



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

微流體晶片整合硝酸根離子選擇膜於蔬菜檢測之應用

Microfluidic Chip with Nitrate Ion Selective Membrane
for Vegetable Detection Applications

研究生：蘇佩宇

Pei-Yu Su

指導教授：林哲信教授

Dr. Che-Hsin Lin

中華民國 105 年 11 月

Nov 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

研究生蘇珮宇（學號：M023020093）所提論文

微流體晶片整合硝酸根離子選擇膜於蔬菜檢測之應用
Microfluidic Chip with Nitrate Ion Selective Membrane for Vegetable
Detection Applications

於中華民國 105 年 10 月 21 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 李佳言 李佳言

委員 曾韋龍 曾韋龍

委員 林韋至 林韋至

委員 _____

指導教授(林哲信) 林哲信 (簽名)

致謝

三年了，一晃眼就這樣在中山大學待了三年，三年前的我是個很有衝勁對未來感到信心的女孩，隨著時間的磨耗也忘記了自己的熱情與初衷。在此萬分感謝我的指導教授林哲信老師，對於您而言，我們只是其中的一屆學生，但是對於我來說，您是影響我一輩子的貴人，謝謝您選擇當教授並耐心地指導了學生。如今終於能夠以 BEMS 畢業生的姿態離開，對此真的感到十分榮幸，並且引以為傲。

我算是幸運但也相對不幸的學生，從剛進實驗室就確立了自己的研究目標，但也由於站在巨人的肩膀上，很多時候其實很艱苦且孤立無援。巨人的肩膀並沒有想像中的美好，因為在我還沒學會爬以前就已經站在山峰上，再加上自身的知識背景不足，這樣的優勢其實是讓人非常不踏實的。然而，在林哲信老師的耐心指導下，教導了我正確的思考邏輯，並給予中肯的建議，讓我一步一步的慢慢找回自己的信心與價值。再次感謝老師的信任，讓我申請論文口試，也十分感謝曾韋龍老師的指導與幫忙。其次，非常謝謝傅龍明老師、李佳言老師以及林韋至老師擔任口試委員並提供論文的指導與建議。

這一路走來真的不容易，要承受的壓力很大，尤其是延畢的時候，旁人的眼光與家人的不諒解真的很難熬。真的謝謝一路上支持我的每個人，常常被我欺負卻仍支持幫助我的老大和政（雖然我最想念你的水果哈哈）、學長辰勳、汪汪前輩、無敵幽默的智慧王冠維、在他眼中只是一坨肉的小彌陀鐵鐵、無塵室達人阿必、太愛我們不肯畢業的阿波、永遠美麗並勇敢追求的強者安安、總是笑我很沒用的嗆辣鈺珊、努力奮鬥的好姊妹佳儀（我連妳的份一起努力）、聒噪愛自言自語王但脾氣很好的大老闆高毅、健身狂蘇殷寬、嘴砲有才華的毛怪吳尚璟 537、貓奴宅男爽哥、最盧的肥肉搞笑王雷 47、成熟堅強的暖男方4J、禮貌又努力的乖寶寶哲緯、為了一件外套可以很煩惱的雨果弟弟、每次都莫名害老師說台語的廠長祥哥、零食供應商 87 妹妹翁翁、貼心小可愛蔚馨、知性美女君敏、給我很多知識學術上的

最強 Support 政樺學長&岱恩、實驗無聊時最佳良伴大白，以及其他學弟們，真的謝謝一路上你們每個人的幫忙與付出。姊姊我要滾蛋了，你們好好加油啊~~不要讓皇上太操勞了，他老人家很辛苦的啊！

最後，最感謝家人的等待與支持，我知道三年的時間對於你們來說是有點不能理解，但是你們的體諒是最強大的後盾，我永遠愛你們，這最後的成果，請讓我與你們一起分享。

2016.11.21 蘇珮宇

中文摘要

本研究使用離子選擇薄膜快速製作技術，並結合特殊的為結構設計，製作出具有不對稱感測面積的微流體晶片，並將其應用於食品之蔬菜檢測。本研究改良微流體晶片設計，使其封裝效能提升，增加晶片中薄膜的製程良率；也改良微流體感測晶片之銀/氯化銀電極製程，藉由自發性氯化反應，使製程不需要任何額外的儀器設備或是複雜的操作，僅透過銀的自發性化學反應即可完成電極的製作。本研究選用 PMMA 作為微流體晶片材質，因其成本低廉，且為熱塑性基材，適合發展可攜、拋棄式檢測裝置。

本研究使用不同設計之微結構阻塊，調整其薄膜兩側之感測面積比例，再利用電化學偵測原理，量測自發性氯化電極的電化學檢測效能。電化學循環伏安法結果顯示，自發性氯化電極的氧化還原能力良好，其氯化 30 秒鐘之銀/氯化銀電極，氧化還原電流為 24.7 μA ，高出市售銀/氯化銀電極約 6.5 倍的訊號。電位量測結果也證實，自發性氯化電極偵測硝酸根濃度範圍從 10^{-4} M 到 1 M，具有良好的線性關係 ($R^2=0.9992$)。因此，於微流體晶片檢測中，使用前人已開發之快速自行封裝成膜技術，將硝酸根離子選擇薄膜封裝於感測晶片中，並透過其晶片微結構的設計，創造出不同感測之面積比，提升對於硝酸根離子的感測靈敏度。量測結果顯示，感測晶片於硝酸根濃度範圍 10^{-5} M 到 1 M 內，具有良好的線性關係 ($R^2=0.9920$)，且樣品溶液與電解液的感測面積比值越高，可有較好的感測靈敏度。其中感測面積比為 5:1 之晶片，對於硝酸根濃度之感測靈敏度達 -57.0 mV/dec；相較於面積比為 1:5 之感測晶片，提升了約 30% 以上的感測度斜率。

在自動連續偵測時，進行濃度梯度量測，其結果顯示，本研究之感測晶片具有良好的再現性反應效能，但由於薄膜具有濃度滯留現象，因此本研究進一步探討反應時間，吸附型薄膜其吸附與脫附硝酸根離子所需要的反應時間不同，由量測結果得知，1 mM 之硝酸根離子吸附於感測薄膜時，僅需花 3.3 秒鐘就可達到 95%

的反應平衡；而相同濃度之硝酸根離子的脫附反應時間，也只需要花 11.4 秒鐘即可達到 95% 的完全反應。最後，本研究也量測不同的干擾源，分別量測醋酸根離子、碳酸根離子以及亞硝酸根離子，探討其干擾離子於感測薄膜的影響，結果顯示這三種干擾離子對於本研究之感測晶片皆不會超過 10^2 倍的濃度訊號干擾。綜觀上述，本研究將硝酸根離子選擇薄膜整合於微流體系統，發展簡單製作、高效能且檢測對象範圍廣泛的電極感測晶片，並應用於檢測蔬菜中的硝酸鹽含量。

關鍵字：離子選擇電極、微流體晶片、不對稱感測膜、硝酸鹽

Abstract

This research develops a rapid fabrication process of self-forming asymmetric polyvinylchloride (PVC) ion selective membrane in a microfluidic chip and using for nitrate ions detection in the vegetable samples. It is easily trapped the amount of polymer liquid with doping nitrate ionophores to form a thin ion selective membrane between microstructures utilizing surface tension force. Due to a large exposed ratio of the membrane surface areas, this method shows higher sensing performance than the traditional electrochemical detection. The Ag/AgCl electrode fabrication process is modified by using spontaneous chlorination reaction, which doesn't need using any additional equipment or complex operation.

PMMA is a low cost material, which suitable for developing portable and disposable detection devices of the microfluidic chip. This study design different size of microstructures in the chip for adjusting sensing area ratio on both sides of the film to create an asymmetric membrane. In this system, the current response of cyclic voltammetry detection shows 6.5 times enhancement than the commercial system when the silver electrode treat with 1% $\text{FeCl}_3(\text{aq})$ for 30 seconds. And the potential response of EC detection for detecting $\text{NaNO}_3(\text{aq})$ shows a good linear response within the concentration range of 10^{-5} M to 1 M ($R^2=0.9920$).

In addition, the higher sensing membrane area ratio shows better sensitivity for detecting nitrate ion in the buffer solution. When the sensing area ratio of 5 to 1 shows a linear response for nitrate ion detection in the concentration range from 10^{-5} M to 1 M. The good sensitivity for detecting nitrate ion is also achieved -57.0 mV/dec. In comparing to the sensing membrane area ratio of 1 to 5, the ratio of 5 to 1 shows an enhancement of the sensing efficiency of about 30% or more. During the continuous

detection process, different concentrations of trace samples are injected into the sensing area sequentially. The method for cyclic detecting nitrate ion concentrations is measuring from low concentration to higher concentration and back to base concentration, which measuring the concentration in the range at 10^{-5} to 1 M per decade. This study of cyclic detecting nitrate ions concentration are in the range at 10^{-5} M to 1 M, and back to 10^{-5} M. Each concentration measured for 100 seconds. These results show microfluidic chip exhibit good reproducibility for nitrate ions detection. However, when the concentration in the current real sample is much higher than the next, the nitrate ions will dissolve in the next sample during the process of desorption, resulting in the retention phenomenon of concentration in continuous measurement.

The result also indicates that the response time of the adsorption and the desorption processes reach 95% of the maximum response takes 3.3 s and 11.4 s during detecting 1 mM of nitrate. At last, this study successfully integrates nitrate selective membrane into a microfluidic chip and develop a low cost yet high performance way for wide range nitrate concentration analysis. his microfluidic chip is capable of using the nitrate detection in the vegetables.

Keywords: ion selective electrode, microfluidic chip, nitrate, asymmetric membrane

目錄

論文審定書.....	i
致謝.....	ii
中文摘要.....	iv
Abstract.....	vi
目錄.....	viii
圖目錄.....	xi
表目錄.....	xiv
符號表.....	xv
簡寫表.....	xvii
第一章 緒論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 硝酸鹽.....	2
1.2.1 硝酸鹽檢測方法.....	5
1.3 離子選擇電極.....	8
1.3.1 離子選擇電極發展.....	9
1.3.2 市售離子選擇電極.....	10
1.3.3 離子選擇膜感測晶片.....	13
1.4 動機與目的.....	16
1.5 論文架構.....	17
第二章 工作原理.....	19
2.1 電化學.....	19
2.1.1 能斯特方程式.....	20
2.1.2 濃差電池系統.....	21

2.1.3 循環伏安法	23
2.2 離子選擇薄膜	24
2.2.1 液態薄膜	27
2.2.2 PVC 薄膜	30
2.2.3 電極量測系統.....	32
2.3 硝酸根 ISE.....	33
2.3.1 離子干擾	35
2.4 離子感測晶片	36
第三章 設計製作	37
3.1 微流體晶片	37
3.2 晶片設計與製作	39
3.2.1 感測電極	39
3.2.2 微流體管道	40
3.2.3 微結構設計	43
3.2.4 微流道製程	45
3.2.5 微晶片製作	49
3.3 實驗藥品.....	52
3.3.1 溶液配製	53
3.3.2 離子薄膜製備.....	54
3.3.3 蔬菜樣品配製.....	54
3.4 實驗架構.....	55
第四章 結果與討論	56
4.1 離子選擇電極	56
4.1.1 電極效能探討.....	56
4.1.2 氯化銀形貌	59

4.1.3 硝酸鹽對不同陽離子填充及待測液量測評估.....	61
4.1.4 硝酸根離子檢測.....	63
4.1.5 離子干擾評估.....	65
4.1.6 再現性效能	67
4.2 微流體感測晶片	69
4.2.1 微結構成膜	69
4.2.2 晶片效能	71
4.2.3 連續偵測	73
4.2.4 感測面積的影響.....	74
4.2.5 反應時間量測.....	77
4.3 蔬菜檢測.....	78
第五章 結論與未來展望	81
5.1 結論.....	81
5.2 未來展望.....	82
參考文獻	84
附錄.....	92
自述	96

圖目錄

圖 1-1 胃中之硝酸鹽轉變過程.....	3
圖 1-2 硝酸根離子檢測法.....	5
圖 1-3 離子選擇電極基本架構示意圖.....	9
圖 1-4 離子選擇電極薄膜技術.....	10
圖 1-5 市售離子選擇電極.....	11
圖 1-6 離子感測器測量鉍離子濃度.....	13
圖 1-7 使用有機相與水相來分離目標離子的雙液相流體薄膜.....	14
圖 1-8 使用異相層流技術於 X 型微管道晶片中合成化學性聚合高分子薄膜.....	15
圖 1-9 本研究之論文架構圖.....	18
圖 2-1 濃差電池架構，左為反應前；右為反應平衡後.....	22
圖 2-2 電化學循環伏安法原理.....	24
圖 2-3 玻璃薄膜電極示意圖.....	25
圖 2-4 玻璃薄膜電極之薄膜排列示意圖.....	25
圖 2-5 固態鹵離子電極感測電極之成分及交互作用排列示意圖.....	26
圖 2-6 液體膜電極組成之成分示意圖.....	27
圖 2-7 離子選擇膜之通過程.....	28
圖 2-8 膜電位與離子流對應圖.....	29
圖 2-9 離子選擇膜之吸附響應機制.....	30
圖 2-10 電化學三電極系統之架設圖，分別為工作、輔助以及參考電極.....	32
圖 2-11 硝酸根離子載體之化學分子結構.....	35
圖 2-12 離子選擇電極晶片於電化學檢測.....	36
圖 3-1 使用真空幫浦使 PVC 薄膜於結構中成形示意圖.....	38
圖 3-2 使用貼紙遮罩濺鍍完成之銀/氯化銀電極基板.....	39

