度的優點，也將前處理大幅簡化，大幅降低檢測所需的時間以及成本，使各項檢測大眾化成為可能。

實驗設計上，根據樣本進樣、二維紙層析分離濃縮以及紙電噴灑質譜法，所需要的卡匣配置以及紙片的相關部件進行探討，藉此決定後續的進樣口、儲液槽以及高分子電極的設計。首先將進樣口的形狀定義出來後，根據常用的樣本進樣量，利用實際檢測的樣本設計進樣口的寬度，使實驗範圍內的進樣量都能夠經由進樣口，於紙片上形成完整的矩形樣本帶，提升第一維層析分離時的穩定度；確立了進樣口的大小後，以染料做為標的，進行第一維層析分離，檢視新型紙片設計是否能夠有效防止樣本的拖尾以及殘留，並且比較新型與舊型設計分離後的效能差異；隨後，將經過第一維層析分離的實際檢測樣本，進行第二維層析濃縮，檢視第二維層析溶液儲液槽以及配合插入的紙側，是否能夠有效且均勻的將展開液吸附於紙片上，推擠分離後的樣本至紙片尖端，完成第二維紙層析濃縮，並且比較第二維層析濃縮前後的質譜訊號差異。最後再針對完成二維層析分離濃縮的樣本，透過紙電噴灑游離法進行質譜分析，證明本卡匣的高分子電極，確實可以傳輸高壓電至紙片上，達成紙電噴灑游離的效果，同時根據量測到的訊號，判斷本卡匣系統分離濃縮的效能，以及後續實驗的可行性。

首先透過染料進行多次的層析分離濃縮測試，藉此取得層析最佳的樣本量、第一及第二維層析的展開液量，提升二維層析分離濃縮的效果及穩定度。完成上述優化後，便開始對於天然樣本進行量測，首先針對較容易量測的天然植物樣本進行農藥訊號分析，將樣本直接搗碎後萃取其汁液，於卡匣進樣後，進行二維紙層析分離濃縮，再透過紙電噴灑游離法進行質譜檢測，並且針對農藥訊號分析不同紙尖上所含有的物質，驗證本研究卡匣系統做為天然植物樣本檢測裝置的可行性及效能後，再以較難量測的生物樣本進行後續檢測實驗，針對服用藥物後所取得的生物樣本，以藥物殘留為標的進行分析，驗證本卡匣系統的泛用性。

### 3.6 實驗溶液配製

- (一) 二維層析分離濃縮使用之展開液，通常使用市售層析級的甲醇、正己烷，第一維層析分離的用量為 80.0  $\mu\text{L}$ ，第二維層析濃縮的用量為 8.0  $\mu\text{L}$ 。
- (二) 紙電噴灑質譜法所使用之電噴灑溶液為去離子水與甲醇以 1:1 之比例進行調配，每次進行紙電噴灑游離法時的添加量為 30.0  $\mu\text{L}$ 。
- (三) 第一維層析分離效能測試，使用螢光染劑玫瑰紅(Rhodamine B)，以去離子水調配 1.0 mM 的濃度，作為第一維層析分離時，展開液是否產生拖尾現象以及樣本殘留的依據。
- (四) 本實驗量測天然植物樣本的部分，使用市售的葡萄等作為樣品，直接將所需的部分如外皮、果肉、籽等部位，直接搗碎萃取其汁液即可。
- (五) 生物樣本中針對尿液量測人體攝取咖啡因後殘留於排泄物的部分，受測者首先攝取市售的黑咖啡(包含 500 mL 的水分以及 170 mg 的咖啡因)後，經過兩個小時進行排泄，並且收集排泄的尿液做為樣品。
- (六) 生物樣本中針對尿液量測人體攝取複合藥物後進行代謝的部分，受測者首先攝取市售的維他命 B 群(包含 160 mg 的維他命 B2 (Vitamin B2)以及 120 mg 的維他命 B6 (Vitamin B6))以及 500 mL 的純水後，經過兩個小時進行排泄，並且收集排泄的尿液做為樣品。
- (七) 生物樣本中針對吸菸者唾液中的量測口腔中尼古丁殘留的部分，受測者吸菸後，先經過完整的口腔清潔，再收集唾液做為樣品。
- (八) 生物樣本中針對食用複合藥物後量測口腔中藥物殘留的部分，受測者食用市售的喉糖後，收集唾液作為樣本。

## 第四章 實驗結果與討論

### 4.1 樣本進樣口寬度分析

圖 4-1 為本實驗針對樣本進樣口寬度以不同進樣量進行分析。樣本進樣時所形成的樣本帶，對於第一維層析分離時有著最為直接的影響，當樣本塊無法於紙片上形成一個均勻的矩形時，將導致層析時兩邊的毛細作用力不平均，非常容易造成拖尾現象的產生，使分離效能嚴重下降，因此可見，樣本帶的完整度，對於整個系統有著絕對的重要性。因此必須先優化檢測卡匣之進樣口，確保對於所需要的樣本進樣量範圍(0.8~2.0  $\mu\text{L}$ )，都能夠在紙片上形成完整的矩形樣本塊，才能夠確保後續的第一維層析能夠達到最佳的分離效果。

在本實驗中，受限於 3D 列印機的加工精度，最小僅能加工 0.4 mm 的孔洞，因此分別對於 0.4 mm、0.6 mm、0.8 mm 三種不同寬度的進樣口進行測試，樣本量則為 0.8  $\mu\text{L}$ 、1.0  $\mu\text{L}$ 、1.2  $\mu\text{L}$ 、1.4  $\mu\text{L}$ 、1.6  $\mu\text{L}$ 、1.8  $\mu\text{L}$ 、2.0  $\mu\text{L}$ 。於實驗結果中可以看到，0.6 mm 及 0.8 mm 的進樣口寬度無法涵蓋本實驗常用的樣本進樣量，當檢測較微量的樣本時，將無法產生完整的樣本帶，對於整體層析分離有著嚴重的影響。而 0.4 mm 的進樣口在實驗所需的進樣量範圍內，皆能形成完整的樣本塊，因此最終採用 0.4 mm 作為進樣口的寬度。

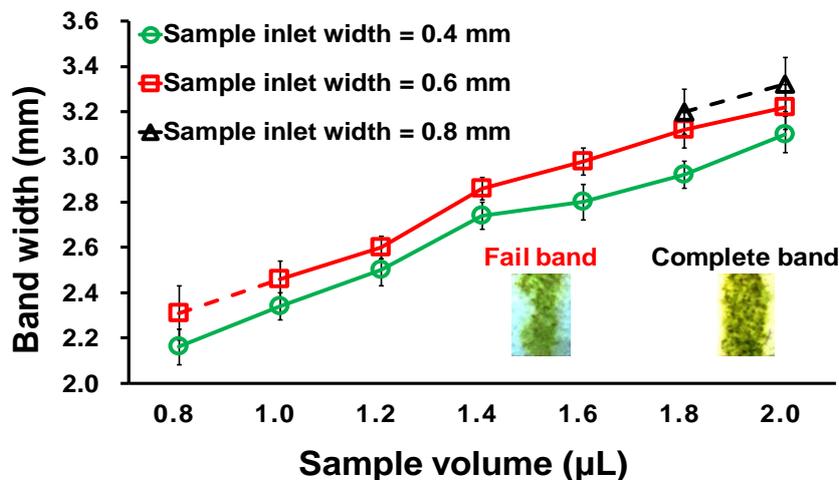


圖 4-1 樣本進樣口寬度分析。三種顏色的資料線分別對應不同寬度的進樣口，虛線部分則為無法形成完整樣本帶的情形。

## 4.2 卡匣系統分離效能分析

本小節主要討論本卡匣系統各部件設計，對於第一維層析分離的效能優化分析。本研究針對第一維層析分離設計了幾項功能部件來進行優化，包含紙片上的犧牲翼以及卡匣上的節流閥，並且透過影像分析以及理論板數來量化比較優化前後的層析分離效能。

### 4.2.1 犧牲翼效能分析

本小節主要討論犧牲翼的設計對於第一維層析分離時之效能分析，由於本研究使用之紙微流體紙片，為了實現電噴灑游離法，需於紙片的其中一端留下紙片尖端，但也因為此設計，於第一維層析時產生紙片兩側毛細作用力不一的副作用，造成非常嚴重的拖尾現象，大幅降低分離的效能。因此，透過一個犧牲翼的設計，將電噴灑所需尖端埋入紙片內部，將尖端旁的紙片保留下來，並且使用較低功率雷射切割一凹槽，方便第一維層析結束後將尖端旁的犧牲部分移除，使兩側毛細作用力一致，用以解決舊型設計所產生的拖尾現象，且大幅降低紙片尖端的樣本殘留，顯著提升樣本的分離效果。

本實驗使用 1.0 mM 的羅丹明 B 作為實驗樣本，並且以純甲醇做為展開液，羅丹明 B 屬於一個高極性的樣本，與高極性的甲醇有著絕佳的親和性，當甲醇受到毛細作用力牽引時，羅丹明 B 幾乎會受到相等的毛細作用力牽引，因此當毛細作用力不相等時，所造成的拖尾現象會更為明顯。為了方便觀察樣本的展開狀況，使用 0.5  $\mu\text{L}$ 、1.0  $\mu\text{L}$ 、1.5  $\mu\text{L}$ 、2.0  $\mu\text{L}$  的樣本進樣量進行實驗，以移液器滴定於卡匣上蓋的樣本進樣口，並且將 80.0  $\mu\text{L}$  的展開液滴定於第一維層析展開液進樣口。

實驗結果如圖 4-2 所示，從結果中可以觀察到，沒有犧牲翼的紙片設計產生了嚴重的拖尾現象，且透過 ImageJ 影像分析軟體，進行色塊面積分析後，發現在進樣量 2.0  $\mu\text{L}$  時有著高達 15% 的樣本殘留於前面的紙尖上，對於第一維層析分離的效能有著極大的影響，而當樣本量減少時，由於樣本受到的牽引力會逐漸增大，降低樣本滯留於尖端的情形，使得兩者間的樣本殘留量逐漸縮小。結果表明，含有犧

