



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

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

Novel Cassette-Based Two Dimensional Paper Chromatography  
Integrated with Electrospray Ionization for Mass Spectrometry  
Detections

研究生：陳仲祥

Chung-Hsiang Chen

指導教授：林哲信 教授

Dr. Che-Hsin Lin

中華民國 105 年 9 月

September 2016

# 論文審定書

國立中山大學研究生學位論文審定書



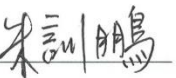
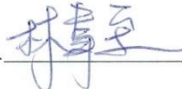

本校機械與機電工程學系碩士班

研究生陳仲祥（學號：M033020069）所提論文

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  
Novel Cassette-Based Two Dimensional Paper Chromatography Integrated  
with Electrospray Ionization for Mass Spectrometry Detections

於中華民國 105 年 9 月 5 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 	委員 林哲信 
委員 朱訓鵬 	委員 林韋至 
委員 莊承鑫 	委員 _____

指導教授(林哲信)  (簽名)

# 論文授權書

2016/9/20

國立中山大學博碩士論文公開授權書

國立中山大學博碩士論文公開授權書



etd-0820116-055341

2016-09-20 06:04:53

本授權書所授權之論文為授權人陳仲祥在國立中山大學 機械與機電工程學系研究所 105學年度第1學期取得碩士學位之論文。

論文題目： 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

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。  
另有關於著作權相關資訊，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110年09月20日，校外(含國家圖書館)民國110年09月20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110年09月20日。

授權人：陳仲祥

學 號：M033020069

授 權 人： 陳仲祥 (簽章)

陳仲祥

指導教授：林哲信 (簽章)  
林哲信

中華民國 105年 9月 20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](mailto: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，各別與紙本論文一併繳交。

## 致謝

兩年前毅然決然地放棄了一個學年的努力，回到了高雄來重新開始，當初其實也沒有料想到，能夠有機會進到中山大學就讀，知道錄取的當下喜憂參半，喜的是終於能夠到好大學了，憂的則是必須要放棄一年來的努力。最後幾經衡量之下，回到了熟悉的地方，接受了新的挑戰，接觸完全不同以往的領域，過程中雖有不少的挫折，但是在努力學習和老師、學長姐及同學的指導與協助下，都能夠將問題迎刃而解，才能夠有今天的研究成果。

首先最感謝我的指導教授林哲信老師，在兩年的研究所生涯中，您的指導方式總是給予我們無拘束的思考空間，讓我們有了獨立思考與解決問題的能力，也在我們產生問題與困惑時適時導正，並時時關心我們，不論在研究上或是生活上，都給予我們很大的幫助。實驗室充分的資源，不管是設備或資金，都能讓我們無後顧之憂的進行研究。感謝口試委員朱訓鵬老師、林韋至老師、傅龍明老師、莊承鑫老師，給予論文與研究上的建議與指導，使我的學位論文能更加完整。感謝陳俊邑學長與王育翔學長，在我初來乍到滿頭疑問的時候，不厭其煩的解答我各式的疑惑與研究上的指導，更是使我獲益良多。感謝學長李和政、陳冠維、吳尚璟、蘇殷寬、高毅，學姐蘇佩宇，助理黃鈺珊，在儀器操作和實驗室事務上提供協助，使研究的進行更佳順利。感謝一起為畢業打拼的林哲緯、雷世勤、方識傑、林承毅，讓煩悶的研究生活增添了色彩，一起向著同個目標奮鬥和兩年來的酸甜苦辣，相信大家永生難忘的。感謝學弟白祥廷、嚴瑋星、李岱恩、呂維銘、陳子捷、鄭名栩，學妹翁琳凱、高尉馨、王君敏，在我碩二忙碌之際，不論是幫忙打理實驗室事務，以及給予我適時的協助，讓我能專心的研究與撰寫碩論。感謝專題生劉照瑄在實驗與數據整理的協助，也讓我在教導你的專題的同時，能夠有反思與重新學習的機會，也祝福你的研究生涯順利。感謝科技部提供實驗室計畫與經費。最後感謝我的家人，父母、哥哥和妞妞，你們總是在背後給予我支持與鼓勵，讓我有繼續前進的動力，現在才能有一點小小的成就。

## 中文摘要

本研究提出利用低成本的定性濾紙，與 3D 列印製造技術，製作一個整合電噴灑游離質譜偵測，於快速檢測卡匣系統，並成功透過創新二維紙層析分離，將待測物成分分離、再濃縮，經由電噴灑游離法脫附、游離後，透過質譜偵測、分析，應用於生醫與食品樣本的檢測。因此本研究選用市售孔徑 2.5  $\mu\text{L}$  之定性濾紙，再透過自行設計與雷雕機切割為  $40\times 5.0\text{ mm}^2$  與紙片尖端角度  $60^\circ$  之紙片，作為卡匣樣本傳遞與偵測之微流道，結合電噴灑游離法進行即時的檢測，且其成本低廉、取得容易，是個檢測即時、攜帶式、拋棄式檢測裝置。而本研究所提出的二維紙層析，不需要經過其他設備或是複雜的操作，只需要透過紙纖維本身的毛細作用力，即可以完成樣本成分的分離與濃縮。待測物經由兩個維度之紙層析後，質譜所偵測到之離子訊號強度，大幅的提升了 100 倍外，訊雜比也增加了 1.73 倍，證實二維層析讓樣本成分被濃縮，同時能將殘渣或雜質剔除，以提升質譜偵測分析之解析度。實驗結果顯示，系統在標準品對乙酰氨基酚與維生素 B<sub>2</sub> 之檢測極限可以達到 1.0 ppb；在噴灑穩定度量測上，在尖端角度  $60^\circ$  之紙片陣列上施加  $1.26\times 10^6\text{ V/m}$  的電場條件下，可得到電噴灑游離離子強度為  $10^{10}\text{ ions/cm}^3$ ，並持續兩分鐘以上之穩定噴灑。利用兩個維度之紙層析分離，成功分離亞甲基藍及甲基紫兩種指示劑，能夠在過程中直接觀察到分離效果，並於質譜偵測應證其分離效能。於茶葉、大蒜實驗中，人為摻雜了 10.0 ppm 之巴拉刈，經過了層析分離後，成功的被質譜偵測。最後，選用市場購買之青蔥，直接萃取其汁液，經過層析後，偵測到了派美尼以及伏寄普兩種農藥訊號。本研究成功開發一快速檢測卡匣，整合進樣前處理、二維紙層析、電噴灑游離，在標準品與天然物皆有良好的靈敏度，農藥的偵測上也成功量測，其訊號之訊雜比皆能達到 7.31 dB 以上，表示此快速檢測卡匣，於生醫與食品安全檢測應用上，有著極大的潛力。

關鍵字：紙微流體、紙層析、電噴灑游離法、側流式檢測卡匣、質譜檢測

# Abstract

This research successfully presents a lateral flow cassette combined with electrospray ionization (ESI) for rapid mass spectrometry detection of ambient samples. The developed aims to substitute conventional food-safety examination approaches such as high performance liquid chromatography tandem mass spectrometer (HPLC/MS) and gas chromatography tandem mass spectrometer (GC/MS). The cassette is demonstrated with the ingredient separation and electrospray process of the ambient liquid samples under unique cassette-based two-dimensional (2-D) paper chromatography scheme. Liquid sample is directly applied on the cassette for sample separation with paper chromatography and then concentrated with the second paper chromatography for enhancing the detection performance of ESI. Results show that the electrospray ion intensity is enhanced for 100 times higher after the 2-D paper chromatography process for sample enrichment. The whole process can be done in 30 min on a patterned filter paper. The time and cost for food-safety examination can be dramatically reduced with the developed method. The experimental results also indicated that the developed cassette exhibits a lower limit of detection (LOD) of 1.0 ppb for detecting acetaminophen and vitamin B<sub>2</sub>. The intensity for ESI on the paper tips is as high as  $10^{10}$  ions/ cm<sup>3</sup> for the paper tip of 60°. Several samples including like Chinese herbal medicines (cinnamon), raw vegetables (garlic, green onion), clinical medicines (acetaminophen, chlorpheniramine), paraquat-spiked garlic sample are used to evaluate the performance of the developed method. Moreover, two pesticides of pyrimethanil (fungicide) and fluazifop-butyl (herbicides) in raw fresh green onion are detected with high SNR (signal to noise ratio) of 4.77 dB. The developed method has shown its potential on rapid food-safety examination compared to conventional HPLC/MS & GC/MS.

Keywords: Electrospray ionization, Lateral flow system, Paper-based microfluidic, Paper chromatography, Mass spectrometry

# 目錄

論文審定書 .....	i
論文授權書 .....	ii
致謝 .....	iv
中文摘要 .....	v
Abstract .....	vi
目錄 .....	vii
圖目錄 .....	ix
表目錄 .....	xii
符號表 .....	xiii
簡寫表 .....	xiv
第一章 緒論 .....	1
1.1 前言 .....	1
1.2 快速檢測卡匣系統簡介 .....	2
1.2.1 快速檢測卡匣的介紹與回顧 .....	2
1.2.2 酵素結合免疫吸附分析法 .....	7
1.2.3 快速檢測卡匣效能評斷 .....	9
1.3 大氣壓力質譜法 .....	12
1.4 電噴灑游離法 .....	14
1.4.1 脫附電噴灑游離法 .....	14
1.4.2 直接電噴灑探針 .....	15
1.4.3 紙噴灑游離法 .....	16
1.5 研究動機與目的 .....	19
1.6 論文架構 .....	20
第二章 實驗原理 .....	21
2.1 毛細作用力 .....	21
2.2 紙層析 .....	22
2.3 電噴灑游離法 .....	27
第三章 實驗設計與架構 .....	30



3.1 快速檢測卡匣設計與製作.....	30
3.1.1 紙片設計與製作.....	32
3.1.2 卡匣電極設計與製作.....	34
3.2 紙層析分離系統.....	35
3.3 紙噴灑游離偵測系統.....	36
3.4 實驗系統架構.....	37
3.5 實驗設計與檢測目標.....	39
3.6 實驗溶液配置.....	41
第四章 實驗結果與討論 .....	43
4.1 紙片尖端角度特性分析.....	43
4.2 紙層析分離參數分析.....	46
4.3 檢測卡匣系統偵測極限.....	48
4.4 紙層析分離後量測.....	51
4.4.1 標準藥品層析分離.....	52
4.4.2 天然物層析分離.....	56
4.5 二維層析分離效能比較.....	59
4.5.1 直接量測與層析後量測比較.....	59
4.5.2 一、二維層析後量測比較.....	62
4.6 天然物快速檢測.....	65
4.7 天然物農藥快速檢測.....	67
第五章 結論與未來展望 .....	70
5.1 結論.....	70
5.2 未來展望.....	72
參考文獻 .....	73
自述 .....	79

# 圖目錄

圖 1-1 快速檢測卡匣應用之範圍 .....	3
圖 1-2 膠體金膨脹製程示意圖 .....	4
圖 1-3 克倫特羅與萊克多巴胺檢測卡匣實體圖 .....	5
圖 1-4 黃麴毒素 B2 檢測卡匣示意圖 .....	5
圖 1-5 二維檢測卡匣示意圖 .....	6
圖 1-6 Song 團隊開發之黴菌毒素檢測裝置 .....	7
圖 1-7 ELISA 檢測示意圖 .....	9
圖 1-8 各式快速檢測卡匣系統圖 .....	10
圖 1-9 以電噴灑游離法與大氣壓力化學游離法，為基礎發展之游離法 .....	13
圖 1-10 脫附電噴灑游離法架構圖 .....	15
圖 1-11 直接電噴灑探針結構示意圖 .....	16
圖 1-12 紙噴灑游離法架構示意圖 .....	17
圖 1-13 Shen 團隊開發之移動噴灑平台架構示意圖 .....	18
圖 1-14 人蔘組織電噴灑之架構圖與 SEM 圖 .....	18
圖 1-15 Cooks 團隊在 2012 年所提出使用植物葉片直接電噴灑 .....	19
圖 1-16 論文架構圖 .....	20
圖 2-1 毛細現象於玻璃管柱在水中示意圖 .....	22
圖 2-2 紙層析分離混合物中成分之示意圖 .....	24
圖 2-3 二維紙層析分離流程示意圖 .....	24
圖 2-4 電噴灑游離法之游離過程示意圖 .....	27

圖 3-1 快速檢測卡匣之設計圖 .....	32
圖 3-2 快速檢測卡匣之實體圖 .....	32
圖 3-3 快速檢測卡匣之紙片設計圖 .....	34
圖 3-4 快速檢測卡匣之電極圖 .....	34
圖 3-5 本實驗使用之紙層析架構流程圖 .....	36
圖 3-6 本實驗之系統架構圖 .....	38
圖 4-1 不同尖端角度兩分鐘之噴灑離子強度圖 .....	45
圖 4-2 紙片尖端角度 60° 紙噴灑游離之張角圖 .....	45
圖 4-3 固定進樣 2.0 $\mu\text{L}$ 量下之不同展開液分離效果 .....	47
圖 4-4 固定展開液 40.0 $\mu\text{L}$ 量下之不同進樣量分離效果圖 .....	47
圖 4-5 維生素 B <sub>2</sub> 1.0 ppb 量測質譜訊號圖.....	49
圖 4-6 對乙醯氨基酚 1.0 ppb 量測質譜訊號圖 .....	50
圖 4-7 快速檢測卡匣在維生素 B <sub>2</sub> 與對乙醯氨基酚之檢測極限檢量線圖.....	50
圖 4-8 快速檢測卡匣在維生素 B <sub>2</sub> 與對乙醯氨基酚之濃度與取樣訊雜比圖.....	51
圖 4-9 快速檢測卡匣在氯苯那敏與對乙醯氨基酚之層析分離後量測圖 .....	53
圖 4-10 快速檢測卡匣在吡哆醇與菸鹼醯胺之層析分離後量測圖 .....	54
圖 4-11 快速檢測卡匣在甲基紫與亞甲基藍之層析分離後量測圖 .....	55
圖 4-12 快速檢測卡匣在中草藥肉桂之層析分離後量測圖 .....	57
圖 4-13 快速檢測卡匣在青蔥之層析分離後量測圖 .....	58
圖 4-14 甲基紫與亞甲基藍未經層析分離直接量測之質譜圖譜 .....	60
圖 4-15 甲基紫與亞甲基藍經層析分離後之質譜圖譜 .....	60

圖 4-16 青蔥未經層析分離直接量測之質譜圖譜 .....	61
圖 4-17 青蔥經層析分離後之質譜圖譜 .....	62
圖 4-18 甲基紫經第一維層析分離後之質譜圖譜 .....	63
圖 4-19 甲基紫經第一維層析分離與第二維層析濃縮後之質譜圖譜 .....	64
圖 4-20 甲基紫經第一維層析與第二維層析後量測之離子訊號強度比較圖 .....	64
圖 4-21 大蒜直接量測圖譜 .....	65
圖 4-22 中草藥當歸直接量測圖譜 .....	66
圖 4-23 中草藥川芎直接量測圖譜 .....	66
圖 4-24 中草藥肉桂直接量測圖譜 .....	67
圖 4-25 茶葉摻雜 10.0 ppm 巴拉刈經第一維層析後量測圖譜 .....	68
圖 4-26 茶葉摻雜 10.0 ppm 巴拉刈經第二維層析後量測圖譜 .....	68
圖 4-27 青蔥之蔥綠、蔥白與兩者交界處之量測圖譜 .....	69

# 表目錄

表 1-1	快速檢測卡匣系統效能之 SWOT 分析表[.....	11
表 1-2	現行檢測系統效能與快速檢測卡匣系統比較表 .....	11
表 1-3	ESI 與 APCI 比較表 .....	13
表 5-1	本系統與現行檢測法比較表 .....	71

## 符號表

amu: 原子質量單位

dB: 分貝

DPI: 解析度

mM: 毫莫耳

m/z: 質荷比

N: 理論板數

ppb: 千萬分率

ppm: 百萬分率

## 簡寫表

- AMU: Atomic Mass Unit, 原子質量單位
- ABS: Acrylonitrile Butadiene Styrene, 丙烯青丁二烯苯乙烯
- APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization, 大氣壓力化學游離法
- ASAP: Atmospheric Solids Analysis Probe, 大氣壓力固態分析探針游離法
- CI: Chemical Ionization, 化學游離法
- CRT: Charge Residue Theory, 電荷殘留理論
- Da: Dalton, 道耳頓
- DART: Direct Analysis in Real Time, 即時直接分析法
- DAPCI: Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization, 脫附大氣壓力化學游離法
- DEP: Direct Electrospray Probe, 直接電噴灑游離探針
- DESI: Desorption Electrospray Ionization, 脫附電噴灑游離法
- DNA: Deoxyribonucleic Acid, 去氧核糖核酸
- EI: Electron Ionization, 電子束游離法
- ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 酵素結合免疫吸附法
- EESI: Extractive Electrospray Ionization, 萃取式電噴灑游離法
- ESI: Electrospray Ionization, 電噴灑游離法
- GC: Gas Chromatograph, 氣相層析
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography, 高效能液相層析
- IEC: Ion Evaporation Theory, 離子揮發理論
- Ig: Immunoglobulin, 免疫球蛋白
- IMR: Ion-Molecule Reaction, 分子離子反應
- IVDs: In vitro Diagnostic System, 體外檢測系統
- LC: Liquid Chromatography, 液相層析

LIFA: Lateral flow immunoassay, 側流式免疫檢測

MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, 基質輔助雷射脫附游離法

MS: Mass Spectrometry, 質譜儀

PCB: Printed Circuit Board, 印刷電路板

PCR: Polymerase Chain Reaction, 聚合酶鍊反應

POC: Point of Care, 定點照護檢驗

PSI: Paper Spray Ionization, 紙電噴灑

SNR: Signal to Noise Ratio, 訊雜比

TLC: Thin Layer Chromatography, 薄層層析法

UPT: Up-Converting Phosphor, 上轉換磷光體



# 第一章 緒論

## 1.1 前言

快速檢測卡匣是生活中常見的檢測工具，例如流感快篩試片、驗孕棒、登革熱快篩試片...等卡匣。然而上述這些卡匣，都是透過酵素結合免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)進行檢驗，此方法固然有著高度準確性，但是製備過程繁複且有酵素壽命限制，並且存在著偽陰或偽陽性之疑慮，都是這種檢測卡匣的缺陷。若能將檢測機制交由定性及定量上，有著高精確性、靈敏度的質譜儀，便能夠避免檢測失準，也不會有使用期限的問題。將卡匣做為樣品載體，質譜進行後端定性或定量之檢測，可以大幅提升卡匣的準確性以及效能。目前質譜儀已被廣泛使用於各領域，如分析化學、藥物檢測、環境偵測、食品安全、國土安全等。

常見的質譜儀大致可分為六大部分，即進樣系統、游離源、質量分析器、偵測器、數據處理系統以及真空系統，傳統的質譜游離源，需要在高真空環境下進行游離，讓待測物脫附、游離，形成帶電離子進到質譜中，再依照待測物質量，以及所帶之電荷數目的比值(質荷比,  $m/z$ )差異，利用電場或磁場使其分離進到偵測器，最後透過軟體計算得知待測物分子量。而現代的質譜游離源，已經能在大氣壓力下操作，省去了許多繁複的前處理，並且能夠快速且連續地分析樣品，大大提升了質譜檢測的效能及使用範圍。

本研究即結合檢測卡匣之快速篩檢特性，以及大氣質譜法之高靈敏度、準確性，開發了具有快速篩檢定性分析之檢測卡匣，並針對了數種標準品及天然物，進行分析與量測，定義出了此檢測卡匣之操作參數、檢測極限等參數；且透過兩次的層析分離、濃縮樣本，達到提升質譜檢測之離子訊號強度，成功開發一創新二維紙層析分離快測檢測卡匣系統。

## 1.2 快速檢測卡匣系統簡介

快速檢測卡匣是近代快速診斷的一大利器，其裝置方便可隨身攜帶，並且成本低廉使用後可拋棄，皆是現在定點照護檢驗(Point of care, POC)的要求[1]，而所使用的材料與技術將決定該系統之成本。快速檢測卡匣系統大多採用濾紙或硝化纖維等材料，這些材料有著不需外加推動裝置、取得及銷毀容易、成本低廉、攜帶方便等其他材料無法取代的優點，因此被大量應用於卡匣檢測系統。由於這些優點，研究團隊得以大肆發揮，因此在這個章節，將會對於快速檢測卡匣系統，由發展歷史、文獻回顧、檢測方法等，做概略的介紹。

### 1.2.1 快速檢測卡匣的介紹與回顧

快速檢測卡匣系統，被稱為側流式免疫檢測(Lateral flow immunoassay, LIFA)，也是體外檢測系統(In vitro diagnostic system, IVDs)的一種，這個系統優點在於，能夠直接進行採樣、檢測，而不需要太多樣本的培養或純化等步驟。在 1960 年代，首先有了商業化模組的誕生，用來進行糖尿病的檢測，針對尿液中的葡萄糖進行監測[2]。快速檢測卡匣系統的原型為紙基微流體(Paper-based microfluidics)，又被稱為紙上實驗室(Lab on paper)，意即可以應用於多個領域，並且將所有檢測流程，都在紙上完成，舉凡環境監測、食品安全、醫學檢測等，都能夠在紙上作檢測，如圖 1-1 所示。

對於醫療程度、設備較為落後之國家，快速檢測卡匣時常扮演重要的角色，可作為初步診斷之依據，更快找到病因，使病患能即早進行治療。因此快速檢測卡匣是聯合國無國界醫生，常在第三世界國家使用之醫療器材，也是 POC 常用之系統，顧名思義就是能夠隨時隨地都可以進行診斷檢驗，猶如現在市面上常見的消費性生醫產品，最成功且廣為人知的即是血糖機、驗孕棒等。

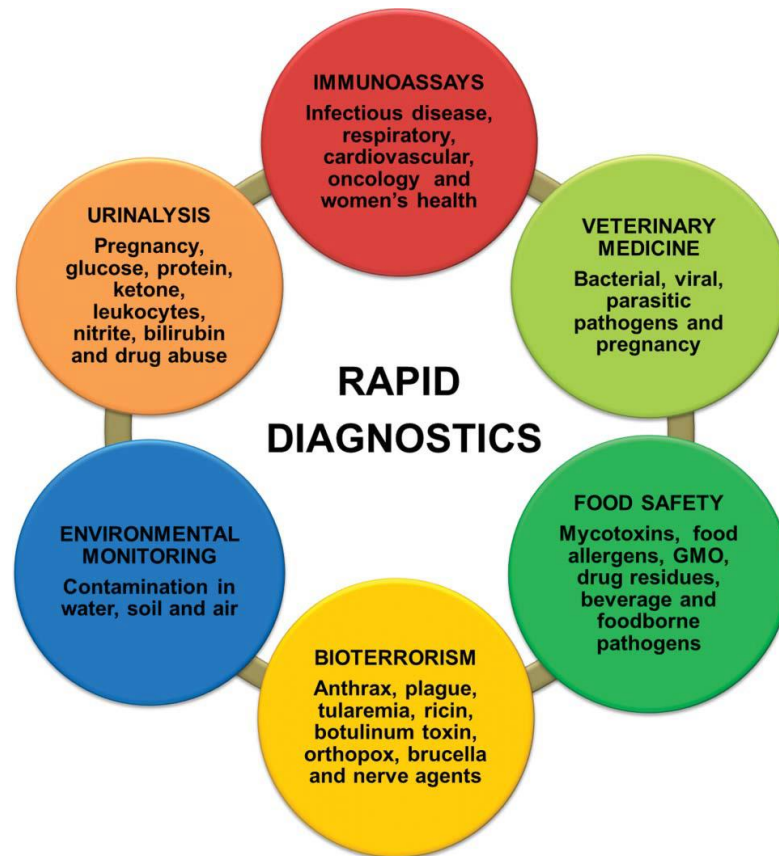


圖 1-1 快速檢測卡匣應用之範圍[3]。快速檢測卡匣應用於包括環境檢測、生物檢測、食品安全、臨床診斷、免疫檢測等領域。

隨著科技的發展，醫學的進步，人類壽命也越來越長壽，因此快速診斷與遠端的照護，都是近年來注重之議題，故低成本、操作便利的卡匣檢測系統得以蓬勃發展，且常被用於 DNA 標記、臨床醫學檢驗、食品安全監測等方面。2006 年 Wang 等人，發表了氣動式螢光 DNA 標記檢測卡匣[4]，利用聚合酶鍊反應(Polymerase chain reaction, PCR)標記 DNA，再透過上轉換磷光體(Up-converting phosphor, UPT)粒子染色，在紅外光雷射掃描下觀察。同年 Wang 團隊，開發豬肉中伏馬鐮孢毒素 B1 之檢測卡匣[5]，藉由 ELISA 作為檢驗機制，在十分鐘內就可以得到檢驗結果。2007 年，Kaur 團隊發展了蛋白質標記檢測卡匣[6]，能在五分鐘之內完成檢測，並且偵測極限達到 1.0 ppb；藉由將膠體金粒子放進 0.01%氯化金與 0.1 mM 羥胺中兩分鐘後，所之膠體金粒子尺寸放大，直徑由 28 nm 變為 309 nm，在標記過程中更加地容易地抓取抗體。

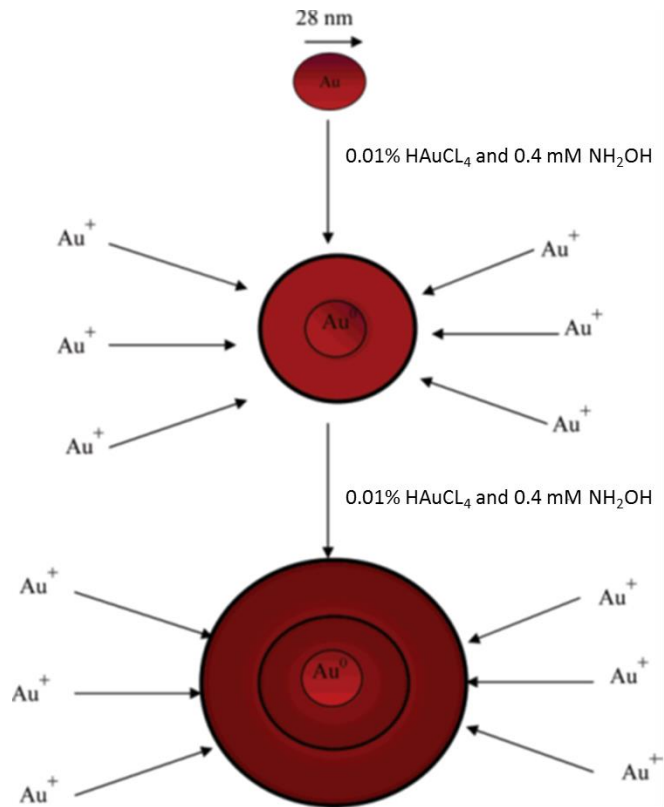


圖 1-2 膠體金膨脹製程示意圖[6]。原尺寸僅有 28 nm 之膠體金粒子，經過浸泡於 0.01%氯化金與 0.1 mM 羥胺中兩分鐘後，膨脹為 309 nm，膨脹之後有助於接合更多的第二級抗體，提升對於樣本的檢測靈敏度。

2009 年，Zhang 等人針對瘦肉精克倫特羅 (Clenbuterol) 與萊克多巴胺 (Ractopamine) 同時進行快速檢測[7]，以檢測豬隻是否有被違法施打上述兩種藥物；整個檢驗流程能在五分鐘內完成，並且偵測極限能夠達到  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ 。與 GC/MS 相較之下，檢測時間明顯縮短並可在現場進行篩檢，又能夠同時檢測克倫特羅與萊克多巴胺是否殘留，是個相當可靠、快速且低成本的快篩系統。同年，Molinelli 團隊開發了檢測穀物中之 T2 黴菌毒素的篩檢系統[8]，將小麥、燕麥與甲醇水 1:1 混合、萃取後，即可進行檢測，兩個檢測分別於四分鐘內，就能都得到了結果，執行現場篩檢作物之任務便宣告達成。



圖 1-3 克倫特羅與萊克多巴胺檢測卡匣實體圖[7]。此為檢測肉品中瘦肉精成分之多重檢測卡匣，能夠一次檢驗肉品中是否殘留克倫特羅和萊克多巴胺。

Tang 等人開發了黃麴毒素 B<sub>2</sub> 檢測卡匣[9]，應用於花生、榛果、杏仁等作物，且在 15 分鐘內就能得到結果。最大的突破在於，這個檢測系統下，不會有偽陰性的情形，表示其結果極為準確。此卡匣使用氧化鐵奈米粒子為核心，外圍包覆著金奈米粒子與單克隆抗體，形成具由磁性之奈米粒子，作為該檢測系統之膠體金，使系統的視覺偵測極限下降至 0.9 ng/mL，因此才有如此高之解析度，其結果也能夠與 HPLC 不相上下，並且此系統也適用其他毒素之檢測。

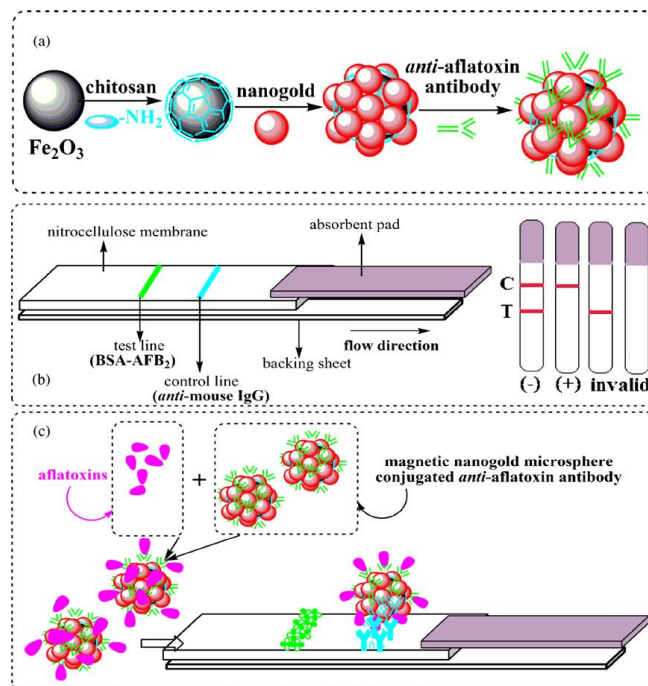


圖 1-4 黃麴毒素 B<sub>2</sub> 檢測卡匣示意圖[9]。圖(a)為檢測抗體製作過程流程圖，圖(b)為卡匣之紙片載體架構與檢測範例，圖(c)為卡匣檢驗之示意流程圖。