圖 3-3 實驗室自行組裝之高真空濺鍍機.....	40
圖 3-4 微流道設計之二維模擬設計圖	41
圖 3-5 微流道 ANSYS® Fluent 空氣流速模擬圖	43
圖 3-6 微流體晶片結構設計圖	44
圖 3-7 微管道晶片玻璃母模製程圖	47
圖 3-8 PMMA 晶片熱壓機台實體示意圖	48
圖 3-9 電漿處理設備儀器實體圖	49
圖 3-10 微流體晶片製程圖	51
圖 3-11 微流體電極晶片圖	52
圖 4-1 使用電化學循環伏安法測試銀/氯化銀電極效能.....	58
圖 4-2 拍攝銀金屬經過不同氯化時間處理之氯化銀電極表面形貌 SEM 圖.....	60
圖 4-3 拍攝銀電極氯化處理 30 秒鐘之銀/氯化銀電極斷面 SEM 圖	61
圖 4-4 使用不同陽離子之硝酸鹽檢測硝酸鈉溶液	63
圖 4-5 離子選擇電極量測系統架構圖	64
圖 4-6 使用商用的 RE 與本實驗製備之 RE 量測硝酸根離子之變化	65
圖 4-7 使用硝酸根離子選擇電極量測不同濃度之干擾離子樣品	66
圖 4-8 硝酸根離子選擇電極於濃度梯度量測之數據圖.....	68
圖 4-9 微流道 ANSYS® Fluent 空氣流模擬圖.....	70
圖 4-10 液態薄膜於微流道結構成膜圖.....	71
圖 4-11 電化學實驗架設示意圖	72
圖 4-12 使用離子選擇薄膜量測不同濃度的硝酸根離子樣品	73
圖 4-13 硝酸根離子感測晶片於連續式濃度梯度量測數據圖	74
圖 4-14 比較不同膜面積的電極晶片檢測硝酸根離子樣品的響應程度.....	75
圖 4-15 感測晶片於量測 1 mM 硝酸根離子之吸附與脫附的反應時間.....	77
圖 4-16 硝酸根離子感測晶片於蔬菜檢體之檢測	79

圖 5-1 雙重離子選擇薄膜之感測晶片	83
圖 A1 使用硝酸鉀電解液作為內部填充液量測硝酸鈉樣品溶液	92
圖 A2 使用硝酸鈉電解液作為內部填充液量測硝酸鉀樣品溶液	92
圖 A3 使用硝酸鉀電解液作為內部填充液量測硝酸鉀樣品溶液	93
圖 A4 使用硝酸鈉電解液作為內部填充液量測硝酸鈉樣品溶液	93
圖 A5 使用硝酸鈉電解液作為內部填充液量測硝酸鈣樣品溶液	94
圖 A6 使用硝酸鉀電解液作為內部填充液量測硝酸鈣樣品溶液	94
圖 A7 使用硝酸鈣電解液作為內部填充液量測硝酸鈉樣品溶液	95
圖 A8 使用硝酸鈣電解液作為內部填充液量測硝酸鈣樣品溶液	95

表目錄

表 1-1 台灣主婦聯盟規定之蔬菜硝酸鹽限制含量標準.....	4
表 1-2 硝酸鹽檢測方式比較.....	7
表 1-3 市售離子選擇電極規格表	12
表 2-1 市售之硝酸根離子選擇電極規格表.....	34
表 4-1 電化學循環伏安法測試銀/氯化銀在不同氯化時間下的電流反應.....	58
表 4-2 三種不同陽離子之硝酸鹽交叉檢測.....	62
表 4-3 不同干擾離子對於硝酸根離子之選擇性係數	67

符號表

A	電極面積 (cm^2)
D	分析物擴散係數 (cm^2/s)
dec	以十進位
E	電池電位
E^0	標準電位
E_{pa}	氧化峰值電位
E_{pc}	還原峰值電位
E_x	離子平衡電位
F	法拉第常數
G	通透性
I	電流
i_{pa}	氧化峰值電流
i_{pc}	還原峰值電流
$K_{i,j}$	電極對待測離子 i 與干擾離子 j 之選擇性係數
L	公升
M	莫耳濃度
mg/dL	1 分升含的毫克數
mL	毫升
mm	釐米
mV	毫伏
n	反應的電子數目
nm	奈米
pH	酸鹼值

ppm	百萬分率
Q	提供之電量
R	理想氣體常數 (8.314 J/mol-K)
T	絕對溫度
V	電壓
V_m	膜電位
W	功率
Z_i	待測離子之電荷價數
Z_j	干擾離子之電荷價數
α	活性 (活性=濃度×活度係數)
α_i	待測離子的活性
α_j	干擾離子的活性
μm	微米
μL	微升
Δc	分析物的濃度差
ΔG^0	標準自由能變化量
Δx	電極表面距離

簡寫表

BOE	緩衝二氧化矽蝕刻液 Buffered Oxide Etchant
CE	輔助電極 Counter Electrode
CV	循環伏安法 Cyclic Voltammetry
EMF	電動勢 Electromotive Force
FIA	流動注入分析 Flow Injection Analysis
HMDS	六甲基二硅氮烷 Hexamethyldisilazane
HPLC	高效能液相層析法 High Performance Liquid Chromatography
IC	離子層析法 Ion Chromatography
ICP	電感耦合電漿 Inductive Coupling Plasma
ISE	離子選擇電極 Ion Selective Electrode
JECFA	聯合國食品添加物專家委員會 Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
MEMS	微機電系統 Micro Electro Mechanical System
OCPT	開路電位-時間 Open Circuit Potential - Time
PDMS	聚二甲基矽氧烷 Polydimethylsiloxane
PMMA	聚甲基丙烯酸甲酯 Polymethyl Methacrylate
PVC	聚氯乙烯 Polyvinylchloride
RE	參考電極 Reference Electrode
TBP	磷酸三丁酯 Tributyl Phosphate
TEA ⁺	四乙基銨陽離子 Tetraethylammonium Cation
THF	四氫呋喃 Tetrahydrofuran
TLM	熱透鏡顯微鏡 Thermal Lens Microscope
WE	工作電極 Working Electrode

第一章 緒論

1.1 研究背景

隨著人們對健康和食品安全等議題的重視，各式檢測裝置的開發越來越重要，許多研究機構和工業界便開始致力於產業生產模式的改善，進而發展簡易攜帶且微型化的機電元件。其中微機電系統（Micro Electro Mechanical System, MEMS）的發展備受矚目[1]，其技術包含微電子元件與系統之整合，不但使控制器與感測系統微小化，在工程、科學及醫學領域上更為近年來最具發展潛力且前瞻性的整合性科技。常見的有光感測器[2]、化學感測器[3]及生物感測器[4]...等，此類科技產品具有體積小、快速大量生產以及降低成本，僅以少量樣品檢體即可獲得檢測結果等優勢，故非常具有市場應用之潛力。

自 1960 年代開始，離子選擇電極（Ion Selective Electrode, ISE）為離子檢測技術中重要發展之一，此技術為一種簡單、即時且能使用於有色混濁的樣品溶液，不需使用精密的儀器即可辨別不同離子的存在，為非破壞性分析工具。相較於傳統分析需要大量樣品、大型檢測設備，且需經由檢測中心專業人員操作；微流體系統只需搭配電化學(Electrochemistry)的分析方法，便能進行微量級樣品的檢測。因此，此種量測方法非常適合用於自家使用、野外即時分析或自動連續監測，在市場上的應用具有舉足輕重之地位[5]。現今已有各種市售離子選擇電極感測器，分析對象也十分廣泛，如環境監測、土壤和水質分析、海洋考察、工業自動化控制、臨床化驗以及冶金、農業、地質、食品與藥物分析...等領域。離子選擇電極的特性之一就是對特定離子具有選擇性，可測得待測物中的特定離子，如硝酸根離子電極就能直接檢測含有硝酸根離子的物質，並不需再搭配大型分析裝置[6]。如此低成本且快速的量測系統，對養殖業、農業、工業、食品業或是醫學而言十分實用，故開發高效能離子選擇電極，製作出穩定、微小、低成本且可置換的感測裝置，將會是未來微機電領域發展的趨勢之一。

然而，現今環境中的污染來源趨於增長，最受關注之污染物便是硝酸鹽，硝酸鹽的污染源來自於如人工化肥、生活污水、垃圾糞便、工廠排出大量的含氮廢棄物、食品防腐劑與保鮮劑等。當人體食用含有大量硝酸鹽含量之飲用水、生鮮蔬果、漬酸菜、隔夜炒菜或魚肉製品時，硝酸鹽會於人體中被還原成亞硝酸鹽，而過量的亞硝酸鹽可使人產生中毒，輕者頭昏、嘔吐、心悸，重者導致神智不清、呼吸急促甚至產生抽搐現象，搶救不及時可能喪命[7]。但普遍大眾往往只注意到亞硝酸的含量，而忽略了硝酸鹽的重要，因此為了防止亞硝酸鹽與硝酸鹽的危害，除了適量的施用化肥、禁止污灌、實行環保措施之外，經由有效地處理污水排放、垃圾及糞便等，才可確保地表水源與地下水源不受硝酸鹽及亞硝酸鹽之污染。

1.2 硝酸鹽

硝酸鹽 (Nitrate) 是一種多原子離子化合物，為硝酸根 (NO_3^-) 所形成的鹽類。許多金屬都能形成硝酸鹽化合物，硝酸鹽於高溫環境中屬於強氧化劑，但是溶解於水溶液狀態的硝酸根離子時幾乎無氧化作用。硝酸鹽在大自然中本來就存在，除了生物體從外界獲取氮，並經由硝化菌的硝化作用可以生成亞硝酸鹽和硝酸鹽，硝酸鹽是氮素高度氧化的最後產物；亦可經由人工合成，也是植物的主要利用的營養來源之一，為環境污染物並存在於自然環境中，主要存在於地表水與地下水或氣態水以及動植物與食品中[8]。

環境中許多物質經降水溶解後會形成硝酸鹽，例如污水灌溉、化肥植種、糞便垃圾、燃料燃燒排放之含氮廢氣、工業含氮廢棄物等自然環境中，產生之硝酸根離子滲入地下、流入河流或湖泊。過量的硝酸鹽造成水質污染，像濫施化肥、污灌農田、污水下滲等會使地下水硝酸鹽含量遽增，而國家生飲水硝酸鹽含量衛生標準為小於 $876 \mu\text{M}$ [9]。而過度使用化肥或使用被硝酸鹽污染之水源灌溉，會導致農作物吸收大量硝酸鹽類，蔬菜中之硝酸鹽含量主要來自於氮肥，因此吸收硝酸鹽後的含量分布會依據使用的肥料、種植的蔬菜品種、生長環境的差異、收割

時間、食用部位、加工處理方式等而有所不同。環保署經由調查抽樣統計後得知，蔬菜之硝酸鹽大部分存在於葉柄與莖幹，再來是葉片及根部，因此若使用過多的化肥會導致蔬菜中的硝酸鹽含量增多[10]。

事實上硝酸鹽對人體本身是無害的，現今有生物學家證實它是人體抵禦感染機制的一部份，近期的研究報告表明，硝酸鹽其實是我們身體對抗腸胃炎的重要組成部分[11]，但從 1950 年代開始，硝酸鹽卻備受質疑。當時有研究者發現，有一類的硝酸鹽衍生物會破壞 DNA，稱為 N-亞硝胺 (N-nitrosamines)，並導致農場動物和實驗室大鼠得到癌症，但是後續的研究卻無法證實硝酸鹽和癌症的直接相關性[12, 13]。直到 1994 年才對硝酸鹽有較深入的研究報告，Lundberg 等人[14]和 Ralston 等人[15]分別注意到人體的胃中含有大量一氧化氮氣體，且當時已知白血球釋出一氧化氮能降低微生物的活力。而亞硝酸鹽在胃酸這種酸性環境中會形成氮氧化物，其中包含一氧化氮，因此當硝酸鹽進到食道與唾液產生化學反應，和腸胃中的微生物轉變，其中約有 5% 的硝酸鹽被還原成亞硝酸鹽 (Nitrite, NO_2^-)，接著再轉化成亞硝基化合物 (N-nitroso Compounds)，此時它就成為了會導致人體血液缺氧或造成基因突變的物質，若此時體內的亞硝酸鹽接觸到胺類，就會產生致癌的亞硝胺物質[16, 17]。