牲翼的紙片設計已經完全解決拖尾的問題，並且大幅降低了層析時紙片尖端上的樣本殘留，證明了本研究所使用的犧牲翼紙片設計，確實可以大幅提升第一維層析的分離效能。

經由影像分析後，本研究進一步的以理論板數來量化比較層析分離的效能，使其更為直觀，由前一個實驗可以得知，樣本進樣為 2.0  $\mu\text{L}$  時有無犧牲翼會有著高達 13% 的樣本殘留差異，因此本實驗使用 2.0  $\mu\text{L}$  的樣本進樣量以及 50.0  $\mu\text{L}$ 、60.0  $\mu\text{L}$ 、70.0  $\mu\text{L}$ 、80.0  $\mu\text{L}$  的層析溶液進樣量進行實驗，其結果如圖 4-3 所示，由於沒有犧牲翼的紙片會產生嚴重的拖尾現象，根據理論板數的計算公式，拖尾現象會大幅增加樣本訊號的半高寬，直接導致理論板數低落，而犧牲翼完全解決了拖尾現象的產生。其中於實驗結果可以看到層析溶液進樣量為 80  $\mu\text{L}$  時，含有犧牲翼設計的紙片，相較於沒有犧牲翼的設計，理論板數提升了 3.9 倍，證明本設計確實可以有效提升第一維層析的分離效能。

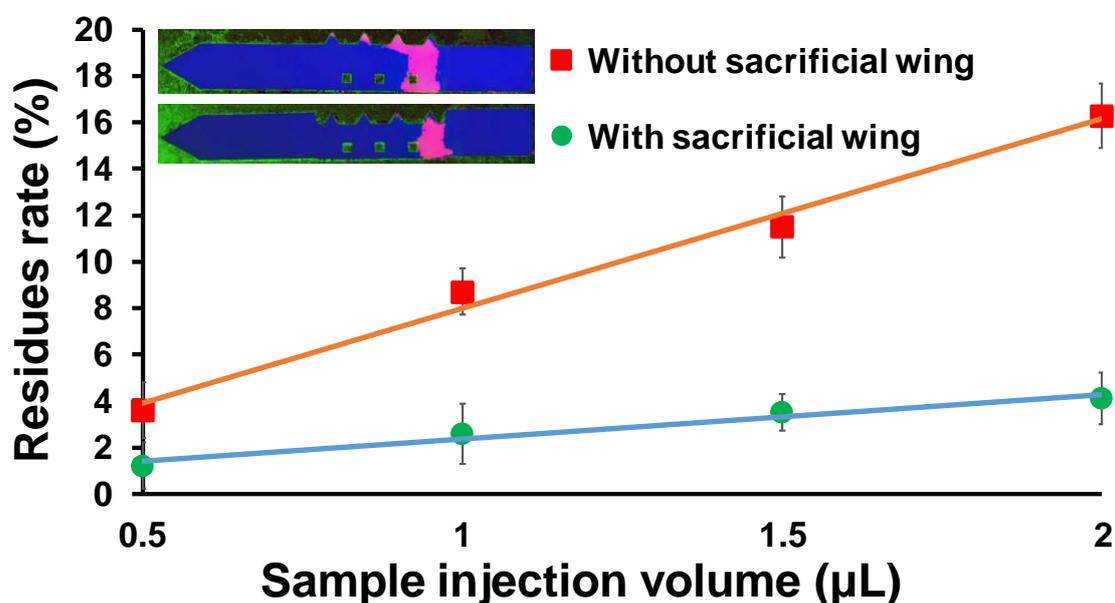


圖 4-2 犧牲翼設計層析效能影像分析。可以看到含有犧牲翼的紙片設計大幅減少了樣本的殘留，且完全解決了第一維層析時產生的脫尾問題。

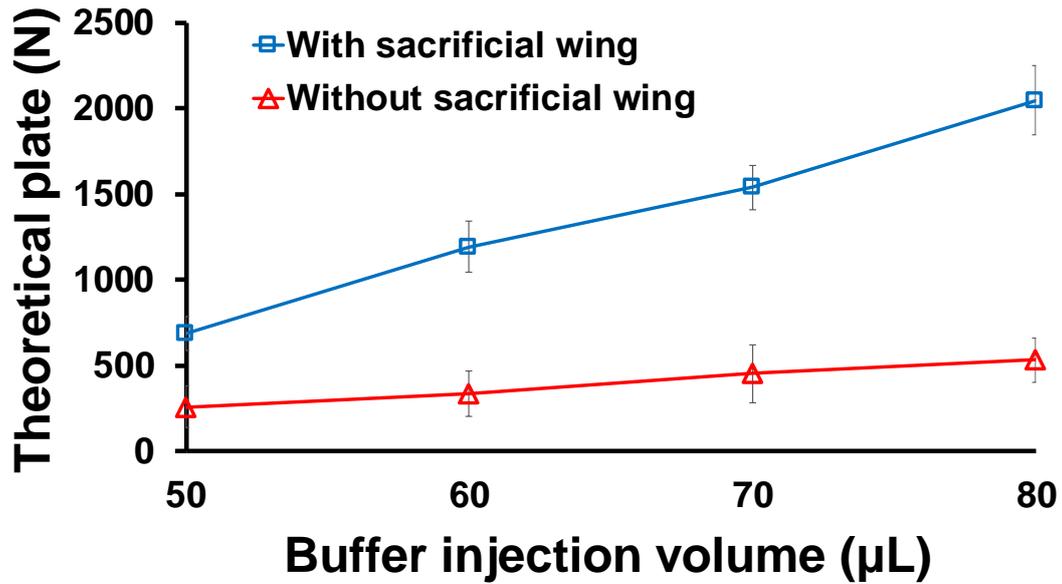


圖 4-3 犧牲翼設計層析效能理論板數分析。可以看到犧牲翼的設計使層析分離的理論板數提升了 3.9 倍，證明此設計可以大幅提升層析分離的效能。

#### 4.2.2 節流閥效能分析

本小節主要探討卡匣節流閥的設計對於第一維層析效能的影響，進行第一維層析時，展開液注入的速度會大幅度的影響到層析分離的效果，當注入流速過快則會造成展開液淹沒於紙片上，而不是經由紙片內部的毛細作用力展開，便會導致層析效果大幅下降，因此本研究透過設計一個雙槽式的展開液儲液槽，透過一個矩形通道作為節流閥連結兩個儲液槽，達到穩定液體流速的作用，其中第一槽位於展開液注入口下方，第二槽則於紙片相連接，透過此設計，即使在短時間內快速的注入展開液，也只會經由矩形的通道穩定的流向與紙片接觸的第二槽，大幅提升第一維層析的穩定度。

本實驗使用 1.0 mM 的羅丹明 B 作為實驗樣本，並且以純甲醇做為展開液，以 2.0 μL 的樣本進樣量以及 50.0 μL、60.0 μL、70.0 μL、80.0 μL 的展開液進樣量進行實驗，其結果如圖 4-4 所示，從標準差可以看出，由於節流閥穩定流速的效果，使第一維層析的穩定度大幅提升，並且在展開液進樣量為 80.0 μL 時，理論板數提升了 1.6 倍，證明節流閥設計確實可以提升整體層析的穩定度，並且可以使第一維層

析的效果有效提升。值得注意的是，於展開液進樣量為 50.0  $\mu\text{L}$  時，由於展開液較少，其流動又受到節流閥的限制，導致紙片所能吸取的展開液反而過少，因此節流閥設計雖然能夠有效提升第一維層析的穩定度，但是需要使用更多的展開液來確保其效果。

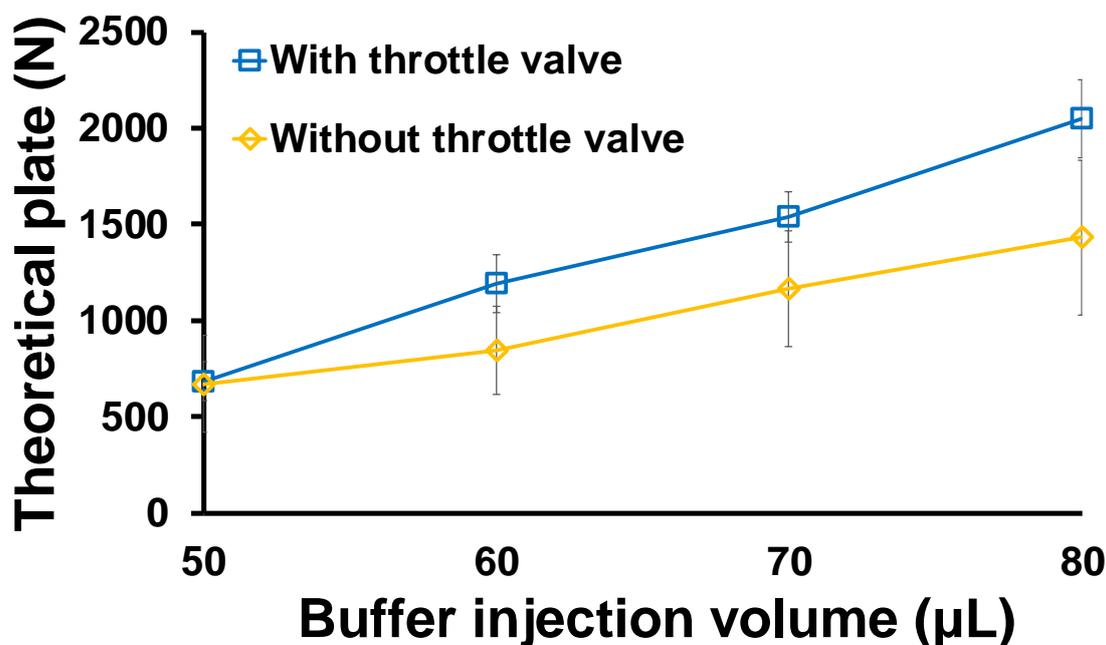


圖 4-4 節流閥效能理論板數分析。可以看到節流閥設計大幅提升層析的穩定度，以及進樣量足夠時的理論板數，當進樣量為 80.0  $\mu\text{L}$  可以提升 1.6 倍。