2011 年，Blacksell 團隊針對當時市面上六種登革熱檢測卡匣[10]，進行效能評估，尋找最適合斯里蘭卡 259 型之急性登革熱之卡匣。六種抗體組合不同之檢測卡匣，在收集五天之樣本後，針對其靈敏性、檢測範圍、特異性，進行相互比較，找出最適用於當地之系統。最後抗原 IgM/IgG 抗體組合之檢測結果，準確率為 83%，為六組中最好的一組，因此獲得選用。同年，Fu 等人開發了兩個方向流動的檢測卡匣[11]，藉由兩個不同維度之流動，提升系統之檢測性能，也能夠降低檢測極限，有效達到 4 倍之多，證實第二個維度之緩衝溶液，可以提升待測物之濃度與檢測靈敏度。

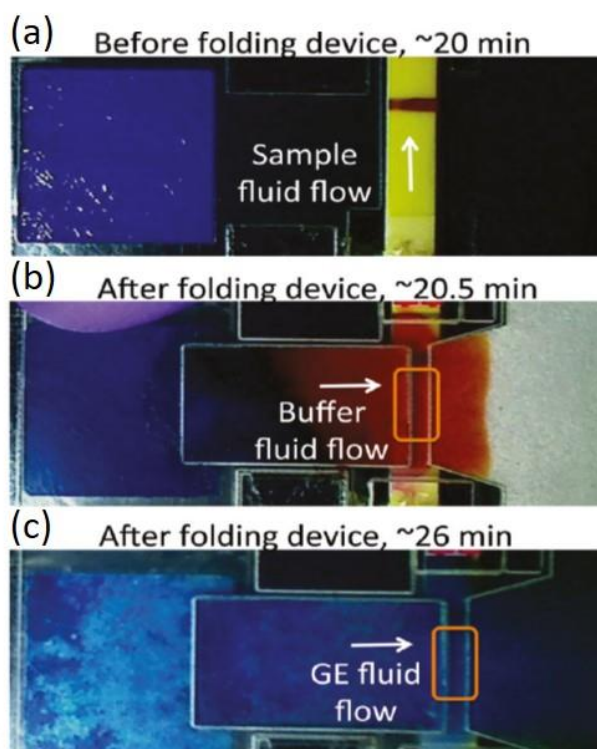


圖 1-5 二維檢測卡匣示意圖[11]。圖(a)樣本流動方向示意圖，圖(b)緩衝溶液流動方向示意圖，圖(c)為檢測效能提升溶液流動示意圖。

2014 年，Cho 團隊將尼龍膜、玻璃纖維膜、玻璃纖維、硝基化纖維膜、硝基化層析薄膜等五種薄膜，互相堆疊製造層析試片，將心肌鈣蛋白一型、肌紅蛋白、肌酸激酶 MB 亞型等三種抗體，固定在硝基化纖維膜上，用以檢測急性心肌梗塞，並

且能夠及時將檢測結果回傳 [12]。同年，Song 團隊開發能夠同時檢測黃麴毒素、玉米斥黴烯酮、脫氧雪腐鏟刀菌烯醇等毒素之檢測裝置，偵測極限皆在 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以下，且量測結果於 LC/MS/MS 間，有著良好的一致性[13]。一般而言，側流式之系統與層析法，相較於黴菌毒素的定量上，側流式系統仍然略勝一籌。

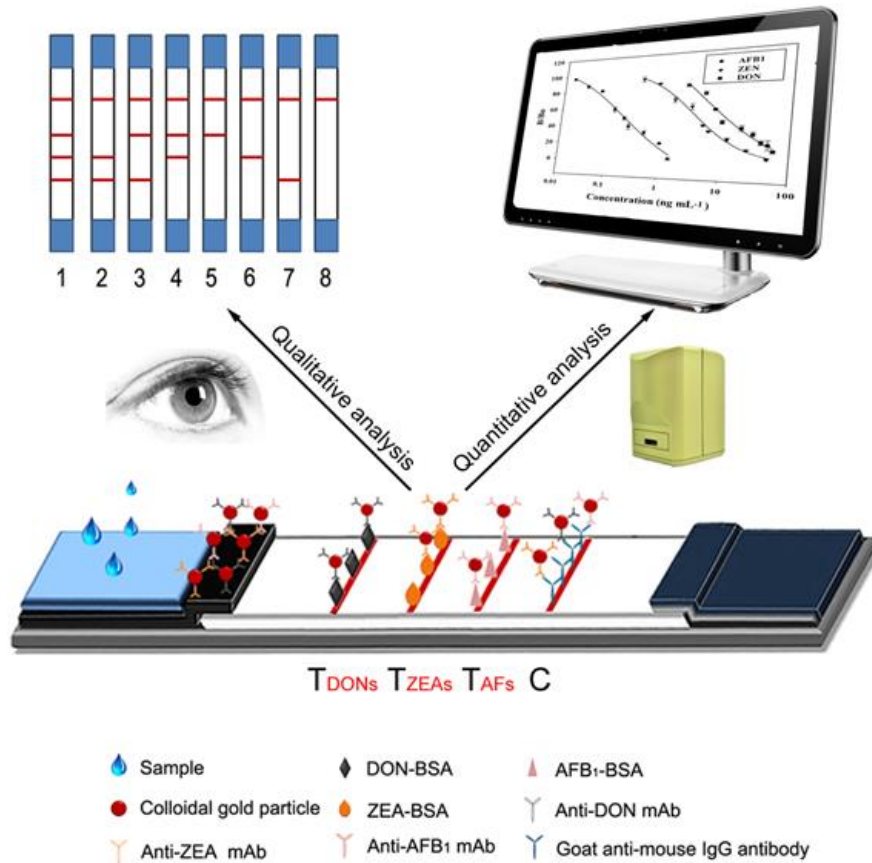


圖 1-6 Song 團隊開發之黴菌毒素檢測裝置[13]。圖中清楚的標示了各酵素與二級抗體之位置，以及三種檢測標的之檢測結果示意圖。

## 1.2.2 酵素結合免疫吸附分析法

酵素結合免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，是利用抗體(Antibody)與抗原(Antigen)之間鍵結的專一性，由於抗體抗原間分子相互作用準確性高，形成具有高親和力且緊密結合之關係，因此可用以針對特定樣品進行檢測，配合酵素連結搭配染色或螢光呈色反應，達到快速篩檢的目的。抗體抗原間的分子

作用力有以下幾種：兩個帶負電之分子間的氫鍵作用力、自主聚集的疏水作用力、帶正電荷的氨基酸和帶負電荷的羧基之間的靜電吸引力與凡德瓦力等，透過多重非共價作用力抵抗結構損壞。此外，由於抗體抗原皆為蛋白質，所以會影響蛋白質之結構的因素，都會影響抗體抗原之結合[14]。

抗原通常被作為能夠引發免疫反應之物質，然而並非所有之抗原都能夠讓抗體產生免疫反應。絕大多數的抗原，都是來自於外在環境，此類抗原被稱作為異種抗原(Heteroantigens)，例如細菌、病毒、灰塵、藥物等；也有部分抗原是由組織或細胞增生轉移，例如癌細胞。抗原的組成大多為蛋白質或是多醣體，因大分子物質較容易誘發免疫反應。抗體則是大分子球狀蛋白質，又被稱為免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)，是免疫系統用來作為辨識、中和外來病原體之大型 Y 形蛋白質，目前僅被發現存在於脊椎動物之體液、血液或是 B 細胞(B 淋巴球)之細胞膜表面。一般來說，抗體單體皆為 Y 字形，但是依照種類不同，結構也有單 Y 型、雙 Y 型與五個 Y 組成之五邊型；而辨別抗原種類之功能則是由重鏈與輕鏈等四條肽鏈(Polypeptides)所負責，識別抗原表位後所產生多種對應之抗體，稱之為多株抗體(Polyclonal antibody)，若生成單一對應抗體，則稱為單株抗體(Monoclonal antibody)，而 ELISA 所篩選、使用的即是單株抗體。

除了抗體抗原之外，ELISA 中檢測欲偵測之抗體或抗原存在與否的膠體金(Colloidal gold)，通常與第二抗體標記在一起，被固定在硝化纖維膜上，當流經的液體中，有欲標記之第一抗體時，兩者便會在該區域結合，並且染色、顯色，顯示有檢測到目標物。膠體金的功用能夠讓試劑與樣本用量減少、不需要額外的顯影或檢測儀器，且保存期限長，能縮短檢測時間、提升檢測速度、大多數大分子物質皆能夠被其成功標記，且性質不會改變。

ELISA 是由 Engvall 和 Perlman 在 1971 年所提出[15]，依照不同待測物條件，除了進行對於特定抗原或是抗體之定性分析外，在定量分析上也能夠達成，因此，根據不同類型之樣品，衍生出了三種檢測方式，主要有間接法、三明治法、競爭法三種，其中間接法最為常用，而三明治法則較適用於大分子。ELISA 在檢測上有著



極高的靈敏度和專一性，可檢測之範圍相當廣泛，從葡萄糖、賀爾蒙到 DNA 都能夠適用，讓使用設備相較之下少了許多，成為現今快速檢測卡匣大量應用之技術；但是 ELISA 仍然有其缺陷存在，例如偽陽性、偽陰性、保存條件及酵素期限等，都會是其限制。

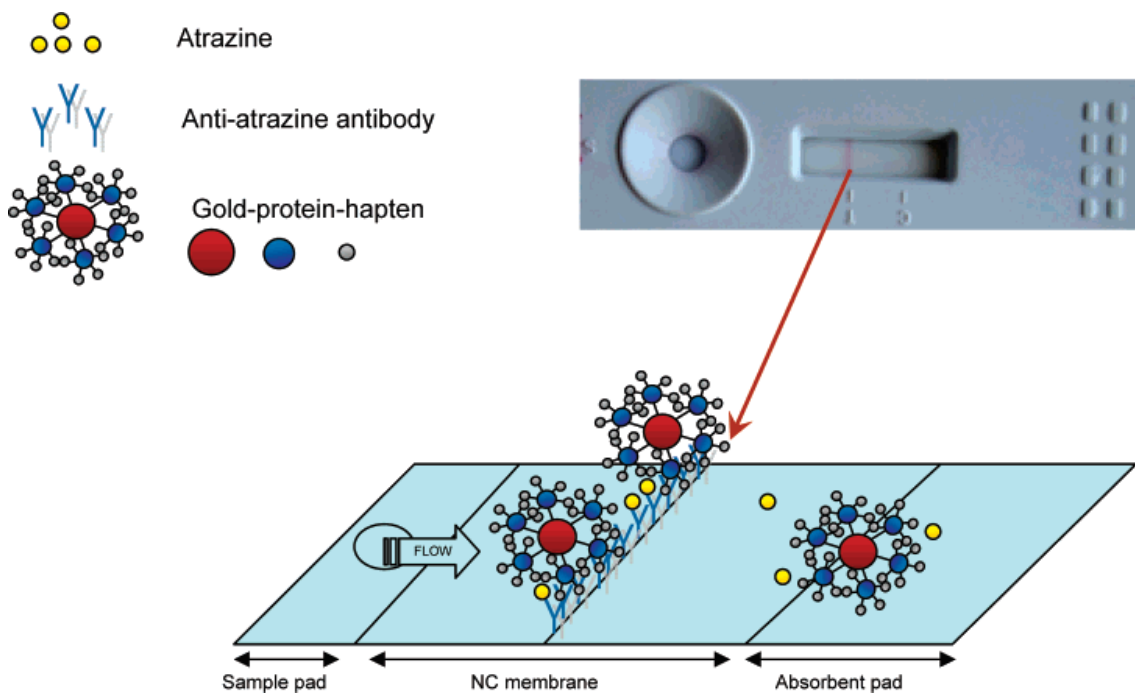


圖 1-7 ELISA 檢測示意圖[6]。圖中標示了檢測線如何透過酵素與抗體、抗原結合後顯色產生。

### 1.2.3 快速檢測卡匣效能評斷

快速檢測卡匣系統早在 1960 年代，已經有了商業化模組的誕生，而在 1970 年代，在原先的架構上，加上了具有良好過濾特性之硝酸纖維膜，用來作為分子檢測用途；1980 年代血清學大量被應用於快速檢測卡匣系統，驗孕檢測便是從此時開始使用[16]。此後，快速檢測卡匣系統便不再專屬於醫學診斷上，而有了許多的其他用途，例如環境水質檢測、食品、藥物、生物等。而卡匣的外型也有了更多樣貌，

由早期需要氣動幫浦進樣[17]，發展至現代攜帶式這般便利；也有卡匣之檢測結果須由其他機台顯示，例如手持裝置等[18]，改變至可攜帶、直接在卡匣上顯示檢驗結果，並且已開發出多種不同類型檢測之卡匣，不僅止於驗孕棒，更是未來高齡化社會、居家照護不可或缺的設備，如圖 1-8 所示。以下針對快速檢測卡匣系統之優缺點，進行 SWOT 分析，如表 1-1 所示，討論了快速檢測卡匣系統之優缺點，以及潛在的威脅和未來的機會。其中提到的低成本、操作簡單、即時診斷的應用，都會是其他系統難以比擬的，有著難以取代的優勢。因此在臨床上或是其他應用上，快速檢測卡匣越來越常見，但是普及性仍是不足，僅限於專門單位或設施，如此便失去其便利性。既然都能夠由卡匣快速定性檢測，操作人員也不該受限，除了特殊的採樣之外，容易取得之樣本應該能夠讓民眾自行檢驗，徹底發揮快速檢驗卡匣的精神，作為第一道的篩檢、分類，進一步的檢查或是治療才到醫療機構，能夠減少醫療資源的浪費，也可以提升醫療品質與效率。

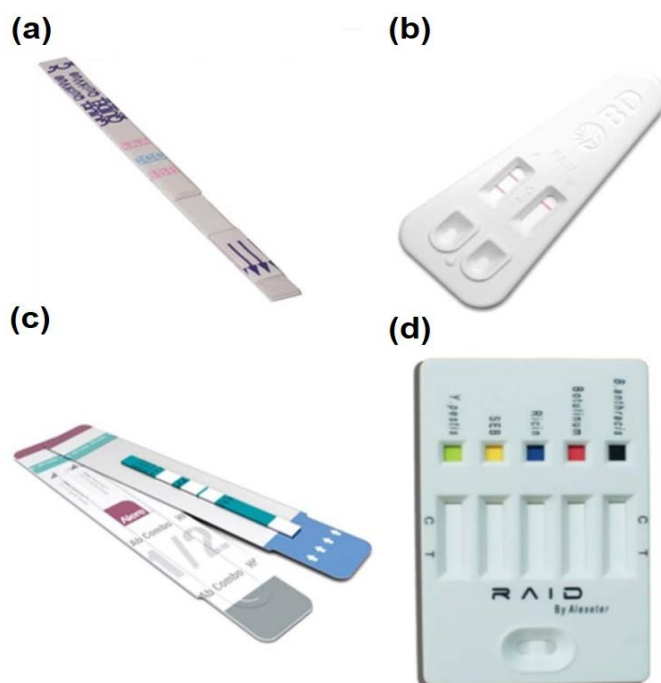

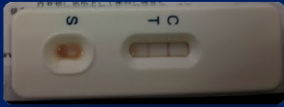


圖 1-8 各式快速檢測卡匣系統圖。圖(a)(b)為流行性感冒 A、B 型快篩，圖(c)為愛滋快速檢測卡匣，圖(d)為複合式檢測卡匣[3]。

表 1-1 快速檢測卡匣系統效能之 SWOT 分析表[19]

Strengths	Weaknesses
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fast and low cost, low sample volume</li> <li>2. Simple test procedure</li> <li>3. Sample pretreatment is often not necessary when the sample is a fluid</li> <li>4. Applications at point of care/need</li> <li>5. Simple test procedure</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Imprecise sample volume reduces precision</li> <li>2. Restriction on total volume in test gives a limit on sensitivity</li> <li>3. Sample pretreatment is obligatory when the sample is not a fluid</li> <li>4. Qualitative or semi-quantitative results</li> </ol>
Opportunities	Threats
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. New applications at point of care/need</li> <li>2. Application on other biometrics: tears, saliva, sweat</li> <li>3. Miniaturisation of the LFIA strips</li> <li>4. Development of high-throughput LFIA assays</li> <li>5. Sweeping of the market at existing and upcoming economies</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. GC-MS or LC-MS in an automated format</li> <li>2. Microparticle immunoassays</li> <li>3. Lab-on-a-chip technology</li> <li>4. Concentration of lateral flow (device) patents at one commercial enterprise (Inverness Medical Innovations)</li> </ol>

表 1-2 現行檢測系統效能與快速檢測卡匣系統比較表

Methods Items	(A)Conventional 	(B)Common cassette 
Cost (NTD) (Each detection)	ESI/MS \$1500↑ GC or LC/MS \$2000↑	\$50-300
Processing time	30-240 min	3-15 min
Accuracy	100%	93-98%
Reuse	Yes	No
Sample pretreatment	Delicate sample	Simple sample
Portable	No	Yes
Cross contamination	Yes	No

### 1.3 大氣壓力質譜法

大氣壓力質譜法(Ambient ionization mass spectrometry)[20]，顧名思義即是在大氣壓力下，直接對樣品脫附、游離，使其形成帶電離子，進到質譜進行偵測的質譜法。儘管質量分析器和偵測器，仍需要在高真空環境下運作，但是游離機制能在大氣壓下操作，已經是一大突破。相較於傳統游離源，除了減少樣品前處理時間外，更多了便利性、快捷性以及樣品與液態介面結合更良好等優勢，使大氣壓力質譜法能夠被廣泛地應用，如醫學檢測、農藥及食品添加劑檢驗、環境監控等，都是其工作範圍，且與我們生活息息相關。

現今常用的大氣壓力質譜法，可以簡單的分為電噴灑游離法(Electrospray ionization, ESI)[21, 22]、大氣壓力化學游離法(Atmospheric pressure chemical ionization, APCI)[23, 24]兩大類。其中，技術基礎還是來自傳統真空下之游離源，例如電子束游離法(Electron ionization, EI)[25, 26]與化學游離法(Chemical ionization, CI)[27]。電子束游離法是利用高能量之電子束(70 eV)撞擊待測物表面，使其產生之碎片離子帶電，進而能夠被質譜儀偵測；使用此游離法較難得到分子離子( $M^+$ )之訊號峰。化學游離法則是使用反應氣體，例如甲烷或是氬等氣體，先利用高能量電子束轟擊，讓通入之反應氣體先被游離，形成帶電之氣體離子後，再與待測物產生分子-離子反應(Ion-molecule reaction, IMR)，使得待測物成功被游離，此法較容易得到分子離子訊號峰，因此又被稱為是軟性游離法(Soft ionization)。上述兩種游離法都需要在真空下操作，樣品同時也需要汽化，才能夠被游離；而偵測的上限約為分子量 500，如此一來讓能夠游離的樣品的種類及範圍，便受到了很大的限制。為此，大氣壓力質譜法應運而生，一改分子量上限及真空環境才能操作之困境，大大提升了質譜法的效能。

目前，以電噴灑游離法與大氣壓力化學游離法為發展基礎之游離法眾多，如圖 1-9 所示。接下來將會概略介紹這些游離法。首先，以大氣壓力化學游離法為基礎的有：脫附大氣壓力化學游離法(Desorption atmospheric pressure chemical ionization,

DAPCI)[28]、大氣壓力固態分析探針游離法(Atmospheric solids analysis probe, ASAP)[29]、即時直接分析法(Direct analysis in real time, DART)[30, 31]。

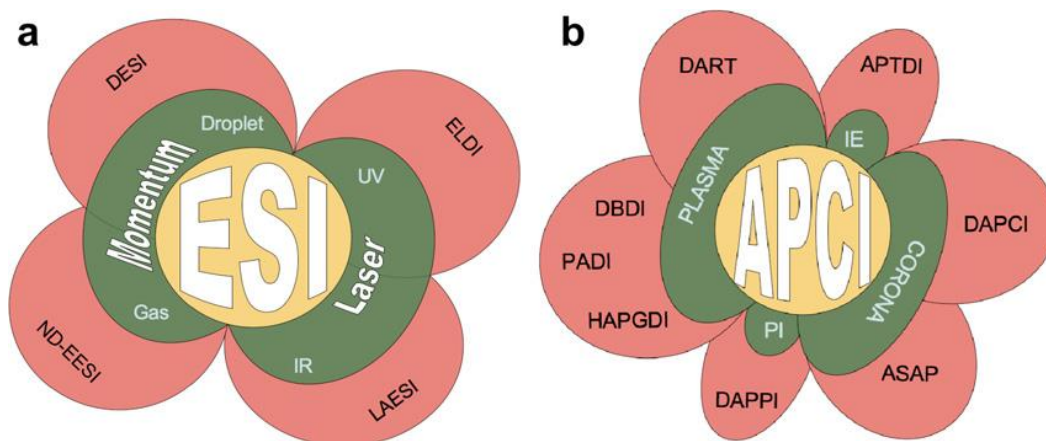


圖 1-9 以電噴灑游離法與大氣壓力化學游離法，為基礎發展之游離法[32]。圖(a)為 ESI 基底開發之游離法，圖(b)為 APCI 基底開發之游離法。

以電噴灑游離法為基礎發展的有萃取式電噴灑游離法(Extractive electrospray ionization, EESI)[33]、脫附電噴灑游離法(Desorption electrospray ionization, DESI)[34]，以及基質輔助雷射脫附游離法(Matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)[35-37]。其中電噴灑游離法以及基質輔助雷射脫附游離法，由於能夠游離大分子，例如蛋白質等，又被稱作為現代游離法，代表這兩者對於科學研究上，有著無法取代的重要性。

表 1-3 ESI 與 APCI 比較表[38]

游離源	電噴灑游離法(ESI)	大氣壓力化學游離法(APCI)
適用	高極性物質、大分子物質、蛋白質、胜肽類、低聚合甘酸等生物分子；胺類、銨鹽等；含多原子化合物、酶類等。	低極性或中等極性之小分子物質，例如脂肪酸、磷苯二甲酸等；長直鏈烷烴類、多環芳香烴等。
限制	非極性或低極性物質，例如苯。常用游離法有 ESI、PSI、ELDI。	非揮發性物質、受熱不穩定之物質等。常用游離法有 ASAP、DAPCI、DART。

## 1.4 電噴灑游離法

電噴灑游離法(ESI)是現代最被廣泛應用於有機質譜分析的游離技術。電噴灑游離法與其他游離法最大的差異在於，能讓待測物被游離後形成帶多價電荷之帶電離子，使質荷比得以降低，大幅地提升了質譜儀的量測質量範圍。電噴灑一開始並不是應用在科學領域，而是使用在工業用途，例如內燃機的霧化點火系統等；直到1968年，Dole 等人正式的將電噴灑帶到科學上[39]，成功地利用了電噴灑游離，將分子量 14 kDa 的溶菌酶(Lysozyme)游離，但是，當時並沒有與質譜儀串接，所以沒有辦法得到質譜訊號圖譜，僅能使用法拉第杯(Faraday cup)，觀察到電流大小的改變，因此沒有直接證據能夠證實，透過電噴灑游離法可以得到帶有多價電荷之離子。到了1984年，J. Fenn 與 Yamashita 首度把電噴灑游離法與四極柱質譜儀串接後，成功在圖譜上觀察到了帶多價電荷之離子訊號，證明了電噴灑游離法，能夠讓待測物產生多價電荷離子[40]；得到這個成果後，讓研究團隊更有信心地嘗試了蛋白質，結果顯示，圖譜上出現了帶 45 個正電的蛋白質離子，表示分子量高達 40 kDa 的蛋白質，成功的經由電噴灑游離法游離。此後，以電噴灑游離為基礎的游離技術，便開始快速發展，也讓生物大分子科學，不再是個難題。電噴灑游離游離源及其相關機制，將在第二章中會有更詳盡的敘述。

### 1.4.1 脫附電噴灑游離法

脫附電噴灑游離法是由 R. Cooks 團隊，於2004年所開發提出之游離源[34, 41]。其主要工作原理是利用高速的氮氣流，帶動來自毛細管噴灑之帶電液滴，使這些液滴藉由氮氣流，衝擊待測物表面，讓待測物脫附、游離，形成帶電離子得以被質譜偵測，原理與二次離子游離法有些類似。主要差異在於，二次離子游離法是以高速離子束轟擊樣品表面，而脫附電噴灑游離法則是使用氮氣流帶動帶電液滴。

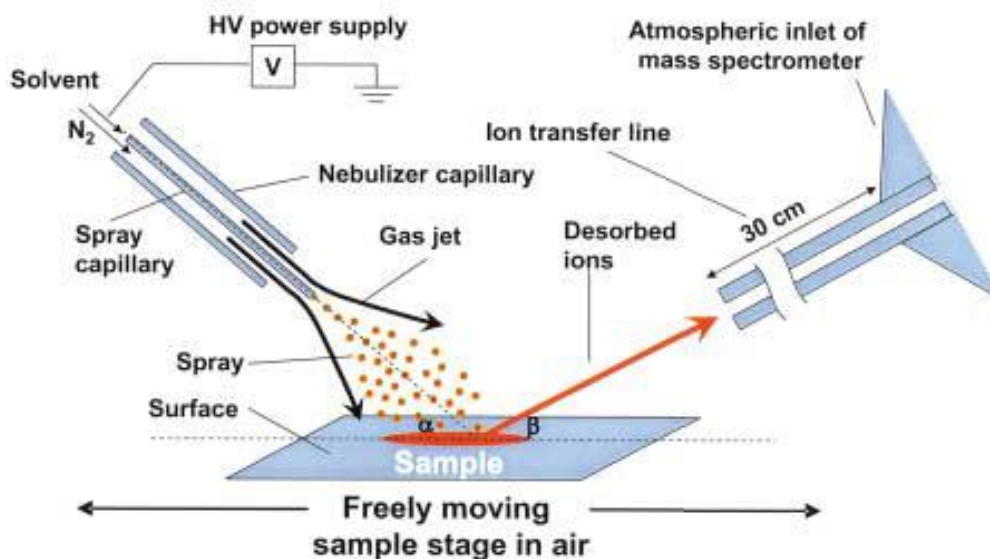


圖 1-10 脫附電噴灑游離法架構圖[34]

脫附電噴灑游離法的游離機制有兩種，其一，當帶電液滴由氮氣流帶動，撞擊待測物時，會產生電子或質子轉移到待測物表面的現象，使待測物表面有電荷堆積，直到電荷密度足以突破庫倫斥力，待測物表面即可有離子脫附、游離。其二就是當待測物表面受到帶電液滴衝擊，使得待測物之表面物質融入液滴中，或是吸附於液滴的表面，在帶電液滴持續重擊之下，讓含有待測物成分之帶電液滴，得以有足夠能量離開待測物表面，完成脫附、游離的程序。由於上述之游離機制，讓脫附電噴灑游離法的偵測範圍擴大，從有機小分子到大分子的蛋白質、胜肽，都能夠在此法得到游離，此外，也能夠游離較弱極性之分子，例如膽固醇。

#### 1.4.2 直接電噴灑探針

直接電噴灑游離探針(Direct electrospray probe, DEP)[42, 43]，是由本校化學系謝建台老師於1999年提出發表，架構如圖 1-11 所示。將直徑 1.0 mM 之銅線繞成環狀，剩餘銅線則相互交錯捲曲，在環形結構前形成相連圓環長直狀，後端接上一壓克力盒，連接至高壓電源供應器。只要將液態樣品放置環上，經由後端高壓裝置提供電場，樣品液滴就會受到影響而往前堆積，最後液滴電荷斥力大於液體表面張力時，便會往前飛出，產生電噴灑現象。

此法不僅不需要用到毛細管或連結管道，更不需要推送樣品的幫浦，大大地簡化了整體的實驗架構，卻仍然保有游離能力。直接電噴灑游離探針在游離範圍上，從有機小分子到大分子蛋白質，都可以成功地游離，也因為是一個開放的介面，在替換樣品上相當便利且快速，且不容易形成殘留，減少量測受到干擾的機會。

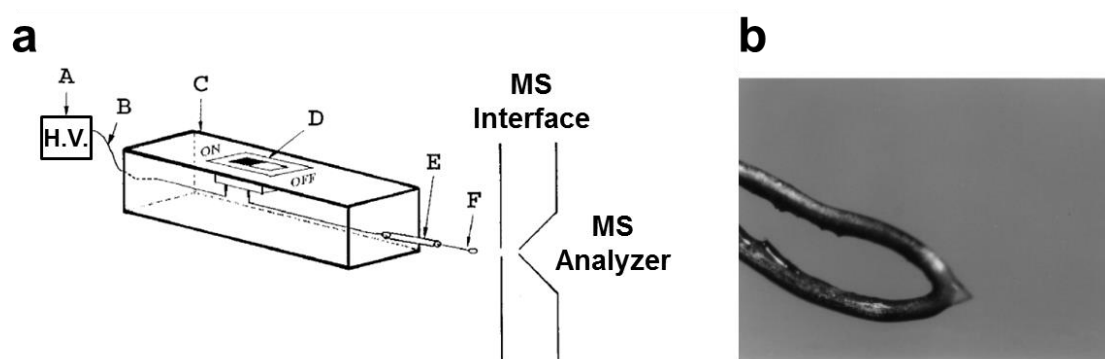


圖 1-11 直接電噴灑探針結構示意圖。(a)圖為直接電噴灑探針之架構示意圖，(b)圖為探針實際電噴灑圖[41]。

### 1.4.3 紙噴灑游離法

紙噴灑游離法(Paper spray ionization, PSI)[44-47]，由 Cooks 團隊在 2010 年發表提出，主要架構如圖 1-15 所示，其游離方式與直接探針電噴灑法類似，只是將金屬銅線圈探針換成三角形的濾紙片。首先須將樣品配置成溶液，滴取微量於紙片中央，等待乾燥後再加上電噴灑溶液，常用的是甲醇和水 1:1 之溶液，再由紙片之後端施加高壓電，讓濾紙上的待測物分子帶電。隨著電壓持續施加，聚集在紙片尖端的帶電液滴間，排斥力越來越大，直到最後突破了液體的表面張力，產生了電噴灑現象。這個游離法所強調的即是低成本、快速檢測，樣品前處理上也較先前之游離法簡單，設備僅需要高壓電源供應，大幅地減少了檢測器材之體積；操作步驟也相當簡便，能夠有效降低實驗過程中之污染，促進了許多以濾紙基材之快速檢測游離法的開發。