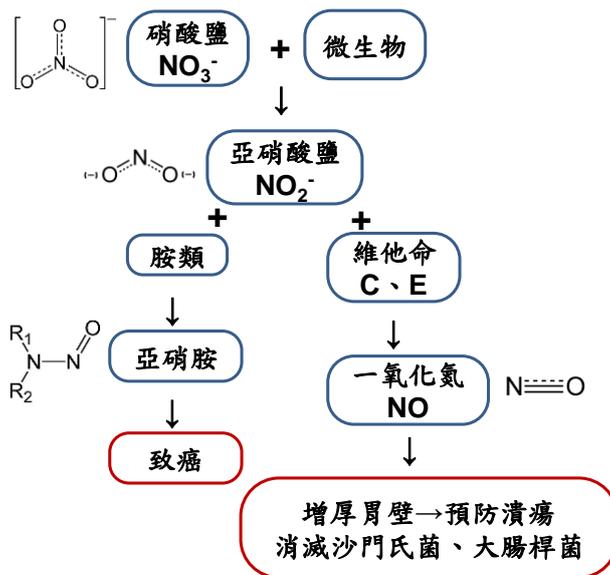


圖 1-1 胃中之硝酸鹽轉變過程

亞硝酸鹽其本質對人體是有毒的，不論是從硝酸鹽轉變而來的或是直接攝取，當過多之亞硝酸鹽被人體血液吸收後，會使血液中的低鐵血紅蛋白轉化為高鐵血紅蛋白，進而影響運送與攜帶氧的功能，導致人體各器官組織無法獲得充裕的氧，身體就會引發缺氧症狀，輕者腹痛腹瀉、噁心嘔吐、口唇與指甲青紫，若嚴重缺氧則導致大腦神經受損，身體皮膚青紫，一般人稱為藍嬰症（Methemoglobin），陷入抽搐、昏迷、致癌而死亡[18]。

當食用過量的硝酸鹽時會造成人體健康上的疑慮，但每天控制攝取量就可降低硝酸鹽帶來的傷害，因此每個國家都有各自的限制攝取量。以歐盟的標準規定為例，食品中的最高殘留量以硝酸鹽殘留量計算，臘肉及罐頭肉類製品使用量為250 mg/kg。而一般消費者多數知道香腸或臘肉等製品含有硝酸鹽，卻不知道蔬果中也含有硝酸鹽，而且蔬菜的硝酸鹽含量大多高於肉類，尤其是葉菜類。人體攝取的硝酸鹽有八成以上來自蔬菜，而蔬菜類食物由於吸收土壤中含氮的化學肥料，導致蔬菜中硝酸鹽大部分殘留於葉柄與莖幹，其次是葉片與根部[11]。台灣主婦聯盟生活消費合作社於十多年前開始推動蔬菜硝酸鹽減量，並於1996年自訂蔬菜之硝酸鹽含量標準，限制蔬菜裡的硝酸鹽含量以保護消費者的健康，限制量如表1-1所示。

表 1-1 台灣主婦聯盟規定之蔬菜硝酸鹽限制含量標準

蔬菜類別	硝酸鹽含量
精力湯-蔬菜（生食）	1000 ppm 以下
根菜類	1500 ppm 以下
冬季葉菜類	2500 ppm 以下
夏季葉菜類（缺菜期間）	3000 ppm 以下
陰雨天葉菜類	3000 ppm 以下

現今國際上對於蔬菜之硝酸鹽限制量仍有爭議，許多國家如美國及加拿大等皆無訂定蔬菜中硝酸鹽的限制量標準。歐盟也只對於萵苣及菠菜這兩種蔬菜，於2001年公告訂定限制的範圍，並依不同栽種季節及栽種方法分別限制。聯合國組織則訂定人體每天所攝取的硝酸鹽含量，於1973年公佈硝酸鹽的安全攝取量，但是聯合國食品添加物專家委員會（Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA）於1995年重新評估，包括從飲用水、蔬果、穀物、魚肉類製品...等所包含的硝酸鹽總量，並更改每日可攝取的硝酸鹽含量（Acceptable Daily Intake），硝酸鹽的安全攝取量為每天每公斤體重0~3.65毫克，以國人平均體重50~70公斤為例，每天硝酸鹽的許可攝取量為182.5~255.5毫克。

1.2.1 硝酸鹽檢測方法

硝酸鹽檢測一直是人們所關心的議題，自1970年後便開始研發技術，檢測土壤、飲用水、植栽等項目中的硝酸鹽。傳統針對硝酸鹽所開發之檢測方法更廣泛地應用於食品安全、動物飼料及生化材料等方面。初期人們使用棕色環實驗法[19]以及馬錢子鹼比色法[20]，此兩種檢驗為最常見之化學試驗方式，其原理為利用硝酸根離子在酸性介質中會產生顏色反應的變化，藉此方法檢測溶液中的硝酸根離子含量，如圖1-2所示。

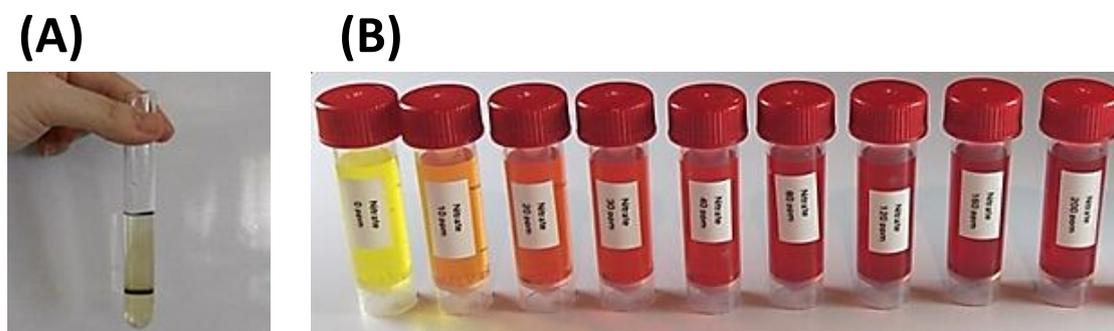
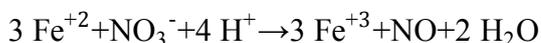


圖 1-2 硝酸根離子檢測法：(A) 棕色環實驗法 (B) 馬錢子鹼比色法

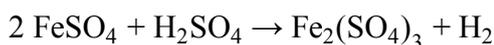
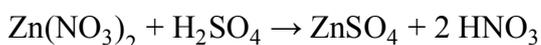
1. 棕色環實驗法 (Brown Ring Test) :

棕色環實驗法是利用鐵離子接觸硝酸鹽的時候會產生反應，並觀察試管中是否產生一圈棕色環，如圖 1-2 (B) 所示，其總反應為：



藉此檢測方式能容易地辨別硝酸根離子是否存在。雖然此反應機制很早就被提出，卻到 1980 年經由分光光度法 (Spectrophotometry) 及電位滴定法 (Potentiometric Titration Method) 的技術發展後才獲得驗證。然而，棕色環實驗雖辨別容易，卻無法精準量測硝酸鹽的濃度，僅能依顏色反應得知溶液中是否具有硝酸鹽成分。

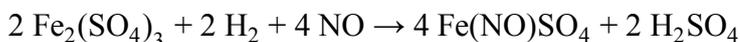
以硝酸鋅為例，反應時以下兩個反應會同時進行：



硝酸分解所需的溫度由濃硫酸提供：



$\text{Fe}(\text{NO})\text{SO}_4$ 會在進行反應的溶液中生成一個棕色環：



2. 馬錢子鹼比色法 (Brucine Method) :

馬錢子鹼為最古早用於檢測硝酸根離子的檢測方式，於 1965 年被編列為美國公共衛生協會檢測地表水、地下水以及生活污水的標準方法[21]，1970 年以後被廣泛的應用於檢測土壤、植物萃取液、水等。許多學者便因此探討馬錢子鹼比色法與其他檢測方式的優缺點，其中較為廣泛研究的量測方法為雙電極式離子選擇電極[22]。1994 年台灣行政院環保署發布，以馬錢子鹼比色法為檢測水中硝酸鹽氮含量的官方做法，其檢測原理為利用水中硝酸根在高溫硫酸溶液中，會與馬錢子鹼產生化學反應形成黃色複合物，再以分光光度計 (波長 410 nm) 測其吸光度值來定量，其檢測硝酸態氮濃度範圍為 0.1~2.0 mg/L。但由於其檢測藥品具有毒性，於 2012 年公告廢止「水中硝酸鹽氮檢測方法—馬錢子鹼比色法(NIEA W417.51A)」。

分光光度法[23]是發展最完整之分析法，但量測程序較為繁雜且耗時，使用之反應藥品通常具有毒性，因此便陸續發展出其他檢測硝酸鹽的方法，其中包含色層分析法(Chromatographic Analysis)、高效能液相層析法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)、離子層析法(Ion Chromatography, IC)、毛細管電泳法(Capillary Electrophoresis) [24, 25]、極譜分析法(Polarography) [26]及流動注入分析(Flow Injection Analysis, FIA) [27]等，但此類檢測分析仰賴許多複雜之大型儀器進行樣品前處理、分離與檢測，且需至實驗室或相關檢測中心才可量測，各項方法之優缺如表 1-2 所示。由於此類檢測方法具有檢測儀器昂貴、樣品需做前處理或藥品配製繁複等缺點，使得電化學量測法為一快速、便利且成本低廉之硝酸鹽檢測方式。

表 1-2 硝酸鹽檢測方式比較

分析方式	優點	缺點
色層分析法	檢測快速、方便	精準度有限、誤差大
分光光度法	可分別檢測硝酸鹽與亞硝酸鹽的準確含量	試驗藥品多為有毒溶劑，且須將硝酸鹽還原成亞硝酸鹽後再計算其各別含量
離子層析法	精確及敏感度高，可同時檢測硝酸鹽與亞硝酸鹽	樣品須前處理、操作儀器昂貴、量測耗時
毛細管電泳法	可同時檢測多種可分離之樣品	操作須有電化學基本專業知識，以及大型設備
極譜分析法	精確且敏感度高，可同時分析多種樣品	操作困難，須外施電壓，精確至 0.01 V
流動注入分析法	樣品無需前處理	操作控制不易且量測程序繁雜

1.3 離子選擇電極

離子選擇電極為一種分離型電化學感測器，離子感測器的離子接受與電訊號轉換是分開進行的，因此不需要預先處理樣品溶液，且能於連續作用的流體下進行偵測，在醫學上更為遠距離診斷和臨床實驗監測等各領域中被廣泛應用[28-31]。離子感測器具有對待測離子的形狀或分子結構有選擇性接受器，並將接受的離子含量有效地轉換為電信號，可作為對離子具有選擇響應的 ISE。ISE 利用膜電位來測量溶液中待測離子的濃度或活性 (Activities)，使液態膜或固態膜具有接受器的功能。當電化學薄膜將兩種不同的電解質隔開後，若薄膜對於任何的離子均可通過無阻礙，只減緩兩種不同溶液迅速的混合作用，擴散物質分布不相等之兩測溶液界面 (Boundary) 就會產生滲透壓差 (Osmotic Pressure Difference)。擴散時，電化學膜兩側的溶液中，各離子濃度的差別形成擴散電位。ISE 的感測膜為一種選擇性薄膜，對於不同離子具有相對的選擇性而無專一性，因此當 ISE 與待測離子溶液接觸時，溶液中待測的特定離子會和離子選擇薄膜內的離子發生交換，在感測膜產生膜電位，由電極完成電信號的轉換並量測其電位差，藉此推斷出特定離子的濃度[32]。

離子選擇電極為電化學半電池 (Half-cell) 系統，需加上外部參考電極 (Reference Electrode, RE) 才能組成一個完整迴路，形成電化學電池系統。由於離子選擇電極無法量測到絕對電位，故需使用一已知固定電位的半反應作為 RE，因平衡時只有微電流流動，故需一個獨立的 RE，藉此更精準地量測其反應的相對電位值。當 ISE 與 RE 同時放入待測液體時，離子選擇薄膜的電位引起變化，造成兩根電極電位上的改變，再藉由此訊號量測出電位差，並分析推算出濃度或 pH 值。

ISE 之基本架構示意圖如圖 1-3 所示，使用電極為銀/氯化銀電極 (Silver/Silver Chloride Electrode, Ag/AgCl)，Ag/AgCl 為在銀表面電鍍上氯化銀，其半反應方程式為： $\text{AgCl}_{(s)} + e^- \rightleftharpoons \text{Ag}_{(s)} + \text{Cl}^-_{(aq)}$ ，其中薄膜固定於離子選擇電極 PVC 管之底端，並浸泡於緩衝溶液中以維持銀/氯化銀電極與薄膜內之電位穩定[33]。