### 4.3 卡匣系統濃縮效能分析

本小節主要討論二維紙層析濃縮之效能，本實驗使用市售的綠色植物樣本直接進行萃取，並且使用移液器吸取 2.0  $\mu\text{L}$ ，滴定於卡匣進樣口，待其自然乾燥後，以移液器吸取 100.0  $\mu\text{L}$  的正己烷作為展開液，滴定於第一維層析展開液進樣口，待其層析完成，自然乾燥後，以移液器吸取 10.0  $\mu\text{L}$  的正己烷，滴定於第二維層析展開液進樣口，進行第二維層析濃縮，濃縮完成後將質譜提供之高壓電接上相對應的高分子電極，並且滴定 30.0  $\mu\text{L}$  的甲醇水溶液作為電噴灑溶液，進行紙電噴灑質譜偵測。本次實驗的質譜設定參數如下：紙電噴灑工作電壓 6.0 kV、紙片尖端距離質譜入口 5.0 mm、質譜入口溫度 250 $^{\circ}\text{C}$ 、質譜入口毛細管電壓 6 V、質譜通道偏

移電壓 20 V。

結果如圖 4-5 所示，維他命 B2 的特徵訊號訊雜比由 0.03 提升至 3.56 相當於提升了約一百倍。值得注意的是，由於本實驗是使用低極性的正己烷作為層析展開液，因其低極性的特性，僅有少數的物質與其具有親和性，因此相當適合作為本效能測試，可以針對單一的物質做訊號強度的分析。實際的實驗影像也顯示，大部分的樣本都還是留在進樣處的樣本帶，僅有少數物質被展開液所分離出來。僅進行第一維層析分離時，維他命 B2 的訊號峰值 377.73 [M]<sup>+</sup>相當低落，幾乎無法判別，然而經過第二維層析濃縮後，維他命 B2 的訊號峰值大幅提升。結果表明，本系統的第二維紙層析設計，確實可以將樣本濃縮至紙片尖端，進而大幅提升質譜偵測的訊號強度。

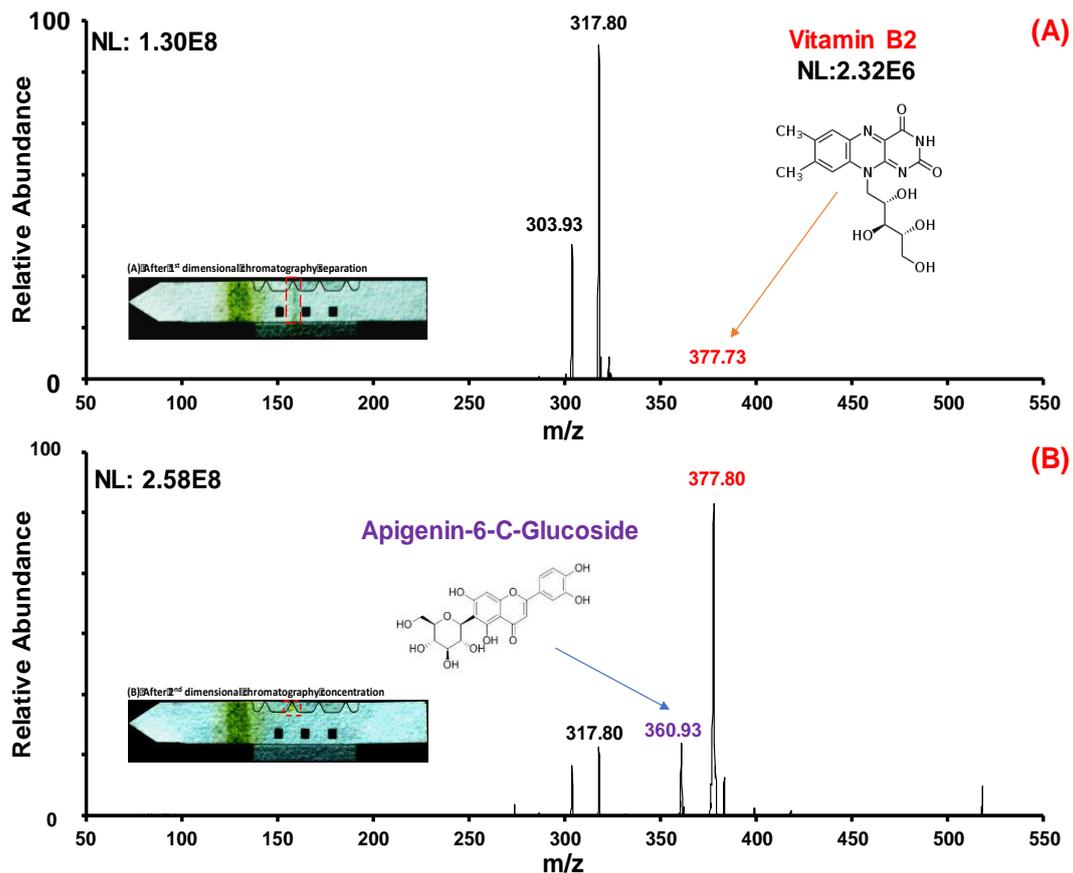


圖 4-5 第二維紙層析濃縮效能分析。圖(A)為僅經過第一維紙層析分離處裡的樣本，進行質譜檢測所取得之質譜圖，可以看到維他命 B2 的訊號相當低落，幾乎無法看見。圖(B)為經過第二維紙層析濃縮後進行質譜檢測所取得之質譜圖，經過濃縮後維他命 B2 的訊號大幅強化，提升了約一百倍的特徵訊號訊雜比。

## 4.4 卡匣系統偵測極限分析

本小節主要討論本卡匣系統的偵測極限，並且透過與傳統紙電噴灑質譜法進行比較，襯托本系統對於偵測靈敏度的優勢。檢測極限對於所有的檢測方式都是相當重要的一個性能指標，代表著該系統能否用於不同領域的檢測，以農藥檢測為例，部分的農藥殘留量限制為 0.01 ppm，代表該檢測系統需要在樣本中農藥為 0.01 ppm 的含量下，成功測得該農藥，並且得到特徵訊號訊雜比為 3 以上，才能夠用於農藥檢測的領域。

本實驗使用咖啡因標準品做為樣本，並且以去離子水調配 0.01 ppm、0.1 ppm、1 ppm、10 ppm、100 ppm 共五種濃度，進行卡匣偵測極限的實驗分析，並且與傳統紙電噴灑質譜法進行比較，為了避免樣本的殘留影響到實驗的準確度，由濃度最低的 0.01 ppm 到最高的 100 ppm，依序進行檢測，而各濃度皆取 2.0  $\mu\text{L}$  進行實驗。本實驗主要分為兩組對照組，其中傳統紙電噴灑游離法直接將樣本滴定於三角形紙片上，待其自然乾燥後，施加 30.0  $\mu\text{L}$  的甲醇水作為電噴灑溶液，進行紙電噴灑質譜法。而另一組則是使用本卡匣系統進行紙電噴灑質譜偵測，將樣本滴定於樣本進樣口後，待其乾燥，使用移液器將 80.0  $\mu\text{L}$  的展開液滴定於卡匣上蓋的第一維層析溶液進樣口，進行第一維層析，將樣本由進樣處推向紙片的檢測區域，第一維層析結束後，待其自然乾燥，取下犧牲翼，並且使用移液器將 8.0  $\mu\text{L}$  的展開液滴定於卡匣上蓋的第二維層析溶液進樣口，進行第二維層析濃縮，將檢測區域的樣本推向紙片尖端，第二維層析濃縮結束後，待其自然乾燥，將質譜提供的高壓電電源接上相對應的卡匣電極，施加 30.0  $\mu\text{L}$  的甲醇水作為電噴灑溶液，進行卡匣紙電噴灑質譜分析。本次實驗的質譜設定參數如下：紙電噴灑工作電壓 6.0 kV、紙片尖端距離質譜入口 5.0 mm、質譜入口溫度 200°C、質譜入口毛細管電壓 6.0 V、質譜通道偏移電壓 20 V。

實驗結果如圖 4-6 所示，為了方便直觀，直接將實驗結果轉換完訊雜比進行分析，一般來說，訊雜比需要在 3 以上才能作為有效資料，而本系統在 0.01 ppm

(10 ppb)以上之濃度檢測，皆擁有 6 以上的訊雜比，而傳統紙電噴灑偵測僅能於 1 ppm 的濃度才能達到 3 以上的訊雜比，證明本卡匣系統的檢測能力，相較於傳統的紙電噴灑質譜法，偵測極限提升了一百倍左右，到達 10 ppb，且符合農藥檢測所需要的偵測靈敏度。

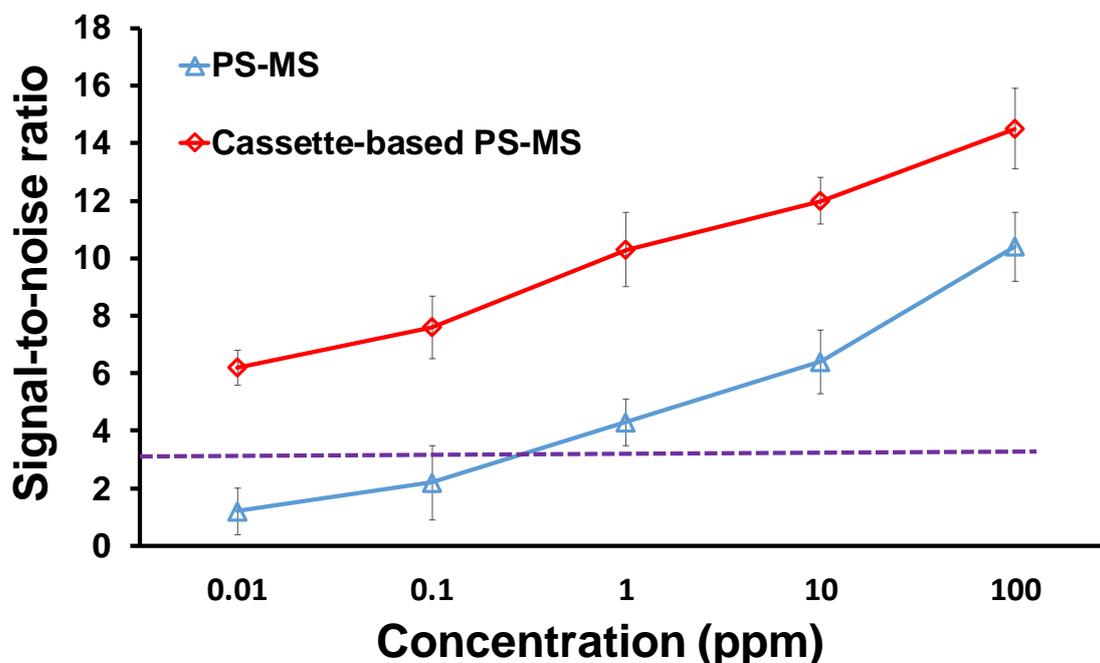


圖 4-6 卡匣系統與傳統紙電噴灑效能分析。可以看到本系統於 0.01 ppm 以上濃度量測皆可得到 6 以上之訊雜比，且偵測極限較傳統紙電噴灑質譜法提升了 100 倍左右，證明本卡匣系統的檢測能力。