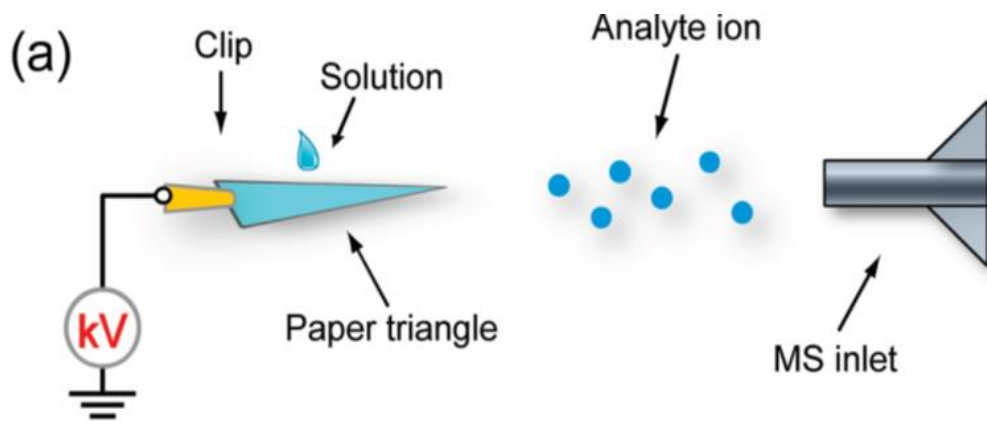


圖 1-12 紙噴灑游離法架構示意圖[48]。PSI 使用紙片取代 ESI 中之毛細管，也捨棄了進樣幫浦，僅需要透過毛細作用力，與後端高電壓產生之庫倫靜電力，即可進行電噴灑游離。

Cooks 已在先前的研究中，將紙噴灑游離法應用在血液中藥物監控、食品添加物，以及生物組織切片檢測等方面[48, 49]。同年 Zhang 等人，為了增加濾紙載體對於樣品的吸附能力，在紙片上塗佈一層矽膠(Silica gel)鍍膜，讓血液樣本能夠藉由矽膠提升附著率，進一步使檢測靈敏度上升[50]；隔年 Deng 等人，使用紙噴灑游離架構與化學指紋法結合，針對市售的花草茶進行成分分析[51]；2013 年，Shen 等人發表了具有自動給樣以及單軸移動平台的系統，希望能用於藥物監控與食品安全的檢測上[52]。這個系統的檢測速度，為一個樣品七秒鐘，一次能夠檢測 12 個不同的樣品；在其設計的紙片陣列中，供電方式為利用銅膠帶纏繞於平台的正面與背面，藉由高壓電源接觸平台上之銅膠帶，將電供給至與紙片接觸端，再由毛細管滴定噴灑溶劑，便能進行紙噴灑游離。這個系統除了快速檢測之外，還能夠檢測不同種類的樣品，大幅提升了檢測之效率，也是本系統開發之靈感來源之一。

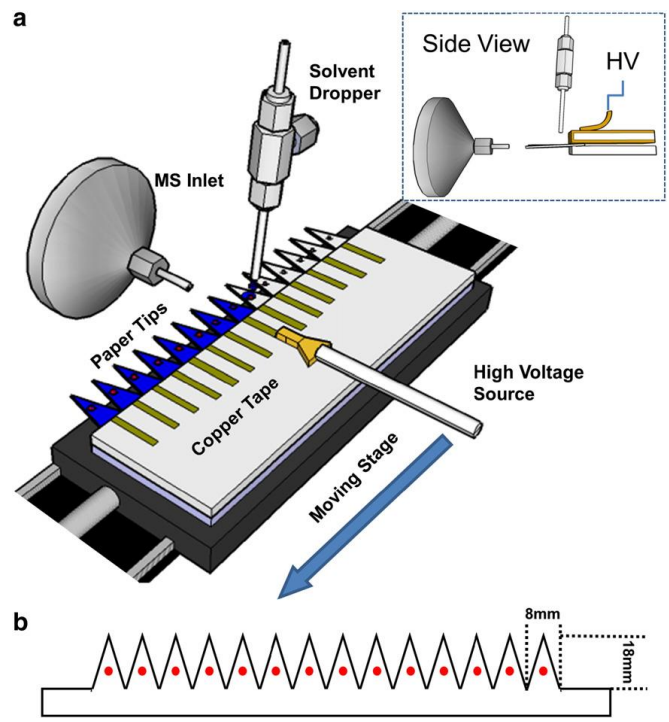


圖 1-13 Shen 團隊開發之移動噴灑平台架構示意圖[52]。圖(a)為系統電噴灑游離與進樣移動平台架構，圖(b)為紙片陣列之尺寸示意圖。

較為特別的是，2011 年 Chan 團隊，直接使用人蔘組織進行電噴灑游離[53]，以待測物組織取代紙片基材，直接進行檢測，無須經過繁雜的樣品前處理，達到快速檢測的目的。另外，Cooks 團隊也在 2012 年提出使用植物葉片直接電噴灑[54]，利用富含水分之植物之葉片，例如青蔥、菠菜、番茄等植物葉片，取代紙片作為電噴灑游離之載具，直接利用樣品自身作為游離源，無須任何之前處理，只要剪裁適當尺寸，再加上噴灑溶劑，即可以進行紙噴灑游離處理，此極富創意的構想，也是本研究發想的起源。

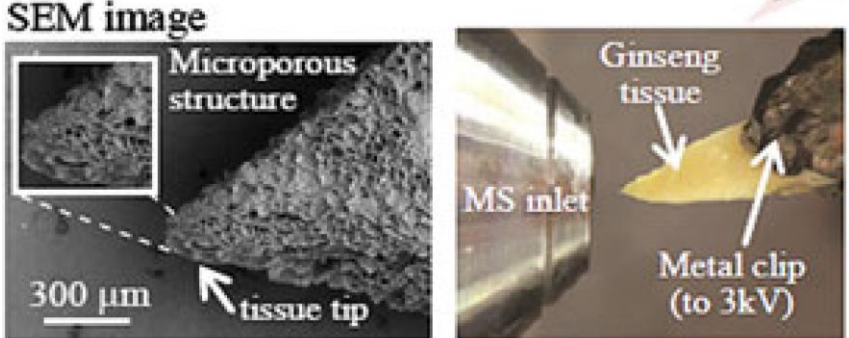


圖 1-14 人蔘組織電噴灑之架構圖與 SEM 圖[53]

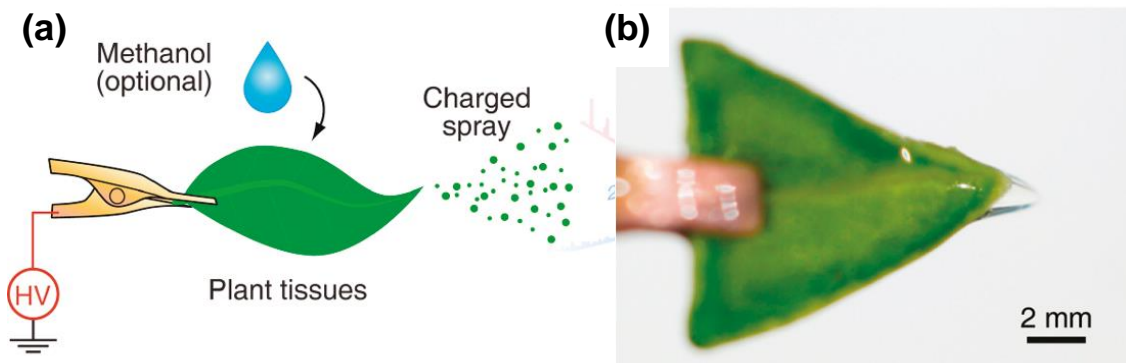


圖 1-15 Cooks 團隊在 2012 年所提出使用植物葉片直接電噴灑[58]。圖(a)為葉片噴灑之架構圖，圖(b)為實際噴灑時之照片。

## 1.5 研究動機與目的

開發快速檢測裝置是目前臨床診斷、食品安全的發展趨勢，目的在於改善現行之實驗室檢驗方式，使得檢測能夠達到更快速、普及等檢測需求。而目前廣泛使用的 LC/MS 或 GC/MS，皆無法滿足市場快速且低成本的要求，設備上也存有汙染樣本之疑慮，且操作上需要專業人員。因此許多學者便開始使用便宜又容易取得的紙材料，開發可攜帶式、低成本且操作容易的檢測裝置，也就是快速檢測卡匣，目前已經被廣泛使用於不同領域，例如血糖、蛋白質標記、食品安全、農藥殘留檢測、驗孕等。但是現行之卡匣也有其限制，如酵素生命週期、檢測的準確性與種類等。其中檢測仍存在偽陽性、偽陰性的可能性，對於診斷上會形成誤判，進而造成檢驗結果錯誤而不自知。

因此本研究提出之快速檢測卡匣，即為結合檢測卡匣之便利性、低成本和紙噴灑游離，結合質譜儀檢測之高靈敏度檢測裝置。這個卡匣是個容易操作的系統，其步驟僅需搗碎萃取、取樣、進樣、層析，這些步驟皆能夠透過簡單的文字或圖像說明後操作，完成步驟後便交付專業實驗室，進行電噴灑游離檢測，便可得知檢測結果。所以本研究將開發上述之流程，並且驗證其可行性，應用於食品安全檢測，讓檢測可以更主動、自主，不需受限於專業人員。此快速檢測卡匣將會是一個低成本、高效能、多檢測標的、自主式的新穎檢測工具，使食品安全檢測有新的突破。

## 1.6 論文架構

本論文於第一章介紹常用之快速檢測卡匣，第二章節針對本研究所應用之檢測原理做詳盡的介紹；第三章會詳盡地呈現本研究之架構，第四章為結果與討論，第五章則會對上述兩個章節做總結。詳細架構如圖 1-16 所示。



圖 1-16 論文架構圖

## 第二章 實驗原理

紙層析、紙噴灑游離、質譜偵測，是本研究最主要的三個檢測技術，質譜檢測技術主要是透過量測待測物質量，以及游離後所帶之電荷數目的比值，依照質荷比的大小不同，造成其通過分析器的時間或是路徑之快慢、大小，作為偵測器的偵測標準，可做定性分析，檢測待測物成分，抑或是定量分析，得到未知待測物之質量及特性。

而紙層析和紙噴灑游離，即是質譜量測前的處理，透過好的層析分離效果，能夠大幅提升，紙噴灑游離之能力，也能提高質譜偵測的準確性和靈敏性。因此，本節中將分別介紹，對於本研究極其重要的檢測技術。

### 2.1 毛細作用力

毛細現象(Capillary action)是生活中很常見使用的物理現象，也經常成為許多發明的靈感來源，舉凡與水或液體有接觸的事物，都會有它的存在。毛細現象是指液體在管柱狀物體、纖維、多孔性材質中，因為內聚力和附著力的差異，而克服地心引力向上爬升的現象，常見者如植物根莖水分傳遞、蠟燭燃燒等，都是液體對於固體之附著力大於液體內部之內聚力，就會形成液體在管柱中上升之現象，此即為毛細現象。

最早利用毛細現象作為理論發展的是波以耳(Robert Boyle)，於1662年所提出波以耳定律(Boyle's law)。根據其實驗結果表示，在含有定量氣體之容器裡，於恆溫條件下，氣體的壓力會與體積成反比；此一現象也可以理解為人體在呼吸時，也是透過氣體的體積與壓力間的相互作用來完成動作。有了波以耳的研究成果，才有了後續的連通管、虹吸等原理的發現。

毛細現象最常舉的例子就是在水中插入玻璃管柱，如圖 2-1 所示，液面和管柱的接觸面是一個向下凹陷的圓弧狀，這個現象就是水對於管壁的附著力大於其內聚力，因此接近管壁處之液面高度會高過中央，而液體之表面張力想讓液面保持平

衡，所以會產生沿著液面切線方向之力分量，使得管柱內的液體被往上拉升，直到向上的表面張力與液體重量達到平衡時，拉升的動作將會停止。此拉升高度與管柱之直徑成反比，故管柱內之液體將會高過於管柱外；反之，若是內聚力大於附著力之液體，例如汞，則會和上述之情形相反，管柱內之液面為中央較凸起，而管柱內之液體高度則是低於管柱外。

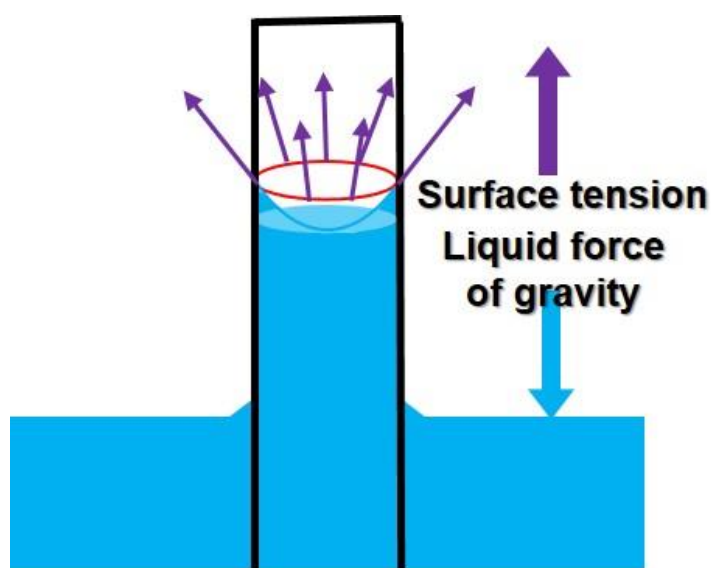


圖 2-1 毛細現象於玻璃管柱在水中示意圖。當液體之向上表面張力，與液體本身之重力達到平衡時，液面將不會再上升。

## 2.2 紙層析

紙層析(Paper chromatography)是分析化學中色層分析(Chromatography)的一種，層析方法是利用固定相(Stationary phase)的紙片，以及流動相(Mobile phase)的展開液，針對混合物中之成分，在展開液裡的遷移速率不同，藉此將混合物內含之成分，層析分離在紙片上。此法特點在於透過混合物中之成分，對於固定相與流動相的親和力不同，造成當展開液受到毛細作用(Capillary action)在紙上遷移時，混合物中的成分因此被分離，如圖 2-2 所示。本卡匣實際層析分離、濃縮之

步驟與示意圖如圖 2-3 所示。首先使用 pipette 滴定 2.0  $\mu\text{L}$  之樣本於卡匣進樣口，隨後讓其自然乾燥後，便能夠進行第一次的層析分離，同樣使用 pipette 將展開液 40.0  $\mu\text{L}$  滴定於層析液口，由紙片尖端接觸儲液槽，藉由毛細作用力將展開液帶到紙片上，沿著紙纖維往上流動，進而達到第一維層析分離的效果。第一維層析完成後，等待紙片上剩餘之展開液揮發後，便能夠進行第二維的濃縮訊號，由紙片側邊以充滿展開液之拭鏡紙接觸紙片，將以分離之顏色區帶往紙片尖端推動，而達到濃縮樣本訊號之效果。如此方法不僅肉眼便能夠觀察，且相當的直接有效，完全不需要任何幫浦推動，樣本前處理上也不需繁雜手續，只需要溶入溶劑中萃取即可，大幅縮減了實驗步驟與時間，增加了檢驗之效率。

最早提出此概念是在 1906 年[55,56]，使用植物萃取液溶於石油醚，再將其倒入含有碳酸鈣顆粒之管柱中，植物中所含有之天然色素如葉綠素、胡蘿蔔素等，將碳酸鈣當作吸附劑，石油醚作為沖提液，使得葉綠素和胡蘿蔔素在管柱中被分離，形成不同顏色之色帶，這就是最早期的色層分析法。而紙層析分離最早被應用於顏料，針對天然植物中特有之色素成分，進行層析分離後，即可得到染色效果[57,58]。然而，並非無色的混合物就不適用紙層析，只要混合物中之成分，對於展開液之親和力或是屬性有相同即能使用。除此之外，在 1953 年有了二維層析(Two dimensional chromatography)的概念[59]，第一維的層析與先前的方式一致，在第一維層析完成後，讓其自然陰乾後把濾紙旋轉 90°，重新進行一次紙層析，用意在於提升混合物中之成分濃度，Levy 將此法實現於胺基酸之層析分離。

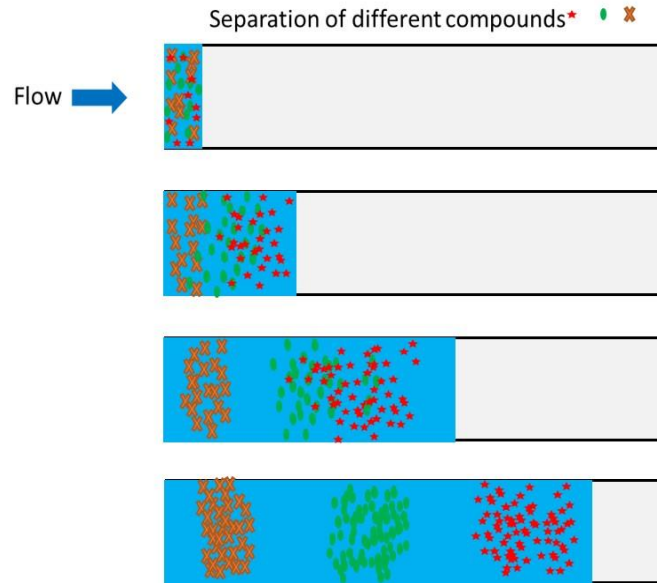


圖 2-2 紙層析分離混合物中成分之示意圖。經由展開液的帶動，混合物中三種成分，隨著親和力不同而被分離。

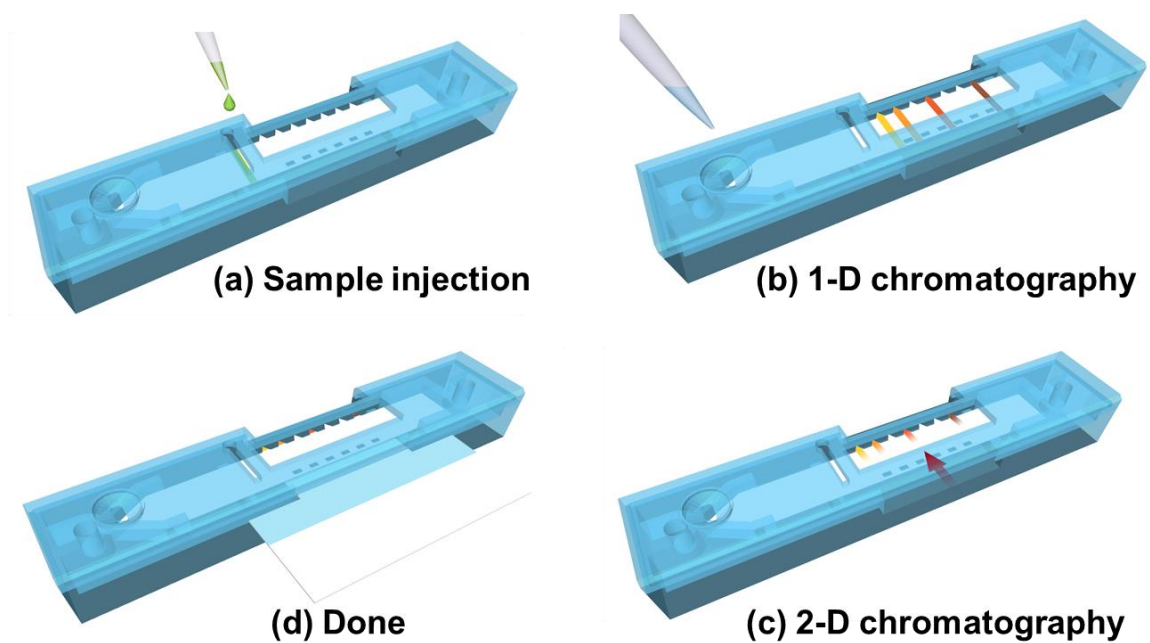


圖 2-3 二維紙層析分離流程示意圖。圖(a)為進樣示意圖，圖(b)為展開液進樣與第一維層析示意圖，圖(c)為第二維層析開始，各樣本塊往尖端移動之示意圖，圖(d)為第二維層析濃縮樣本塊完成圖。



一般紙層析過程中，除非本身即具有顏色之樣品，否則樣品通常會加上染色劑，例如羅丹明 B(Rhodamine B)。因此層析分離結果的好壞，可以輕易地由目視觀察到，不需其他的外加設備判斷，不過詳細的分離結果，還是需要藉由影像處理，才能夠將其整理量化。

一般影響待測物在濾紙上之遷移速率，有以下的因素：

(一) 分子量(Molecular weight)

混合物中成分若有分子量較小者，其遷移速率就會比較快；反之，分子量較大者就移動得比較慢。

(二) 電荷(Charge)

混合物中之成分若在層析過程中，形成帶電離子狀態，就會受到展開液之酸鹼度影響遷移速率和方向。

(三) 極性(Polarity)

混合物本身之極性，是造成內含成分在固定相之親和力或流動相溶解度差異的主要原因，表示本身之極性，在層析中扮演著重要的角色，決定著固定相與流動相之組成、成分。

(四) 溶劑(Solvent)

使用溶劑的種類是由混合物的極性所決定，若混合物為極性分子，則溶劑將使用高極性之溶劑，例如酒精、甲醇等；反之若為中低極性，則使用非極性之溶劑，例如石油醚、丙酮、苯等。

(五) 濾紙(Filter paper)

濾紙之材質組成，例如纖維、孔徑、厚度等，都會影響展開液的流動，以及混合物被分離時的擴散現象。因此，這是僅次於混合物之極性的重要因素。

現今使用理論板數(Theoretical plate number, N)表示分離效能，其計算公式如下：

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

N：理論板數

t：分析物遷移時間(Migration time of an analyte)

$w_{1/2}$ ：分析物訊號之半高寬(Full width at half maximum)

而影響分離效率的因素很多，主要分為五個因素，如以下所示：

#### (一) 樣本注入體積

若液態樣本注入體積太大時，造成樣本區帶過寬，混合物中的成分在短時間內難以分開，導致分析物訊號重疊，使得分離效能下降。

#### (二) 焦耳熱效應

當充滿電解質緩衝溶液的毛細管被施加電場後，受到電泳電流影響，進而產生焦耳熱效應。而毛細管中溫度上升後，會使溶液之擴散速率增加，讓樣本訊號寬度增加，隨之降低分離效能。

#### (三) 電場強度

電泳分離的效果大多取決於電場的作用，當電場強度越高，相對應的分離效果也越好，但是過高的電場會造成焦耳熱效應，反而降低分離效能。

#### (四) 分離管道長度或寬度

由公式中可以得知，分離的時間越長所得到之分離效果也越好，因此分離管道越是細長，將能夠增加樣本中之成分分離之時間，提升分離效能。

#### (五) 緩衝溶液酸鹼值

緩衝溶液之酸鹼值與其電解質解離程度有關，也會影響容易電滲透流之流速，而流速增加，樣本分析時間則縮短，反之時間則增加，進而能夠調整分離效能。

現今普遍常用的分離層析技術有氣相層析法(Gas chromatography, GC)、高效能液相層析(High performance liquid chromatography, HPLC)、薄層層析法(Thin layer chromatography, TLC)等。這些方法固然有著比紙層析法高的分離能力，理論板數約為上萬至數十萬不等，但是過程繁雜，所耗費的時間、樣品前處理、搭配之器材或設備較為昂貴等，皆是上述這些層析法的缺點。因此，本研究所使用之快速檢測卡匣，搭載著兩個維度的紙層析分離、濃縮，提高系統的偵測靈敏度，也能夠彌補

紙層析法先天上的缺陷，達到能在濾紙上先分離混合物成分，再將其訊號濃縮以利於後端質譜偵測，同時也實現在本研究提出之快速檢測卡匣上，檢測複雜天然物或農藥之理想。

## 2.3 電噴灑游離法

紙噴灑游離法的機制，是建構在電噴灑游離法的基礎上，最大的差異在於樣品的載台，以及進樣的方式不同，前者是將濾紙片裁切為三角形，而進樣方式則是直接滴定於濾紙，與使用毛細管及進樣幫浦的電噴灑，有明顯的差別，然而在游離樣品的機制上，兩者是一致的，如圖 2-4 所示。主要的游離步驟有三個部分，(一)霧化、(二)去溶劑、(三)游離[60]。

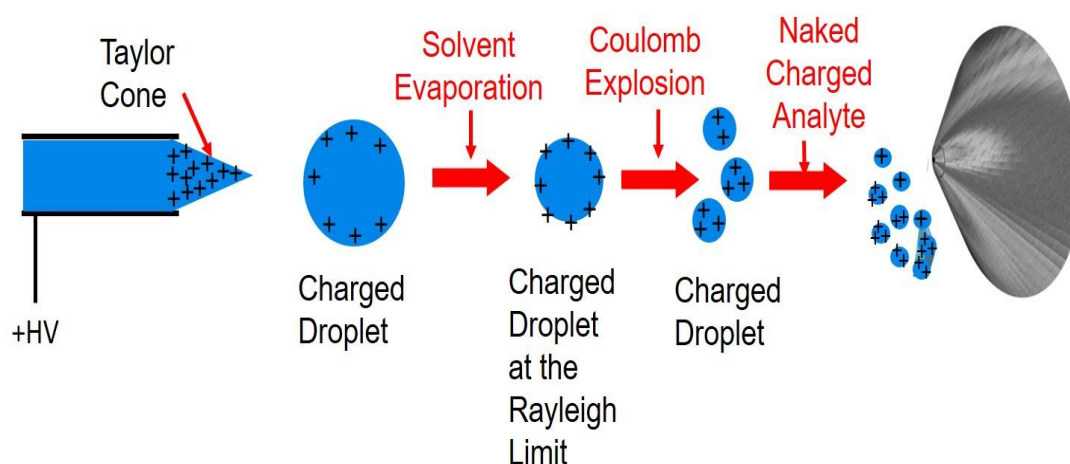


圖 2-4 電噴灑游離法之游離過程示意圖。分為帶電液滴的形成、帶電液滴的揮發與爆炸、氣態帶電離子的產生[60]。

### (一) 霧化(Nebulization)：

藉由電噴灑溶液的帶動，以及後端高壓電持續推動，使得濾紙上的樣品離子往尖端靠近。由於後端施加正高電壓，讓帶著正電荷的離子，因為排斥力的作用，往紙片尖端移動、累積。一開始受到液體表面張力影響，會在前端形成圓錐狀，

此即為泰勒錐(Taylor cone)[61]。帶正電荷離子持續堆積，液滴間電荷之庫倫排斥力，與液體的表面張力達到臨界點，當庫倫斥力大於表面張力時，液滴將會從泰勒錐前端開始爆裂，向外飛濺出帶電液滴，形成電噴灑噴霧(ESI plume)，這個過程即是霧化。

### (二) 去溶劑(Desolation)：

帶電液滴在飛行過程中，溶劑會不斷地揮發，使得帶電液滴之體積逐漸縮小，讓液滴中的電荷密度上升，而當庫倫斥力與表面張力到達雷利極限(Rayleigh limit)[62]時，帶電液滴將會再次爆裂，形成更多更小的帶電液滴，此過程將在液滴飛行過程中反覆發生，使液滴體積在短時間內縮小。

### (三) 游離(Ionization)：

電噴灑過程中，要讓帶電液滴形成單價或多價的氣相離子，而關於此游離機制，目前學界存在兩種解釋。其一為 1968 年 Dole 等人所提出之電荷殘留說(Charge residue theory, CRT) [20]，另一個則是 1976 年，由 Thompson 和 Iribarne 所提出之離子揮發理論(Ion evaporation theory, IET)[63]。

電荷殘留理論，由 Dole 團隊首先提出，Rollgen 再行延伸，此理論主要提到，不同分子所具有的表面活性也不同，因此，當大的帶電液滴爆裂出許多小帶電液滴時，表面活性較大之分子容易跑進小帶電液滴中，產生許多單一離子的帶電液滴；當溶劑持續地揮發，帶電液滴中的電荷，便會殘留於待測物之離子，形成帶有電荷之氣相離子，便完成游離步驟，此理論較適用於大分子分析。

而離子揮發理論提到，並非全部的多價電荷之氣相離子都是在溶劑完全揮發後形成的，而是帶電液滴的飛行過程中，由於持續的爆裂與溶劑揮發，使得帶電液滴之表面電場不穩定，使待測物離子在液滴排出過程中，一起和電荷被帶走，因此待測物之氣相離子能夠帶電；而在液滴飛行過程中，反覆地重複這樣的過程，最終讓待測物氣相離子帶有電荷[64]，此理論較適用於小分子分析。

檢視電噴灑游離之離子訊號強度，除了於質譜圖譜中觀察以外，還能夠透過該離子訊號之訊雜比(Signal to noise ratio, SNR)大小來檢視。訊雜比計算方式為，先

選取待測物離子訊號後，由圖譜上提供之離子強度作為訊號之強度，再以待測誤特徵訊號前後之雜訊之平均強度，作為雜訊之強度，最後將訊號之離子強度除以雜訊之平均強度，再以此商值取十為底對數後乘以十倍，結果值即為該特徵訊號相對應之訊雜比，而其大小需大於 4.77 dB 以上，才被視為有效訊號。其計算公式如下：

$$\text{SNR(dB)} = 10 \log_{10} \left( \frac{P_{\text{signal}}}{P_{\text{noise}}} \right) \dots\dots\dots(2)$$

SNR：訊雜比

$P_{\text{signal}}$ ：訊號之強度

$P_{\text{noise}}$ ：雜訊之強度

## 第三章 實驗設計與架構

本章節第一小節會介紹快速檢測卡匣與紙片、電極等之設計及製作；第二小節則介紹快速檢測卡匣系統中，紙層析分離之操作流程與設計概念；第三小節將對於游離、偵測系統，以及紙噴灑游離質譜法架構，進行詳細的介紹，包含噴灑參數、質譜端之設定等；第四小節就整體快速檢測卡匣系統，從設計、製造、操作進行各別說明；第五小節會對整體實驗設計與檢測目標，作完整的總結與敘述，使本研究之架構與構想，更加清楚的呈現；最後，第六小節將介紹本研究所使用之樣品配置、展開液調配等，實驗所需之溶液製備。