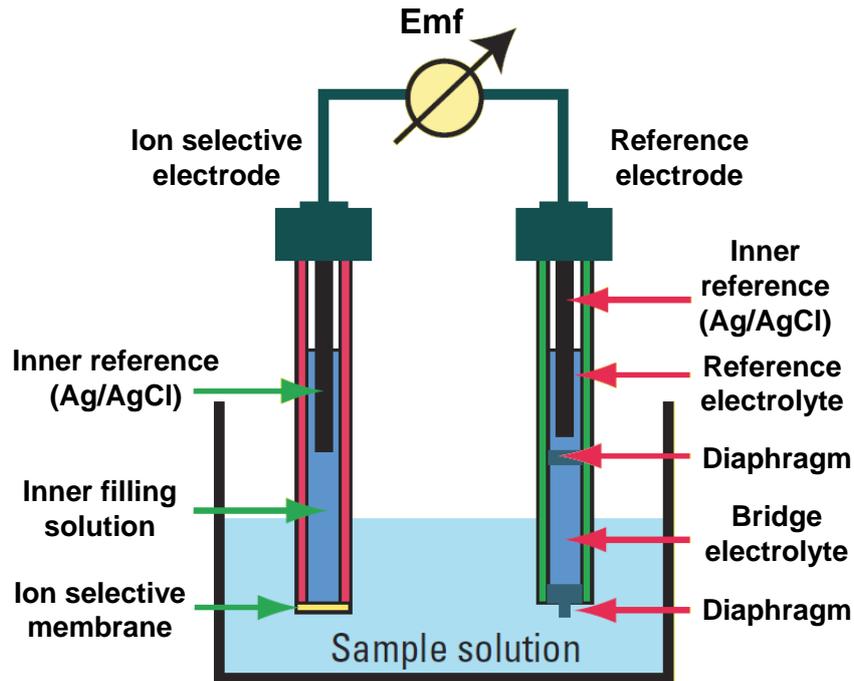


圖 1-3 離子選擇電極基本架構示意圖[33]

1.3.1 離子選擇電極發展

目前在電化學檢測中，藉由氧化還原的反應方式來分析溶液中之特定離子，是最具有潛力的技術之一[34-36]，在應用方面則以離子選擇電極最為廣泛。電化學檢測於使用上，一般是將電化學電極浸泡於樣品溶液中，再利用循環伏安法量測待測離子的氧化還原訊號。然而，若樣品中有其他的離子干擾，亦能偵測到干擾離子之氧化還原訊號，而使待測離子的感測訊號受影響。因此，電化學電極在樣品量測上，最困難的問題即是溶液中存在許多其他干擾的離子，造成量測結果精準度降低。因此，為了減少其他離子的干擾，發展出離子選擇薄膜，使檢測時只讓薄膜篩選過之離子能被偵測到，此種結合離子選擇薄膜的電化學電極，即為離子選擇電極。

離子選擇電極的發展可以追溯到 1967 年，最先由 Rose 等人所提出[37]，將液態離子交換膜整合於電化學電極中，成功製作出具有液體交換離子型的鈣離子選

擇電極。隨後更陸續發展出許多不同類型的離子選擇電極，用來檢測不同的特定離子，如 2.3 章節介紹之硝酸根離子選擇電極，使用了摻雜特定的硝酸根離子載體之選擇薄膜，來提高對硝酸根離子的選擇性[38]。

目前一般市售的離子選擇電極，為了使用上的便利性，已將電化學電極進行整合，使複合式離子選擇電極包含一個電化學工作電極及參考電極，並於離子選擇電極上製作離子選擇薄膜作為感測層，用於檢測樣品溶液之特定離子，這些技術已被廣泛應用於食品安全檢測、醫學臨床研究及環境污染檢測等領域上[39]。

1.3.2 市售離子選擇電極

隨著市場需求量大，離子選擇電極於檢測上已具有舉足輕重的地位，市面上已有許多如 HACH[40]、Cole-Parmer[41]、Nico2000[42]等公司，致力於研發販售離子選擇電極感測器，以 Nico2000 市售的離子選擇電極為例，其感測薄膜類型如圖 1-4 所示，主要分為三類：傳統 PVC 膜、晶體膜以及全固態 PVC 膜，其中以全固態 PVC 膜為主要產品，因感測薄膜為全固態膜，在保存方面不需像傳統 ISE 需將 PVC 膜浸泡於標準液中，不僅操作使用上更為便利，不必擔心流體洩漏，對於使用的工作條件和場合沒有特殊要求，即便檢測含有雜質的混濁樣品仍能正常使用。

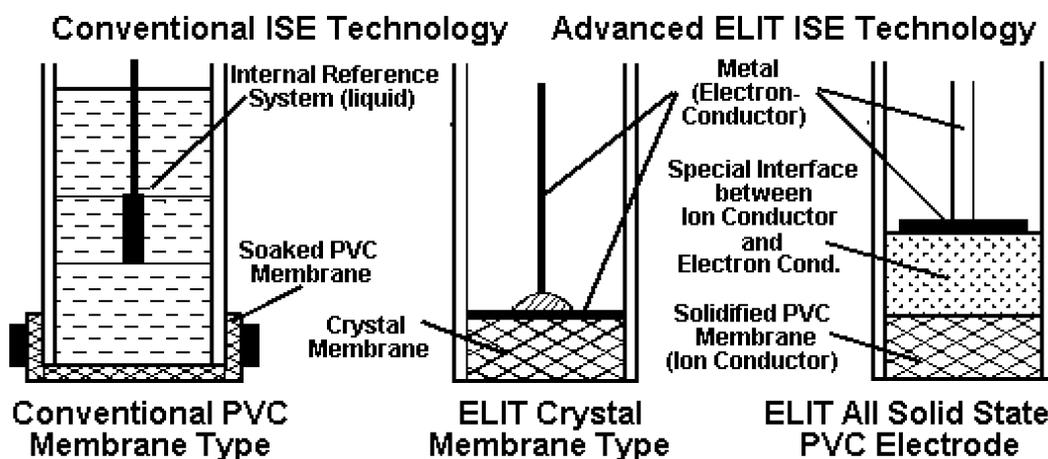


圖 1-4 離子選擇電極薄膜技術[42]

目前市面上也已開發出各種 ISE 系統，不論是陰離子或是陽離子皆可量測，如表 1-3 所示。離子選擇電極主要依賴兩種不同的電導方式，電極上的傳導以金屬薄膜的電子傳遞，液體中的電流是由離子傳遞，量測時藉由離子選擇薄膜感測的電位差，正比於外部離子濃度的對數，故可直接取兩個已知的標準樣品量測出校準曲線，再以內插法換算電壓即可。市售離子選擇電極通常會符合校準曲線：單價陽離子為 $+55\pm 5$ mV/dec、單價陰離子為 -55 ± 5 mV/dec、二價陽離子為 $+26\pm 3$ mV/dec、二價陰離子為 -26 ± 3 mV/dec。量測時只有微電流流動，電子會由離子選擇電極彌補給參考電極，藉此量測原始穩定的參考電壓之改變，故使用一個獨立的參考電極可使量測更精準，市面上也販售不同組合方式的離子選擇電極與參考電極，如圖 1-5 所示。市面上之離子選擇電極與參考電極分開製作販售，圖 (A) 為離子選擇電極，圖 (B) 為參考電極，使用者即可購買一根參考電極搭配不同的離子選擇電極使用，且替換時可只維修缺陷的參考電極而不犧牲昂貴的離子選擇電極，但其缺點為兩根電極使用兩種不同的電解液，其電解液之間的擴散電位皆會影響偵測；也有產品製作成複合式電極，如圖 1-5 (C) 所示，將離子選擇電極與參考電極整合於一根電極，不僅使用上較為方便，更可減少電極距離產生的靜電場雜訊，但其缺點為使用壽命縮短且價格昂貴。

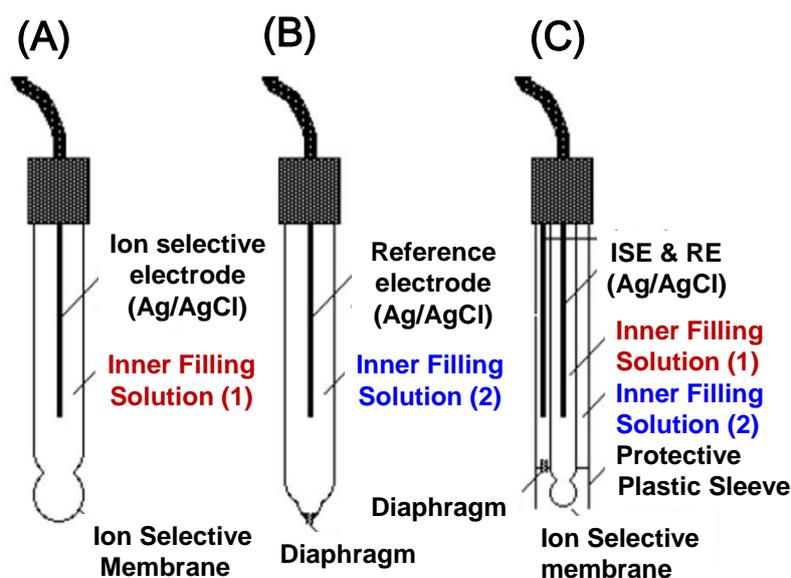


圖 1-5 市售離子選擇電極：(A) 離子選擇電極 (B) 參考電極 (C) 複合式電極

表 1-3 市售離子選擇電極規格表[40-43]

Electrode	Membrane	Concn. Range	pH Range	Interferences	Calibration Standards	Brand Model
Ammonium (NH ₄ ⁺)	PVC membrane	5×10 ⁻⁶ to 1.0 M	4 to 10	K ⁺	NH ₄ Cl	Cole-Parmer: GH-27504-00
Barium (Ba ⁺²)	Solid-state PVC matrix membrane	4×10 ⁻⁶ to 1.0 M	3 to 10	Ca ⁺² , K ⁺ , Mg ⁺² , Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , Sr ⁺²	BaCl ₂	Nico2000: ELIT 8081 PVC membrane
Bromide (Br ⁻)	Solid-state membrane	5×10 ⁻⁶ to 1.0 M	2 to 14	S ⁻² , I ⁻ , CN ⁻ ; high Cl ⁻ , NH ₃	KBr	Cole-Parmer: GH-27504-02
Cadmium (Cd ⁺²)	Solid-state membrane	10 ⁻⁷ to 10 ⁻¹ M	2 to 12	Ag ⁺ , Hg ⁺² , Cu ⁺² ; high Pb ⁺² , Fe ⁺²	Cd(NO ₃) ₂	Cole-Parmer: GH-27504-04
Calcium (Ca ⁺²)	PVC membrane	5×10 ⁻⁶ to 1.0 M	3 to 10	Pb ⁺² , Hg ⁺² , Cu ⁺² , Ni ⁺² , Fe ⁺² , Mg ⁺² , Zn ⁺² , Ba ⁺²	CaCl ₂	Cole-Parmer: GH-27504-06
Chloride (Cl ⁻)	Crystal membrane	3×10 ⁻⁶ to 1.0 M	1 to 12	Br ⁻ , CN ⁻ , I ⁻ , S ⁻² , Ag ⁺	KCl	HACH: LZW9652C.97.002
Copper (Cu ⁺²)	Solid-state crystal membrane	9×10 ⁻⁸ to 10 ⁻¹ M	2 to 7	Ag ⁺ , Br ⁻ , Cd ⁺² , Cl ⁻ , Fe ⁺² , Hg ⁺² , S ⁻²	CuSO ₄	Nico2000: ELIT 8227 crystal membrane
Cyanide (CN ⁻)	Solid-state crystal membrane	9×10 ⁻⁸ to 10 ⁻¹ M	13 to 14	Ag ⁺ , Hg ⁺²	NaCN	Nico2000: ELIT 8225 crystal membrane
Fluoride (F ⁻)	Solid-state membrane	10 ⁻⁶ to saturated	5 to 8	OH ⁻	NaF	Cole-Parmer: GH-27504-14
Iodide (I ⁻)	Solid-state membrane	5×10 ⁻⁸ to 1.0 M	0 to 14	CN ⁻ , S ⁻² , Br ⁻ , S ₂ O ₃ ⁻² , Cl ⁻ , NH ₃	KI	Cole-Parmer: GH-27504-18
Lead (Pb ⁺²)	polymer membrane	10 ⁻⁶ to 1.0 M	2 to 8	Ag ⁺ , Cd ⁺² , Cu ⁺² , Fe ⁺² , Hg ⁺²	Pb(ClO ₄) ₂	Mettler-Toledo: DX407-Pb Lead half-cell
Mercury (Hg ⁺²)	Solid-state crystal membrane	10 ⁻⁶ to 10 ⁻¹ M	0 to 2	Ag ⁺ , S ⁻²	Hg(NO ₃) ₂	Nico2000: ELIT 8251 crystal membrane
Nitrate (NO ₃ ⁻)	PVC membrane	7×10 ⁻⁶ to 1 M	2.5 to 11	BF ₄ ⁻ , ClO ₄ ⁻ , CN ⁻ , I ⁻	NaNO ₃	Cole-Parmer: GH-27504-22
Nitrite (NO ₂ ⁻)	hydrophobic gas-permeable membrane	5×10 ⁻⁶ to 5×10 ⁻³ M	1.1 to 1.7	CO ₂ , SO ₂ , HF, acetic acid	NaNO ₂	VanLondon-pHoenix: NOX1501
Perchlorate (ClO ₄ ⁻)	Solid-state PVC matrix membrane.	2×10 ⁻⁶ to 10 ⁻¹ M	0 to 11	Cl ⁻ , I ⁻ , NO ₃ ⁻ , SCN ⁻	NaClO ₄	Nico2000: ELIT 8061 PVC membrane
Silver (Ag ⁺)	Solid-state Crystal membrane	9×10 ⁻⁸ to 10 ⁻¹ M	1 to 9	Ag ⁺ , S ⁻²	AgNO ₃	Nico2000: ELIT 8211 crystal membrane
Thiocyanate (SCN ⁻)	Solid-state crystal membrane	2×10 ⁻⁵ to 10 ⁻¹ M	2 to 12	Br ⁻ , Cl ⁻ , I ⁻ , Ag ⁺ , S ⁻² , S ₂ O ₃ ⁻²	KSCN	Nico2000: ELIT 8229 crystal membrane