#### 4.5 市售植物樣本檢測

經由前面的效能測試，證明本卡匣的檢測效能後，便開始對本實驗的初步目標：市售的植物樣本進行檢測，由於植物中含有大量的葡萄糖以及許多植物本身所含有的天然成分，當使用未經過前處理的樣本直接進行質譜檢測時，由於懸殊的濃度差距，目標物的訊號往往會被上述的葡萄糖及其他成分所蓋過，造成分析上的困難，因此便需要使用本卡匣系統的二維式紙層析分離濃縮，來進行樣本的前處理，並且使用卡匣上的高分子電極傳輸高壓電，直接進行紙電噴灑質譜分析。本次實驗的質譜設定參數如下：紙電噴灑工作電壓 6.0 kV、紙片尖端距離質譜入口 5.0 mm、質

譜入口溫度 200°C、質譜入口毛細管電壓 6 V、質譜通道偏移電壓 20 V、質荷比掃描範圍設定為 50 ~ 550。

本實驗以水果中的葡萄作為樣本，並且以純甲醇作為展開液，直接將整顆葡萄搗碎萃取其汁液，由於葡萄含有大量的水分，因此不需加入溶液即可取得大量的液體樣本，經過離心過濾後，使用移液器吸取 2.0  $\mu\text{L}$  的樣本量，滴定於卡匣上蓋的樣本進樣口，待其自然乾燥後，使用移液器將 80.0  $\mu\text{L}$  的展開液滴定於卡匣上蓋的第一維層析溶液進樣口，進行第一維層析分離，第一維層析分離結束後，待其自然乾燥，取下犧牲翼，並且使用移液器將 8.0  $\mu\text{L}$  的展開液滴定於卡匣上蓋的第二維層析溶液進樣口，進行第二維層析濃縮，第二維層析濃縮結束後，待其自然乾燥，將質譜儀提供的高壓電源，根據所要檢測的紙尖，接上卡匣前端相對應的高分子電極，並且依序為每個紙尖滴定 30.0  $\mu\text{L}$  的甲醇水作為電噴灑溶液，由質譜內部提供的高電壓，透過紙電噴灑游離法進行質譜檢測。

實驗結果如圖 4-7 所示，從圖中可以看到，葡萄中含量最高的葡萄糖已經被分離，並且留在第一個紙尖上，並且也在同一個尖端上發現花青素的存在，花青素可能經由葡萄中所含有的無色花青素還原酶經由化學反應而產生。而最重要的是，於最後一個紙尖進行檢測的質譜圖，發現了啞菌酯(Azoxystrobin)的訊號峰值 372.00  $[\text{M}]^+$  及 344.00  $[\text{M}]^+$  存在[61]。啞菌酯是目前世界上最廣用的殺菌劑，也是唯一可以抵禦四大類真菌的藥劑，常用於小麥種植、香蕉運輸及葡萄養殖，本實驗量測的葡萄樣本正好與之呼應，證明本卡匣檢測系統，確實能夠偵測到植物樣本中的微量農藥殘留。

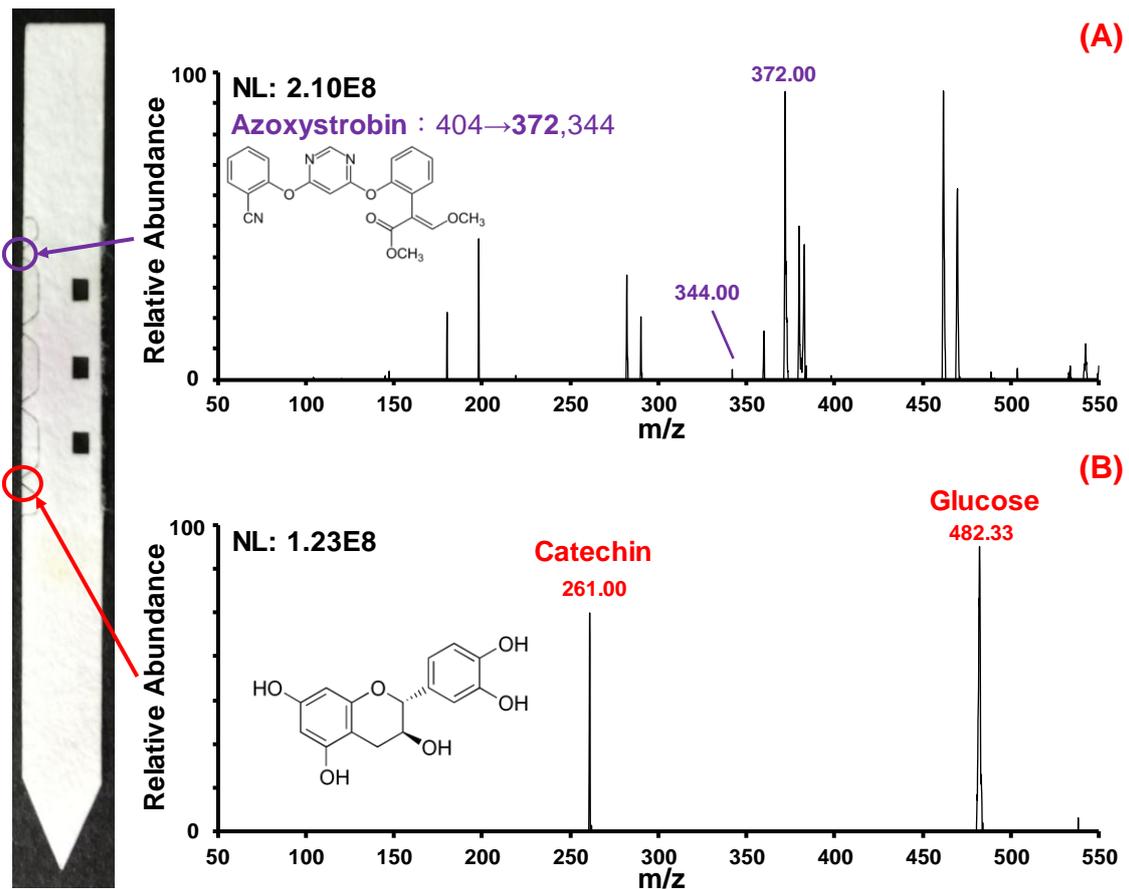


圖 4-7 市售葡萄量測質譜圖。經過二維紙層析分離濃縮後，進行紙電噴灑質譜分析，圖(A)為檢測第四個紙片尖端所得之質譜圖，可以看到樣本中殘留的農藥已經被確實分離出來，並且在第四個紙片尖端被偵測到，圖(B)為檢測第一個紙片尖端所得之質譜圖，可以看到大量的葡萄糖以及兒茶素被留在第一個紙片尖端，大幅降低這些成分對於後續紙片尖端量測的影響。

## 4.6 生物樣本檢測

本小節將針對本研究的最終目標—生物樣本的檢測分析進行討論，目前已經知道本卡匣系統確實可用於天然植物樣本的量測，然而，生物樣本比起植物樣本複雜許多，因此有著更高的層析分離效能需求。其中尿液及唾液是人體代謝的產物中，非常容易帶有藥物殘留的物質，因此本研究將針對這兩種人體體液做為實驗的樣本，來進行後續的分析。

#### 4.6.1 人體尿液中的藥物殘留分析

首先針對水分含量較多的尿液進行分析，尿液不僅是人體代謝物中，生產量最大的物質，且由於尿液是根據人體所攝取的水分，進行吸收並且代謝後的產物，使其非常容易殘留攝取的物質，並且以較單純的物質做為檢測標的物，降低觀察的困難度。本次實驗的質譜設定參數如下：紙電噴灑工作電壓 6.0 kV、紙片尖端距離質譜入口 5.0 mm、質譜入口溫度 200°C、質譜入口毛細管電壓 6 V、質譜通道偏移電壓 20 V、質荷比掃描範圍設定為 50~450。

本實驗以服用過咖啡因後所排泄的尿液做為檢測樣本，首先受測者須喝下市售的黑咖啡，內含有 500 mL 的水分以及 170 mg 的咖啡因，經過兩個小時的代謝後，收集排泄的尿液做為樣本，並且以甲醇作為展開液，經過離心過濾後，使用移液器吸取 2.0  $\mu\text{L}$  的樣本量，滴定於卡匣上蓋的樣本進樣口，使用 80.0  $\mu\text{L}$  的甲醇作為第一維層析分離的展開液，並且使用 8.0  $\mu\text{L}$  的甲醇作為第二維層析濃縮的展開液，二維紙層析分離濃縮結束後，將質譜儀提供的高壓電源，根據所要檢測的紙尖，接上卡匣前端相對應的高分子電極，並且依序為每個紙片尖端，透過紙電噴灑游離法進行質譜檢測。

結果如圖 4-8 所示，圖(A)為二維紙層析分離濃縮處理前，直接透過紙電噴灑質譜法量測尿液樣本的質譜圖，可以看到非常大量的肌酸(Creatinine) 訊號峰值 114.13  $[\text{M}]^+$ ，肌酸是人體尿液中經常出現的物質，主要來源是經由肉類及魚類的攝取，因此也可以藉此來判斷受測者的飲食情形。而圖(B)為尿液樣本經過二維紙層析分離濃縮後，透過紙電噴灑質譜法量測第三個紙片尖端所得到的質譜圖，可以看到量測到的物質跟經過二維層析處理前有著極大的差異，並且能夠在其中發現咖啡因的微量訊號峰值 195.00  $[\text{M}]^+$ ，證明本卡匣系統確實可以在生物樣本中檢測到微量的藥物殘留。