### 3.1 快速檢測卡匣設計與製作

快速檢測卡匣是本研究最核心之部分，包含進樣、層析分離、紙噴灑游離，皆在此卡匣上完成，且與一般常見之檢測卡匣不同，此卡匣以紙噴灑(PSI)作為偵測機制，取代傳統所使用之酵素結合免疫吸附法(ELISA)，避免酵素、抗體抗原之時效性影響，也減少了存放上的限制，並且保留極高的靈敏度，以及使用性和便利性。雖然 1960 年代已有卡匣問世，且發展至今，不再只有單一功能卡匣，而是複合式卡匣，意即能夠針對特定種類進行檢測，用途也涵蓋各領域，包含醫學檢測、環境監測、食品安全等，儼然是現代社會中最常見、平價的檢測設備。

本研究所開發之卡匣，將會以食品安全為主要標的，由 Cooks 團隊所發展之紙噴灑游離法，與葉片電噴灑之架構做為發想。恰巧近年台灣頻傳食品安全問題，檢驗需求也大幅提升，也因此看到了契機，開發一個具有紙基微流體之偵測靈敏度，又能夠簡單且快速脫附、游離樣品的檢測卡匣，並以質譜儀做為後端偵測器，結合紙微流體與質譜儀的高靈敏度，提高了在快速檢測中需要的準確性，以及便利性。

卡匣原型的基礎材料為壓克力，於 AutoCAD 設計、定義草圖後，再交由二氧化碳雷射雕刻機(LaserPro Venus II, GCC, Taiwan)切割零件，使用氯乙烯膠將各零組件接合；但是卡匣在進行層析時，壓克力基板會遭到有機溶劑侵蝕，而影響層析分

離之效果。因此，對於最後的快速檢測卡匣之設計，除了側流式的層析分離、直線型之進樣、紙噴灑游離之電極之外，卡匣基材即為設計之首要考量；再搭配紙片之尺寸，設計、製作一個  $50.0 \times 9.0 \times 8.5 \text{ mm}^3$  的卡匣。最終，選用材料為 ABS 高分子光固化樹脂，透過基層製造技術(3D 列印)製造，使卡匣能夠輕易地被製造。而 ABS 高分子樹脂是由丙烯(Acrylonitrile)、丁二烯(Butadiene)、苯乙烯(Styrene)所組成之高分子聚合物，各取第一個字母而形成縮寫 ABS。之所以選為材料的原因除了其表面平整細緻外，更重要的一點，就是不怕有機溶劑的溶解，既穩定且强度高又輕巧等特性，再再與本系統之需求吻合，因此最終之卡匣組成便是由 ABS 光固化樹脂所製作而成。

在結構上，為了能夠執行側流式層析分離，在卡匣的底板設計了儲液槽，大小為  $6.0 \times 4.0 \times 2.0 \text{ mm}^3$ ，足以容納  $40.0 \text{ }\mu\text{L}$  之展開液，目的在於存放由層析進樣口施加之展開液，再由紙片前端之尖端接觸，藉由毛細現象將展開液由儲液槽帶至紙片上，進而執行層析分離的動作，避免大量的展開液在短時間內施加於紙片上，導致樣品色帶暈開或是層析分離的失敗，故在最終設計的版本中，加入了儲液槽的結構，提升本系統之層析分離效能。在直線型進樣上，首先解釋進樣為直線的重要性。在層析過程中展開液等向液面，接觸到樣品區帶時，樣品在紙上的形狀將會影響展開液的走向，是否能夠繼續維持其原方向，與層析的結果有著緊密的關聯。所以在卡匣的進樣口設計上，就需要將進樣口設計為細長的區塊，使樣品在接觸紙片之前，會因為毛細現象在進樣口中形成一直線，再藉由漏斗狀的結構，使樣品液體往下流動、接觸紙片，在紙片上形成較為平整之樣品區帶，使得後續層析分離可以有良好的接觸面。而在電極缺口與紙噴灑尖端出口，仍然保持原有卡匣之設計，並且設計上蓋時，需要一再確認不會有公差或是干涉，避免紙噴灑游離受到影響；基於這個考量，於底板的支撐組塊有針對電極進行設計，在紙片感測區域下方，設計了工字型的結構，一來支撐因為層析或紙噴灑溶液濕潤變重之紙片，二來工字型中間之開口尺寸，與 PCB 電極之寬度相符，因此能夠固定住電極，避免電極浮動影響紙噴灑之供電，進而讓紙噴灑游離效果打了折扣。

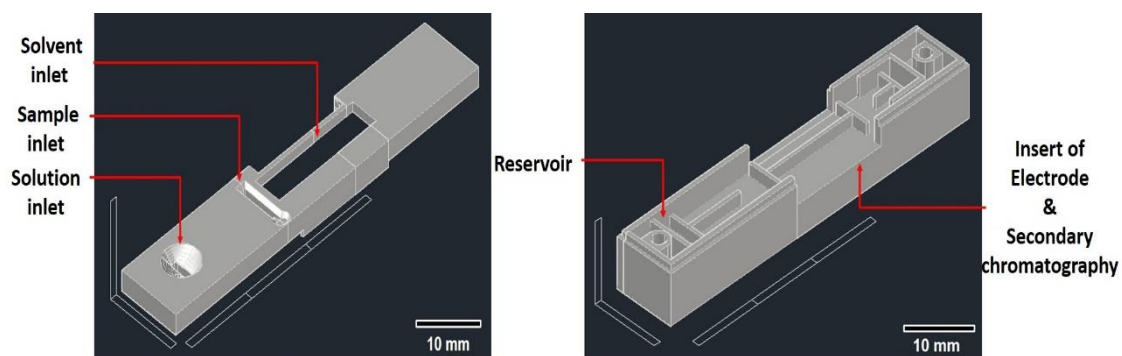


圖 3-1 快速檢測卡匣之設計圖。左圖為卡匣上蓋去溶劑添加口、進樣口與展開液進樣口，右圖為卡匣下蓋中之儲液槽、二維層析接觸點與電極插入區。

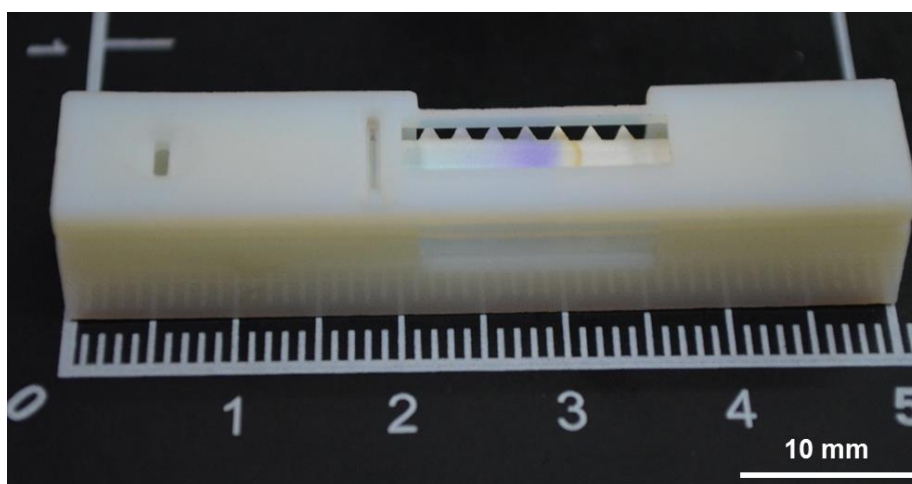


圖 3-2 快速檢測卡匣之實體圖

### 3.1.1 紙片設計與製作

本研究所使用之濾紙為 Whatman No.42 之定性分析濾紙(Whatman, No.42 90 mm, GE healthcare life sciences, UK)，濾紙孔徑 2.5  $\mu\text{m}$ ，透過二氧化碳雷射雕刻機，依據 AutoCAD 所設計之圖形裁切，可以批次大量製造，也能夠減少操作誤差，間接降低檢測時所受到之影響，避免人為變因影響檢測結果。裁切上需要特別注意，二氧化碳雷射功率之設定，本實驗操作參數如下：解析度(DPI)1000、尖端區域功率與速度為 1.2 W 和 152.4 mm/s、紙片主體區域功率與速度為 2.4 W 和 101.6 mm/s，其中若功率大於 3.0 W 且速度小於 100 mm/s，會讓紙片在裁切過程中燒焦，而燒焦的部分，會捲曲為小毛球停留在紙片尖端，如此一來將會大大影響，電噴灑游離



之效果，導致系統偵測之結果有誤。

紙片的設計上，需要考量到其樣品乘載面積、層析分離時所需之長度、以及電噴灑之於紙片尖端角度等因素。樣品乘載之面積與紙片寬度有著極高相關性，進樣後所展開之寬度，也將會影響到層析分離之參數，而紙片的寬度及長度，皆對於層析之效果影響甚鉅。層析結果的好壞，能夠很直觀地由顏色分層觀察，層析液展開速率過快，會使得樣品區段直接暈開，導致層析失敗，因此需要調配控制展開液之比例。所以紙片的設計與層析之效果好壞，是檢測結果成功與否之關鍵。

因此紙片尺寸設計的考量上，需要優先考慮紙片之寬度與長度，讓系統在進樣與層析時穩定，後續的電噴灑游離和質譜量測才能順利。紙片的設計，起初是參考Cooks團隊的尺寸 $10.0 \times 5.0 \text{ mm}^2$ ，後續依照本研究之架構修改、調整為 $40 \times 5.0 \text{ mm}^2$ ，而紙片尖端角度由 $30^\circ$ 改為 $60^\circ$ ，尖端長度為 $1.3 \text{ mm}$ ，如圖 3-3 所示。而紙片側邊一排 $2.0 \times 2.0 \text{ mm}^2$ 的方形小孔，可防止電噴灑時，電流毫無阻礙的在紙片上流通，造成非待測之尖端，也出現電噴灑現象，導致質譜儀量測的失真，是故在紙片側邊加上一排小孔，只留下尖端所對應之通道，使電流選擇走最短路徑，讓電極能夠更針對性地供電，避免同時噴灑的現象產生，干擾量測結果。

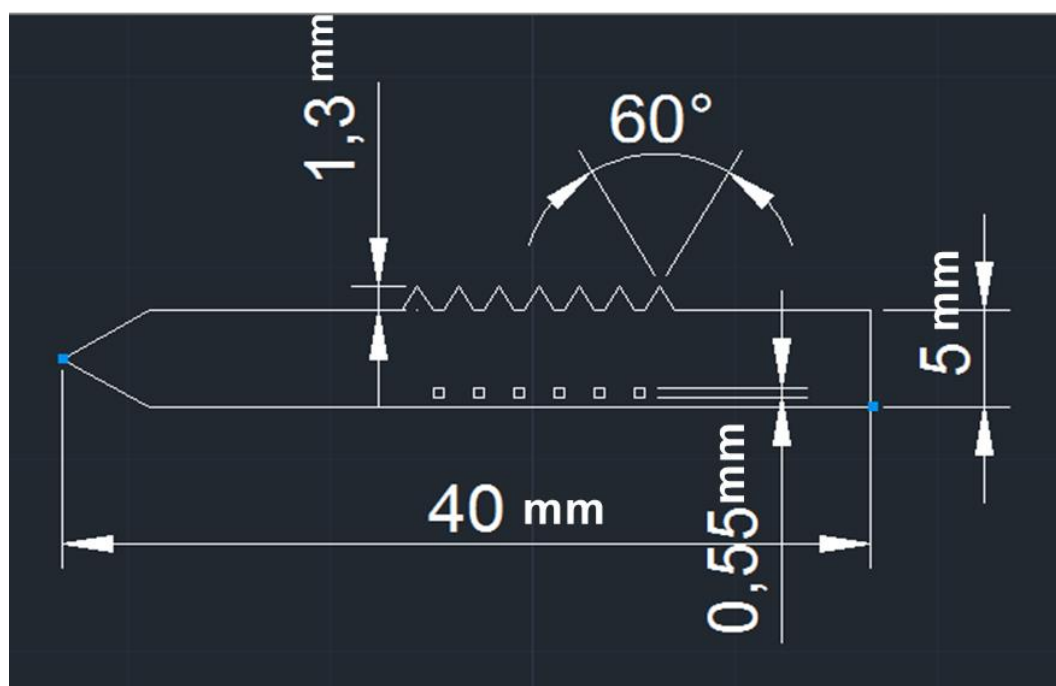


圖 3-3 快速檢測卡匣之紙片設計圖

### 3.1.2 卡匣電極設計與製作

在快速檢測卡匣系統中，影響偵測結果最為大的便是電極，最首當其衝即是脫附、游離之效果。藉由拔插式插槽，將質譜儀提供之高壓電源傳遞至電極上，再透過紙片接觸電極導電，進行脫附、游離的流程。因此，這是影響檢測結果之重要因素，即使前面的步驟做得再好，只是游離效果不佳，便直接導致質譜量測失敗，所以在電極的設計上，一點都不能妥協。電極的長度、寬度，以及電極間間距、與拔插式插槽的腳位對位等，都是設計時需要考量的因子。

電極的材料選擇電木感光電路板，既直接又直觀，厚度也恰巧是紙片與卡匣底板之距離，所以能夠完全的緊密接合，不會有接觸不良或是電極浮動之疑慮，只需要簡單的曝光、顯影、蝕刻就能製作。設計之初稿與光罩皆是使用 AutoCAD 繪製，完成後進到本實驗室之黃光室，進行後續之曝光、顯影、蝕刻等步驟。曝光是使用 UV 曝光機，進行曝光 30 秒，定義出所設計之電極圖形；隨後進行顯影動作，使用氫氧化鈉配置之顯影液，將曝光完成之電路板放入顯影液中，再放置震盪機中三分鐘，隨後取出用去離子水沖洗，即完成顯影步驟。接續進行蝕刻，將電路板放入氯化鐵蝕刻液中，再放置到震盪機中升溫至 50°C 震盪 10 分鐘，直到電路板上只留下電極形狀，取出沖洗後，即完成電極之製作。

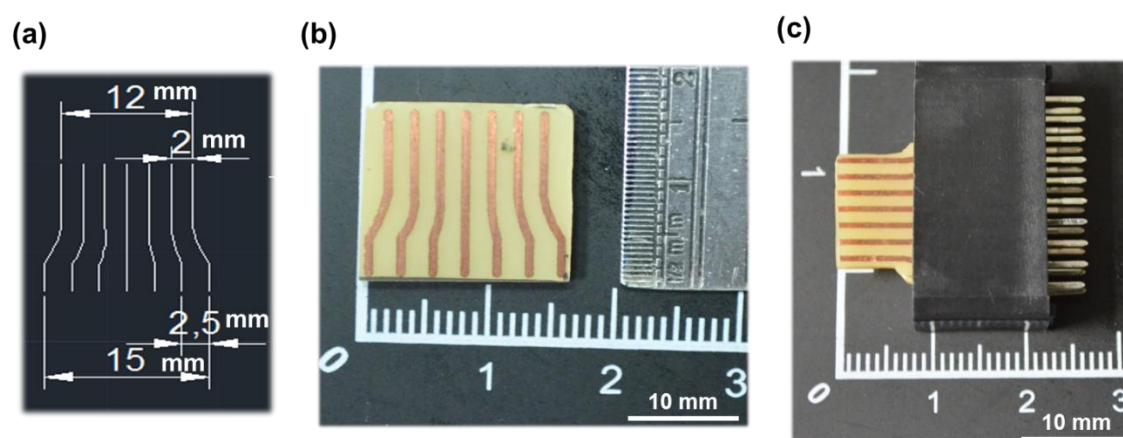


圖 3-4 快速檢測卡匣之電極圖。圖(a)為 Layout 電極之設計實體圖，圖(b)電極實體圖，圖(c)為整體電極供電系統之實體架構圖。

## 3.2 紙層析分離系統

本節將介紹本研究所使用之紙層析系統，從架構流程到步驟，都會詳細的介紹，架構上僅需要使用卡匣、Pipette(移液器)、展開液等，如圖 3-5 所示。首先由 Pipette 吸取 2.0  $\mu\text{L}$  的樣本溶液，滴定於卡匣的進樣孔，由於卡匣進樣孔有一漏斗狀之結構，能夠讓樣本液滴集中為直線後，再往下滑落接觸紙片，完成直線型進樣，避免進樣不平均，而影響層析分離之效率。等待紙片乾燥後，即可進行層析分離，若紙片未完全乾燥，當展開液接觸未乾燥區域時，會有部分展開液成分溶入其中，而使層析分離無法進行，僅把樣本沖散、暈開，而非讓其中的成分分離。因此確定紙片乾燥後，使用 Pipette 吸取配置好之展開液 40.0  $\mu\text{L}$ ，滴定於卡匣之層析孔，層析孔與進樣孔同樣都有漏斗結構，避免展開液一次給量過多，導致層析失敗。在卡匣底板也有儲液槽的設計，搭配紙片前端的小尖端，只要稍稍接觸儲液槽，就能藉由毛細作用力吸取展開液，進而完成層析分離，此為第一維層析。

完成第一維層析後，待展開液揮發乾燥，就能進行第二維的層析，使用一張拭鏡紙，加上 2.0 mL 展開液，當充滿展開液之拭鏡紙接觸紙片側邊時，毛細作用力將會帶動展開液，由拭鏡紙端移動至完成第一維層析之紙片上，進而讓已經被分離為一條條的成分區域，往紙片之紙噴灑尖端移動，達到了濃縮成分訊號之效果，整個流程約在 120 秒完成，此為第二維層析。待完成以上這些步驟後，便可以於紙片側邊加上電極，由質譜提供高電壓，進行紙噴灑游離偵測各尖端上之成分，於質譜圖譜上檢視有無農藥訊號產生，完成待測物快速檢測之分析。

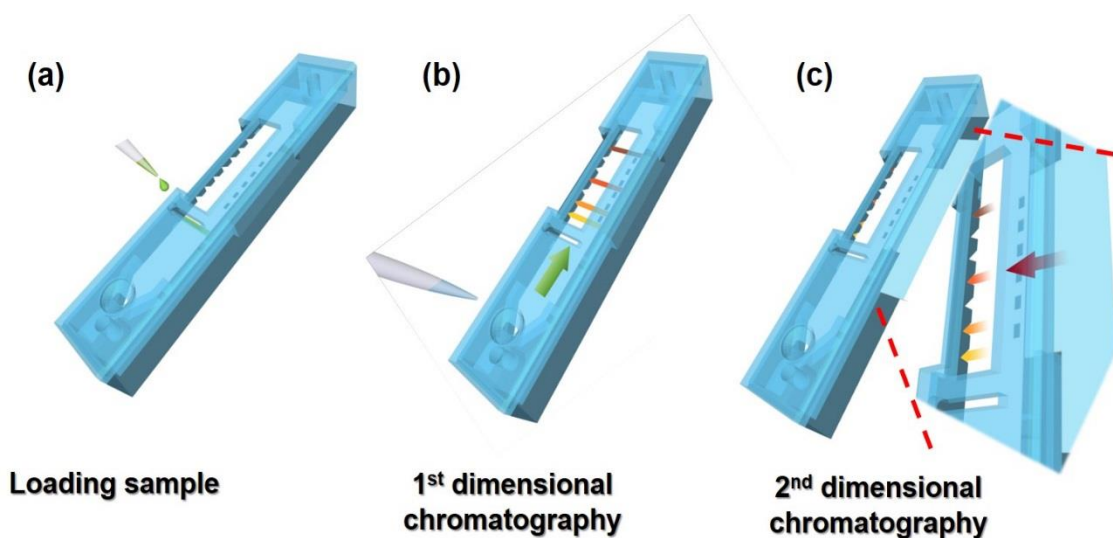


圖 3-5 本實驗使用之紙層析架構流程圖。圖(a)為 Pipette 取樣 2.0  $\mu\text{L}$  樣本溶液滴定於卡匣進樣孔，圖(b)為第一維層析示意圖，Pipette 吸取 40.0  $\mu\text{L}$  的展開液，滴定於卡匣層析孔，進行第一維的層析分離，圖(c)為第二維層析示意圖，將含有 2.0 mL 展開液之拭鏡紙接觸紙片側邊，由毛細作用力帶動下，進行第二維層析濃縮。

### 3.3 紙噴灑游離偵測系統

紙噴灑游離系統，是本研究的最後一道關卡，負責將前面層析分離好之樣品，脫附、游離、帶電之後進到質譜儀中，再透過分析器、偵測器得到質譜訊號圖。質譜儀分析的原理如下，首先前端游離源負責將樣品游離，讓樣品被分解成帶電離子的型態，而帶電離子受到電場吸引加速運動，進而進入質量分析器中，由於這些離子質荷比不同，所產生之加速度也不同，在分析器中便有不同的作用點，偵測器即是利用不同區域，所產生之質量訊號進行分析、偵測，最後將訊號傳遞至數據處理系統，即顯示於螢幕上之質譜圖譜。

本研究使用 Thermo 所生產製造之離子阱質譜儀(Ion trap mass spectrometer)，型號為 LCQ DECA XP Plus(Agilent, USA)。離子阱架構是藉由電場或磁場，將帶電離子限制於一個固定區間運動之裝置，由直流或交流電方式將不同質荷比之離子分離，進而進行偵測；而離子阱架構之質譜儀，體積相對其他種類分析器之質譜儀小，解析度也比四極柱質譜儀好，用以定性、定量檢測都相當理想。質譜入口前端

為可拆卸式，能夠搭配 ESI 或 APCI 等商業游離源，抑或是結合自行開發之大氣壓力游離源；LCQ DECA XP Plus 具有三種質量掃描模式：低分子量模式(15–200 amu)、一般模式(50–2000 amu)以及高分子量模式(200–3000 amu)，此外還有多次質譜偵測之功能( $MS^n$ )，協助分析大分子之待測物。

紙噴灑游離之操作參數如下：操作電壓 6.3 kV 由質譜儀提供、尖端距離質譜入口 5.0 mm、去溶劑甲醇水 1 : 1 (v/v) 30.0  $\mu$ L、質譜入口毛細管溫度 250°C、質譜毛細管電壓 6.0 V、質譜通道偏移電壓 20.0 V。一般紙噴灑之工作電壓大約 3~4 kV，就足夠系統脫附、游離樣品，但是本系統紙片面積遠大於一般，因此需要較高的電壓，提供足夠的電場，讓樣品能夠被游離；所以經過測試之後，將工作電壓訂定為 6.3 kV，尖端距離質譜入口 5.0 mm，意即電場梯度為  $1.26 \times 10^6$  V/m，由於工作電壓較高，尖端與質譜入口之距離就需要格外注意，避免距離過近，直接對質譜入口放電之現象，造成質譜真空遭到破壞，或是真空計(Ion gauge)、內部電路元件損壞，紙片尖端與質譜入口之距離便固定在 5.0 mm，既有足夠的離子強度，也能夠避免直接放電的產生。

### 3.4 實驗系統架構

本研究所開發之快速檢測卡匣，整合進樣、層析分離、紙噴灑游離於一個卡匣系統上，有著側流式檢測系統之優點，靈敏度高、進樣量少如 1.0  $\mu$ L，且樣本檢測範圍廣，包括環境監控、臨床醫學、生物樣本、食品安全等等。目前本研究開發之卡匣，著眼在於在天然物農藥的量測，鑒於國內現行之檢測機制耗時且昂貴，因此提出此快速檢測卡匣，整個檢測流程只需要十分鐘。進樣、一二維層析分離、紙噴灑游離、質譜偵測分析等步驟，對比傳統 GC/MS、HPLC/MS 量測候機台的清洗或毛細管柱的更換，動輒幾小時的流程，不論是在時間或金錢放面，此卡匣系統都更具優勢。

本實驗系統之架構，即是結合前兩節而成，整合於 3D 列印製作之卡匣，取萃取好的樣品溶液 2.0  $\mu$ L，滴定於卡匣的進樣區，待其自然乾燥後，便取層析展開液

40.0  $\mu\text{L}$ ，由卡匣表面之層析液進樣口滴定，透過通道進到卡匣內層之儲液槽，讓紙片前端之尖端接觸，藉由毛細作用力帶動，進而使樣本層析、分離，層析時間在三分半，時間一到便將卡匣放置腔體中，使殘留在紙片上之展開液，在抽真空的過程中快速揮發，避免過度層析，破壞分離結果。而此卡匣與原型卡匣最大的差別就在於層析的方式，原型卡匣層析方式與先期文獻中雷同，都是將固定相放置於流動相中，藉由固定相之毛細作用力，將展開液吸取上來，進行層析分離之動作，這種方式將會受到層析時間和接觸展開液面積之影響，導致層析結果不易掌控，需要嚴格管控層析時間和接觸面積、角度；反之，改良原型卡匣所研發之快速檢測卡匣，加入了漏斗狀的進樣口和層析口，讓進樣能夠呈現直線進樣，減少進樣的不平均，讓層析液流速減緩，結合儲液槽收集展開液，透過紙片尖端的接觸，帶動展開液流動，避免層析速度過快。此舉成功地將縱向的層析改變為橫向、側流式層析，也藉由儲液槽的輔助，讓整個層析分離流程由時間相關，轉變為與展開液進樣量相關，由展開液之多寡控制層析之時間、效果，為本研究開發之快速檢測卡匣之一大特點。

最後便是將 PCB 電極和拔插式插槽之電極，插入紙片下方，藉由噴灑輔助溶液(甲醇水)30.0  $\mu\text{L}$  的添加，讓紙片濕潤並黏貼於 PCB 電極板上，隨後透過質譜儀提供之 6.3 kV 高電壓，進行紙噴灑游離，讓樣本脫附、游離為帶電離子，進到質譜中被量測，再經由 Xcalibur 2.0 進行圖譜的處理，檢視量測結果。

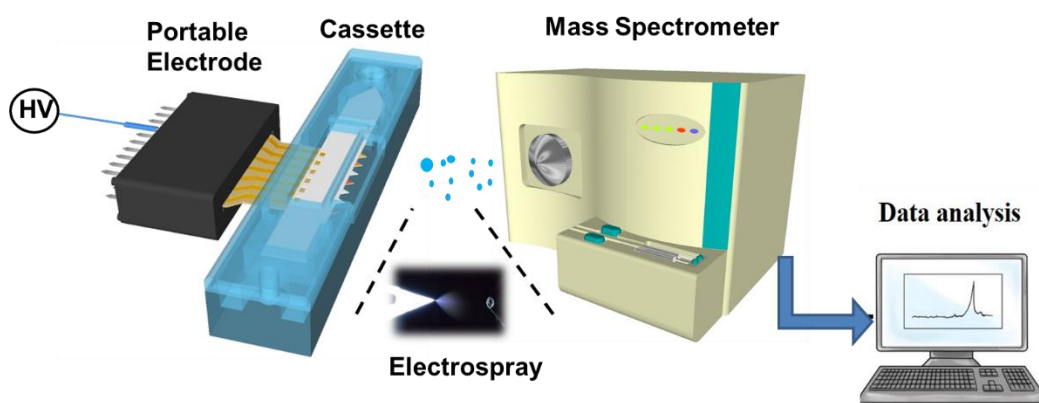


圖 3-6 本實驗之系統架構圖。樣本由進樣口進樣後，透過兩次的層析分離、濃縮，接上拔插式電極，藉由質譜儀提供之高壓電，進行電噴灑游離，將樣本脫附、游離後，進到質譜中被偵測。

### 3.5 實驗設計與檢測目標

現行之食品或藥物檢測，大多仍然仰賴 LC/MS 或 GC/MS，進行高精確度之定性或定量檢測，這兩種檢測法固然有著高精度，但是在樣品的前處理、檢測時間以及成本都是其限制，因此需要能在大氣壓力下快速檢測，且檢測機制成本低之系統，才能在短時間內就得到檢驗結果，並且費用也不會造成負擔。為此，本研究所開發之快速檢測卡匣，有著上述之優點外，還有著操作簡單、可攜式、極少的前處理等優勢；在設計上，也具有可開模大量製造之結構，如此能夠降低成本，還可以更加普及化，成為食品及藥物安全檢測上之新選擇。

實驗設計上，首先就紙片尖端角度與噴灑角度、穩定性、離子強度等特性進行探討，決定紙片尖端角度後，即可定義在此紙片尺寸下，系統電噴灑游離質譜量測之偵測極限。而為了提升系統偵測之靈敏度，需要將樣品層析分離後，再進行量測，為此層析分離之操作條件，就必須在控制之內；確定了層析參數後，以標準品與天然物為標的，檢視層析分離之效能，並且比較一、二維層析分離後量測之差異。最後，針對天然物摻雜農藥，經過層析分離後，驗證本快速檢測卡匣之解析能力；以及，直接量測市售天然物，進行農藥檢測，顯示本快速檢測卡匣之功能與可行性。

首先藉由觀察不同尖端角度，所形成之噴灑角度，定義本研究之紙片尖端角度，利用噴灑甲醇水溶液，比較各尖端角度所產生之噴灑角度，以及質譜所得到之離子濃度訊號強度，從中挑選最適合本系統之尖端角度。接續使用確定尖端角度之紙片，進行系統偵測極限之量測，定義本系統有效檢測之區間。再結合紙層析分離後之量測，對標準品染色後，進行反覆的層析分離，以找到最佳之層析時間、展開液量、進樣量等參數，讓層析分離效果提升，也可以使檢測之靈敏度增加。接著，利用紙層析分離，對於標準品和天然物進行分離後量測，顯示本系統之紙層析分離混合物之能力。最後，偵測標準品摻雜農藥，以及市售之天然物，針對其中之農藥訊號進行檢測，驗證本研究開發之快速檢測卡匣，的確有其可行性和效能。

檢測目標首先就系統特性上，使用單一標準品，例如咖啡因(Caffeine)、對乙醯

氨基酚(Acetaminophen)、氯苯那敏(Chlorpheniramine)、維生素 B<sub>2</sub>(Riboflavin)等，進行偵測極限的檢測，定義出本快速檢測卡匣之有效量測區間。再接續地量測標準藥品，測試系統之檢測靈敏度與解析度，並檢視本系統脫附、游離樣品之能力。有了檢測標準品的成果後，便能偵測成分較為複雜之天然物，例如青蔥、大蒜、茶葉、複方中草藥等，不僅驗證本系統的靈敏度是否適用於天然物樣品，也能夠展現層析分離之效能，由不同的分層區域量測，能夠分別得到待測物之特徵訊號質譜訊號圖，證實本系統之層析分離在天然物樣品上，也能夠作用。另外，也針對第二維層析濃縮進行驗證，透過比較一、二維層析後之質譜量測，取出兩分鐘內之離子訊號強度進行比較，即可得知第二維層析濃縮訊號之能力，使系統偵測時待測物訊號強度得以有效提升。