Berduque 等學者提出異液相流體的方式來檢測目標離子[48]，此微流體晶片的設計是利用在矽基板上定義出鉑電極圖案（厚度 150 nm），再使用 SU-8 光阻作為微流道（深度 180 μm ），上蓋使用 PDMS 接合。圖 1-7 為此微流體設計的 Y 型微流道結構，使用兩片鉑電極（間距 350 μm ）結合 Y 型微流道設計，利用 Y 型注入口分別注入有機相溶液與水相溶液，當有機相電解質溶液與水相溶液平行流動於管道中，因兩相不互溶，所以會在兩液相間產生一個動態平衡的介面，藉由管道兩旁的鉑電極施加需要的電壓值（+2.5 V ~ +3.0 V），即可控制要萃取的目標離子。此研究的萃取離子為四乙基銨陽離子（Tetraethylammonium Cation, TEA⁺），從量測的電流值得之萃取出離子的比例。結果證實，異液相技術經由控制電壓與流速，可萃取分離出濃度 25 μM 的 TEA⁺ 離子，其萃取效率介於 8% 到 11%。

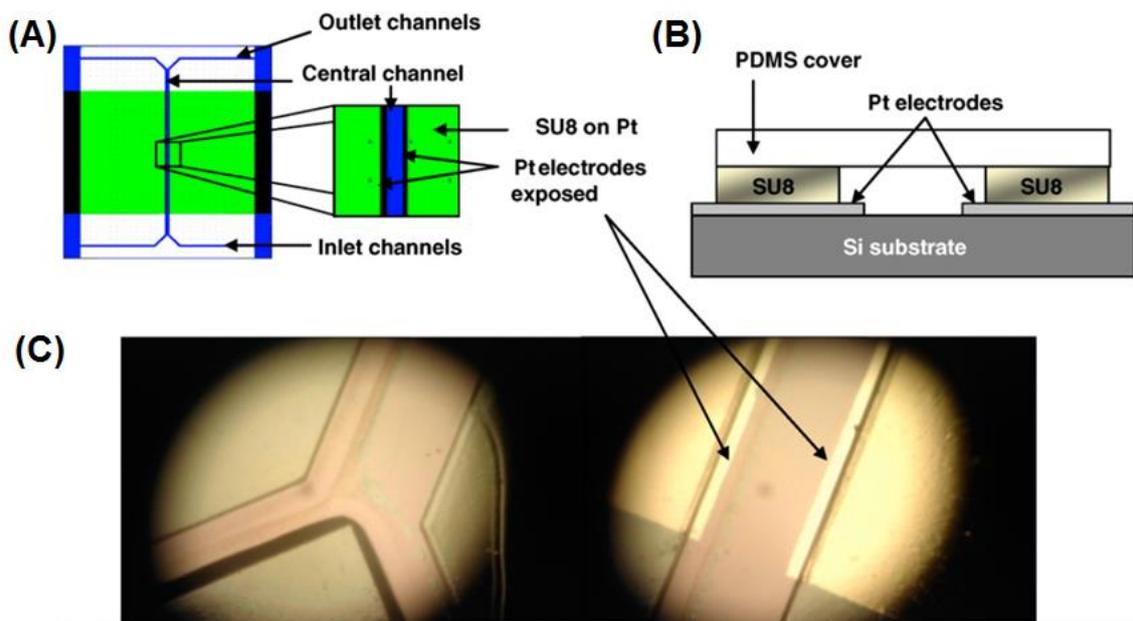


圖 1-7 使用有機相與水相來分離目標離子的雙液相流體薄膜：(A) 晶片管道與電極設計 (B) 管道的橫切面 (C) 左為 Y 型結構的注入流道區；右為中央感測區域，電極分布於流道兩側[48]

Hisamoto 等學者提出另一種成膜機制，使用流體介面頸縮與異相層流的特性，於微流體管道內合成化學性聚合高分子薄膜[49]。藉由有機相與水相流體產生的介面，於介面產生化學頸縮反應，如圖 1-8 所示，在 X 型的管道中，使用異相溶液產生的介面，可製造出聚合薄膜結構，並可使用有機相/水相/有機相的三異相流體，製作出雙層平行的薄膜結構。圖 (B) 微晶片管道的剖面圖，使用電子顯微鏡拍攝管道內的橫切面圖，從影像中可證實此技術於管道內可順利成膜，且在管道內製作出的立體薄膜厚度約為 10 μm 。使用此技術成型的聚合薄膜，其薄膜厚度可利用有機相與水相溶液中，參與反應的離子濃度不同，而可改變薄膜成型的厚度。此研究使用含銨離子的水溶液，利用管道內製作出的薄膜滲透過去，使用熱透鏡顯微鏡 (Thermal Lens Microscope, TLM) 便可量測到訊號。

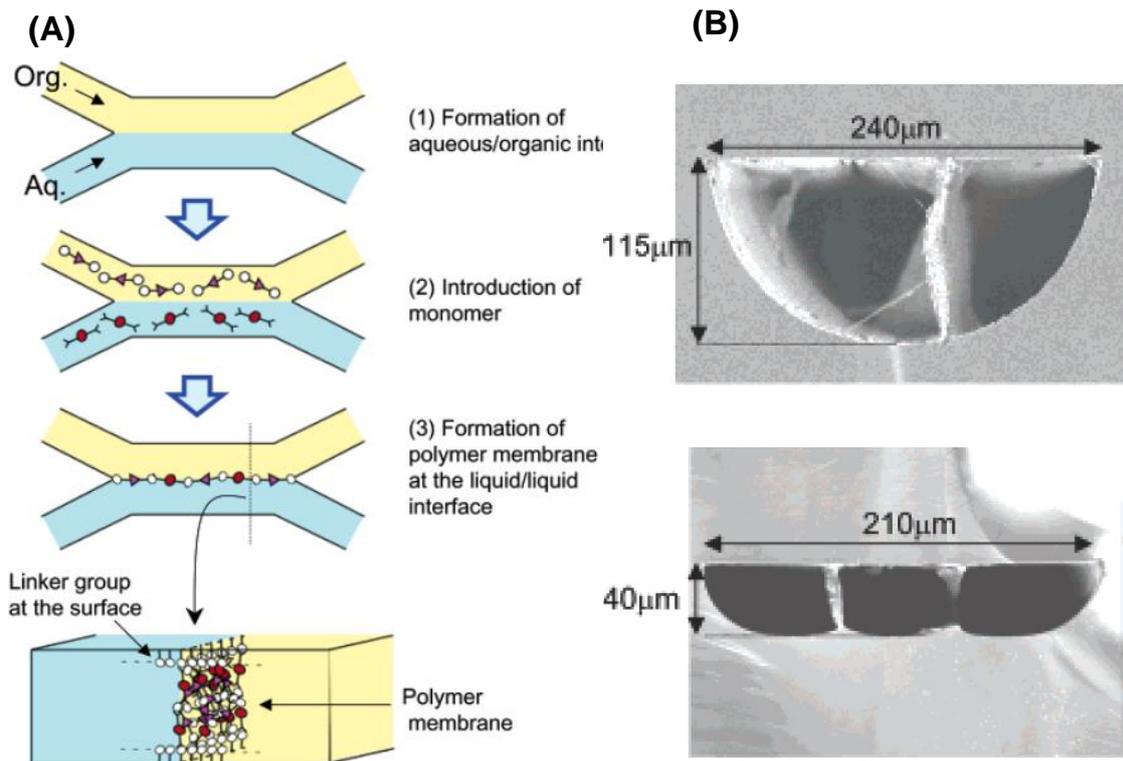


圖 1-8 使用異相層流技術於 X 型微管道晶片中合成化學性聚合高分子薄膜：(A) 異相層流晶片示意圖，利用有機相與水相溶液產生化學性聚合膜 (B) 管道內橫切面 SEM 圖[49]

上述介紹的三種離子選擇膜感測器所使用的薄膜，分別為 PVC 膜、雙液相液態膜以及化學性聚合高分子膜。雙液相流體在操作上需穩定控制異相介面，量測時需額外提供電壓，同時穩定控制流速大小；而化學性聚合薄膜雖可製作多層薄膜結構，且可控制薄膜厚度，但其製程繁雜需穩定異相介面，且製作薄膜需耗費許多薄膜樣品。因此本實驗選用 PVC 薄膜作為離子選擇膜感測器的材料，不僅薄膜樣品配製容易，且可使用簡單的製程即可完成，不須大型的專業儀器即可製作感測器並檢測樣品。

1.4 動機與目的

本研究室已成功開發出一種簡便且容易製作的成膜技術，在過去的研究中已成功將銨離子選擇薄膜整合電極於微流體晶片中，並使用電化學循環伏安法檢測樣品中的銨離子濃度[50, 51]。此研究不僅大幅減少了至少一半的感測反應時間，並提升感測效能相較於市售產品五個量級，晶片體積為 $23 \times 20 \times 3 \text{ mm}^3$ ，攜帶上更加地方便。離子選擇電極也隨著檢測技術上不斷的進步與發展，市面上已有許多公司發展出高效能的離子選擇膜，如 Sigma-Aldrich 等藥品商提供配製好之離子選擇薄膜配方，將販售之離子選擇膜溶於有機溶劑中，製作出可替換式離子選擇膜，使用者即可因需求使用不同的離子選擇膜。

先前已介紹過離子選擇薄膜量測原理，總離子強度在溫度固定時，可利用膜兩側之電位差來推算樣品濃度，其中感測面積為膜電位數據的主要變因之一，但目前尚未有學者探討過離子選擇薄膜內外面積差異所帶來的影響。因此在前人的設計原理架構下，本研究改良量測電極與感測面積條件，利用微流道之結構設計，創造出感測面積相對較大之樣品區，對應到感測面積相對較小之電解液區。由於薄膜內填入濃度不變的內部填充液，因此當僅有薄膜外部的濃度變因的情況下，希望藉由此薄膜的感測面積差異，提升離子選擇電極之感測效能，創造出更容易成膜、量測更為靈敏之離子選擇感測晶片。

本研究使用一種透明的熱塑式玻璃替代塑膠基材，以聚甲基丙烯酸甲酯（Polymethyl Methacrylate, PMMA）作為微流體通道材質，利用不同設計之微結構梯形阻塊，使成膜後的 PVC 薄膜具有不同的內、外感測面積，藉此提升感測靈敏度。微流道設計部分，使用套裝軟體 Ansys[®] Fluent 模擬，優化前人之微流道晶片結構，找出最適合成膜的微流道結構設計，並探討其微流道內部氣體流場分布。在 PMMA 晶片接合製程上不採用具有輕微腐蝕性之化學黏著法，改使用電漿表面改質接合技術，不僅增加表面能及親水特性，更能在不破壞微流道結構之情況下完整地接合，完成 PMMA 微流道晶片的製作。電極部分使用銀/氯化銀電極作為感測電極，普遍的電極製程使用電鍍的方式，通電使電解液中的氯離子與銀電極產生化學反應，生成氯化銀結晶。本研究改變製作方式，使用自發性氯化反應製作，不須儀器額外的供電，更能隨時隨地製作出具有檢測效能的銀/氯化銀電極。本研究提出之微流體晶片不僅於量測線性範圍廣於市售離子選擇電極，檢測效能、穩定性以及成本低廉等優點，都足以取代市售離子選擇電極，除了對於食品檢測有所貢獻，也希望能提供一個更方便的量測系統，可利用簡便的三用電表即可精準的檢測樣品中硝酸鹽的含量。