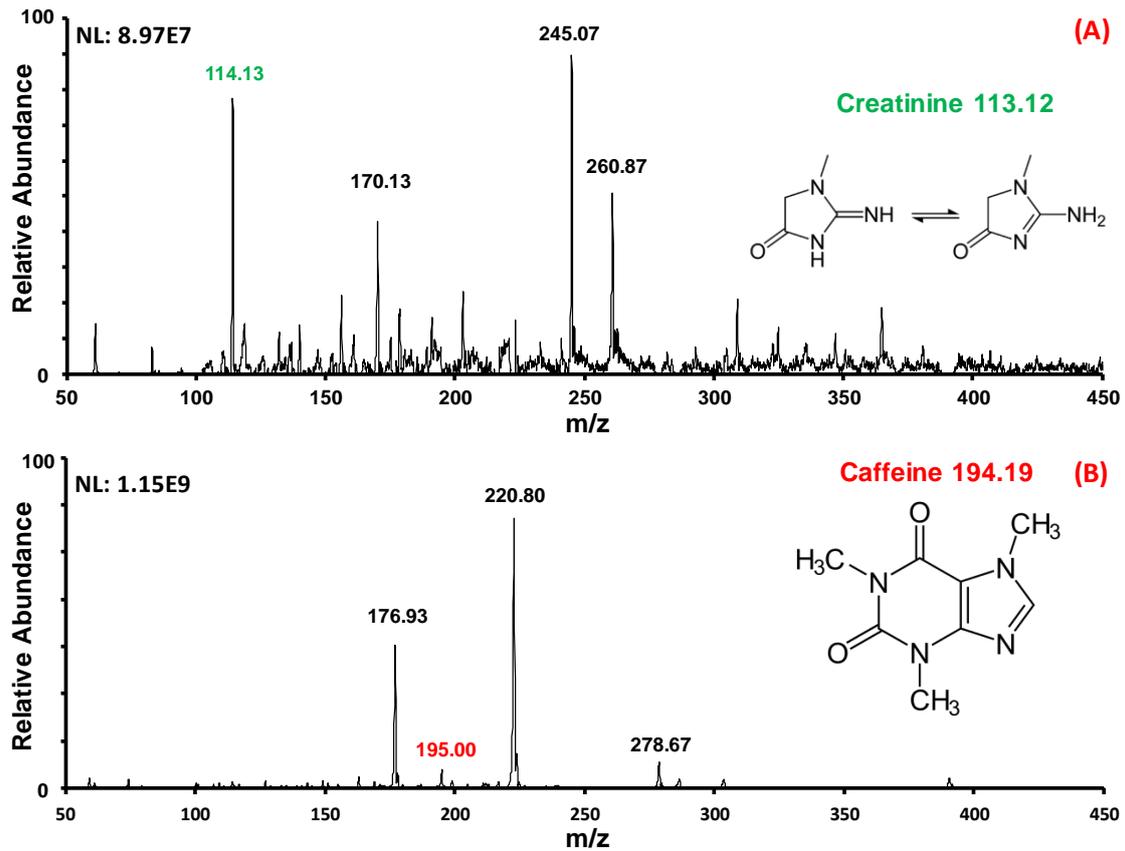


圖 4-8 攝取市售黑咖啡後的人體尿液樣本量測質譜圖。圖(A)為樣本未經過二維紙層析處理直接進行紙電噴灑質譜檢測，圖(B)為樣本經過二維紙層析分離濃縮處理後，於第三個紙片尖端進行量測的質譜圖。

然而，大部分的藥物進入人體後，都會經由人體消化、代謝，轉化為其他物質，因此需要透過服用複合藥物進行實驗，確保即使藥物經由人體反應過後，本系統依然能夠檢測到最終藥物產生的物質。本實驗以服用過維他命 B 群複合藥物後，所排泄的尿液做為檢測樣本，首先受測者須服下市售的維他命 B 群，內含有 160 mg 的維他命 B2 以及 120 mg 的維他命 B6，並且服用 500 mL 的水，經過兩個小時的代謝後，收集排泄的尿液做為樣本，並且以甲醇作為展開液，經過離心過濾後，使用移液器吸取 2.0  $\mu\text{L}$  的樣本量，滴定於卡匣上蓋的樣本進樣口，使用 80.0  $\mu\text{L}$  的甲醇作為第一維層析分離的展開液，並且使用 8.0  $\mu\text{L}$  的甲醇作為第二維層析濃縮的展開液，二維紙層析分離濃縮結束後，將質譜儀提供的高壓電源，根據所要檢測的

紙尖，接上卡匣前端相對應的高分子電極，並且依序為每個紙片尖端，透過紙電噴灑游離法進行質譜檢測。

結果如圖 4-9 所示，圖(A)為二維紙層析分離濃縮處理前，直接透過紙電噴灑質譜法量測尿液樣本的質譜圖，可以看到訊號主要被生物素所壓制，導致無法觀察到主要的目標，因此需要透過二維紙層析來分離濃縮樣本。而圖(B)為尿液樣本經過二維紙層析分離濃縮後，透過紙電噴灑質譜法量測第四個紙片尖端所得到的質譜圖，可以看到量測到的物質跟經過二維層析處理前有著極大的差異，並且能夠在其中發現維他命 B6 的訊號峰值 377.76 [M]<sup>+</sup> [62]，以及維他命 B6 的代謝物質 (Pyridoxine-D3)的訊號峰值 171.20 [M]<sup>+</sup>，證明本卡匣系統不僅可以在生物樣本中檢測到微量的藥物殘留，也能檢測出藥物經由人體代謝後所生成的產物。

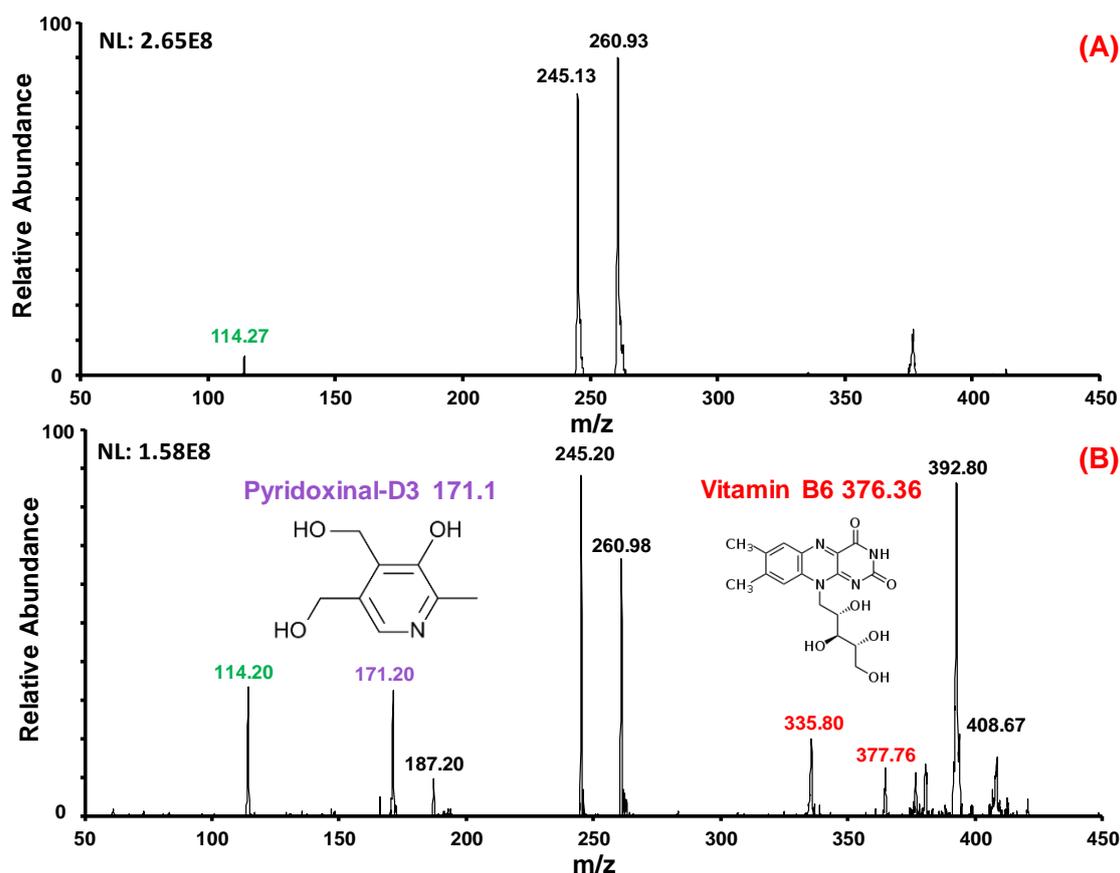


圖 4-9 攝取複合藥物的人體尿液樣本質譜圖。圖(A)為樣本未經過二維紙層析處理直接進行紙電噴灑質譜檢測，圖(B)為樣本經過二維紙層析分離濃縮處理後，於第四個紙片尖端進行量測的質譜圖。

## 4.6.2 人體唾液中的藥物殘留分析

唾液也是人體體液中，容易形成藥物殘留的代謝物質之一，由於人體的口腔黏膜，可以透過擴散作用將藥物滲透至微血管，並且兼具保護口腔的作用，因此經由口腔吸收的藥物，容易因為口腔黏膜的作動機制而造成大量的殘留，因此選定唾液作為接下來的檢測樣本。本次實驗的質譜設定參數如下：紙電噴灑工作電壓 6.0 kV、紙片尖端距離質譜入口 5.0 mm、質譜入口溫度 200°C、質譜入口毛細管電壓 35 V、質譜通道偏移電壓 55 V、質荷比掃描範圍設定為 50~450。