最後，便是天然物中農藥之成分檢驗。本研究針對巴拉刈(Paraquat)，俗稱百草枯，是一般農業常用之除草劑。檢測上先以人為摻雜，於大蒜和茶葉中，藉由層析分離之後，檢測大蒜和茶葉內含之 1.0 ppm 巴拉刈，與未層析分離之量測作為比較，以此證實本研究所開發之快速檢測卡匣，能夠在層析分離後，將農藥訊號從中分離，再藉由第二維層析提升濃度，使檢測農藥訊號效能增加，即便濃度僅有 1.0 ppm，仍可以不受干擾的成功地偵測，與當初發想之設計理念吻合。人為添加之農藥能夠成功檢測後，選定一日常生活常見之天然物：青蔥，作為實驗對象，青蔥在國人的飲食習慣中，是最為常被使用之蔬菜，因此特別挑選為標的，直接於市場購買一把青蔥，先針對其特徵訊號進行檢測，分別由蔥綠、蔥白分段檢測，以確立其特徵訊號，樣品萃取僅需 5.0 g 之蔥綠或蔥白，即可應用於檢測。如同以上之量測，將青蔥經過層析分離、濃縮後，再利用紙噴灑游離使質譜得以偵測，從中找尋是否含有農藥訊號，驗證本快速檢測卡匣是否具備農藥檢測之能力。



### 3.6 實驗溶液配置

1. 紙電噴灑游離使用之輔助去溶劑，使用去離子水(DI water)與甲醇(Methanol (Sigma-Aldrich, USA))以 1:1 之比例調配，每次電噴灑添加量為 30.0  $\mu\text{L}$ 。
2. 本實驗使用之螢光染色劑為羅丹明 B(Rhodamine B (Acros Organics, USA))，將不具有顏色之樣品，輔助層析分離時觀察，濃度為 1.0 mM。
3. 層析分離使用之展開液有：甲醇、正己烷(Hexane (Sigma-Aldrich, USA))與乙醇(Ethanol (Sigma-Aldrich, USA))以 9:1 之比例調配、正己烷與丙酮(Acetone (Sigma-Aldrich, USA))以 7:3 或 8:2 之比例調配，一次層析用量為 40.0  $\mu\text{L}$ 。
4. 測試系統偵測極限使用俗稱維生素 B<sub>2</sub> (Vitamin B<sub>2</sub>)之核黃素(Riboflavin (Sigma-Aldrich, USA))，以去離子水調配 10<sup>5</sup> ppb、10<sup>4</sup> ppb、10<sup>3</sup> ppb、10<sup>2</sup> ppb、10<sup>1</sup> ppb、10<sup>0</sup> ppb 等濃度，做為系統檢量線濃度之依據。
5. 驗證系統紙層析分離之效能樣本，選用市售感冒藥泰諾加強錠 (Tylenol, Extra strength, USA)中高含量的對乙醯氨基酚(Acetaminophen)，與市售榮民治鼻敏中的氯苯那敏 (Chlorpheniramine (治鼻敏，榮民製藥，台灣))，以去離子水調配 100.0 ppm，再使用羅丹明 B 染色；以及維生素 B<sub>6</sub> 的化合物吡哆醇(Pyridoxine(Sigma-Aldrich, USA))，與維生素 B<sub>3</sub> 化合物菸鹼醯胺(Nicotinamide(Sigma-Aldrich, USA))，去離子水配置濃度同樣為 10.0 ppm，再使用羅丹明 B 染色，方便層析觀察。
6. 為驗證一、二維層析分離效果，選用亞甲基藍(Methylene blue (Sigma-Aldrich, USA))與甲基紫(Methyl violet (Sigma-Aldrich, USA))分別使用去離子水配置為 1.0 ppm 溶液，再將其混合後，可供驗證層析效能。而上述兩個標準樣品，本身就具有指示劑與染劑的特性，因此不需再染色，且皆為高極性，可直接進行層析分離，再透過紙噴灑游離檢測。

7. 本實驗所選用之市售農藥樣品為巴拉刈(Paraquat (Syngenta, Switzerland))，將巴拉刈原液加入去離子水稀釋為 10.0 ppm，摻雜入樣品中。
8. 本實驗天然物量測部分，使用市售之青蔥、大蒜、肉桂、當歸、丁香、茶葉等作為樣品，除了茶葉是茶包形式，需要浸泡在去離子水中，煮沸至 100°C 後取 2.0  $\mu$ L 用於量測；其他的天然物樣本，只需要搗碎後配置溶液萃取即可。

## 第四章 實驗結果與討論

本研究進行實驗分析之內容，主要包含紙片尖端的特性，與其在紙噴灑時之影響，包括噴灑時之張角、長時間噴灑離子強度與穩定度等(4.1 節)；並且透過反覆的層析實驗，觀察並找到適合本研究系統之最佳層析參數，包括層析時間、展開液之調配等，使層析效果提升，增進系統分析混合物之能力(4.2 節)。再選用標準藥品，測試本研究開發之檢測卡匣之檢測極限，確立檢測卡匣之有效量測區間(4.3 節)；接著分別使用標準品和天然物，對於檢測卡匣之層析能力進行測試，並透過質譜量測檢視其分離效能，針對不同區段之紙噴灑游離，可以觀察到是否成功分離混合物樣本(4.4 節)。層析分離條件確定後，其分離之效能也得到驗證，接續在第一維層析後，進行第二維的層析、濃縮，透過質譜偵測之後，比較一、二維層析之間之差異，藉由影像上、質譜量測到之離子訊號強度，清楚地表現出第二維層析之特性(4.5 節)；再對於本研究所選定之標的農藥進行量測，定義其特徵質譜訊號，再藉由比較有無層析之量測，表現出本檢測卡匣系統之價值(4.6 節)；最後，直接於市場購買青蔥，測試本檢測卡匣之性能，可以明顯觀察到，經由層析分離之後，除了量測到原有之特徵訊號外，還多得到了兩種農藥訊號，證實本檢測卡匣之可行性(4.7 節)。

### 4.1 紙片尖端角度特性分析

影響紙噴灑游離效果的因素有以下幾種，紙片尖端角度、噴灑電壓、噴灑溶液等。其中紙片尖端角度的大小，最直接影響紙噴灑游離的效能，其次才是噴灑電壓。紙片尖端角度所對應的是噴灑時的霧化噴灑角度，而此角度即表示紙噴灑游離之霧化噴灑好壞，也間接影響質譜儀偵測的結果，可見紙片尖端角度對於整個快速檢測卡匣的重要性。因此必須先確定尖端角度大小，確保系統在紙噴灑游離時，有好的霧化噴灑品質，才能夠有好的偵測結果。

因為要決定尖端角度參數，所以需要裁切不同尖端角度之紙片，藉由量測不同尖端角度之噴灑穩定度，以及霧化噴灑時之張角角度，來決定最佳的紙片尖端角度。尖端角度範圍由 30° 到 90° 共三個角度。噴灑電壓固定為 6.3 kV，尖端距離質譜入口 5.0 mm。由於僅需要觀察離子訊號強度，故並未添加樣本，而是使用紙噴灑溶液 30.0  $\mu\text{L}$  (甲醇與去離子水 1:1 水溶液)，作為施加之溶劑。觀察的重點在於霧化噴灑之角度，以及兩分鐘內的噴灑穩定度和離子強度，從中挑選出最適合本研究開發之卡匣的紙片尖端角度。

由圖 4-1 可以觀察到，在兩分鐘的紙噴灑中，尖端角度 90° 之紙片穩定度是相對較好的，訊號的變動相對較小；而尖端角度 30° 雖然強度高過 90°，但是在穩定度和變異性上，都明顯的比尖端角度 90° 之紙片差了一截；四個尖端角度中，噴灑離子強度最高的是角度 60° 之紙片，從在圖中可以看到，離子強度最高可達到  $10^{10}$  ions/cm<sup>3</sup>，雖然最後兩分鐘時下降至  $10^9$  ions/cm<sup>3</sup>，仍然是四個角度中離子強度最好的，而穩定性僅次於尖端角度 90° 之紙片。而圖 4-2 所取得之影像，經過影像處理軟體(ImageJ)灰階、調整影像對比度、二值化處理後再進行分析，得到該霧化噴灑角度為 70°，遠大於文獻中提到之霧化噴灑角度需大於 49.3°，因此尖端角度 60° 之紙片，最為適合本研究開發之快速檢測卡匣系統。

基於本研究開發之快速檢測卡匣的特性，需要在短時間內有良好的噴灑特性以及穩定度，才能夠進行快速篩檢樣本。綜合以上之敘述與實驗之結果，本研究所使用之紙片尖端角度為 60° 之紙片，而非是有著最好穩定度之尖端角度 30°；角度 90° 之噴灑固然很穩定，但是在離子訊號強度上，仍是略遜尖端角度 60° 之紙片一籌，角度 60° 之紙片有著很高的離子訊號強度，也能夠維持一定之噴灑穩定性，以及足夠大的霧化噴灑角度 70°，說明其霧化噴灑效果相當理想，雖然尖端角度 30° 之紙片噴灑角度有 120°，但是張角過大，導致霧化噴灑出之帶電離子過於擴張，使進入到質譜儀中之離子量與強度不如尖端角度 60°。綜合上述之結果，再再顯示尖端角度 60° 之紙片，擁有最適合本快速檢測卡匣系統之特性。

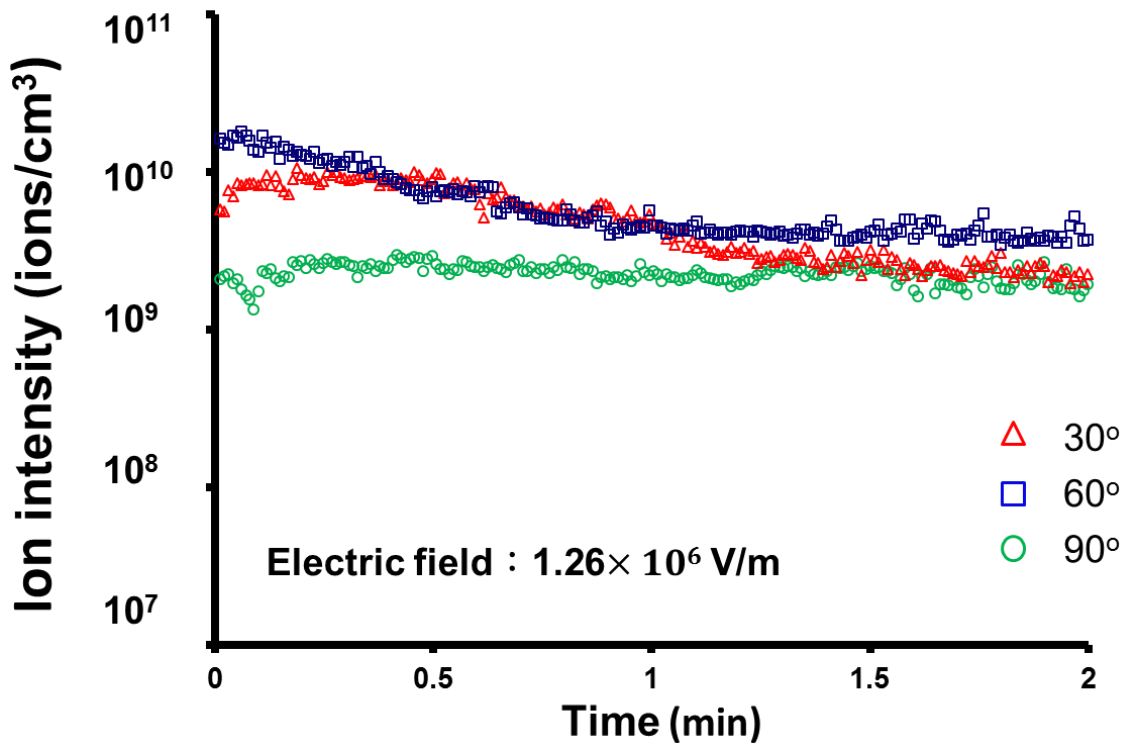


圖 4-1 不同尖端角度兩分鐘之噴灑離子強度圖。從圖中可以觀察到，尖端角度 60° 之紙片在前 30 秒離子強度最高，且兩分鐘內仍維持約  $10^{10}$  ions/cm<sup>3</sup> 之強度。

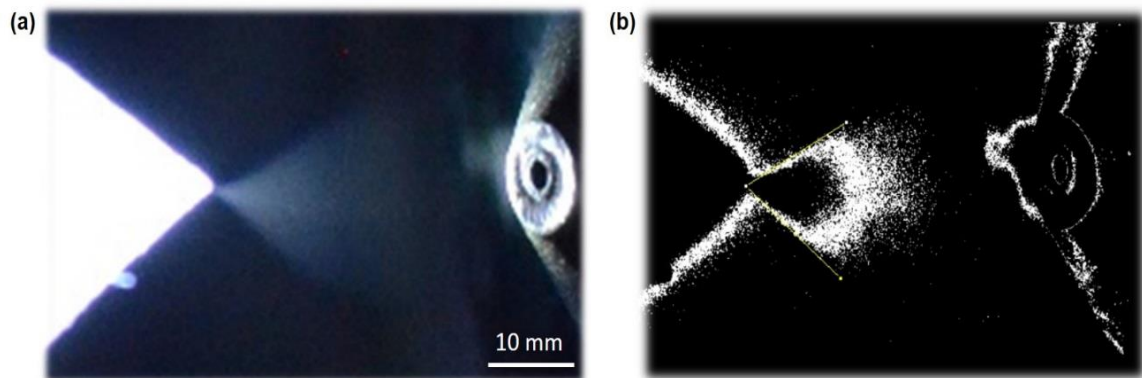


圖 4-2 紙片尖端角度 60° 紙噴灑游離之張角圖。圖(a)為實際噴灑圖，圖(b)為影像處理測量，尖端角度 60° 紙噴灑之張角為 70°。

## 4.2 紙層析分離參數分析

本小節開始將詳述本研究主要層析分離之參數內容。依照本研究開發之快速檢測卡匣，影響紙層析分離效果的為展開液的量與樣品進樣量，層析時間不再是影響本系統之因素，只要供給足夠之展開液，便能夠由展開液的量，控制層析之時間與效果。而展開效果好壞，與樣品進樣量最為相關；進樣量的多寡，則需要牽涉本系統所使用之紙片尺寸，過多的量會使展開後，待測物分離出的顏色區帶，超出紙片設計之紙噴灑游離區域，使超出之範圍無法進行檢測；反之，過少的量在展開後，將會有部分待測物之顏色區帶被稀釋，或無法抵達紙噴灑游離區域。由此可知，紙層析分離之結果，會對本系統之偵測結果造成重大影響，所以在決定紙片尺寸後，便需要確定層析分離系統之操作參數，以利於後續檢測。

訂定層析分離參數之樣品為甲基紫與亞甲基藍 1:1 之混合液，此樣品在分離過程中方便觀察到兩種不同之顏色分布；展開液則是使用甲醇。首先決定展開液的量，在樣品進樣量為 2.0  $\mu\text{L}$  時，從所得到之理論板數與分離寬度，便能夠找到最適合此紙片尺寸下之展開液的量，實驗結果如圖 4-3 所示，從結果中可以觀察到，雖然 40.0  $\mu\text{L}$  與 50.0  $\mu\text{L}$  之展開液，所得到之理論板數是不相上下，但是在分離後甲基紫與亞甲基藍之寬度上，兩者就有了明顯的差異。在展開液 50.0  $\mu\text{L}$  之分離下，樣本展開長度將近 18.0 mm，而紙電噴灑游離區域長度約為 15.0 mm，表示將會超出紙噴灑游離之區域，故展開液 40.0  $\mu\text{L}$  在假設進樣量為 2.0  $\mu\text{L}$  時，有較好的分離效果，適用於本系統之紙片尺寸。

確定展開液 40.0  $\mu\text{L}$  較適合本系統後，隨即進行不同進樣量下之層析，用以交叉比對，是否在進樣量為 2.0  $\mu\text{L}$  時，展開液 40.0  $\mu\text{L}$  較適合本系統，實驗結果如圖 4-4 所示。進樣量 1.0  $\mu\text{L}$  與 2.0  $\mu\text{L}$ ，在展開後之顏色區塊長度相近，也都未超出紙噴灑游離區域，惟進樣量 1.0  $\mu\text{L}$  之理論板數較進樣量 2.0  $\mu\text{L}$  少，且變動量也較大。因此可以說明，在進樣量為 2.0  $\mu\text{L}$ 、展開液為 40.0  $\mu\text{L}$  時，本系統能夠有最好的層析分離效果，也表示在這個參數之下，可以有最好的檢測結果。

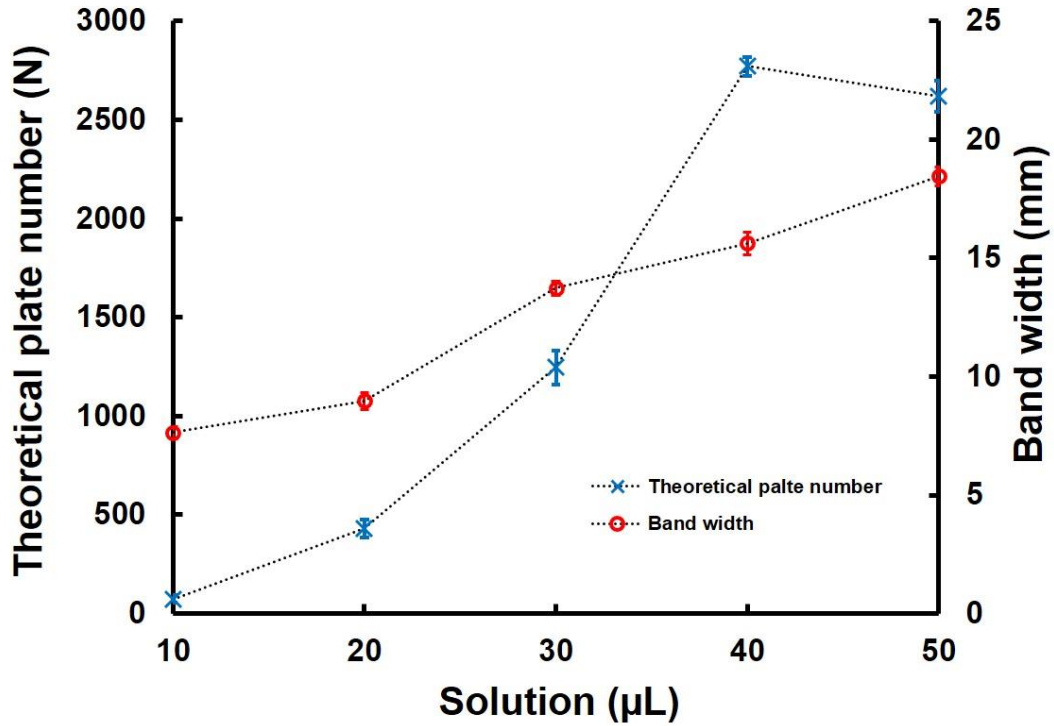


圖 4-3 固定進樣 2.0  $\mu\text{L}$  量下之不同展開液分離效果。在理論板數的表現上，層析分離效果在展開液 40.0  $\mu\text{L}$  時達到最高。展開的樣本寬度雖然在 50.0  $\mu\text{L}$  展開液條件下，達到最大的寬度，但是已經超過乘載紙片之感測區域，因此綜合這兩個條件，選定展開液之容量為 40.0  $\mu\text{L}$ 。

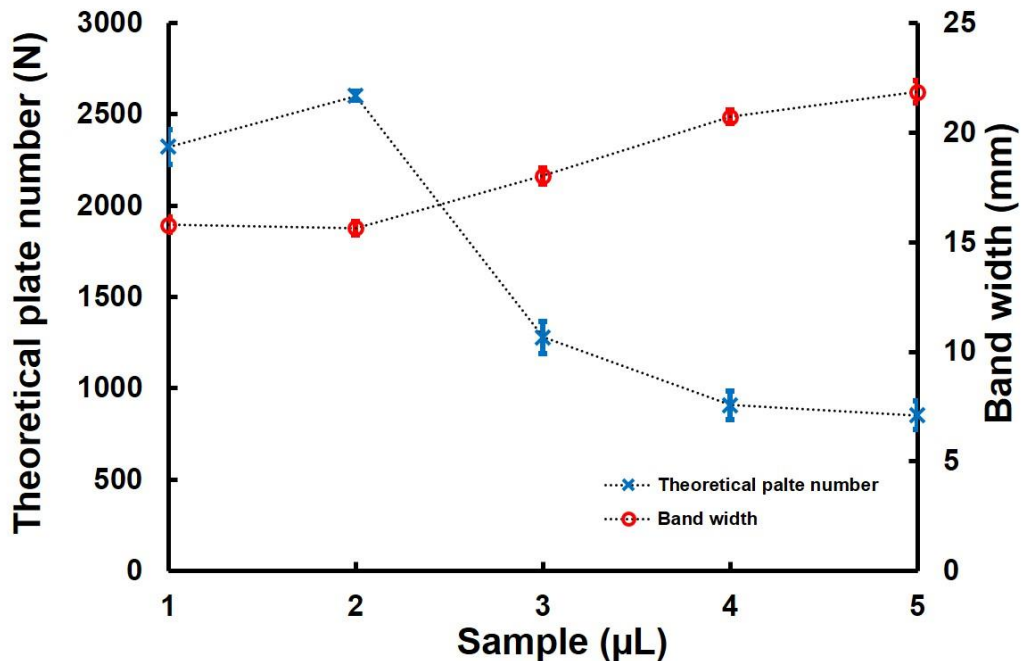


圖 4-4 固定展開液 40.0  $\mu\text{L}$  量下之不同進樣量分離效果圖。進樣量 2.0  $\mu\text{L}$  有著最高的理論板數值，與紙片感測區內展開之樣本寬度，因此決定進樣量為 2.0  $\mu\text{L}$ 。

### 4.3 檢測卡匣系統偵測極限

本小節將針對快速檢測卡匣之偵測極限，於本研究感測系統靈敏度影響進行探討。檢測極限對於一量測系統來說是相當重要的，而一個量測系統的好壞，通常也能夠從它的偵測極限來辨識，也就是該系統的檢測之解析度，其量測之範圍大小，都是檢測極限對於一個量測系統的意義與重要性。質譜儀操作參數如下：操作電壓 6.3 kV 由質譜儀提供、尖端距離質譜入口 5.0 mm、質譜入口毛細管溫度 250°C、質譜毛細管電壓 6.0 V、質譜通道偏移電壓 20.0 V。

偵測極限的實驗上，選定了維生素 B<sub>2</sub> 和對乙醯氨基酚(Acetaminophen)為樣品。首先使用維生素 B<sub>2</sub> 與去離子水，配置 10<sup>5</sup> ppb、10<sup>4</sup> ppb、10<sup>3</sup> ppb、10<sup>2</sup> ppb、10<sup>1</sup> ppb、10<sup>0</sup> ppb 等濃度，以供快速檢測卡匣系統進行偵測極限實驗。檢測順序由高濃度 10<sup>5</sup> ppb 到最低之 10<sup>0</sup> ppb，各濃度皆是由 Pipette 取 2.0 μL，滴定於紙片尖端上，施加紙噴灑輔助溶劑(甲醇水 1:1 溶液) 30 μL 後，接上電極即開始進行量測。

維生素 B<sub>2</sub> 之偵測極限量測結果如圖 4-5、4-7 所示，在高濃度的量測如預期般的高強度；直到 100 ppb，系統仍然有 10<sup>6</sup> ions/cm<sup>3</sup> 的離子訊號強度，表示本研究之快速檢測卡匣之解析度良好。鑒於質譜儀的偵測方式，質譜儀對於檢測濃度有著極高的靈敏度，只要待測物之訊號強度大於周邊背景訊號，那麼即使濃度再低，都可以被質譜儀偵測到。然而檢測至 10.0 ppb 和 1.0 ppb 時，正常的全離子掃描模式已不足以使用，維生素 B<sub>2</sub> 之特徵訊號出現遭到背景訊號干擾的現象，因此需要使用二次質譜法(MS/MS)，進行針對維生素 B<sub>2</sub> 之特徵訊號之量測，所幸系統之檢測能力，仍然可以將 10.0 ppb 和 1.0 ppb 之維生素 B<sub>2</sub> 成功游離，藉由二次質譜法的輔助，讓偵測極限得以推進至 1.0 ppb。但進一步再量測 0.1.0 ppb 之維生素 B<sub>2</sub> 時，即便使用二次質譜法，仍然未能得到訊雜比大於三之維生素 B<sub>2</sub> 之特徵訊號，是故可以推定，本系統之偵測極限就落在 1.0 ppb，如圖 4-7 所示。

為了確認系統之偵測極限是否落在 1.0 ppb，使用對乙醯氨基酚作為樣本，由相同之濃度區間，再進行一次檢測極限實驗。用去離子水與對乙醯氨基酚配置 10<sup>5</sup> ppb



至  $10^0$  ppb 等濃度之溶液，檢測順序由高濃度  $10^5$  ppb 到最低之  $10^0$  ppb，各濃度皆是由 Pipette 取  $2.0 \mu\text{L}$ ，滴定於紙片尖端上，施加紙噴灑輔助溶劑(甲醇水 1:1 溶液)  $30.0 \mu\text{L}$  後，接上電極即開始進行量測。檢測流程、質譜操作條件如同維生素 B<sub>2</sub> 檢測極限實驗，如此才有相同的比較基準。高濃度區的檢測表現和維生素 B<sub>2</sub> 一致，都具有  $10^6 \text{ ions/cm}^3$  的離子訊號強度，不同的是在於  $1.0 \text{ ppb}$  的量測，如圖 4-7 所示。雖然其他訊號仍有壓過對乙醯氨基酚特徵訊號之現象，仍然可以在圖譜中直接觀察到其特徵訊號，而不需要使用二次質譜法，表示本快速檢測卡匣，在  $1.0 \text{ ppb}$  的量測上，能夠有其直接性，不一定要透過二次質譜法的撞擊量測。

由上述之結果所繪製之系統偵測極限檢量線，如圖 4-7 所示，可以看到此區間就是本快速檢測卡匣之檢測範圍。即使濃度僅有  $1.0 \text{ ppb}$ ，系統離子訊號強度仍然有  $10^4 \text{ ions/cm}^3$ ，表示系統處在有效檢測的範圍，也顯示本快速檢測卡匣之游離能力，能夠在低濃度下運作，不受到待測物濃度之影響。而在圖 4-8 中可以觀察到，本系統在檢測極限檢測之訊雜比，濃度  $1.0 \text{ ppb}$  下維生素 B<sub>2</sub> 之特徵訊號，仍然有  $7.31 \text{ dB}$  以上之訊雜比，表示所得到之特徵訊號，是真實待測物特徵訊號，也是有效之訊號。

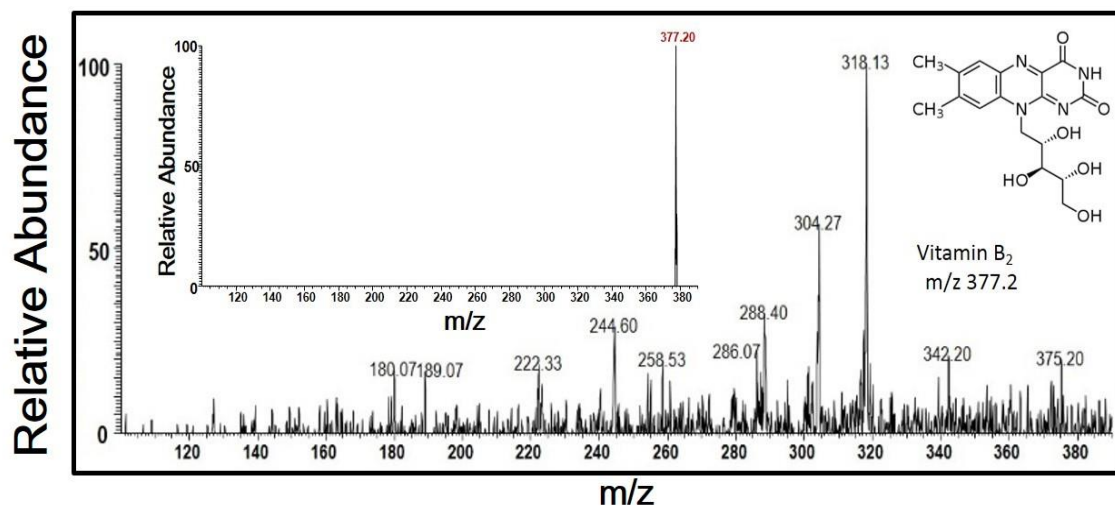


圖 4-5 維生素 B<sub>2</sub>  $1.0 \text{ ppb}$  量測質譜訊號圖。全掃描模式下已無法直接偵測到維生素 B<sub>2</sub> 之特徵訊號，因此需要使用二次質譜法，針對 B<sub>2</sub> 之特徵訊號進行偵測。

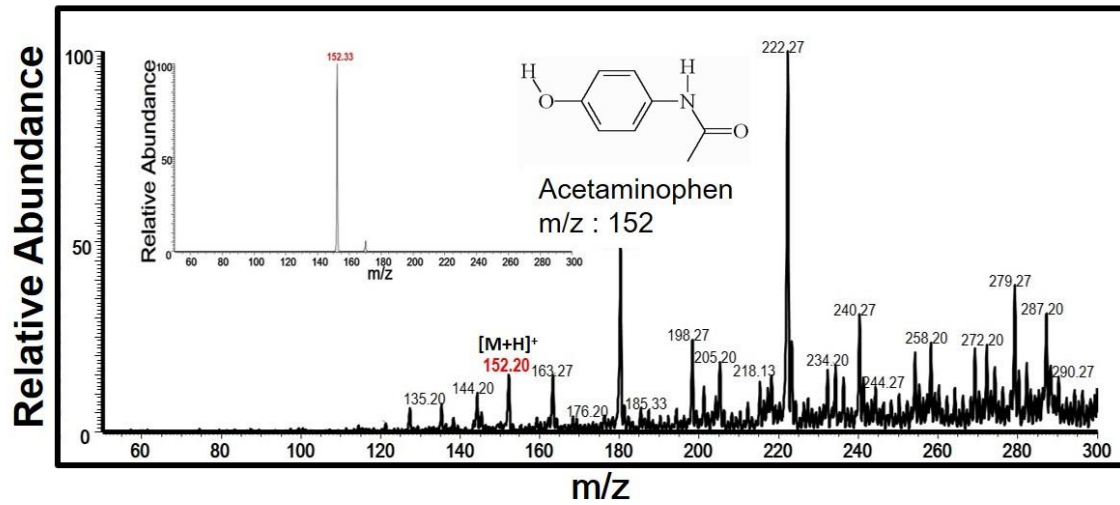


圖 4-6 對乙醯氨基酚 1.0 ppb 量測質譜訊號圖。全掃描模式下仍可以直接偵測到對乙醯氨基酚之特徵訊號，小圖為使用二次質譜法，針對對乙醯氨基酚之特徵訊號進行偵測。