1.5 論文架構

本論文共分為五章節，包含緒論、感測器原理與材料特性、實驗設計與架構、實驗結果與討論、結論與未來展望，圖 1-9 為此論文架構之支狀圖。



圖 1-9 本研究之論文架構圖

第二章 工作原理

2.1 電化學

電化學反應是一種涉及電子與化學相互反應關係的科學，主要利用不同電位產生的電能進行反應。電化學反應即為藉由電子移轉的過程，其電子轉移行為發生在不同相的介面上，也就是電荷轉移前後所產生的一連串化學反應，如電荷由電子轉移至液態之離子。在電化學反應的過程中，可能會產生新的生成物或者消耗反應物，如氣體或氧化物等。而這些反應牽扯到複雜一連串的化學反應，因此進行電化學反應時需考慮後續反應物的脫附、生成物吸附等現象[52]。

電化學分析是一種簡單、快速且隨時檢測的技術，所使用的量測系統中最常見的數據訊號，分別有電壓、電量、電流，其中以電流大小最易檢測也較靈敏，可用來量測產物的生成速率或反應物的消耗速率。電化學是利用電位來驅動化學反應之進行，分析電荷轉移與化學反應之間的相互關係，其導電方式由電子的移動來完成，因此可利用調整電位改變電極表面之電子能量，促使溶液中之高活性離子與電極界面產生電子轉移[53]。當電極電位由相對正電轉變成相對負電時，電極上的電子能量會隨之提高，當反應的電子位能高於分子軌域中最低位能的空軌域時，電極上的電子將跨越電極與反應物間不連續的界面，使得反應物得到電子，此過程稱為還原反應。反之，當電極電位由相對負電轉變成相對正電時，電極上的電子能量會隨之降低，一旦電極的電子位能低於分子軌域中最高位能的佔有軌域時，反應物之電子將跨越界面使電極得到電子，此即為氧化反應。

電化學反應僅於表面產生變化，因此離子選擇電極於檢測使用時，利用電位計量測薄膜之電位差，檢測樣品濃度；而量測電極感測效能時，使用循環伏安法量測電極表面之之氧化還原電位。

2.1.1 能斯特方程式

在許多研究中發現，離子活性會影響量測結果，因此需要測定電解質溶液內之離子活性，以計算電極於不同溫度下量測時之離子活性系數。為此，德國化學家瓦爾特.赫爾曼.能斯特 (Walther Hermann Nernst) 提出一方程式，以描述電化學電池之電位差與反應物濃度之關係，此為著名的能斯特方程式 (Nernst Equation)，由方程式可得知可逆電池或電極之電位，用於計算電化學半電池反應之平衡還原電位 (Equilibrium Reduction Potential)，而其平衡還原電位與氫電極之電位差為標準電位。電位除了由電極組成成分決定，也和溫度與溶液活性有關，可由熱力學推導出其相對關係[54]。

能斯特方程式廣泛應用於計算電化學電池的電動勢 (Electromotive Force)，是表達電極電位跟濃度的關係式，在電化學系統中，若電極反應產生之電位為 E ，提供之電量為 Q ，其電量 Q 在 1 莫耳電子反應下為 1 法拉第 ($1 F = 96500 C$)，則電極所作之淨功為 QE 。若過程中有 n 莫耳電子參與反應，則產生之電量為 $Q = nF$ 。定溫定壓時，由熱力學原理可推知，化學反應之吉布斯自由能 (Gibbs Free Energy) 減少的能量，應該等於電池於可逆條件下所作之淨功。

$$\Delta G = -nFE \quad (2.1)$$

假設一可逆反應式為：



反應物 A、B 進行氧化還原反應形成產物 X、Y，反應之自由能變化為

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[X]^x [Y]^y}{[A]^a [B]^b} \quad (2.3)$$

將公式 (2.1) 代入公式 (2.3) 可得：

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[X]^x [Y]^y}{[A]^a [B]^b} \quad (2.4)$$

此公式稱之為能斯特方程式，以表示電極或電池之電位。

在常溫下 (298K)， RT/F 的值大約為 0.0591，因此能斯特方程式可簡化為：

$$E = E^0 - \frac{0.0591}{n} \ln \frac{[X]^x[Y]^y}{[A]^a[B]^b} \quad (2.5)$$

E：電池電位

E^0 ：標準電位

R：氣體常數 (8.314 J/mol-K)

T：絕對溫度 (室溫為 298K)

F：法拉第常數 (96500 C)

n：半反應之電子轉移數

ΔG ：反應之標準自由能變化量

以一個可逆反應來說，反應會趨近於平衡方向進行，當反應物濃度隨著電化學反應降低，電池電位 (Cell Potential) 也會不斷產生反應，直到平衡 $E = 0$ ，此時電極間不再有電位差，故氧化還原反應達到平衡，電化學電池不再做功。利用能斯特方程式，可藉由改變物質的濃度的方法來改變電池電位，從而改變氧化還原反應的方向，不過電池或電極量測時的溶液並非理想溶液，因此溶液濃度需考慮活性 α (Activity)， $\alpha = \text{濃度} \times \text{活性係數}$ (Activity Coefficient)，因此對能斯特方程式加以修正為：

$$E = E^0 - \frac{0.0591}{n} \ln \frac{\alpha[X]^x \alpha[Y]^y}{\alpha[A]^a \alpha[B]^b} \quad (2.6)$$

在電化學半反應中，若還有其他物質參與 (固體和水除外)，則其濃度也應寫在方程式中。

2.1.2 濃差電池系統

電化學濃差電池 (Concentration Cells) 原理是利用電位滴定法，與傳統滴定法相似，但量測過程無需添加指示劑，而是利用兩根以上的電極，測得其電極的電位差，並依據電位差去計算該溶液的離子濃度。濃差電池過程伴隨著自由能變化轉為電能，電池內之物質變化由高活性往低活性移動，即 $aA + bB \rightarrow xX + yY$ ，與自發性擴散作用不同，兩個溶液藉由多孔性薄膜或鹽橋區隔開，以防止溶液混和。濃差電池中的物質轉移是間接地透過電極反應得以實現的[55]，此過程之自由能變化為

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[X]^x[Y]^y}{[A]^a[B]^b} \quad (2.7)$$

為了能量測出溶液中的感測電極間的電位差，而單一電極無法量測到絕對電位，故使用另一個電極的電位作固定基準，對應兩根電極間的電位，因此獲得其電位差，此基準電極為參考電極。參考電極一般採用難溶性、不易氧化的金屬，例如銀/氯化銀電極及飽和甘汞電極兩種。而相對於參考電極的另一根電極為工作電極，工作電極的材質視化學反應之種類而定，例如：酸鹼滴定可使用玻璃電極，氧化還原滴定可使用白金電極，沉澱滴定可使用銀電極，錯合滴定可使用離子選擇性電極或光度電極等。

電化學濃差系統為一種雙電極架構，是由於系統中存在濃度差而產生電位的電池，濃差電池因性質上的不同又分為兩類：一類為兩極間電解質濃度不同的濃差電池，如圖 2-1 所示，它的電解質及電極材料都相同，只有電解質的濃度不同，反應式： $\text{Cu} | \text{Cu}^{2+}(0.1 \text{ M}) || \text{Cu}^{2+}(1.0 \text{ M}) | \text{Cu}$ ，兩 Cu 電極與陽離子 Cu^{2+} 均互為可逆，此類稱為離子濃差電池。另一類為電極濃差電池，其電極材料相同但電解質不同，但不論是何種性質之濃差電池，其電池之標準電位均為零，並遵守能斯特方程式。

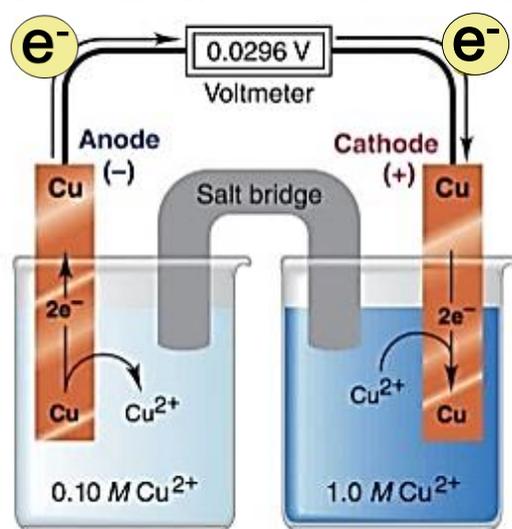


圖 2-1 濃差電池架構，左為反應前；右為反應平衡後

2.1.3 循環伏安法

循環伏安法 (Cyclic Voltammetry, CV) 為電化學電極分析中最常見的方法之一，是以待測溶液中電極電流與電壓關係為基礎的分析方法。CV 分析法與電位分析法不同，是在於 CV 分析法電位的情況下對於樣品電流的訊號分析，其分析原理為對電極施加一循環電位後，其電子轉移造成電流的產生，於電極表面進行氧化還原反應，觀察其氧化與還原電流之變化；而不同的反應物有不同的分子軌域能階，因此發生反應之電位也有所不同。電極表面與電子產生反應時，可能發生物理吸附、脫附或化學反應作用，當待測物接觸到電極時，氧化還原反應會量測到對應之電流，其公式如下：

$$I = nFAD \left(\frac{\Delta c}{\Delta x} \right) \quad (2.8)$$

A：電極面積大小 (cm²) n：分子與電極交換之電子數目

D：分析物擴散係數 (cm²/s) Δc：待測物之濃度差

F：法拉第常數 Δx：與電極表面之距離

對於許多創新研究的電化學系統，CV 分析法是鑑定氧化還原最有效的方法之一，利用快速的電位掃描出氧化還原反應發生時的電位，進而利用氧化還原之電位值與電流值的變化情形評估其電化學特性。使用電化學分析儀產生循環電位，從初始電位以相同速度升高至設定電位，再以相同速度降回至初始電位，此電位反應為一循環，其電位變化與時間關係如圖 2-2 (A) 所示。圖 2-2 (B) 為常規繪製之電化學數據圖，其表示出產生之電位與電流的關係，又稱伏安特性曲線。從曲線圖中可得知四個重要資訊，分別為還原峰值電流 (i_{pc})、氧化峰值電流 (i_{pa})、還原峰值電位 (E_{pc}) 及氧化峰值電位 (E_{pa})。CV 分析掃描時的電位範圍，基本要求是建立在訊號背景掃描的基礎上，訊號背景掃描出一條穩定的背景訊號特徵，此特徵主要表現出其電極表面的特性，與電極表面積、性質、靈敏度以及表面粗糙度相關。

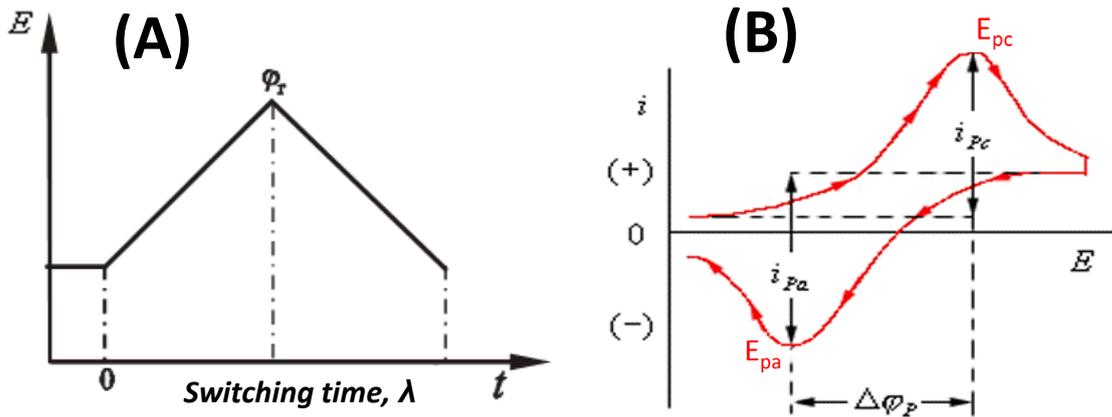


圖 2-2 電化學循環伏安法原理：(A) 循環電位掃描 (B) 可逆之理論循環伏安曲線圖

2.2 離子選擇薄膜

ISE 的原理基於對離子選擇性響應的膜產生膜電位差，因此也稱膜電極[61, 62]。目前已成功研發出許多不同之離子選擇膜材料，薄膜電極依使用材質不同，可用於量測各種離子濃度的離子選擇電極，因此 ISE 一般以感測膜材料來分類，可分為玻璃膜電極[63, 64]、固態膜電極[65]與溶有活性物質的液體膜電極[66]三種。

1. 玻璃薄膜電極 (Glass Membrane Electrode)：

玻璃電極為 ISE 最有名之市售電極，其電極最普及且構件簡單，常用來說明 ISE 的基本原理。玻璃電極如圖 2-3 所示，本體由試管狀之厚玻璃管所製成，其底部之球狀感測部分由對 H^+ 敏感的特殊玻璃薄膜做成，因此會在膜表面產生離子交換層。球內填充含飽和氯化銀的 0.1 M 鹽酸溶液，將電極置入試管內管口完全封閉，即形成玻璃電極內部的銀-氯化銀參考電極[64]或甘汞電極。