由於社會壓力造成的影響，近年來吸菸者的比例近年來大幅增加，因此尋找吸菸者進行唾液量測相對容易，並且針對唾液中的尼古丁殘留做為主要的檢測標的。首先，於受測者吸食完一根香菸後，將口腔完整清潔，在取其唾液作為樣本，並且以甲醇作為展開液，經過離心過濾後，使用移液器吸取 2.0  $\mu\text{L}$  的樣本量，滴定於卡匣上蓋的樣本進樣口，使用 80.0  $\mu\text{L}$  的甲醇作為第一維層析分離的展開液，並且使用 8.0  $\mu\text{L}$  的甲醇作為第二維層析濃縮的展開液，二維紙層析分離濃縮結束後，將質譜儀提供的高壓電源，根據所要檢測的紙尖，接上卡匣前端相對應的高分子電極，並且依序為每個紙片尖端，透過紙電噴灑游離法進行質譜檢測。

結果如圖 4-10 所示，圖(A)為二維紙層析分離濃縮處理前，直接透過紙電噴灑質譜法量測唾液樣本的質譜圖，由於唾液主要是由水分所組成，如未經過處理，將導致內含物質的濃度相當低落，導致直接進行量測時，僅能看到許多雜亂的訊號，無法觀察到本實驗主要的目標，因此需要透過二維紙層析來分離濃縮樣本。而圖(B)為唾液樣本經過二維紙層析分離濃縮後，透過紙電噴灑質譜法量測第三個紙片尖端所得到的質譜圖，可以看到量測到的物質跟經過二維層析處理前有著極大的差異，並且能夠在其中發現尼古丁(Nicorette)的微量訊號峰值 162.73 [M]<sup>+</sup>，證明本卡匣系統確實可以在人體唾液中，檢測到微量的藥物殘留。

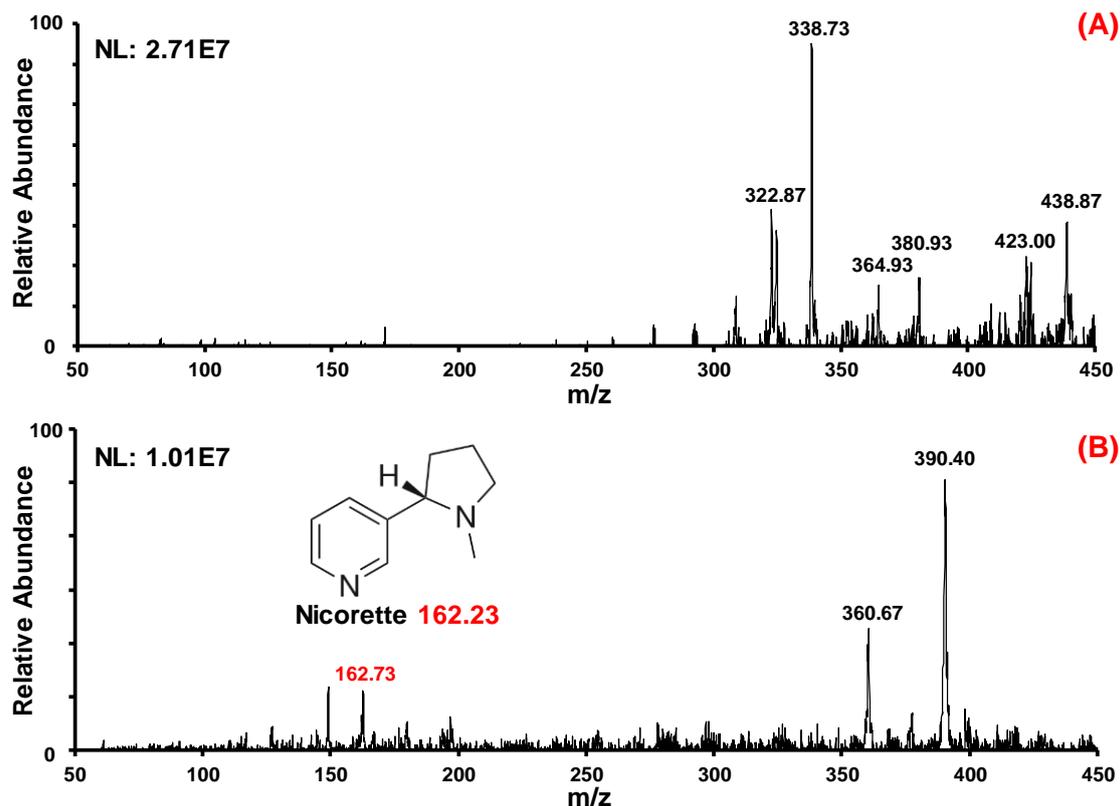


圖 4-10 吸菸者的唾液樣本量測質譜圖。圖(A)為樣本未經過二維紙層析處理直接進行紙電噴灑質譜檢測，圖(B)為樣本經過二維紙層析分離濃縮處理後，於第三個紙片尖端進行量測的質譜圖。

然而尼古丁由於是經由吸菸後殘留於口腔內部，跟一般口服的複合藥物略有不同，因此需要透過口服藥物後分泌的唾液，進行更進一步的檢測分析。而市售的喉糖中，便含有許多的草本植物，這些植物被廣泛用於許多的藥物，因此非常適合做為口服藥物的替代物。受測者攝取完市售的喉糖後，便取其唾液作為樣本，以甲醇作為展開液，經過離心過濾後，使用移液器吸取 2.0  $\mu\text{L}$  的樣本量，滴定於卡匣上蓋的樣本進樣口，使用 80.0  $\mu\text{L}$  的甲醇作為第一維層析分離的展開液，並且使用 8.0  $\mu\text{L}$  的甲醇作為第二維層析濃縮的展開液，二維紙層析分離濃縮結束後，將質譜儀提供的高壓電源，根據所要檢測的紙尖，接上卡匣前端相對應的高分子電極，並且依序為每個紙片尖端，透過紙電噴灑游離法進行質譜檢測。

結果如圖 4-11 所示，圖(A)為二維紙層析分離濃縮處理前，直接透過紙電噴灑質譜法量測唾液樣本的質譜圖，由於市售的喉糖中，含有大量的蔗糖，因此可以看到極高的蔗糖 381.13 [M]<sup>+</sup> 以及其斷了一個氧鍵後的訊號峰值 365.13 [M]<sup>+</sup>，造成其餘物質的訊號被完全壓制，導致無法有效的進行分析。而圖(B)為唾液樣本經過二維紙層析分離濃縮後，透過紙電噴灑質譜法量測第四個紙片尖端所得到的質譜圖，可以看到量測到的物質經過二維層析後，雖然有部分的蔗糖訊號殘留，但是可以於質譜圖中，觀測到市售喉糖中含有的葛根素(Puerarin)離子碎片的訊號峰值 399.07 [M]<sup>+</sup> 以及迷迭香酸(Rosmarinic Acid)的離子碎片峰值 383.67 [M]<sup>+</sup>[63]，證明本卡匣系統確實可以在人體唾液中，檢測到複合的藥物殘留。

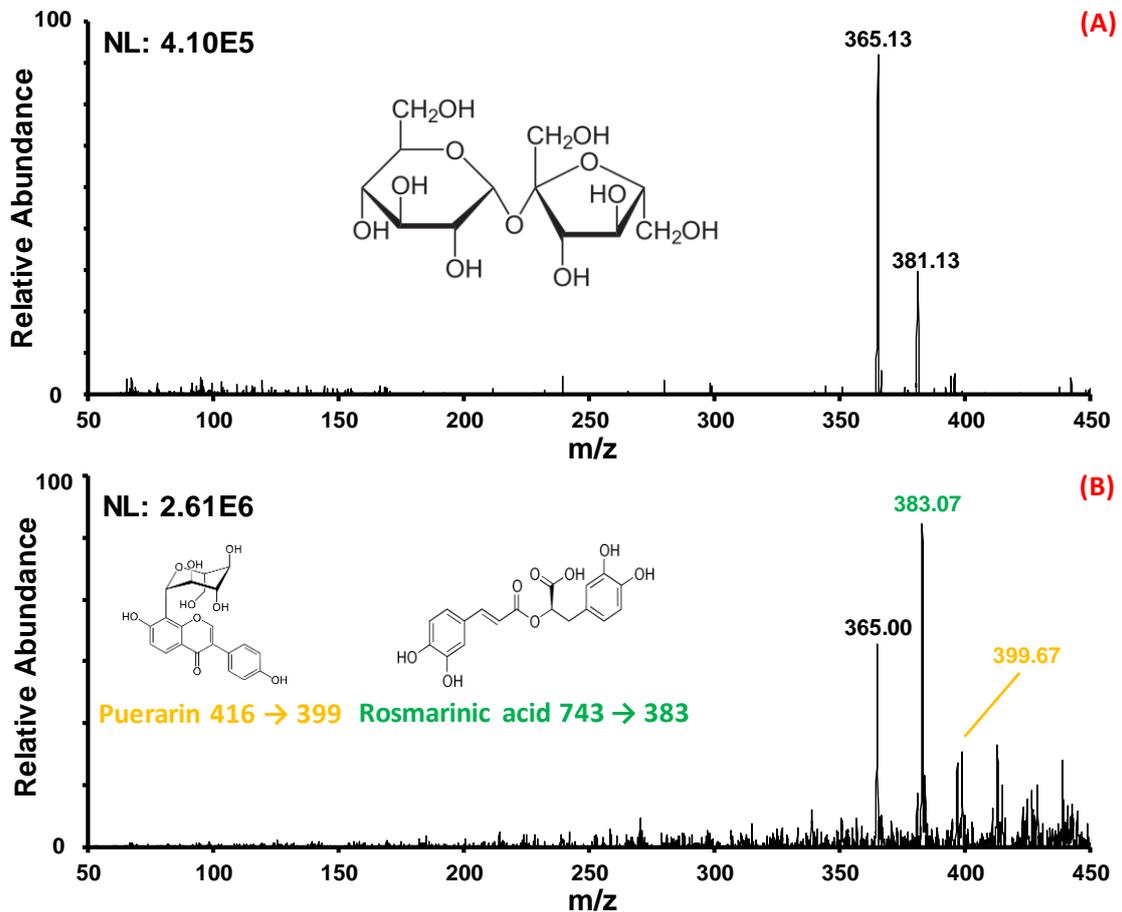


圖 4-11 攝取市售喉糖的人體唾液樣本質譜圖。圖(A)為樣本未經過二維紙層析處理直接進行紙電噴灑質譜檢測，圖(B)為樣本經過二維紙層析分離濃縮處理後，於第四個紙片尖端進行量測的質譜圖。