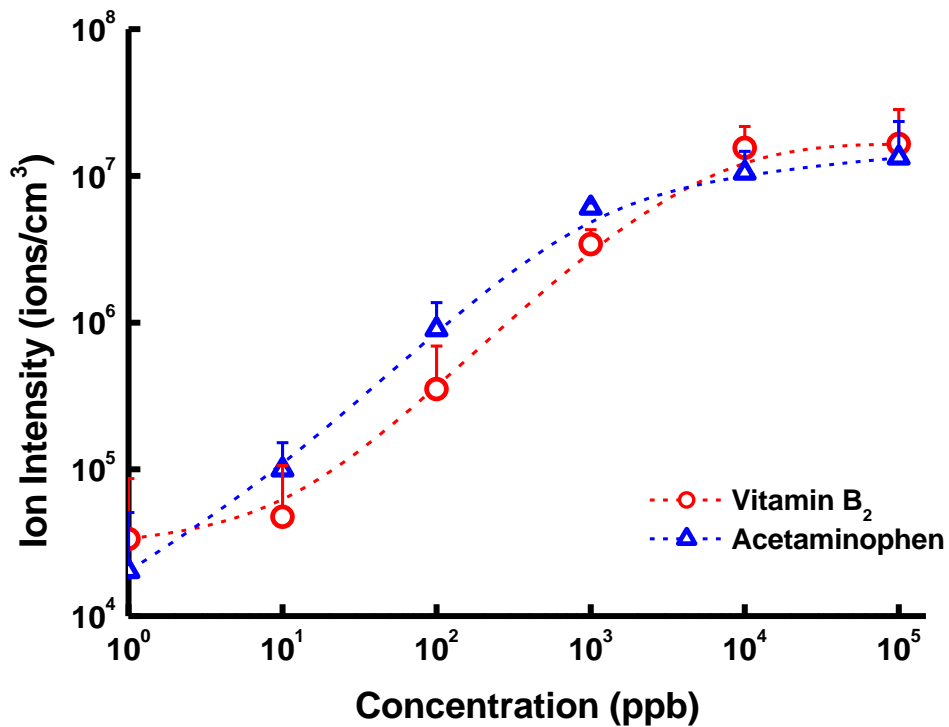


圖 4-7 快速檢測卡匣在維生素 B2 與對乙醯氨基酚之檢測極限檢量線圖。由於兩軸皆是对數座標，所以正標準差與負標準差相差了 10 倍。作圖的時候如果正負標準差都標示，會讓資訊有所誤差，所以只選擇標示正標準差。

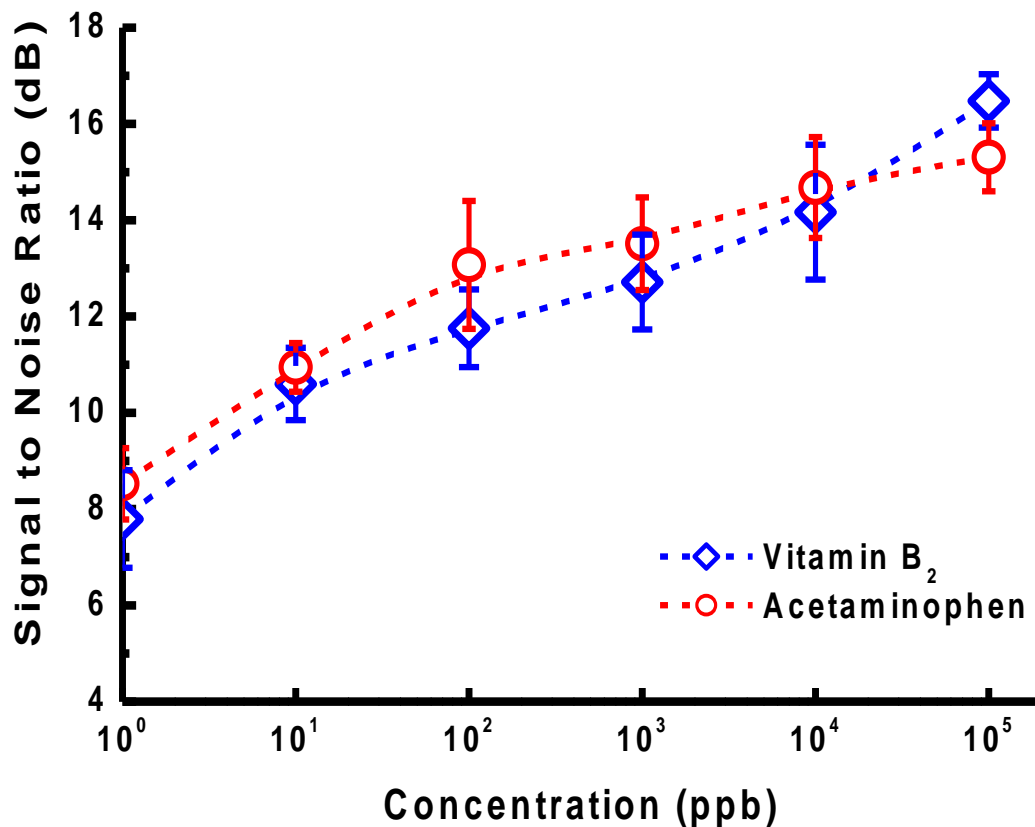


圖 4-8 快速檢測卡匣在維生素 B2 與對乙醯氨基酚之濃度與取樣訊雜比圖。100 ppb 以上之濃度檢測，所得到之訊雜比皆在 10 dB 以上，顯示本系統之檢測能力。

#### 4.4 紙層析分離後量測

在本研究中層析分離扮演著舉足輕重的角色，大大地影響著整個系統的檢測結果，因此本章節將針對本系統之紙層析分離效能進行測試，驗證紙層析分離確實能夠在卡匣上實現。透過第一維層析讓待測物中之成分分離後，再經由後端的質譜偵測不同的顏色區帶或是尖端，觀察層析分離是否確實將樣品分離，而得到其不同的特徵訊號。

第一個小節將使用標準藥品進行層析分離，透過自己調配濃度、比例與成分，先確立本系統之紙層析分離效能，能夠將混合之標準品成分分離，第二小節再接續利用天然物樣品進行驗證，是否層析分離的能力，同樣能在天然物中使用，這對於本研究是相當重要的，支撐整個研究的內容。質譜儀操作參數如下：操作電壓 6.3

kV(由質譜儀內部提供)、紙片尖端距離質譜入口 5.0 mm、質譜入口毛細管溫度 250°C、質譜毛細管電壓 0 V、質譜通道偏移電壓 0 V。

#### 4.4.1 標準藥品層析分離

為了驗證紙層析分離能在本系統上實現，首先取氯苯那敏和對乙醯氨基酚各 10.0 mg，分別溶入去離子水中配置成 100.0 mL 的溶液。由於這兩種標準藥品皆為透明溶液，因此需要再加入 1.0 mM 羅丹名 B 5.0 mL 染色，各取出 10.0 mL 混合備用。再取維生素 B<sub>6</sub> 的化合物吡哆醇(Pyridoxine)，與維生素 B<sub>3</sub> 化合物菸鹼醯胺(Nicotinamide)各 1.0 mg，分別以去離子水 100.0 mL 配置為溶液，再加入 1.0 mM 羅丹名 B 10.0 mL 染色，各取出 10.0 mL 混合備用；取亞甲基藍(Methylene blue)與甲基紫(methyl violet)各 1.0 mg，分別使用去離子水配置為 100.0 mL 的溶液，再將其混合。由於亞甲基藍和甲基紫皆為指示劑，因此不需要再特別染色，上述三組標準樣品，就是驗證紙層析分離實驗之樣品。

首先進行氯苯那敏和對乙醯氨基酚的層析分離，使用 Pipette 取 2.0  $\mu$ L 混合溶液，滴定於卡匣進樣區，等待乾燥後，即可進行層析。此實驗中所使用之展開液為丙酮混合正己烷 40.0  $\mu$ L，調配比例為 7.5:2.5(v/v)，於層析口使用 Pipette 滴定，層析後量測結果如圖 4-9 所示。

從圖中可以觀察到，隨著層析的過程中，對乙醯氨基酚的特徵訊號強度有了明顯的變化，由一開始微弱地在圖譜上出現，到了紙片的尾端，其強度已經超過了氯苯那敏特徵訊號的強度，證明了本紙層析分離系統，成功讓這兩個標準藥品被分離，僅在短短的三分鐘，就可以完成。

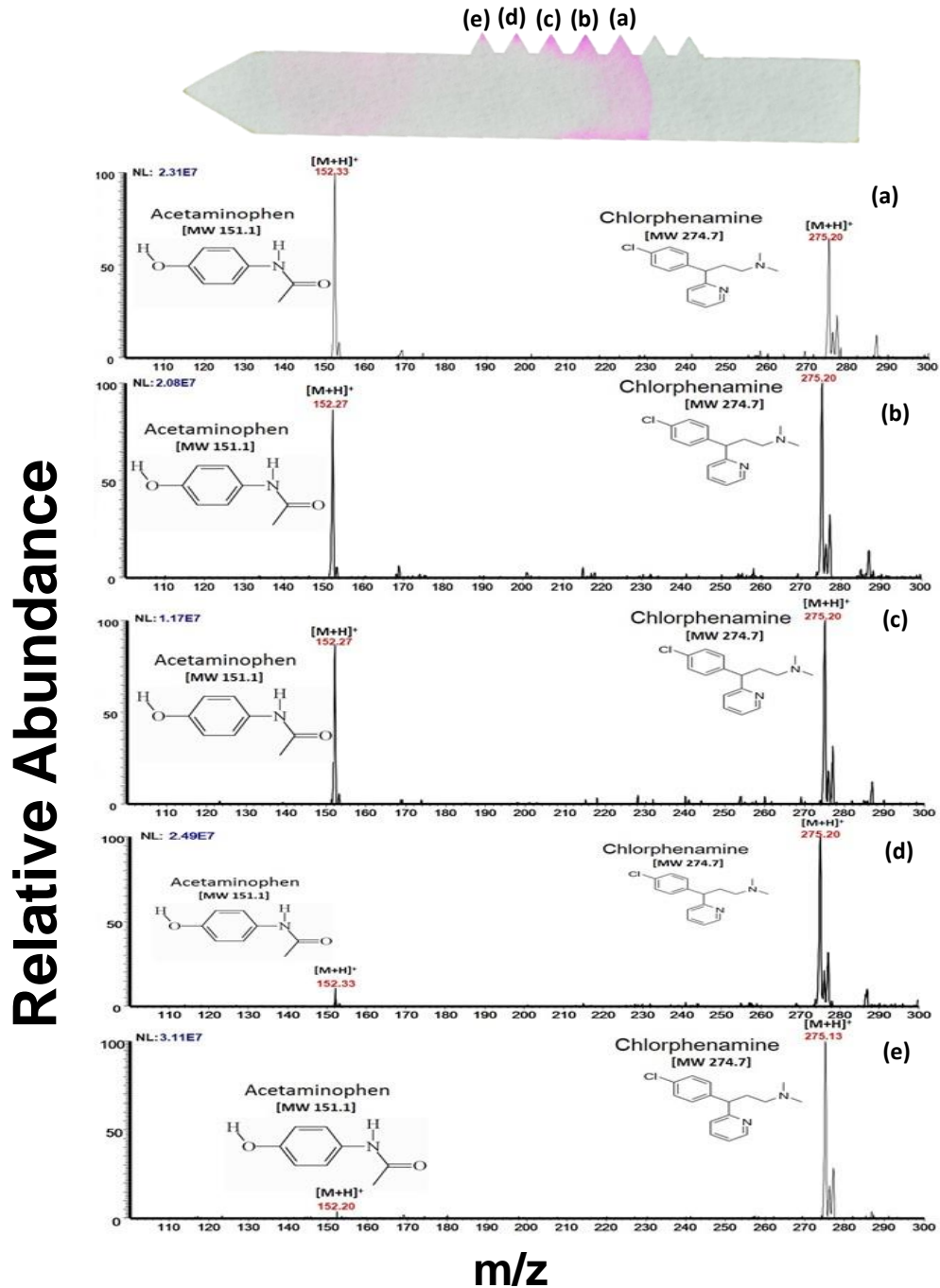


圖 4-9 快速檢測卡匣在氯苯那敏與對乙醯氨基酚之層析分離後量測圖。由圖(a)、(d)、(e)中可以觀察到明顯的訊號分布的差異，證明了兩個標準品被分離之結果。

成功分離對乙醯氨基酚與氯苯那敏後，再使用吡哆醇與菸鹼醯胺進行重複驗證。使用 Pipette 取 2.0  $\mu\text{L}$  混合溶液，滴定於卡匣進樣區，等待乾燥後，即可進行層析，展開液選用正己烷和丙酮混合溶液 40.0  $\mu\text{L}$ ，調配比例為 8:2(v/v)，由層析入口使用 Pipette 滴定，層析後量測結果如圖 4-10 所示。

從圖 4-10 中可以觀察到，除了前三個小圖受到羅丹名 B 訊號過強壓抑的影響外，圖(d)與圖(e)可以明顯地看到，吡哆醇與菸鹼醯胺的特徵訊號強度，各有此消彼漲。如此可以說明，本紙層析分離系統，的確有將吡哆醇與菸鹼醯胺成功分離，表示本卡匣之紙噴灑游離系統，並不會受到因為層析分離之後，樣品濃度下降的影響，仍然有著良好的游離效果。

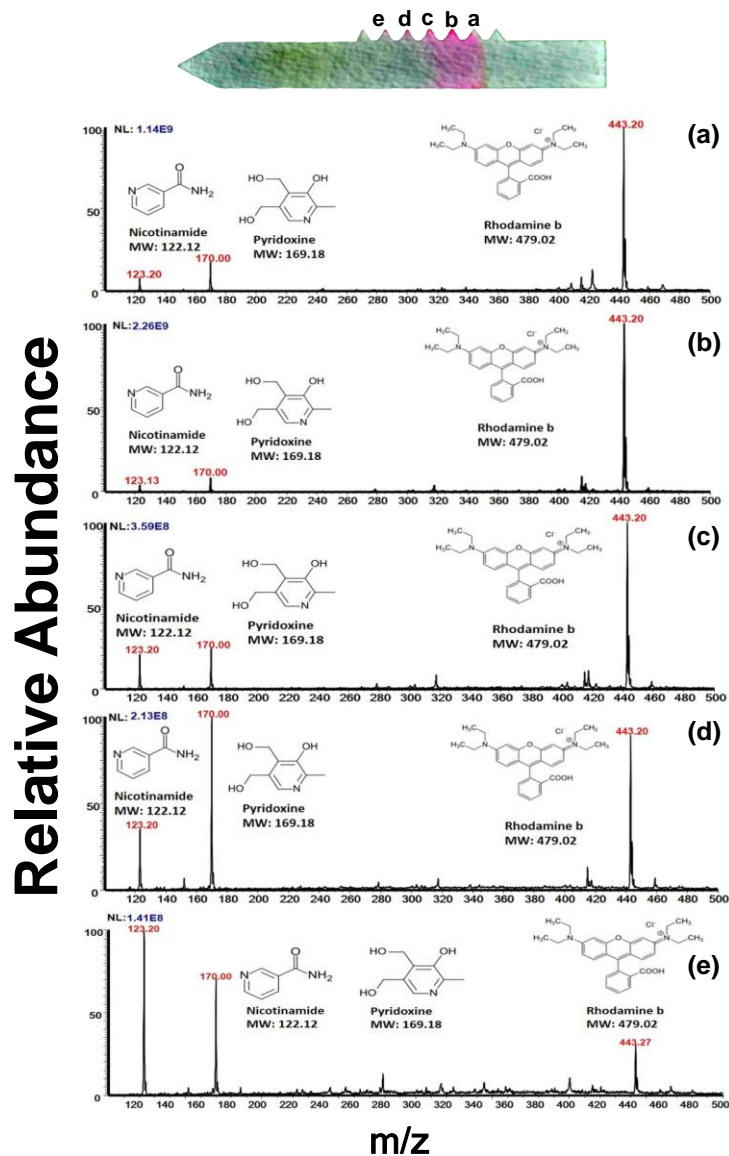


圖 4-10 快速檢測卡匣在吡哆醇與菸鹼醯胺之層析分離後量測圖。由圖(d)、(e)中可以看到兩者訊號之強弱變化，以此辨別層析分離之結果。

最後，選用甲基紫與亞甲基藍，進行第三組層析分離效能驗證，由於甲基紫與亞甲基藍具有指示劑的特性，本身即具有顏色又能被質譜所偵測，因此在後續的實驗中，將會再次使用為樣品，進行卡匣特性之驗證。用 Pipette 取 2.0  $\mu\text{L}$  混合溶液，滴定於卡匣進樣區，等待乾燥後即可進行層析，展開液選用全甲醇溶液 40.0  $\mu\text{L}$ ，層析後量測結果如圖 4-11 所示。

從圖 4-11 中可以觀察到，甲基紫與亞甲基藍分別被分為圖(a)的紫色色塊，與圖(b)中的淡藍色色塊，不僅在紙片上就能夠以肉眼觀察、分辨，透過紙噴灑游離後之質譜的檢測中，結果更為明顯。在各自的色塊中，都只有量測到其對應之特徵訊號[44]，圖譜中的甲基紫特徵訊號之 SNR 為 7.58 dB，亞甲基藍之特徵訊號之 SNR 為 10.14 dB。圖譜中之特徵訊號 SNR 計算選取方式為，特徵訊號之強度除以前後雜訊之平均訊號強度，商值再取十為底之對數後乘十倍，即為該特徵訊號之 SNR。

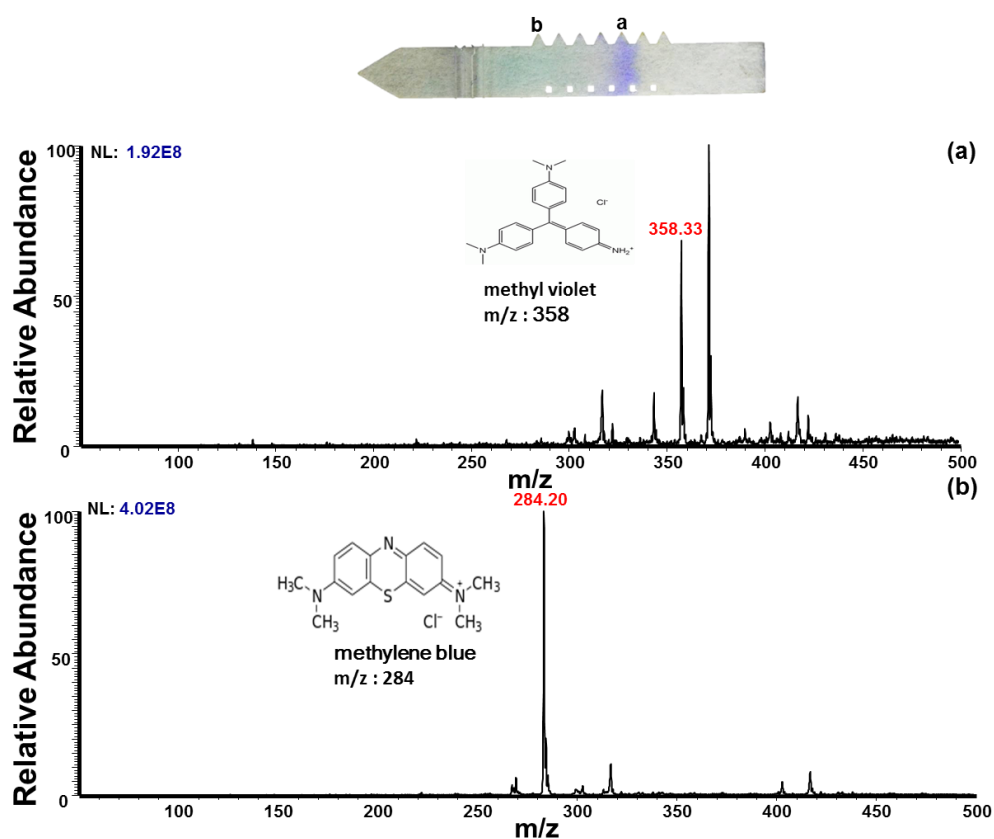


圖 4-11 快速檢測卡匣在甲基紫與亞甲基藍之層析分離後量測圖。由紙片上分布之顏色，與相對應之圖譜，(a)點即是甲基紫分離點，(b)點便是亞甲基藍。

由上述的三個實驗驗證中，可以明顯地觀察到，本紙層析分離系統成功地將三

組標準藥品層析分離，除了在紙片上可以觀察到顏色分布，在後端經由紙噴灑游離，進到質譜儀的檢測結果中，也能夠相對應出濾紙上的顏色區塊是哪個標準藥品。這些都充分顯示，本快速檢測卡匣之層析分離系統，具有高效能的樣品層析分離能力，在標準藥品分離上有著顯著的效果，替接下來所要進行的天然物層析分離，奠定了良好的基礎與範例。

#### 4.4.2 天然物層析分離

成功利用標準樣品驗證紙層析分離系統之效能後，將針對天然物樣本進行層析分離，以測試本紙層析分離系統，是否具有混合物之層析分離能力，實驗結果將在這個小節中呈現。質譜儀操作參數如下：操作電壓 6.3 kV(由質譜儀內部提供)、紙片尖端距離質譜入口 5.0 mm、質譜入口毛細管溫度 250°C、質譜毛細管電壓 6.0 V、質譜通道偏移電壓 20.0 V。

首先要萃取、配置天然物樣本，而本研究選用中草藥肉桂以及青蔥。使用天然物樣本之好處在於，大多的天然物本身都帶有顏色，因此樣本不需要經過染色，也無須擔心添加之染色劑的訊號干擾量測結果。取 10.0 mg 肉桂將其搗碎後，加入 50.0 mL 去離子水並稍作攪拌後，取出肉桂溶液放入離心管中，進行離心分離雜質，以轉速 1500 rpm 持續 5 分鐘。離心完成後，使用 Pipette 將上清液吸取出，再透過孔徑 5.0  $\mu\text{m}$  的濾紙過濾雜質後，即完成肉桂溶液樣品的製備與前處理。青蔥樣品溶液的製備與前處理，與肉桂大致上相同，不同之處在於青蔥的用量與溶劑。取蔥綠 10.0 g 剪成小段，加入 10.0 mL 酒精當作溶劑後，將其搗碎磨出汁液。酒精在於幫助溶解出青蔥內的葉綠素、胡蘿蔔素、葉黃素等，再經過離心、過濾後，青蔥溶液樣品也製備完成。

再來進行中草藥肉桂的層析分離，以 Pipette 取 2.0  $\mu\text{L}$  肉桂溶液，滴定於卡匣進樣區，等待乾燥後，即可進行層析。此實驗中所以使用之展開液為丙酮混合正己烷 40.0  $\mu\text{L}$ ，調配比例為 7:3(v/v)，於層析口使用 Pipette 滴定，層析後量測結果如



圖 4-12 所示。

從圖 4-12 中可以觀察到，肉桂中的揮發成分香豆精(Coumarin)、肉桂醛(Cinnamic aldehyde)、黃樟油素(Safrole)、丁香酚(Eugenol)等，都成功地被本系統層析分離，並且量測到其特徵訊號。觀察層析分離之結果，可以在紙片上看到深、淺黃色之區段，再分別針對這兩個區段進行紙噴灑游離，得到(a)、(b)兩張質譜圖，圖(a)中黃樟油素與肉桂醛之特徵訊號最為凸出，而圖(b)中僅剩肉桂醛之訊號仍然保有強度，如此可以說明肉桂中之成分，的確有被分離，在離子訊號強度上，可以明顯看到差異，這些都是證實本系統之層析分離成功之結果。

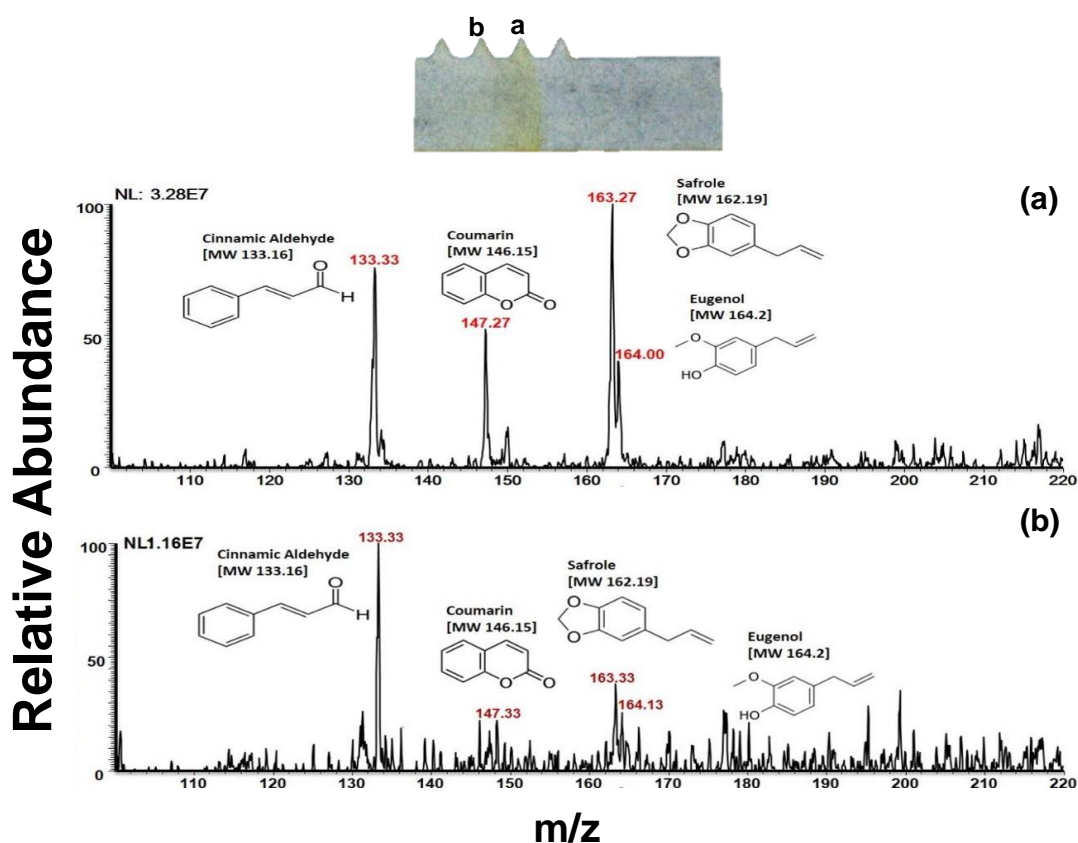


圖 4-12 快速檢測卡匣在中草藥肉桂之層析分離後量測圖。圖(a)量測到較完整之肉桂成分訊號，而圖(b)僅有肉桂醛強度較突出，以此作為分離成功之依據。

成功分離中草藥肉桂後，再使用青蔥進行重複驗證。使用 Pipette 取 2.0  $\mu$ L 混

合溶液，滴定於卡匣進樣區，等待乾燥後，即可進行層析，展開液選用正己烷和丙酮混合溶液 40.0  $\mu\text{L}$ ，調配比例為 8:2(v/v)，於層析口使用 Pipette 滴定，層析後量測結果如圖 4-13 所示。

從圖 4-13 中可以觀察到，紙片上有清楚的顏色區帶分布，選取兩個色帶進行檢測，最上方之胡蘿蔔素為低極性、脂溶性，因此無法在本架構下之紙噴灑游離被偵測，針對 a 點之量測結果顯示於圖(a)，偵測到了帶正一價電荷的葡萄糖加鉀離子，與葡萄糖加鈉離子之特徵訊號離子峰，強度都遠大於帶正一價電荷的蔗糖加鉀離子，與蔗糖加鈉離子之特徵訊號；而圖(b)的檢測結果，顯示了 b 點的色帶成分，恰巧與圖(a)情況相反，帶正一價電荷的蔗糖加鉀離子，與蔗糖加鈉離子之特徵訊號離子峰，強度遠大於帶正一價電荷的葡萄糖加鉀離子，與葡萄糖加鈉離子之特徵訊號。如此能夠說明，本卡匣之紙層析分離系統成功層析分離了青蔥之成分，量測之結果也與濾紙片上的色帶分布相關，證明了層析分離的結果正確，也代表著本層析分離系統，在標準品與天然物中都能夠發揮其效能，意即本研究開發之快速檢測卡匣，能夠分析、檢測天然物中之極性成分。