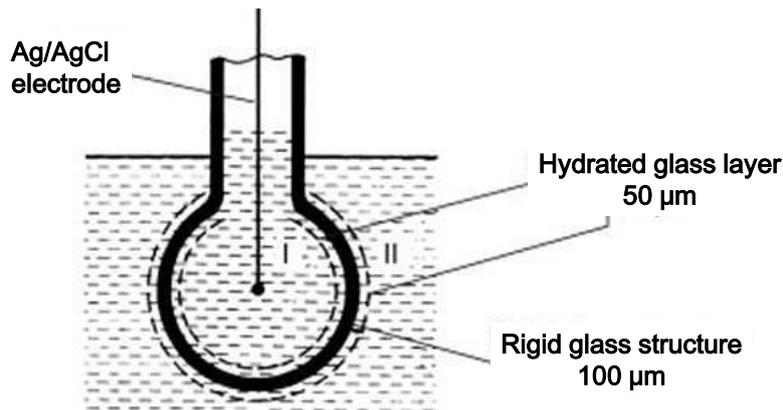


圖 2-3 玻璃薄膜電極示意圖[64]

玻璃電極薄膜之排列如圖 2-4，玻璃薄膜為特定組成之選擇薄膜，能於玻璃薄膜表面產生離子交換層。玻璃在此是唯一的離子導體，玻璃薄膜電極並非於薄膜上實際有電流通過，而是透過薄膜上產生質子傳遞，具有離子交換的功能。玻璃電極優點是使用時不受樣品中氧化物質及各種雜質的影響，使用前須需用 pH 緩衝溶液校正，並浸泡使其表面充分溶脹，大部分使用的 pH 值範圍為 1 到 10，不適用於量測強鹼性樣品。

一個電極感測離子 i ，其電極電位和離子活性關係如下：

$$E = E^i + \frac{RT}{nF} \ln \alpha_i \quad (2.9)$$

其中 E^i 為電極感應離子 i 之固定電位。

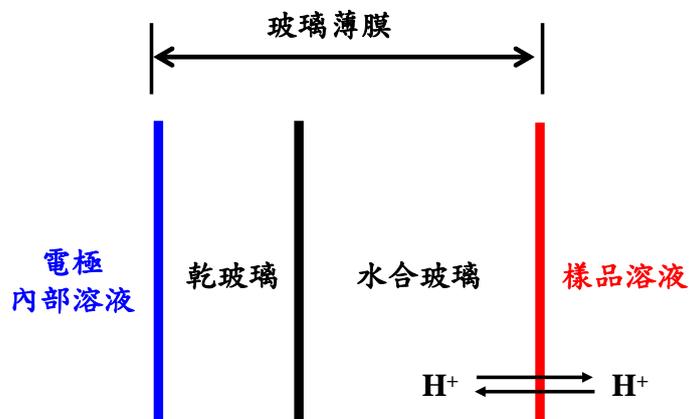


圖 2-4 玻璃薄膜電極之薄膜排列示意圖

2. 固態薄膜電極 (Solid-state Membrane Electrode) :

此處介紹之固態電極薄膜，不是單一晶體就是固態離子交換材質，以鹵化物離子敏感電極為例，其電極薄膜由固態銀鹽所組成，其電極之電位為：

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln \alpha_{Ag^+} \quad (2.10)$$

其中薄膜表面上之銀離子活性，為電極浸泡端之溶液內鹵化物活性之函數，銀離子活性可由鹵化銀之溶解度積 (Solubility Product) 來表示：

$$\alpha_{Ag^+} = \frac{K_{spAgX}}{\alpha_{X^-}} \quad (2.11)$$

因此可將公式 (2.10) 改為：

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} (\ln K_{spAgX} - \ln \alpha_{X^-})$$

$$E = E^{AgX} - \frac{RT}{F} \ln \alpha_{X^-} \quad (2.12)$$

AgX：鹵化銀

E：電池電位

Ag⁺：銀離子

E⁰：標準電位

X⁻：鹵化離子

R：氣體常數 (8.314J/mol-K)

α：活性

T：絕對溫度 (室溫下為 298K)

E^{AgX}：鹵化銀之標準電位

F：法拉第常數

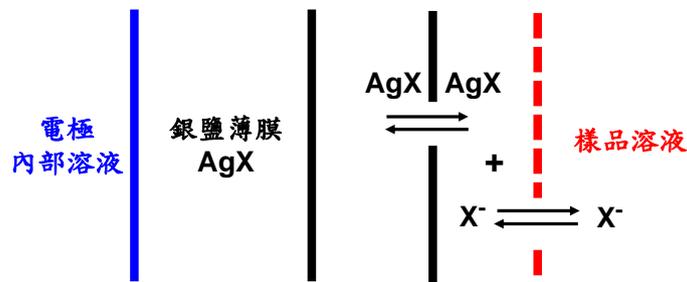


圖 2-5 固態鹵離子電極感測電極之成分及交互作用排列示意圖

3. 液體膜電極 (Liquid-membrane Electrode) :

液體薄膜是由多孔惰性且薄的材質所組成，其結構如圖 2-6，其中在液體中摻雜著離子交換物質 (Ionophore)，摻雜之離子交換物質大多為有機材料，因此能溶解在某些有機溶劑中，其材料準備容易，因此為目前最廣為使用的離子選擇電極材料[31]。液體薄膜有兩種類型之載體，一種是帶電荷之液體薄膜，包含對電感應之離子，操作相似於固態薄膜；另一種為中性之液體薄膜，並沒有包含待測之離子，但高分子載體以膠囊狀填補在適當大小的空洞內，它提供對特定離子的選擇性。典型的聚合物薄膜是使用具有可塑性之聚氯乙稀 (Polyvinylchloride, PVC) 所組成，其組成成分包含 2/3 的塑化劑、1/3 的 PVC 及微量的離子載體[67]，此種薄膜為非均相膜，使用疏水的 PVC 分子加上親水的離子交換樹脂混和成膜，其電化學性能普通、力學性能強且有彈性，但親疏水材料間黏結力差，薄膜存在縫隙影響離子選擇性。

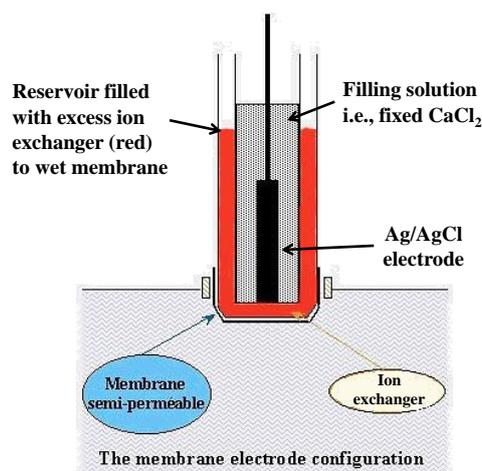


圖 2-6 液體膜電極組成之成分示意圖[31]

2.2.1 液態薄膜

先前已介紹過離子選擇薄膜感測膜材料來分類，可分為玻璃膜電極、固態膜電極以及液體膜電極三種，而液體薄膜又可分為兩種感測機制，根據離子載體之性能不同，分別為滲透型態之離子選擇膜 (Ion Exchange Membranes) [68, 69]，薄膜可選擇離子通過薄膜，其離子感測速率較低；吸附型態之離子選擇膜 (Ion Selective Membranes) [70]，薄膜對特定離子具有專一性，使特定離子附著於薄膜

表面，其離子感測速率快，可提高離子選擇電極之檢測及現與感測效能。離子選擇膜是由疏水性之高分子材料和親水性之離子交換樹脂組成，其黏結力弱，因此常有縫隙存在而影響薄膜之離子選擇能力，故干擾離子為量測時主要影響因素之一[71]。

一、通透性離子膜：

離子交換膜具有開放的三維空間結構，是一種對溶液中的離子具有選擇篩選通透能力、含有離子交換基團 (Ion-exchangers) 之高分子聚合膜，為了保持電中性，需要有陽離子或陰離子包含在膜內，因應用原理主要是利用其離子選擇通透性，所以也稱為離子選擇通透膜[72, 73]。離子交換膜依結構及功能不同，利用其摻雜固定之功能基團而定，可分為陰離子交換膜、陽離子交換膜、兩性交換膜、聚電解質複合物膜、鑲嵌離子交換膜這五種類型。陽離子交換膜中摻雜固定陰離子基團 (Cathodic Groups)，使主要移動之陽離子可藉此擴散滲透過薄膜，離子擴散過程如圖 2-7 所示。反之，陰離子交換膜中摻雜陽離子基團，使陰離子可藉由陽離子基團滲透過去。

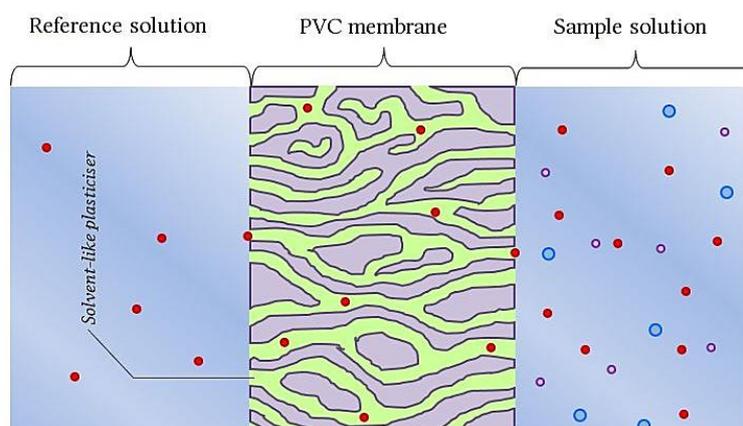


圖 2-7 離子選擇膜之通透過程[73]

通透性離子薄膜的膜電位與離子平衡時電位之間的電位差，會形成驅動主要離子的流動力量，驅動離子流動的力量稱為離子流 (Ion Flow)，可以藉由通透性、膜電位以及離子的平衡電位差來計算。離子流可以用歐姆定義去解釋：

$$I = V/R \quad (2.13)$$

$$G = 1/R \quad (2.14)$$

所以可以將公式代換成：

$$I = G \times V = G \times (V_m - E_x) \quad (2.15)$$

I：電流

V：電壓

R：電阻

G：通透性

V_m ：膜電位

E_x ：離子平衡電位

圖 2-8 是利用上述公式所繪製，其中橫軸是膜電位，縱軸為離子流。當膜兩側的離子尚未平衡時，若膜電位 > 平衡電位時，陽離子傾向於流向膜外，使膜電位恢復平衡，便會造成正向流動 (Positive Current)，離子向外流動 (Outward Current)；陰離子情況則相反，若膜電位 > 平衡電位，陰離子則流入膜內藉此降低膜電位。若膜電位 < 平衡電位，就會形成負向流動 (Negative Current)，離子向內流動 (Inward Current)。圖中標示的 V_{rev} 為反轉電位 (Reversal Potential)，當膜電位等於反轉電位時，表示離子的流動已平衡，離子不會繼續往膜外或膜內擴散，此電位值就是該離子的平衡電位。

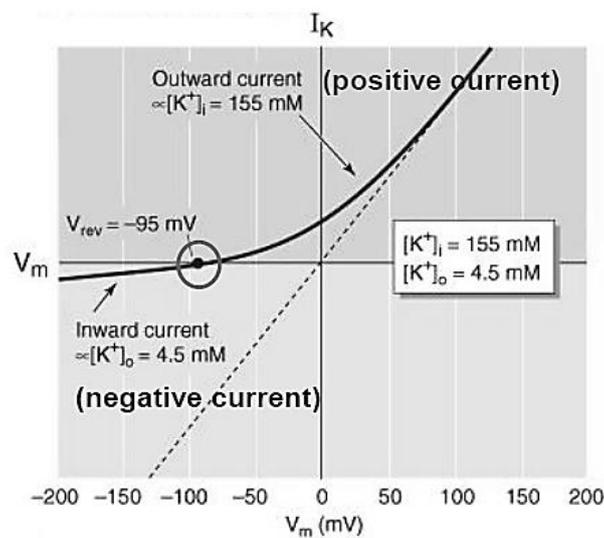


圖 2-8 膜電位與離子流對應圖

二、吸附型離子選擇膜：

離子選擇膜是以離子交換膜的架構為基礎，同為具有篩選能力之高分子聚合物膜，於薄膜中摻雜中性離子載體 (Neutral Carriers)，其環狀結構雖無法使溶液中特定離子擴散滲透，但可吸附溶液中之特定離子。利用薄膜中的離子載體對特定離子具有選擇性，因此當離子選擇膜與溶液中特定離子接觸時，薄膜會吸附特定離子，並於薄膜和溶液的界面產生膜電位差，如圖 2-9 所示。由此感測機制可得知，吸附型離子選擇膜的膜電位差，是藉由參考溶液區與分析溶液區之感測膜吸附的離子量不同，利用電位計量測而來。因此，當膜的一側接觸一已知的參考溶液，另一側接觸未分析之檢測溶液，即可量測出檢測溶液中特定離子的濃度，且膜電位與特定離子含量之間的關係符合能斯特方程式。當薄膜感測的特定離子為陽離子時，其膜電位會隨著濃度提升而往正電位移動；反之，當感測薄膜吸附的特定離子為陰離子時，其膜電位便會隨著濃度提升而往負電位移動。