## 第五章 結論與未來展望

### 5.1 結論

本研究所開發的整合式二維紙層析卡匣系統，成功地將樣本進樣、第一維層析分離、第二維層析濃縮及紙電噴灑游離法整合於單一卡匣中，大幅簡化實驗的操作步驟及所需的儀器，且卡匣可藉由雙噴頭的 3D 列印機於單一次的製造程序中完成，包含卡匣上蓋、本體及內部的高分子電極，而卡匣內部的紙片可經由二氧化碳雷射加工機進行加工，整個系統皆可於自動化環境下生產，大幅降低生產成本及加工複雜度。本卡匣系統不需要任何額外的儀器輔助，也免去了複雜的操作過程，實現了一低成本、簡單、易用、容易製造的卡匣檢測系統。本實驗透過影像分析與質譜偵測，判斷二維式紙層析分離濃縮的效能，結果顯示，新型的紙片設計，於第一紙維層析分離中，能夠有效地將樣本分離，避免掉了紙層析分離容易產生的拖尾現象，使樣本殘留降低了 10 倍，並且透過犧牲翼以及節流閥的特殊設計，將第一維層析的理論板數分別提高了 3.9 倍與 1.6 倍，並且於第二維紙層析濃縮中，樣本確實被聚集到了紙片的尖端，而質譜量測的訊號強度也提升了 100 倍左右，並且透過實驗比較，證明本卡匣系統的偵測極限，相較於傳統的紙電噴灑質譜法，提升了 100 倍左右，到達 10 ppb。

確立了本卡匣系統的效能後，本研究首先針對較容易量測的植物樣本進行農藥殘留檢測，首先將樣本直接萃取，先以離心機過濾，經過二維式紙層析分離濃縮處理後，透過卡匣的電極進行紙電噴灑質譜法，結果顯示，成功的量測出了葡萄中殘留的微量農藥。

成功檢測植物樣本後，本研究針對最後的研究目標，生物樣本進行後續的檢測，分別量測人體體液中的唾液以及尿液，分別由受測者取得攝取咖啡、複合藥物後，經過代謝排泄的尿液，以及吸菸、服用口溶性藥物後，經過口腔清潔的唾液。結果顯示，不僅可以檢測出痕量的藥物殘留，也能夠檢測到服用複合藥物後，經過人體代謝後的藥物代謝物，證明本卡匣系統相容於各項檢測的廣泛性。

最後，本研究成功地利用單一的卡匣系統，完成樣本的前處理分離濃縮，透過紙電噴灑游離法，進行質譜檢測分析，並且將其應用於植物樣本及生物樣本的檢測。相較於傳統的紙電噴灑質譜法，大幅提高了偵測靈敏度，對於各領域的檢測，提供了一個簡單、易用、低成本的新型高效能檢測方式。

## 5.2 未來展望

目前本研究開發的新型紙基微流體卡匣系統，雖然製程的部分已經可以完全交由機器所生產，免去了人工製作的部分，然而實驗依然是全手動進行，人為造成的誤差同樣無法避免。然而，透過與電控平台進行整合，使用電腦來控制卡匣的移動及電噴灑的尖端，達到整個實驗流程的自動化，僅將最後的數據分析交由研究人員進行，不僅能夠大幅提高檢測的效率，也能免去人為操作所造成的失誤以及實驗誤差，使檢測系統的可靠度有效提升。

由於本實驗是使用紙層析作為主要的樣本前處理手段，因此層析溶液與樣本的搭配，對於層析的效能有著絕對的影響，於本文 4.3 中有提及，透過選用相對應的層析溶液，可以達到極高的針對效果，將特定的物質從樣本中分離出來。透過這個特性，將能夠根據樣本的種類及篩選的目標，如植物樣本中的農藥、人體體液中的藥物及環境中的有害物質等，來選擇所要使用的層析溶液。因此未來希望經由數據分析的方式，先將樣本及層析溶液根據其特性進行分類、搭配，再經由後續的實驗來確認兩者間的作用，並且將其建檔統計，最終把各種最適當的組合彙整為一個資料庫，將紙層析的效果最大化，藉此大幅提升後續質譜檢測的效能。另外，於紙層析中作為固相的紙片，也可以經由改質來增加紙層析以及後續紙電噴灑質譜法的效能，與層析溶液相同，可以針對不同的樣本進行紙片的改質，達到針對性的效果，藉此提升整體卡匣系統的檢測效能。

## 參考文獻

- [1] S. Castiglioni, E. Zuccato, E. Crisci, C. Chiabrando, R. Fanelli, and R. Bagnati, "Identification and Measurement of Illicit Drugs and Their Metabolites in Urban Wastewater by Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry," *Analytical Chemistry*, vol. 78, pp. 8421-8429, 2006.
- [2] S. A. Korhammer and A. Bernreuther, "Hyphenation of High-Performance Liquid Chromatography (Hplc) and Other Chromatographic Techniques with Nuclear Magnetic Resonance: A Review," *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, vol. 354, pp. 131-135, 1996.
- [3] A. J. Dempster, "The Ionization and Dissociation of Hydrogen Molecules and the Formation of H<sub>3</sub>," *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 31, pp. 438-443, 1916.
- [4] L. Gervais, N. De Rooij, and E. Delamarque, "Microfluidic Chips for Point-of-Care Immunodiagnosics," *Advanced Materials*, vol. 23, pp. H151-H176, 2011.
- [5] A. J. Capel, S. Edmondson, S. D. Christie, R. D. Goodridge, R. J. Bibb, and M. Thurstans, "Design and Additive Manufacture for Flow Chemistry," *Lab on a Chip*, vol. 13, pp. 4583-4590, 2013.
- [6] P. N. Nge, C. I. Rogers, and A. T. Woolley, "Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications," *Chemical Reviews*, vol. 113, pp. 2550-2583, 2013.
- [7] D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, and A. Manz, "Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip," *Science*, vol. 261, pp. 895-897, 1993.
- [8] M. Bu, T. Melvin, G. J. Ensell, J. S. Wilkinson, and A. G. Evans, "A New Masking Technology for Deep Glass Etching and Its Microfluidic Application," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 115, pp. 476-482, 2004.
- [9] P. Gravesen, J. Branebjerg, and O. S. Jensen, "Microfluidics-a Review," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 3, pp. 168-182, 1993.
- [10] G. N. Doku, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, and A. Van Den Berg, "On-Microchip Multiphase Chemistry—a Review of Microreactor Design Principles and Reagent Contacting Modes," *Tetrahedron*, vol. 61, pp. 2733-2742, 2005.
- [11] C.-H. Lin, G.-B. Lee, Y.-H. Lin, and G.-L. Chang, "A Fast Prototyping Process for Fabrication of Microfluidic Systems on Soda-Lime Glass," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 11, pp. 726-732, 2001.
- [12] R. Müller and D. Clegg, "Automatic Paper Chromatography," *Analytical Chemistry*, vol. 21, pp. 1123-1125, 1949.
- [13] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, and G. M. Whitesides, "Patterned Paper

- as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, pp. 1318-1320, 2007.
- [14] E. M. Fenton, M. R. Mascarenas, G. P. López, and S. S. Sibbett, "Multiplex Lateral-Flow Test Strips Fabricated by Two-Dimensional Shaping," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 1, pp. 124-129, 2008.
- [15] E. Carrilho, A. W. Martinez, and G. M. Whitesides, "Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics," *Analytical Chemistry*, vol. 81, pp. 7091-7095, 2009.
- [16] K. Abe, K. Suzuki, and D. Citterio, "Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper," *Analytical Chemistry*, vol. 80, pp. 6928-6934, 2008.
- [17] Y. He, Y. Wu, J.-Z. Fu, and W.-B. Wu, "Fabrication of Paper-Based Microfluidic Analysis Devices: A Review," *RSC Advances*, vol. 5, pp. 78109-78127, 2015.
- [18] Z. Nie, F. Deiss, X. Liu, O. Akbulut, and G. M. Whitesides, "Integration of Paper-Based Microfluidic Devices with Commercial Electrochemical Readers," *Lab on a Chip*, vol. 10, pp. 3163-3169, 2010.
- [19] A. W. Martinez, S. T. Phillips, and G. M. Whitesides, "Three-Dimensional Microfluidic Devices Fabricated in Layered Paper and Tape," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, pp. 19606-19611, 2008.
- [20] A. H. Free, E. C. Adams, M. L. Kercher, H. M. Free, and M. H. Cook, "Simple Specific Test for Urine Glucose," *Clinical Chemistry*, vol. 3, pp. 163-168, 1957.
- [21] E. Engvall and P. Perlmann, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa: Iii. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes," *The Journal of Immunology*, vol. 109, pp. 129-135, 1972.
- [22] D. J. Litman, T. M. Hanlon, and E. F. Ullman, "Enzyme Channeling Immunoassay: A New Homogeneous Enzyme Immunoassay Technique," *Analytical Biochemistry*, vol. 106, pp. 223-229, 1980.
- [23] M. J. Day, "Introduction to Antigen and Antibody Assays," *Topics in Companion Animal Medicine*, vol. 30, pp. 128-131, 2015.
- [24] L. Belanger, C. Sylvestre, and D. Dufour, "Enzyme-Linked Immunoassay for Alpha-Fetoprotein by Competitive and Sandwich Procedures," *Clinica Chimica Acta*, vol. 48, pp. 15-18, 1973.
- [25] R. Koenig, "Indirect ELISA Methods for the Broad Specificity Detection of Plant Viruses," *Journal of General Virology*, vol. 55, pp. 53-62, 1981.
- [26] E. M. del Campo Sepúlveda, E. Altman, M. Kobisch, S. D'Allaire, and M. Gottschalk, "Detection of Antibodies against Streptococcus Suis Capsular Type 2 Using a Purified Capsular Polysaccharide Antigen-Based Indirect ELISA," *Veterinary Microbiology*, vol. 52, no. 1, pp. 113-125, 1996.
- [27] E.-M. Zhou, M. Chan, R. Heckert, J. Riva, and M. F. Cantin, "Evaluation of a