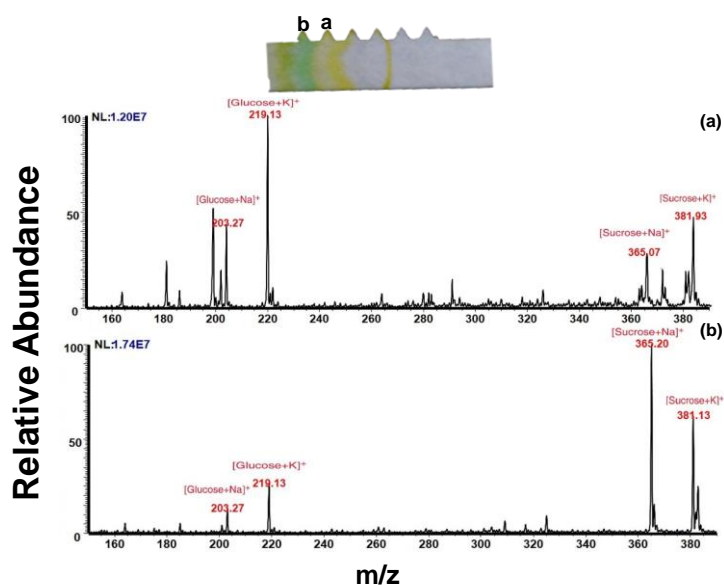


圖 4-13 快速檢測卡匣在青蔥之層析分離後量測圖。從圖(a)、(b)中可以觀察到，葡萄糖加鉀與葡萄糖加鈉，以及蔗糖加鉀和蔗糖加鈉之離子強度變化得知分離成效。

## 4.5 二維層析分離效能比較

本章節將探討一、二維層析作用於本快速檢測卡匣之影響，在檢測之解析度與強度上進行比較，彰顯層析分離對於本系統之重要性。在第一個小節中，以標準藥品與天然物，分別以搗碎直接量測與層析分離後之量測，作為相互對照、比較，驗證本系統之層析分離，確實能夠將混合物成分分離，提高系統檢測之靈敏度。第二小節中，將以本研究所提出的第二維層析濃縮之效果進行討論，針對標準藥品分別進行第一維與第二維之層析，藉此證明第二維層析對於檢驗結果，不論在強度與訊雜比都有大幅的提升。質譜儀操作參數如下：操作電壓 6.3 kV(由質譜儀內部提供)、紙片尖端距離質譜入口 5.0 mm、質譜入口毛細管溫度 250°C、質譜毛細管電壓 6.0 V、質譜通道偏移電壓 20.0 V。

### 4.5.1 直接量測與層析後量測比較

首先，使用標準藥品甲基紫與亞甲基藍作為樣品，分別配置 10.0 ppm 之溶液後將其混合。以 Pipette 吸取 2.0  $\mu$ L 後滴定於卡匣進樣口與紙片尖端，用以比較直接紙噴灑游離量測之結果，與使用甲醇層析分離後，再透過紙噴灑游離之結果，驗證本系統之層析是否能夠將混合物分離，並且再藉由紙噴灑脫附、游離與質譜檢測，實驗結果如圖 4-14、4-15 所示。

從圖 4-14 中可以觀察到，透過紙噴灑游離，成功地游離了甲基紫與亞甲基藍，也在圖譜中得到了這兩者的特徵訊號，且離子訊號強度與訊雜比都相當理想。但是這樣的直接量測方法，容易受到樣品中的濃度所影響，而造成待測物特徵訊號間，會有彼此壓抑之現象，使得訊號強度下降，讓檢測結果出現判讀的困難。為此，本系統之層析分離便能在此時有所作用，將混合物中之成分率先分離後，再分別針對分離出之部分，進行紙噴灑游離偵測，如此就能夠避免待測物之特徵訊號間，彼此訊號壓抑之情形。甲基紫與亞甲基藍層析分離之結果如圖 4-15 所示，紙片上之 a 點即是甲基紫被分離之位置，在其後端加上高電壓，進行紙噴灑游離，便能得到圖 4-15(a)之結果；而紙片上之 b 點就是亞甲基藍之位置，透過紙噴灑游離後，如圖 4-

15(b)所示。綜合以上之實驗結果，可以證實本系統之紙層析分離，確實能將混合物分離，並且再藉由紙噴灑游離量測，分離之後的離子訊號強度與訊雜比，都優於直接量測者，表示紙層析分離有助於提升檢測之解析度與靈敏度。

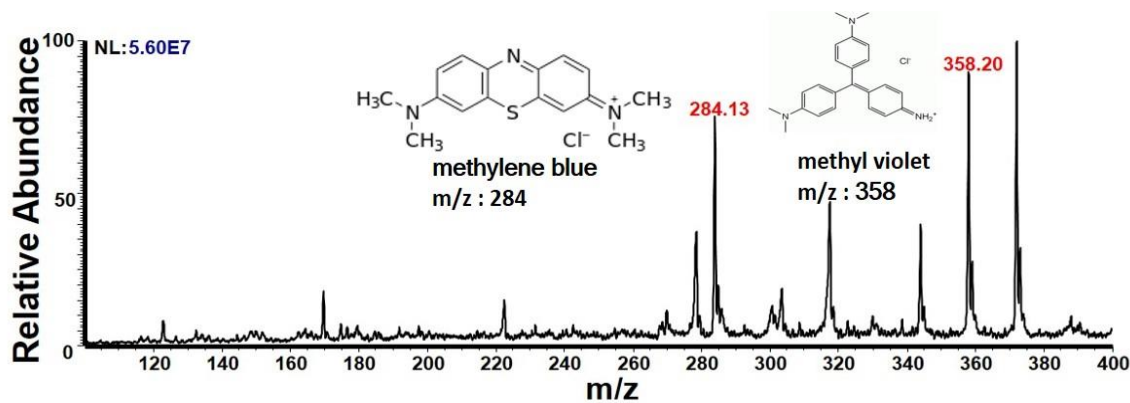


圖 4-14 甲基紫與亞甲基藍未經層析分離直接量測之質譜圖譜

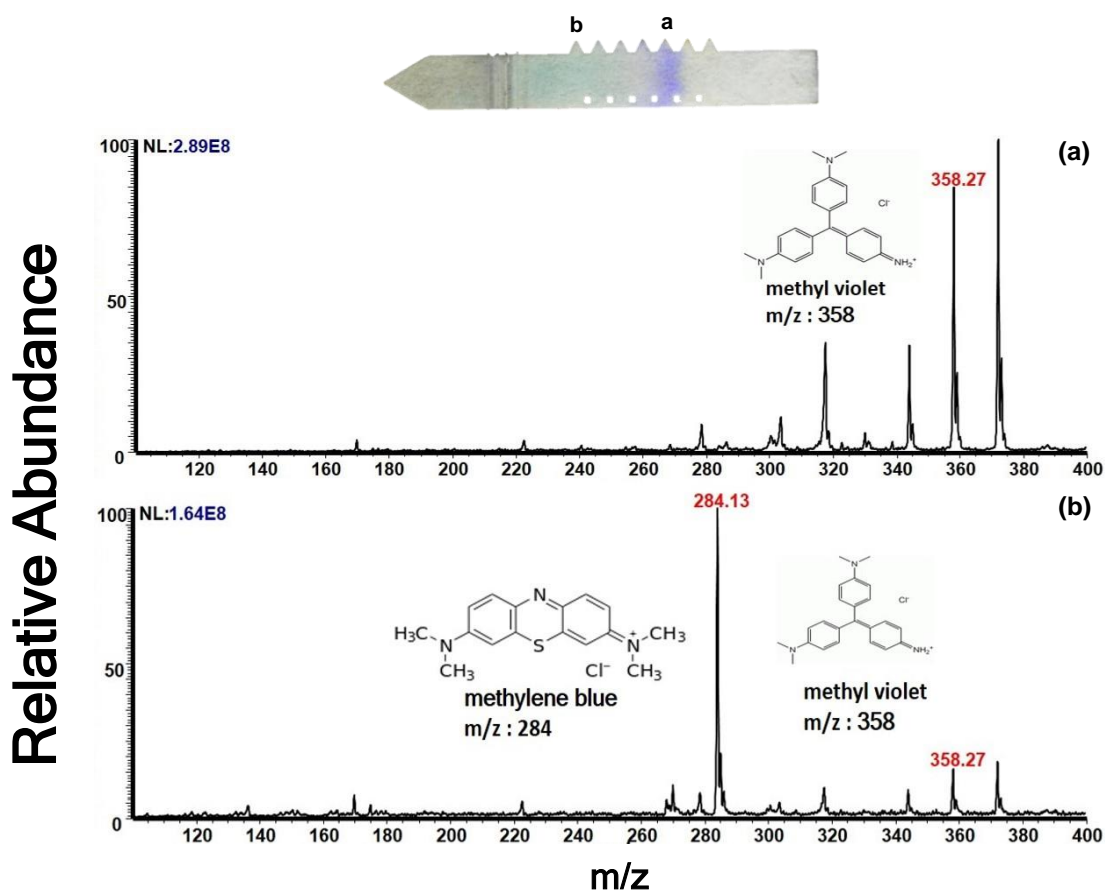


圖 4-15 甲基紫與亞甲基藍經層析分離後之質譜圖譜。由紙片上分布之顏色，與相對應之圖譜，(a)點即是甲基紫分離點，(b)點便是亞甲基藍。

標準藥品的比較成立後，接下來選用青蔥作為天然物樣本，進行層析分離效能的驗證，證明紙層析分離系統在天然物樣本也能夠運作。取 5.0 g 之青蔥蔥綠部分，將其搗碎並加入 5.0 mL 酒精配置成溶液，隨後用 Pipette 吸取 2.0  $\mu\text{L}$  後滴定於卡匣進樣口與紙片尖端，用以比較直接紙噴灑游離量測之結果，與使用正己烷與丙酮 8:2(v/v) 層析分離後，再透過紙噴灑游離之結果，驗證本系統之層析是否能夠將混合物分離，並且再藉由紙噴灑脫附、游離與質譜檢測，實驗結果如圖 4-16、圖 4-17 所示。

從圖 4-16 中可以觀察到，透過紙噴灑游離，成功地游離了青蔥，也在圖譜中得到了其特徵訊號( $[\text{Glucose}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{Glucose}+\text{K}]^+$ 、 $[\text{Sucrose}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{Sucrose}+\text{K}]^+$ ) [54]，且離子訊號強度與訊雜比都相當理想。層析分離之結果如圖 4-17 所示，紙片上之 a 點即是 $[\text{Glucose}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{Glucose}+\text{K}]^+$ 被分離之位置，在其後端加上高電壓，進行紙噴灑游離，便能得到圖 4-17(a)之結果；而紙片上之 b 點為 $[\text{Sucrose}+\text{Na}]^+$ 、 $[\text{Sucrose}+\text{K}]^+$ 被分離之位置，透過紙噴灑游離後，如圖 4-17(b)所示，綜合以上之實驗結果，可以證實本系統之紙層析分離，確實能將混合物分離，並且再藉由紙噴灑游離量測，分離之後的離子訊號強度與訊雜比，都優於直接量測者，表示紙層析分離有助於提升檢測之解析度與靈敏度。

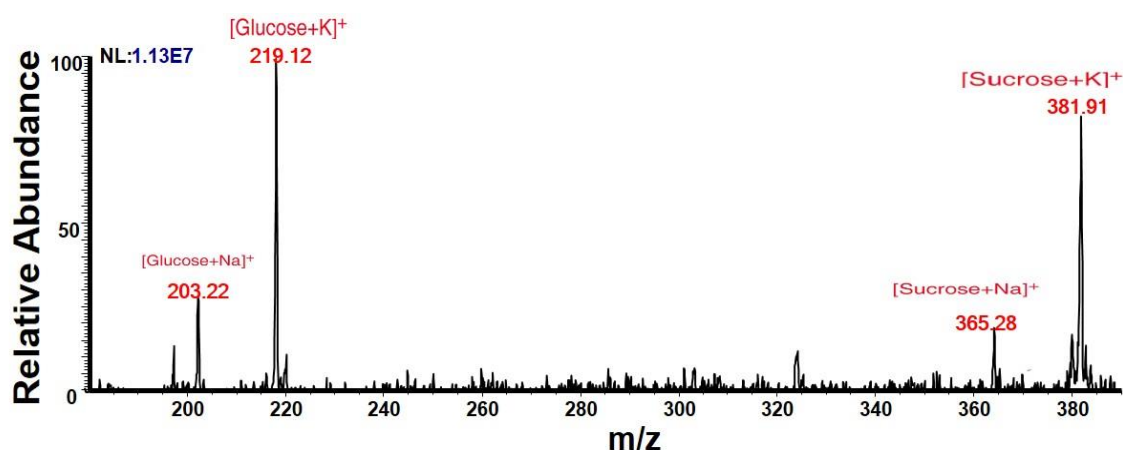


圖 4-16 青蔥未經層析分離直接量測之質譜圖譜

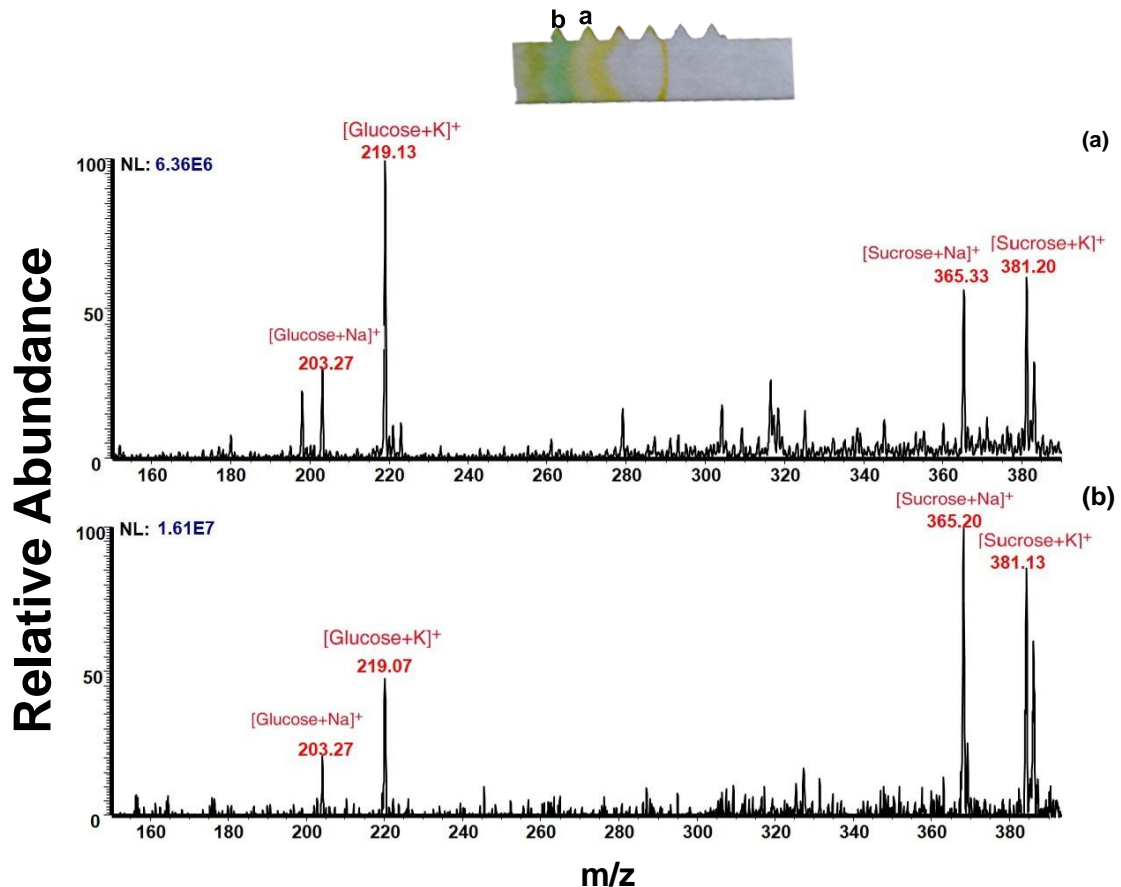


圖 4-17 青蔥經層析分離後之質譜圖譜。從圖(a)、(b)中可以觀察到，葡萄糖加鉀與葡萄糖加鈉之強度有明顯的變化，與蔗糖加鉀和蔗糖加鈉強度變化相反，因此能夠說明層析分離成功。

#### 4.5.2 一、二維層析後量測比較

在本小節中，將會介紹本研究所使用之第二維層析，並藉由實驗結果，直接將其作用與效能表現出來。樣品選用甲基紫，將其備製為 10.0 ppm 之溶液，用 Pipette 吸取 2.0  $\mu\text{L}$  後滴定於卡匣進樣口，隨後進行第一維層析，一維層析後再進行第二維之層析，用以比較一、二維層析後量測之結果。透過紙噴灑游離之結果，驗證本系統之二維層析是否能夠將待測物訊號濃縮，並且藉由紙噴灑脫附、游離與質譜檢測，達到提升待測物訊號強度之效果，實驗結果如圖 4-18、4-19 所示。

由圖 4-18 與圖 4-19 之結果，可以比較得知，經過第二維層析之甲基紫離子訊

號強度高達  $10^9$  ions/cm<sup>3</sup>，並且雜訊更是幾乎被壓抑，而此第二維層析濃縮之操作時間僅需要兩分鐘，表示不需要冗長的處理時間，就能夠讓該離子訊號強度大幅提升，也可以將背景雜訊之影響降到最低，如此可以避免待測物濃度低，而影響量測結果。因此，若在第一維層析後之量測中，有待測物訊號遭到壓抑的現象時，便可以透過第二維的層析濃縮，讓待測物因為層析分離而降低之濃度能再回復狀況，並且讓顏色分布由條狀分布轉變為集中紙片尖端，使待測物之訊號得以獲得濃縮、提升，也能在顏色與分布上，有相當直觀的畫面。於圖 4-20 中便能夠清楚看到，在兩分鐘內所得到之二維層析後量測訊號強度，隨著時間的推移，也讓甲基紫慢慢地往紙片尖端移動，此一現象能夠在離子訊號強度上，明顯地觀察到，這便是第二維層析濃縮可以有效地提升檢測效能，最為有力且直接之證據。除此之外，由圖 4-18、4-19 中，訊雜比的提升也是觀察的重點，經過了第二維濃縮之後，圖 4-19 中甲基紫特徵訊號之 SNR 提升至 10.48 dB，較圖 4-18 中之 SNR 6.05 dB 高出了 1.73 倍，可以說明濃縮待測物訊號的效果，藉此提升待測物之離子訊號強度外，也能夠降低背景訊號之干擾，增進檢測的效能與靈敏度。

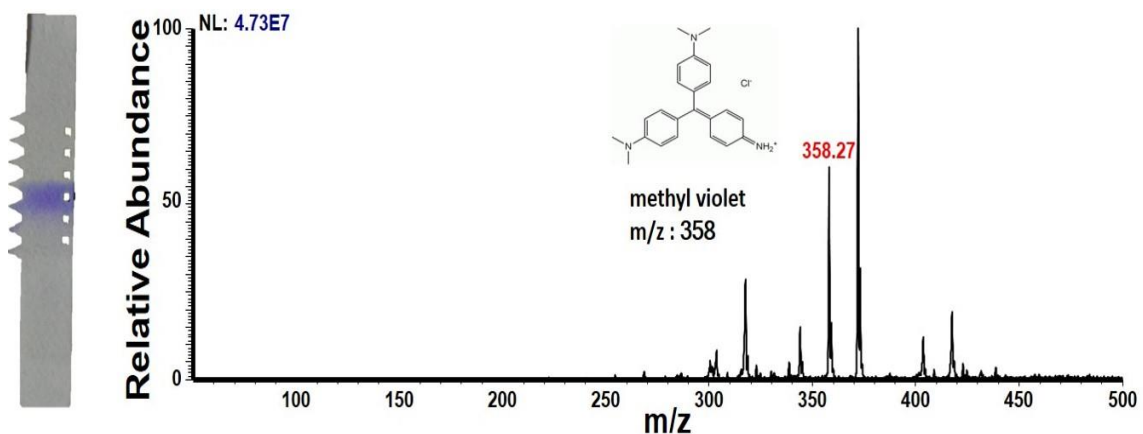


圖 4-18 甲基紫經第一維層析分離後之質譜圖譜

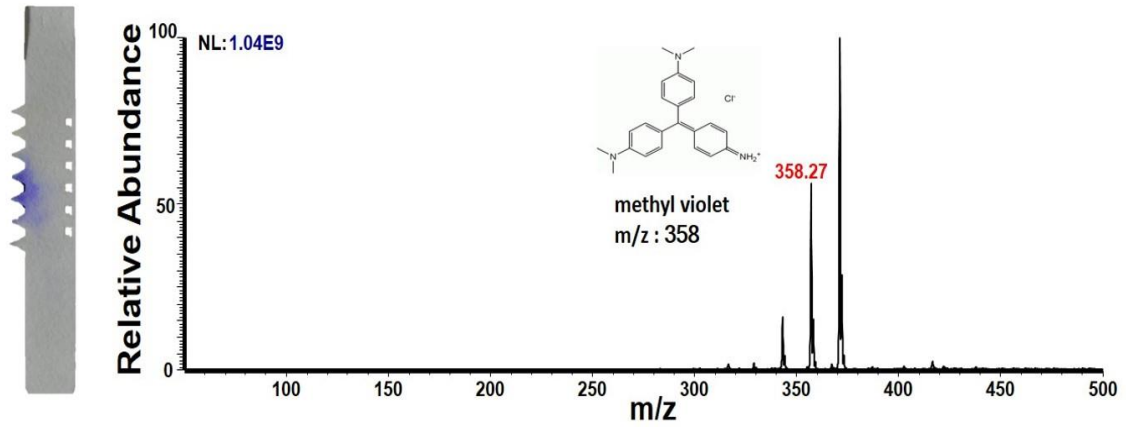


圖 4-19 甲基紫經第一維層析分離與第二維層析濃縮後之質譜圖譜

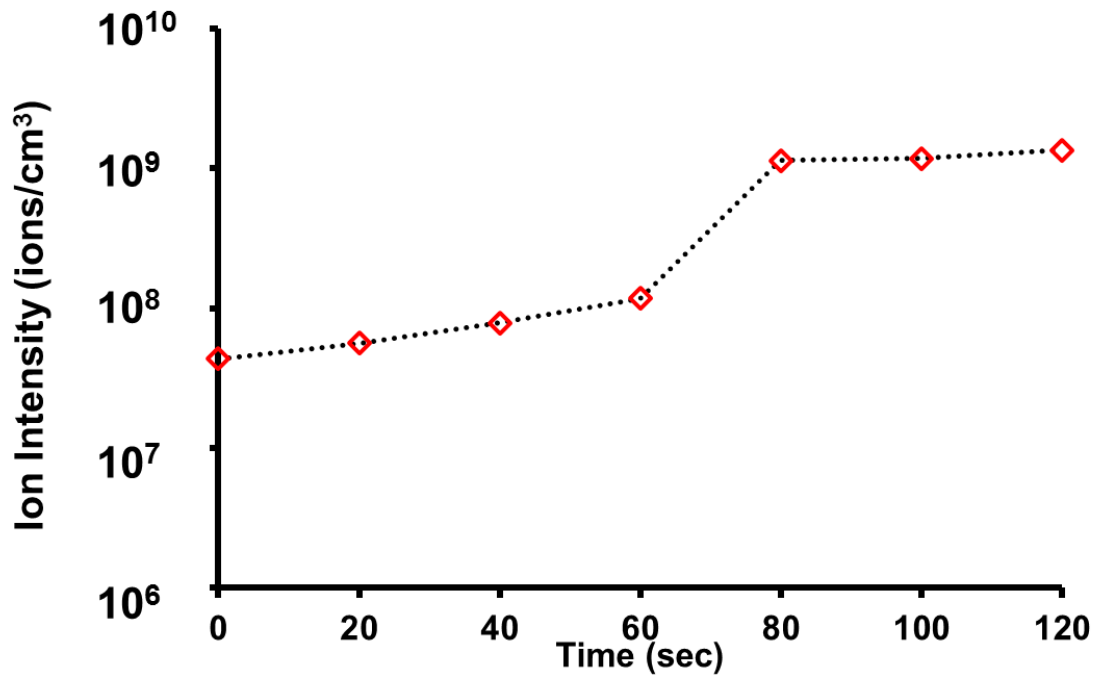


圖 4-20 甲基紫經第一維層析與第二維層析後量測之離子訊號強度比較圖。第二維層析兩分鐘過程中，經過第一分鐘之濃縮後，離子訊號強度達到  $10^9$  ions/cm<sup>3</sup>，離子強度增強了 100 倍。



## 4.6 天然物快速檢測

為了顯示本快速檢測卡匣之功能與最終目標，天然物的快速檢測是必須的。在前面的章節中，可以看到本系統在標準品與天然物中，顯示出良好特性。在這個章節中，量測了多種天然物樣品，例如大蒜、當歸、川芎等，並且都有良好的偵測結果，驗證本系統在天然物中仍然可以運作。質譜儀操作參數如下：操作電壓 6.3 kV(由質譜儀內部提供)、紙片尖端距離質譜入口 5.0 mm、質譜入口毛細管溫度 250°C、質譜毛細管電壓 0 V、質譜通道偏移電壓 0 V。

首先量測飲食中常見的大蒜，取 5.0 g 大蒜將其搗碎加入去離子水 10 mL，隨後進行離心、取上清液，使用 Pipette 吸取 2.0  $\mu$ L，滴定於卡匣上，直接進行電噴灑游離，得到結果如圖 4-21 所示。從圖譜中可以觀察到，大蒜中的大蒜素(Allicin)清楚在圖譜中呈現，且訊號之訊雜比為 5.61 dB，表示本系統成功將大蒜游離，並偵測到其特有的大蒜素特徵訊號離子峰。

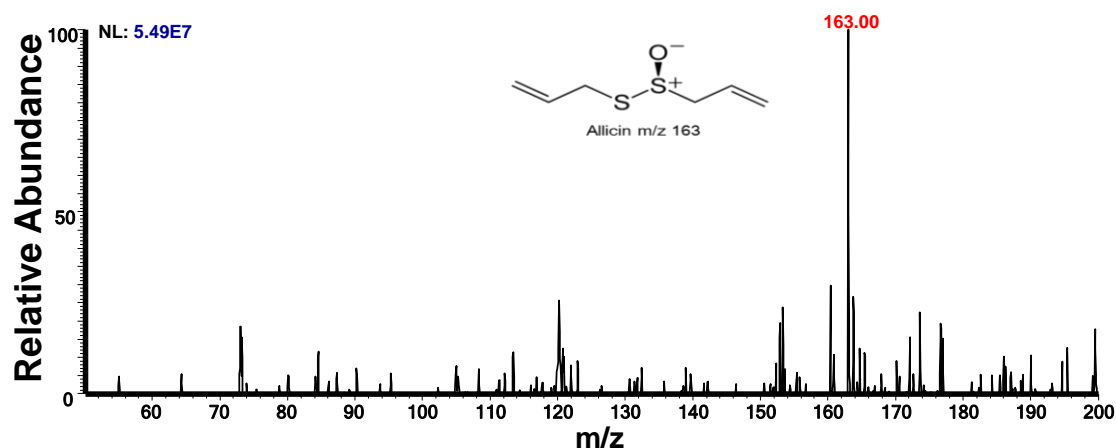


圖 4-21 大蒜直接量測圖譜

成功量測大蒜後，選用中草藥當歸、川芎、肉桂，不同於大蒜，中草藥中通常富含複雜成分，需要良好的游離效能，才能得以將其游離並偵測。將當歸、川芎、肉桂各取 5.0 g，分別搗碎加入去離子水，經過離心、萃取後，使用 Pipette 吸取 2.0

μL，滴定於卡匣上，直接進行電噴灑游離，得到結果如圖 4-22~24 所示。

從圖中可以觀察到，當歸中特有的藁本內酯(Ligustilide)、丁烯基酞內酯(Butylidene phthalide)，川芎中的丁烯基酞內酯(Butylidene phthalide)、藁本內酯(Ligustilide)、阿魏酸(Ferulic acid)、4,5-二氫-3-丁基苯(4,5-dihydro-3-butylphthalide)，以及肉桂中的香豆精(Coumarin)、肉桂醛(Cinnamic aldehyde)、黃樟油素(Safrole)、丁香酚(Eugenol)[65]，都成功地被本系統游離且偵測，顯示本研究開發之快速檢測卡匣之檢測效能，不僅在標準藥品有良好的表現，在天然物的量測也同樣能夠勝任。