- Competitive ELISA for Detection of Antibodies against Avian Influenza Virus Nucleoprotein," *Avian Diseases*, pp. 517-522, 1998.
- [28] A. Y. Kolosova, W. B. Shim, Z. Y. Yang, S. A. Eremin, and D. H. Chung, "Direct Competitive ELISA Based on a Monoclonal Antibody for Detection of Aflatoxin B1. Stabilization of ELISA Kit Components and Application to Grain Samples," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 384, pp. 286-294, 2006.
- [29] S. H. Caldwell, N. Li, R. M. Rourk, A. Millar, K. M. Sosnowski, M. Sue, A. S. Barritt, R. W. McCallum, and E. R. Schiff, "Hepatitis C Infection by Polymerase Chain Reaction in Alcoholics: False-Positive ELISA Results and the Influence of Infection on a Clinical Prognostic Score," *American Journal of Gastroenterology*, vol. 88, pp. 1016-1021, 1993.
- [30] K. McIntosh, R. Hendry, M. Fahnstock, and L. Pierik, "Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of Respiratory Syncytial Virus Infection: Application to Clinical Samples," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 16, pp. 329-333, 1982.
- [31] R. E. Biagini, D. L. Sammons, J. P. Smith, B. A. MacKenzie, C. A. Striley, J. E. Snawder, S. A. Robertson, and C. P. Quinn, "Rapid, Sensitive, and Specific Lateral-Flow Immunochromatographic Device to Measure Anti-Anthrax Protective Antigen Immunoglobulin G in Serum and Whole Blood," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 13, pp. 541-546, 2006.
- [32] S. J. Lehotay, A. D. Kok, M. Hiemstra, and P. V. Bodegraven, "Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection," *Journal of AOAC International*, vol. 88, pp. 595-614, 2005.
- [33] T. J. Kauppila, N. Talaty, T. Kuuranne, T. Kotiaho, R. Kostianen, and R. G. Cooks, "Rapid Analysis of Metabolites and Drugs of Abuse from Urine Samples by Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry," *Analyst*, vol. 132, pp. 868-875, 2007.
- [34] J. J. Thomson, "Cathode Rays," *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 44, pp. 293-316, 1897.
- [35] F. W. Aston, "A Positive Ray Spectrograph," *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 38, pp. 707-714, 1919.
- [36] M. S. Munson and F.-H. Field, "Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 88, pp. 2621-2630, 1966.
- [37] M. Posthumus, P. Kistemaker, H. Meuzelaar, and M. Ten Noever de Brauw, "Laser Desorption-Mass Spectrometry of Polar Nonvolatile Bio-Organic Molecules," *Analytical Chemistry*, vol. 50, pp. 985-991, 1978.

- [38] M. Yamashita and J. B. Fenn, "Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 88, pp. 4451-4459, 1984.
- [39] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, and T. Matsuo, "Protein and Polymer Analyses up to  $m/z$  100000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 2, pp. 151-153, 1988.
- [40] J. Zeleny, "Instability of Electrified Liquid Surfaces," *Physical Review*, vol. 10, pp. 1-6, 1917.
- [41] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, and M. B. Alice, "Molecular Beams of Macroions," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 49, pp. 2240-2249, 1968.
- [42] C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, and J. B. Fenn, "Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers," *Analytical Chemistry*, vol. 57, pp. 675-679, 1985.
- [43] S. Wong, C. Meng, and J. Fenn, "Multiple Charging in Electrospray Ionization of Poly (Ethylene Glycols)," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 92, pp. 546-550, 1988.
- [44] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, " *Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules*," *Science*, vol. 246, pp. 64-71, 1988.
- [45] H. Wang, J. Liu, R. G. Cooks, and Z. Ouyang, "Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry," *Angewandte Chemie*, vol. 122, pp. 889-892, 2010.
- [46] N. E. Manicke, P. Abu-Rabie, N. Spooner, Z. Ouyang, and R. G. Cooks, "Quantitative Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spot Samples by Paper Spray Mass Spectrometry: An Avenue to Therapeutic Drug Monitoring," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 22, pp. 1501-1507, 2011.
- [47] A. Li, P. Wei, H.-C. Hsu, and R. G. Cooks, "Direct Analysis of 4-Methylimidazole in Foods Using Paper Spray Mass Spectrometry," *Analyst*, vol. 138, pp. 4624-4630, 2013.
- [48] H. Wang, N. E. Manicke, Q. Yang, L. Zheng, R. Shi, R. G. Cooks, and Z. Ouyang, "Direct Analysis of Biological Tissue by Paper Spray Mass Spectrometry," *Analytical Chemistry*, vol. 83, pp. 1197-1201, 2011.
- [49] Z. Zhang, W. Xu, N. E. Manicke, R. G. Cooks, and Z. Ouyang, "Silica Coated Paper Substrate for Paper-Spray Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spots," *Analytical Chemistry*, vol. 84, pp. 931-938, 2011.
- [50] Y. Zhang, H. Li, Y. Ma, and J.-M. Lin, "Paper Spray Mass Spectrometry-Based Method for Analysis of Droplets in a Gravity-Driven Microfluidic Chip," *Analyst*,

- vol. 139, pp. 1023-1029, 2014.
- [51] L. Shen, J. Zhang, Q. Yang, N. E. Manicke, and Z. Ouyang, "High Throughput Paper Spray Mass Spectrometry Analysis," *Clinica Chimica Acta*, vol. 420, pp. 28-33, 2013.
- [52] J. Liu, H. Wang, R. G. Cooks, and Z. Ouyang, "Leaf Spray: Direct Chemical Analysis of Plant Material and Living Plants by Mass Spectrometry," *Analytical Chemistry*, vol. 83, pp. 7608-7613, 2011.
- [53] G. I. Salentijn, R. Oleschuk, and E. Verpoorte, "3d-Printed Paper Spray Ionization Cartridge with Integrated Desolvation Feature and Ion Optics," *Analytical Chemistry*, vol. 89, pp. 11419-11426, 2017.
- [54] L. C. Duarte, T. C. de Carvalho, E. O. Lobo-Júnior, P. V. Abdelnur, B. G. Vaz, and W. K. Coltro, "3d Printing of Microfluidic Devices for Paper-Assisted Direct Spray Ionization Mass Spectrometry," *Analytical Methods*, vol. 8, pp. 496-503, 2016.
- [55] 陳仲祥, "創新二維紙層析分離及電噴灑游離快速檢測卡匣於質譜分析之應用," 中山大學機械與機電工程學系研究所學位論文, 2016.
- [56] L. Ettre and K. Sakodynskii, "Ms Tswett and the Discovery of Chromatography I: Early Work (1899–1903)," *Chromatographia*, vol. 35, pp. 223-231, 1993.
- [57] I. E. Bush, "Methods of Paper Chromatography of Steroids Applicable to the Study of Steroids in Mammalian Blood and Tissues," *Biochemical Journal*, vol. 50, p. 370, 1952.
- [58] A. Levy and D. Chung, "Two-Dimensional Chromatography of Amino Acids on Buffered Papers," *Analytical Chemistry*, vol. 25, pp. 396-399, 1953.
- [59] S. J. Gaskell, "Electrospray: Principles and Practice," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 32, pp. 677-688, 1997.
- [60] 林哲緯, "創新線微流體電泳電化學系統結合電噴灑游離質譜偵測於生醫及食品安全之應用," 中山大學機械與機電工程學系研究所學位論文, 2016.
- [61] B. H, "Determination of azoxystrobin residues in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry with solid-phase extraction," *Chinese Journal of Chromatography*, vol. 25, pp. 898-901, 2007.
- [62] M. Khaksari, L. R. Mazzoleni, C. Ruan, R. T. Kennedy, and A. R. Minericka, "Data representing two separate LC-MS methods for detection and quantification of water-soluble and fat-soluble vitamins in tears and blood serum," *Data in Brief*, vol. 155, pp. 54-63, 2017.
- [63] D. Bandoniene, M. Murkovic, and P. R. Venskutonis, "Determination of Rosmarinic Acid in Sage and Borage Leaves by High-Performance Liquid Chromatography with Different Detection Methods," *Journal of Chromatographic Science*, vol. 43, pp. 372-376, 2005.

# 自述

姓名：鄭名栩 (Ming-Hsu, Cheng)

出生日期：1993/12/18

性別：男

出生地：彰化縣

電子信箱：m053020106@student.nsysu.edu.tw



學歷：

國立中山大學 機械與機電工程研究所 碩士 2016/09~2018/06

國立高雄應用科技大學 模具工程系 學士 2012/09~2016/06

國立秀水高工 製圖科 2009/09~2012/06

發表著作：

國際研討會

1. **Ming-Hsu Cheng**, Che-Hsin Lin, “Novel Paper-based Microfluidic Cassette for Two-Dimensional Paper Chromatography and Paper Spray Mass Spectrometry (PS-MS) Detection of Saliva” *The 22th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2018)*, Kaohsiung, Taiwan, November, 2018
2. **Ming-Hsu Cheng**, Che-Hsin Lin, “Novel Paper-Based Microfluidic Cassette for 2D Paper Chromatography and Paper Spray Mass Spectrometry (PS-MS) for Drug Metabolism Analysis in Urine” *The 31st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2018)*, Belfast, United Kingdom, January, 2018
3. **Ming-Hsu Cheng**, Che-Hsin Lin, “3D Printed Cassette Embedded with Conductive Polymer Electrodes for 2D Paper Chromatography and Paper Teeth Spray Mass Spectrometry (PTS-MS) Detection of Residual Pesticides in Agricultures” *The 21th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017)*, Savannah, United States, October, 2017

國內研討會

1. **鄭名栩** 林哲信, “使用 3D 列印製造內含高分子電極卡匣用於二維紙層析與紙電噴灑質譜法檢測農藥殘留” 中國機械工程學會第三十四屆全國學術研討會 (*China Society of Mechanical Engineering –CSME*), 台中, 台灣, 十二月, 2017
2. 林哲緯 **鄭名栩** 林哲信, “創新線微流體系統整合電噴灑游離質譜偵測於生醫及食品安全之應用” 2017 生物醫學工程科技研討會暨科技部醫學工程學門成果發表會 (*Biomedical Engineering Society –BMES*), 桃園, 台灣, 十一月, 2017