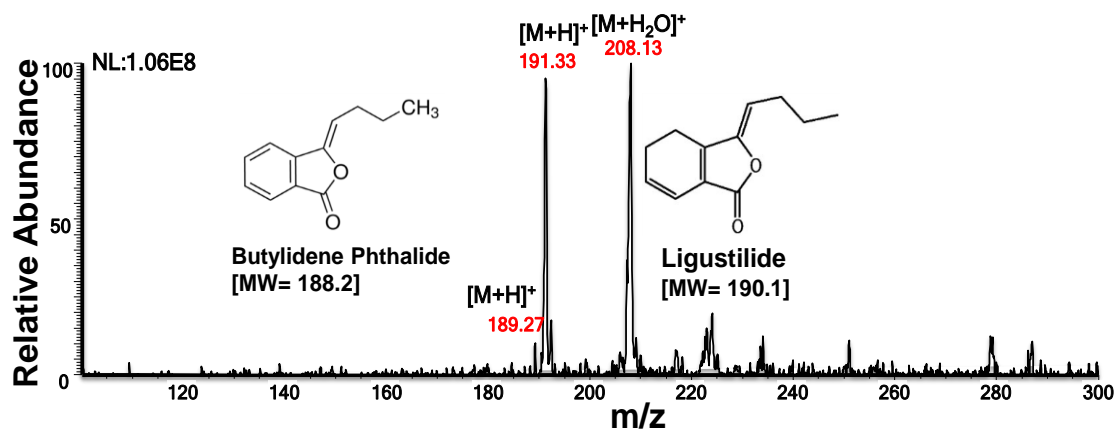


圖 4-22 中草藥當歸直接量測圖譜

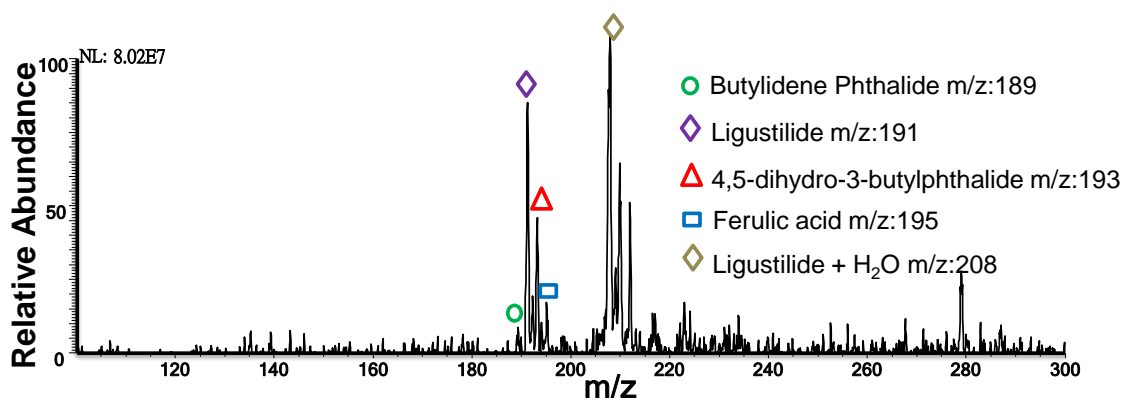


圖 4-23 中草藥川芎直接量測圖譜。量測到川芎的揮發性成分，如丁烯基酞內酯、藁本內酯、阿魏酸以及 4,5-二氫-3-丁基苯訊號。

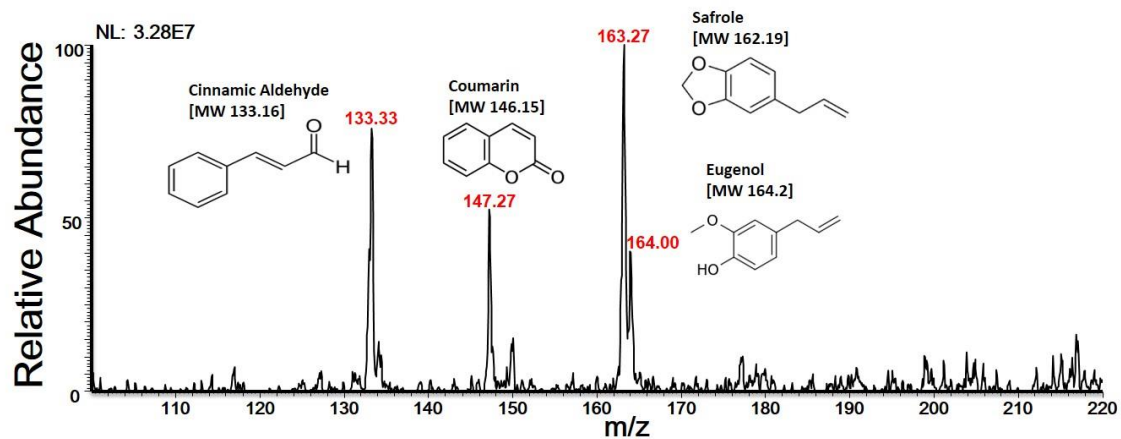


圖 4-24 中草藥肉桂直接量測圖譜。量測到肉桂的揮發成分特徵訊號，如香豆精、肉桂醛、黃樟油素以及丁香酚。

#### 4.7 天然物農藥快速檢測

這個章節分為兩個部分，第一個部分是使用已知濃度之農藥(巴拉刈)，摻雜到大蒜溶液中，藉此模擬農藥殘留，也能夠驗證本快速檢測卡匣，是否能夠成功偵測；第二部分則為直接量測天然物(青蔥)，選用購買自市場的青蔥，分別針對不同部位進行量測，檢測是否有農藥殘留。質譜儀操作參數如下：操作電壓 6.3 kV(由質譜儀內部提供)、紙片尖端距離質譜入口 5.0 mm、質譜入口毛細管溫度 250°C、質譜毛細管電壓 6.0 V、質譜通道偏移電壓 20.0 V。

首先，取用市售之茶包一個，加入 100 mL 去離子水後將其煮沸，隨後待其冷卻後加入 10.0 ppm 之巴拉刈 1.0 mL，將兩者混合後以 Pipette 吸取 2.0  $\mu$ L，滴定於卡匣進樣口，使用丙酮與正己烷比例 9:1(v/v)之溶液為展開液，層析後進行電噴灑游離，得到結果如圖 4-25~26 所示。

在圖 4-25 中，可以觀察到茶葉中的咖啡因(Caffeine)與茶胺酸(L-theanine)，清楚地圖譜中出現，但是巴拉刈(Paraquat)訊號卻沒有辦法看到，於是再進行第二次層析，濃縮濾紙上之訊號，結果如圖 4-26 所示。經過濃縮之後，針對每個尖端進行量測，由於巴拉刈在分離過程中，很快地就被分離出，所以在最下方之尖端檢出巴拉刈訊號，如此證明本系統之第二維層析之效能，同時也表示本系統能夠檢測到農藥 0.1 ppm 的殘留。

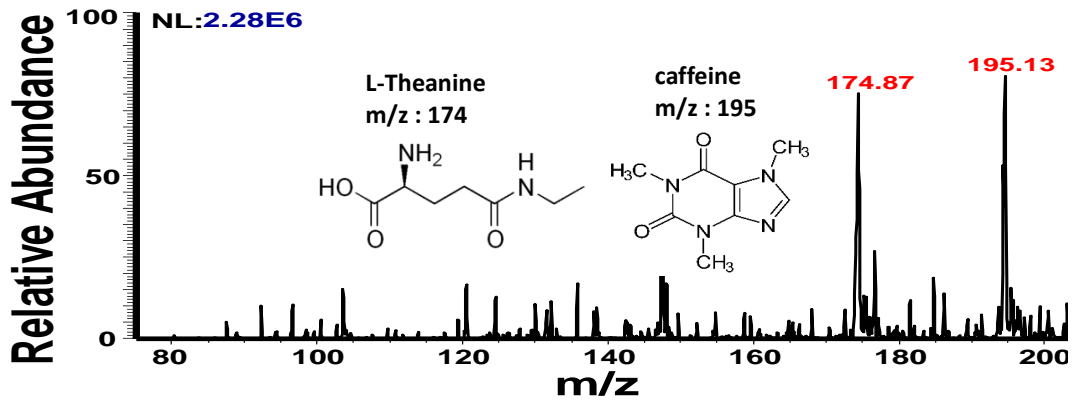


圖 4-25 茶葉摻雜 10.0 ppm 巴拉刈經第一維層析後量測圖譜。針對顏色分不明顯之尖端進行電噴灑游離，量測到茶葉中之咖啡因與茶胺酸特徵訊號。

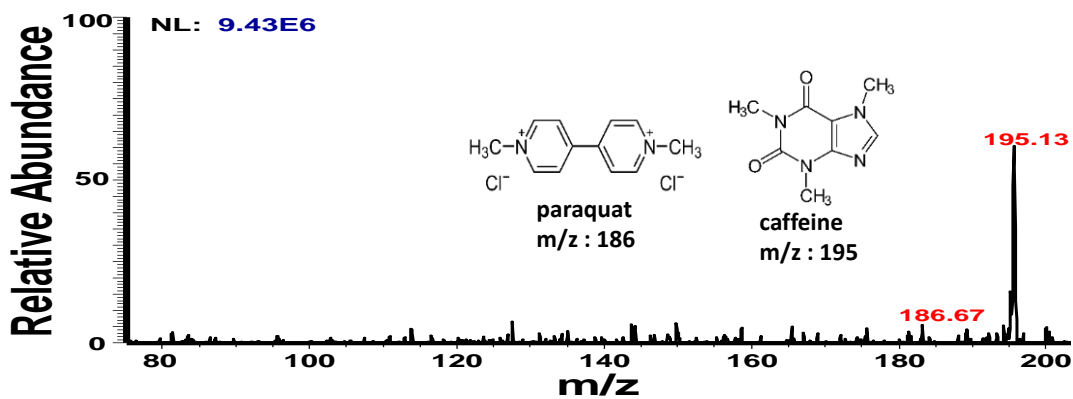


圖 4-26 茶葉摻雜 10.0 ppm 巴拉刈經第二維層析後量測圖譜。由層析終止之尖端開始量測，最後於最下方之尖端，量測到茶葉中之咖啡因特徵訊號之外，還檢測出摻雜之農藥巴拉刈訊號。

成功量測摻雜在茶葉中之巴拉刈後，驗證了本快速檢測卡匣之檢驗能力，進行量測於市場購買之青蔥。在未經過清洗下，直接將蔥綠、蔥白、蔥中段各取 5.0 g，將其搗碎加入去離子水，經過離心、萃取後，使用 Pipette 吸取 2.0  $\mu$ L，滴定於卡匣上，直接進行電噴灑游離，得到結果如圖 4-27 所示。

在圖中可以觀察到，除了青蔥原有之特徵訊號外，還檢測到了伏寄普 (Fluazifop-butyl) 與派美尼 (Pyrimethanil)。前者是俗稱新萬帥的除草劑，後者則是俗

稱施卡樂的殺菌劑，除草劑顧名思義是為了除草，會在稀釋調配後，加入灌溉水中，去除雜草的生長；而殺菌劑的功用在於抑制灰黴病的發生，所以會採取噴灑的方式。將上述農藥的用途與使用方式，與實驗結果對照之下，完全能夠相對應，派美尼是透過噴灑，因此蔥白部分並沒有檢測到，而伏寄普採取水中施放，經由根部毛細作用力向上流動，所以三個部分皆有檢出，末端的蔥綠吸收最少，所檢出之強度也最低。檢測結果與檢出之農藥功用相互對照，使得實驗結果更加合理。

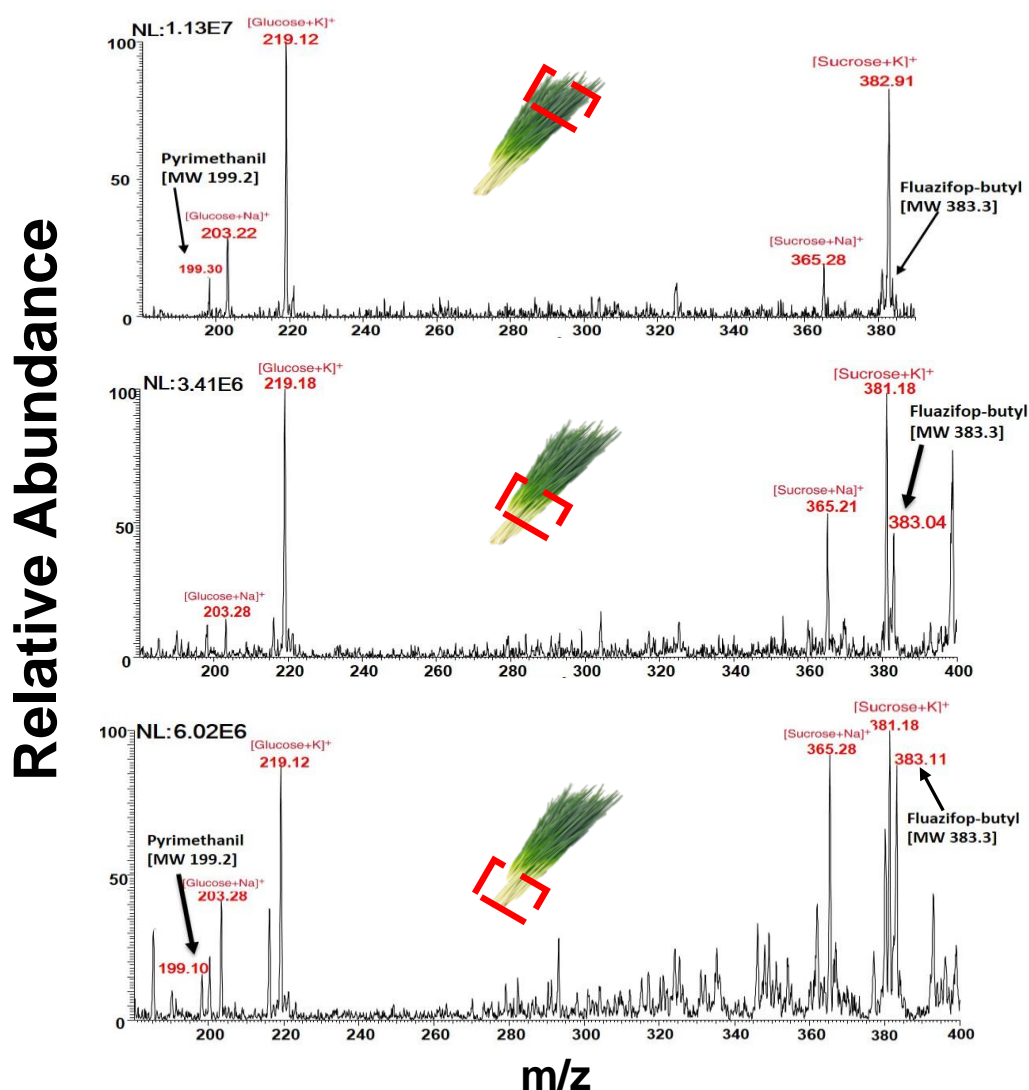


圖 4-27 青蔥之蔥綠、蔥白與兩者交界處之量測圖譜。從三個圖譜中可以觀察到，其伏寄普、派美尼殘留分布與其功效、用途，能夠相互對應且應證。

## 第五章 結論與未來展望

### 5.1 結論

本研究成功開發快速檢測卡匣系統，將檢測卡匣結合電噴灑游離法，使得本系統可以更快更有效率的得到檢測結果，相較於傳統的檢測方式，大幅減少了檢測時間與成本，讓此系統能夠更加普及。此外，本研究提出的二維層析，包括了第一維層析分離、第二維層析濃縮，幫助此快速檢測卡匣得以分析複雜的混合物，透過一維的層析過後，順利將混合物中的成分分離開來，再以第二維的層析濃縮，把分離開之混合物成分，往紙片尖端推移，使其提升電噴灑游離之效率，進而讓質譜可以順利偵測，也能夠提高該待測物特徵訊號之離子強度。


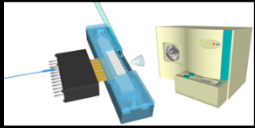
為了驗證本研究開發之快速檢測卡匣之性能，設計並進行了許多實驗，用以證實本系統之效能與可行性，得到的結果如下：

- (一) 首先確定紙片與卡匣尺寸，在電場梯度  $1.26 \times 10^6$  V/m 之條件下，量測紙片電噴灑霧化噴灑角度，與得到之離子強度，決定了紙片尖端為  $60^\circ$  之紙片，其擁有高達  $10^{10}$  ions/cm<sup>3</sup> 之離子訊號強度，並且能夠持續兩分鐘以上。再針對本系統之偵測極限，使用了兩種不同之標準藥品進行檢測，皆可成功測得 1.0 ppb 之樣本濃度結果，且於二次質譜撞擊後，其訊號訊雜比高於 7.31 dB。
- (二) 為要驗證本快速檢測卡匣之層析分離能力，分別於標準藥品與天然物中，都進行了層析分離後之量測。在直接量測與一維層析分離比較中，能明顯地觀察到，透過第一維層析分離後，混合的標準藥品成分被成功分離且偵測。天然物的層析分離也得到了良好的結果。第一維層析功能得到驗證後，隨即進行第二維層析，選擇甲基紫與亞甲基藍混合溶液，經過了二維之濃縮後，可以得到明顯上升之離子訊號強度，足足提升了 100 倍，由  $10^7$  ions/cm<sup>3</sup> 增強為  $10^9$  ions/cm<sup>3</sup>，並且 SNR 也由原先之 6.05 dB，經由濃縮後提升至 10.48 dB，提升了 1.73 倍。
- (三) 在天然物檢測的部分，先量測了單純之天然物大蒜，成功地游離並偵測到大蒜素訊號後，接著進行內含複雜成分之中草藥，如當歸、川芎，一樣獲得了良好

的檢測結果，證實本系統在天然物檢測中是可行的。最後，欲達成檢測殘留農藥之目的，因此先將已知濃度為 10.0 ppm 巴拉刈，加入茶葉溶液中，經過了本系統之二維層析後，成功檢測到摻雜之巴拉刈訊號。進一步進行農藥殘留檢驗，選擇市場購買之青蔥，量測其蔥綠、蔥白及兩者交界處，得到了不同程度之伏寄普與派美尼殘留，對照其使用方法和功效後，得到檢測之結果相當合理。

總結以上所有實驗，可得知本研究所開發之二維層析快速檢測卡匣，擁有良好的靈敏度、穩定度，在整體檢驗上所需的時間極短，且層析能力也能夠應用於混合物，最後量測了天然物中殘留農藥，證實本系統之效能與實用性，與現行之檢驗方法比較，不管是在製造成本、系統體積重量、反應時間、維護成本、樣品需求量等，均優於現行市面上所使用的檢測裝置，甚至一台市售儀器所需的成本，足以讓我們製作卡匣達一千次以上，這樣成本的巨大差異更能突顯本研究所開發之快速檢測卡匣，其商品化可行性之潛力。

表 5-1 本系統與現行檢測法比較表

<b>Methods</b> <b>Items</b>	<b>(A)Conventional</b>	<b>(B)This research</b>
		
<b>Convenience</b>	Low	High
<b>Separation efficiency</b>	High	Low
<b>Sample pretreatment</b>	Delicate sample	Simple sample
<b>Processing time</b>	Up to 30-240 min	Less than 30 min
<b>Reuse</b>	Yes	No
<b>Maintenance</b>	Detail	Less
<b>Cross contamination</b>	Yes	No

## 5.2 未來展望

本研究開發之快速檢測卡匣系統，目前在層析分離上仍有進步空間，距離傳統毛細管晶片電泳之理論板數，還有一些差距，因此希望藉由卡匣進樣機構改善，以縮小進樣板塊，並且在卡匣側邊增設，第二維層析之展開液進樣口，一改目前接觸式之第二維層析，如此讓層析分離效能及理論板數得以提升；抑或是在濾紙表面進行處理，增加樣本吸附於紙片表面之面積，進而提升系統之理論板數。良好的層析分離效能，能夠連帶地提升後端質譜檢測之靈敏度與檢測能力，達到卡匣效能改善。

卡匣電極設計上同樣存在著改善空間。目前電極設計是使用 PCB 電路板以及拔插式插槽，在操作上固然方便，但是在檢測上，外在的接觸增加就提高了污染樣本的可能，因此未來希望能夠將電極直接製作於卡匣內，如此不僅可以避免污染樣本，也能夠降低電噴灑之工作電壓，減少直接對質譜入口放電之現象，以保護質譜儀。此外，紙片尺寸與紙片尖端之張角和長度，目前之設計僅是透過參考文獻中之作法，再行修改至符合本系統架構使用，因此仍需要在層析分離、紙電噴灑游離實驗過程中，調整、修正紙片之設計，以改善現有紙片在層析時尖端會有樣本殘留之情形，便會影響層析分離與後續質譜檢測之效能；同時紙片尖端之長度也會影響紙電噴灑，在於離子訊號之強度與檢測結果。所以紙片尺寸之設計改善，也能夠為此卡匣系統層析分離、電噴灑游離能力提升，增強質譜檢測前之處理，有效的讓系統之檢測極限與精度上升。

最後，在卡匣機構設計與紙片處理方式、尺寸修改完成後，達成理論板數提升與電極供給方式改善後，可以使此快速檢測卡匣之檢測前處理效能增強，進而達到偵測能力提升。本卡匣系統以低成本的紙微流體系統之優勢，成為未來食品安全檢驗上的新選項。



## 參考文獻

- [1] W. K. Tomazelli Coltro, C. M. Cheng, E. Carrilho, and D. P. Jesus, "Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications," *Electrophoresis*, vol. 35, pp. 2309-2324, 2014.
- [2] 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.
- [3] A. K. Yetisen, M. S. Akram, and C. R. Lowe, "Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices," *Lab on a Chip*, vol. 13, pp. 2210-2251, 2013.
- [4] J. Wang, Z. Chen, P. L. Corstjens, M. G. Mauk, and H. H. Bau, "A disposable microfluidic cassette for DNA amplification and detection," *Lab on a Chip*, vol. 6, pp. 46-53, 2006.
- [5] S. Wang, Y. Quan, N. Lee, and I. R. Kennedy, "Rapid determination of fumonisin B1 in food samples by enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, pp. 2491-2495, 2006.
- [6] J. Kaur, K. V. Singh, R. Boro, K. Thampi, M. Raje, G. C. Varshney, and C. R. Suri, "Immunochromatographic dipstick assay format using gold nanoparticles labeled protein-hapten conjugate for the detection of atrazine," *Environmental Science & Technology*, vol. 41, pp. 5028-5036, 2007.
- [7] M.-Z. Zhang, M.-Z. Wang, Z.-L. Chen, J.-H. Fang, M.-M. Fang, J. Liu, and X.-P. Yu, "Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 395, pp. 2591-2599, 2009.
- [8] A. Molinelli, K. Grossalber, M. Führer, S. Baumgartner, M. Sulyok, and R. Krska, "Development of qualitative and semiquantitative immunoassay-based rapid strip tests for the detection of T-2 toxin in wheat and oat," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, pp. 2589-2594, 2008.
- [9] D. Tang, J. Saucedo, Z. Lin, S. Ott, E. Basova, I. Goryacheva, S. Biselli, J. Lin, R. Niessner, and D. Knopp, "Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B<sub>2</sub> in food," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, pp. 514-518, 2009.
- [10] S. D. Blacksell, R. G. Jarman, M. S. Bailey, A. Tanganuchitcharnchai, K. Jenjaroen, R. V. Gibbons, D. H. Paris, R. Premaratna, H. J. de Silva, and D. G. Lalloo, "Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute dengue infections: the need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 18, pp. 2095-2101, 2011.

- [11] E. Fu, T. Liang, J. Houghtaling, S. Ramachandran, S. A. Ramsey, B. Lutz, and P. Yager, "Enhanced sensitivity of lateral flow tests using a two-dimensional paper network format," *Analytical Chemistry*, vol. 83, pp. 7941-7946, 2011.
- [12] J. H. Cho, M. H. Kim, R. S. Mok, J. W. Jeon, G. S. Lim, C. Y. Chai, and S. H. Paek, "Two-dimensional paper chromatography-based fluorescent immunosensor for detecting acute myocardial infarction markers," *Journal of Chromatography B*, vol. 967, pp. 139-146, 2014.
- [13] S. Song, N. Liu, Z. Zhao, E. Njumbe Ediage, S. Wu, C. Sun, S. De Saeger, and A. Wu, "Multiplex lateral flow immunoassay for mycotoxin determination," *Analytical Chemistry*, vol. 86, pp. 4995-5001, 2014.
- [14] M. J. Day, "Introduction to Antigen and Antibody Assays," *Topics in Companion Animal Medicine*, vol. 30, pp. 128-131, 2015.
- [15] E. Engvall and P. Perlmann, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G," *Immunochemistry*, vol. 8, pp. 871-874, 1971.
- [16] J. L. Vaitukaitis, G. D. Braunstein, and G. T. Ross, "A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 113, pp. 751-758, 1972.
- [17] C. Liu, X. Qiu, S. Ongagna, D. Chen, Z. Chen, W. R. Abrams, D. Malamud, P. L. Corstjens, and H. H. Bau, "A timer-actuated immunoassay cassette for detecting molecular markers in oral fluids," *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 768-776, 2009.
- [18] A. F. Coskun, J. Wong, D. Khodadadi, R. Nagi, A. Tey, and A. Ozcan, "A personalized food allergen testing platform on a cellphone," *Lab on a Chip*, vol. 13, pp. 636-640, 2013.
- [19] G. A. Posthuma-Trumpie, J. Korf, and A. van Amerongen, "Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 393, pp. 569-582, 2009.
- [20] R. G. Cooks, Z. Ouyang, Z. Takats, and J. M. Wiseman, "Ambient mass spectrometry," *Science*, vol. 311, pp. 1566-1570, 2006.
- [21] M. Yamashita and J. B. Fenn, "Negative ion production with the electrospray ion source," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 88, pp. 4671-4675, 1984.
- [22] 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, 1989.
- [23] E. Horning, M. Horning, D. Carroll, I. Dzidic, and R. Stillwell, "New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure," *Analytical Chemistry*, vol. 45, pp. 936-943, 1973.

- [24] E. Horning, D. Carroll, I. Dzidic, K. Haegele, M. Horning, and R. Stillwell, "Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream," *Journal of Chromatographic Science*, vol. 12, pp. 725-729, 1974.
- [25] A. Dempster, "LII. 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.
- [26] J. Beran and L. Kevan, "Molecular electron ionization cross sections at 70 eV," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 73, pp. 3866-3876, 1969.
- [27] 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.
- [28] V. V. Laiko, M. A. Baldwin, and A. L. Burlingame, "Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry," *Analytical Chemistry*, vol. 72, pp. 652-657, 2000.
- [29] C. N. McEwen, R. G. McKay, and B. S. Larsen, "Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments," *Analytical Chemistry*, vol. 77, pp. 7826-7831, 2005.
- [30] R. B. Cody, J. A. Laramée, and H. D. Durst, "Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions," *Analytical Chemistry*, vol. 77, pp. 2297-2302, 2005.
- [31] R. B. Cody, J. A. Laramée, J. M. Nilles, and H. D. Durst, "Direct analysis in real time (DART<sub>tm</sub>) mass spectrometry," *JEOL news*, vol. 40, pp. 8-12, 2005.
- [32] A. Venter, M. Nefliu, and R. G. Cooks, "Ambient desorption ionization mass spectrometry," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 27, pp. 284-290, 2008.
- [33] I. F. Shieh, C. Y. Lee, and J. Shiea, "Eliminating the interferences from TRIS buffer and SDS in protein analysis by fused-droplet electrospray ionization mass spectrometry," *Journal of Proteome Research*, vol. 4, pp. 606-612, 2005.
- [34] Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan, and R. G. Cooks, "Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization," *Science*, vol. 306, pp. 471-473, 2004.
- [35] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, and T. Matsuo, "Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 2, pp. 151-153, 1988.
- [36] M. Karas and F. Hillenkamp, "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons," *Analytical Chemistry*, vol. 60, pp.

2299-2301, 1988.

- [37] R. W. Nelson, D. Dogruel, P. Williams, and R. Beavis, "Mass determination of human immunoglobulin IgM using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 8, pp. 627-631, 1994.
- [38] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, and T. Olah, "Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 11, pp. 942-950, 2000.
- [39] M. Dole, L. Mack, R. Hines, R. Mobley, L. Ferguson, and M. d. Alice, "Molecular beams of macroions," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 49, pp. 2240-2249, 1968.
- [40] 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.
- [41] Z. Takats, J. M. Wiseman, and R. G. Cooks, "Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 40, pp. 1261-1275, 2005.
- [42] C. M. Hong, C. T. Lee, Y. M. Lee, C. P. Kuo, C. H. Yuan, and J. Shiea, "Generating electrospray from solutions predeposited on a copper wire," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 13, pp. 21-25, 1999.
- [43] C. P. Kuo and J. Shiea, "Application of direct electrospray probe to analyze biological compounds and to couple to solid-phase microextraction to detect trace surfactants in aqueous solution," *Analytical Chemistry*, vol. 71, pp. 4413-4417, 1999.
- [44] 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.
- [45] J. Liu, H. Wang, N. E. Manicke, J. M. Lin, R. G. Cooks, and Z. Ouyang, "Development, characterization, and application of paper spray ionization," *Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 2463-2471, 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] R. D. Espy, A. R. Muliadi, Z. Ouyang, and R. G. Cooks, "Spray mechanism in paper spray ionization," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 325, pp. 167-171, 2012.
- [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, R. G. Cooks, and Z. Ouyang, "Paper spray: a simple and efficient means of analysis of different contaminants in foodstuffs," *Analyst*, vol. 137, pp. 2556-2558, 2012.
- [50] 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.
- [51] J. Deng and Y. Yang, "Chemical fingerprint analysis for quality assessment and control of Bansha herbal tea using paper spray mass spectrometry," *Analytica Chimica Acta*, vol. 785, pp. 82-90, 2013.
- [52] 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.
- [53] S. L. F. Chan, M. Y. M. Wong, H. W. Tang, C. M. Che, and K. M. Ng, "Tissue-spray ionization mass spectrometry for raw herb analysis," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 25, pp. 2837-2843, 2011.
- [54] 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.
- [55] L. Ettre and K. Sakodynskii, "MS Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903)," *Chromatographia*, vol. 35, pp. 223-231, 1993.
- [56] L. Ettre and K. Sakodynskii, "MS Tswett and the discovery of chromatography II: Completion of the development of chromatography (1903–1910)," *Chromatographia*, vol. 35, pp. 329-338, 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] G. Toennies and J. J. Kolb, "Techniques and reagents for paper chromatography," *Analytical Chemistry*, vol. 23, pp. 823-826, 1951.
- [59] A. Levy and D. Chung, "Two-dimensional chromatography of amino acids on buffered papers," *Analytical Chemistry*, vol. 25, pp. 396-399, 1953.
- [60] S. J. Gaskell, "Electrospray: principles and practice," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 32, pp. 677-688, 1997.
- [61] G. Taylor, "Disintegration of water drops in an electric field," in *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 1964, pp. 383-397.
- [62] L. Rayleigh, "XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity," *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and*

*Journal of Science*, vol. 14, pp. 184-186, 1882.

- [63] J. Iribarne and B. Thomson, "On the evaporation of small ions from charged droplets," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 64, pp. 2287-2294, 1976.
- [64] L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez, and S. Vahidi, "Unraveling the mechanism of electrospray ionization," *Analytical Chemistry*, vol. 85, pp. 2-9, 2012.
- [65] 楊超榮, "介電質常壓電漿產生器之開發及其於質譜分析之應用," 碩士, 國立中山大學, 2010.

# 自述

姓名：陳仲祥 (Chung-Hsiang, Chen)

出生日期：1990/01/29

性別：男

出生地：屏東市

電子信箱：m033020069@student.nsysu.edu.tw



學歷：

國立中山大學 機械與機電工程研究所 碩士 2014/09~2016/06

國立虎尾科技大學 自動化工程學系 學士 2008/09~2012/06

國立屏東高級中學 普通科 2006/09~2008/06

發表著作：

國內研討會

1. 陳仲祥 林哲信，“快速檢測之紙基微流體於電噴灑游離質譜分析之應用” 第十九屆奈米工程暨微系統技術研討會(*Micro & Nano System Technology Conference –NMC*), 台北, 台灣, 八月, 2015
2. 陳仲祥 林哲信，“整合紙層析分離及電噴灑游離於質譜分析之應用” 第三十九屆全國力學會議(*Conference on Theoretical and Applied Mechanics –CTAM 2015*), 台北, 台灣, 十一月, 2015
3. 陳仲祥 林哲信，“創新二維紙層析分離及電噴灑游離快速檢測晶片於質譜分析之應用” 第十四屆奈精密機械與製造科技研討會(*Conference on Precision Machinery and Manufacturing Technology –PMMT*), 墾丁, 台灣, 五月, 2016
4. 陳仲祥 翁琳凱 林哲信，“創新二維紙層析分離及電噴灑游離快速檢測晶片於質譜分析之應用” 第21屆台灣化學感測器科技研討會(*21th Symposium of ACST*), 台中, 台灣, 五月, 2016