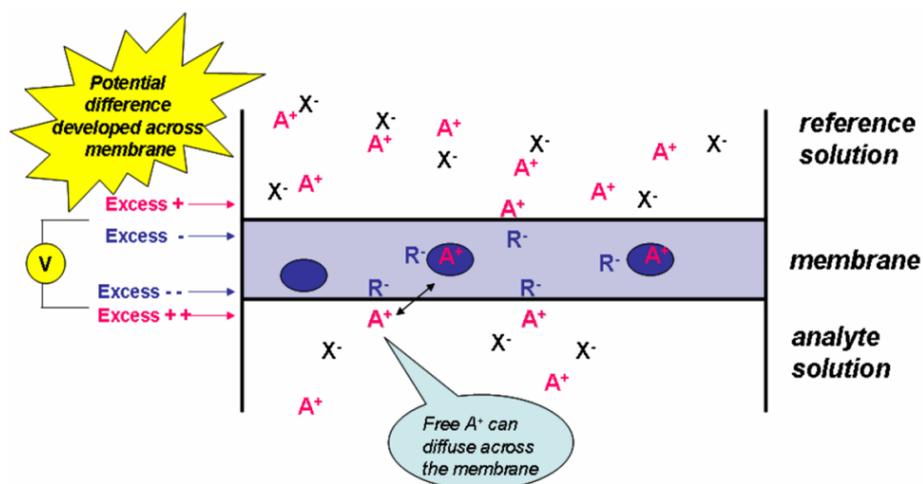


圖 2-9 離子選擇膜之吸附響應機制[74]

2.2.2 PVC 薄膜

隨著科技的發展，高分子材料被廣泛使用，而離子選擇電極由於攜帶方便、檢測範圍廣、操作簡單等優點，不論在何種領域皆被大量應用，其中決定離子選

擇電極性能優劣的因素，主要在於離子選擇的感測薄膜，而離子選擇液態薄膜有很多種類型，例如：Moody 等人提出之 PVC 膜[75]，證實 PVC 可作為離子選擇性薄膜材料，於 PVC 膜中添加離子載體和增塑劑即可，且配方簡單製作方便；Berduque 等人提出的異液相液體膜[48]，使用水相及有機相之雙液相流體來分離目標離子；Hisamoto 等人提出的化學性聚合薄膜[49]，藉由有機相及水相溶液之離子產生化學頸縮反應，製作出單層或多層平行之薄膜結構。在多種液態薄膜中，因 PVC 材質製作出之薄膜，具有良好之可塑性、易於成型加工、透氣性佳及電學特性佳等優點，可於 PVC 材料中摻雜不同的添加劑，使其具有更多樣化的應用。因此當 PVC 中添加離子載體，並使其溶於材料內部及表面後，即可作為替代傳統之感測薄膜材料。

於 1967 年，Bloch 研究團隊製作出鈣離子選擇薄膜，使用 PVC 中摻雜磷酸三丁酯 (Tributyl Phosphate, TBP) 作為增塑劑[76]。1971 年，Moody 等學者更測試了多種使用 PVC 材料薄膜之離子選擇電極，進行一連串的實驗，探討其薄膜之選擇性係數與參數，證明薄膜之結構、評價及使用之情況[77]。1981 年，Anker 等學者使用中性離子載體製作出離子選擇電極，其感測薄膜材料為 PVC，並於 PVC 中特別摻雜 ETH1001 (Calcium Ionophore)，用於檢測血液中血清中所含之鈣離子濃度[78]。1994 年，Schaller 等學者研究在 PVC 感測薄膜，量測混和不同種離子之樣品溶液，探討離子選擇電極對於陽離子與陰離子的反應與行為[79]。Bakker 等學者於 1996 年提出將電極薄膜溶解於含有四苯基硼酸鹽 (Sodium Tetraphenyl Borate) 溶液中，而溶液中之陽離子會與薄膜結合，進而改善離子選擇薄膜之選擇性[80]。

由這五十年來之發展可說明，PVC 材料製作之離子選擇電極已廣泛使用，其 PVC 薄膜著重的重點在於其電極之離子選擇性、量測反應時間與使用壽命。為此，許多研究薄膜之組成並改良，添加不同之離子載體於 PVC 膜中，以提升並改善電極之感測效能。

2.2.3 電極量測系統

電化學循環伏安反應系統中，最常使用三電極系統為量測架構，如圖 2-10 所示，分別使用工作電極 (Working Electrode, WE)、參考電極 (Reference Electrode, RE) 和輔助電極 (Counter Electrode, CE)，其中主要反應進行輸出的為 WE，是反應物產生氧化還原的地方，並且無限制此電極為陽極或陰極，是以反應物於電極發生的反應決定，在 WE 產生還原則為陰極，反之則為陽極。反應過程中為維持電化學平衡之電中性，須搭配 CE，其最大功能就是維持溶液的電中性且相對於 WE 為陰極或陽極；當 WE 產生反應時，CE 需相對應去平衡反應，且以不影響 WE 為原則，亦即 WE 產生氧化反應時，CE 則產生還原反應。進行電化學檢測時，通常僅需 WE 及 CE 即可量測，但訊號靈敏度較不穩定，因此加上 RE，其主要功能為穩定 WE 之參考電位，對於 RE 來說必須滿足下列條件：需近似於理想非極化電極 (Ideal Non-Polarizable Electrode)，且有良好的可逆性及穩定性，並能遵守能斯特方程式[56]。

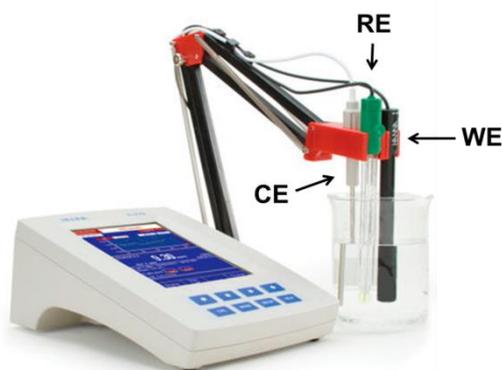


圖 2-10 電化學三電極系統之架設圖，分別為工作、輔助以及參考電極

一般製作電極常見之固態材料主要分為兩類，一種為碳電極，另一種則為金屬電極；其中碳的相關材料被廣泛地研究於電化學檢測上，諸如玻璃碳 (Glassy Carbon)、碳膠 (Carbon Paste)、奈米碳管 (Carbon Nanotube)、碳纖維 (Carbon Fiber)

[57, 58]等。相較於金屬電極，其電子傳遞速率較慢，且無法長期與有機溶劑接觸，但是無電極損耗之問題且成本低。而常見之金屬電極類型有金 (Au) [59, 60]、白金 (Pt) 及銀 (Ag) 等，一般以濺鍍 (Sputtering) 或蒸鍍 (Deposition) 之方式製備，而為了提高金屬電極薄膜與基板之附著能力，會在沉積金屬前於基板間添加黏著層，使得金屬電極不易剝落。常用的 RE 有兩種分別為銀/氯化銀電極 (Ag/AgCl Electrode) 和甘汞電極 (Calomel Electrode)，甘汞電極相對於標準氫電極 (Standard Hydrogen Electrode, SHE) 之電位為 0.244 V；銀/氯化銀電極相對於標準氫電極之電位為 0.199 V。

2.3 硝酸根 ISE

目前市面上已有許多公司販售硝酸根離子選擇電極，如表 2-1 所示，一般的玻璃薄膜或晶體式薄膜的硝酸根離子選擇電極，其使用壽命約 3 至 6 個月，若是於較惡劣之工作環境下 (如濃度較高、動態檢測、腐蝕性強)，電極壽命將縮短至 1 到 3 個月，甚至更短至幾天。而使用 PVC 感測薄膜之硝酸根離子選擇電極，其電極使用壽命取決於薄膜，大約可使用數小時到數千小時。硝酸根離子選擇電極於 1972 年由 Moody 團隊[38]所研發，使用高分子薄膜將離子選擇載體包埋，並使用玻璃管製作而成，結合商業之參考電極作為系統量測。

硝酸根離子載體有許多種類，許多學者已探討不同的離子載體的選擇性能[81]，使用方面也十分廣泛，有離子選擇電極[82-84]、離子選擇性場效應晶體 (Ion-selective Field Effect Transistors, ISFETs) [85-87]與光感測器[88]，其離子載體分為環狀結構[82, 89, 90]與直鏈結構[87, 91, 92]。一般的離子載體化學結構包含有機金屬化合物、大分子以及氫鍵，學者們在研發新離子載體的時候也會合理的推斷，參考生物體本身具有的通透機制 (如鈉鉀幫浦)，摻入能形成氫鍵的官能基，圖 2-11 為硝酸根離子載體之化學分子結構，圖 2-11 (A) 為硝酸根離子載體第四代[89]，其為環狀結構，其將有機化合物混合成離子載體，使整體結構具有方向性，

可使薄膜更穩定、離子選擇性效能更好，但環狀離子載體在不同 pH 值的情況下會影響量測結果，檢測濃度範圍從 4×10^{-6} 到 10^{-1} M；圖 2-11 (B) 為直鏈狀結構的硝酸根離子載體[91]，此離子載體為目前最廣泛被使用的硝酸根離子載體，因其結構為四級胺結構，四級胺結構較不易受 pH 影響，且較能與硝酸根離子形成離子對 (Ion Pair)，可使吸附性效能提升，因此量測反應時間更快速，檢測濃度範圍從 9×10^{-5} 到 1 M，為市售之硝酸根離子選擇薄膜配方[93]所使用的離子載體。

表 2-1 市售之硝酸根離子選擇電極規格表[40-43]

Membrane	Detection Limits	pH Range	Response Time	Temperature Range	Limited Life	Brane Model
Solid-state PVC membrane	5×10^{-6} ~ 0.1 M	2 ~ 11	< 10 s	0 ~ 50 °C	< 3 mV/day	Nico 2000: ELIT8021 PVC Membrane
PVC membrane	1×10^{-5} ~ 1 M	2 ~ 12	< 30 s	0 ~ 50 °C	n/a	Mettler-Toledo: DX262-NO3 Nitrate half-cell
Gelled organophilic membrane	7×10^{-6} ~ 1 M	2.5 ~ 11	< 30 s	0 ~ 40 °C	6 months	VanLondon-pHoenix: NO31502
PVC membrane	1×10^{-5} ~ 0.1 M	3 ~ 8	3 ~ 4 min	0 ~ 40 °C	6 months	HANNAinst: HI 4113 Nitrate Combination ISE
PVC membrane	7×10^{-6} ~ 1 M	2.5 ~ 11	< 30 s	0 ~ 50 °C	6 months	Cole-Parmer: Combination ISE, Nitrate

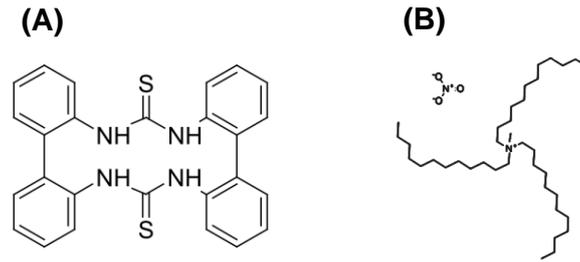


圖 2-11 硝酸根離子載體之化學分子結構：(A) 環形結構[89] (B) 直鏈型結構[91]

2.3.1 離子干擾

離子選擇電極的基本特性為衡量電極優劣的指標，而電極在對一種主要離子量測時，除了薄膜之靈敏度與穩定度外，其最大的困難是來自於其他離子之干擾，包括帶有相同或相反電荷之離子干擾，而這些干擾離子之訊號並不希望被電極偵測。目前市面上的離子選擇電極尚未具有絕對專一性，對溶液中其他離子也會有一定程度的數據反應，因此必須判對其他離子之干擾程度，並評估造成的誤差是否在容許範圍內。可使用選擇性係數 $K_{i,j}$ (Selectivity Coefficient) 來評估，此為電極對待測離子 i 與干擾離子 j 選擇性關係，值越小則電極對離子的選擇性越高。

當有其他離子干擾數據反應時，以能斯特方程式考慮干擾離子之情形，可利用 Nikolsky-Eisenman Equation [94] 計算出待測離子濃度之真實值，其公式如下：

$$E = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln[\alpha_i + \sum_j K_{i,j}^{pot} \alpha_j^{z_i/z_j}] \quad (2.16)$$

α_i ：待測離子之活性

α_j ：干擾離子之活性

Z_i ：待測離子之電荷價數

Z_j ：干擾離子之電荷價數

$K_{i,j}$ ：主要待測離子 i 對干擾離子 j 之選擇性係數

選擇性係數 $K_{i,j}$ 為表示離子選擇電極性能重要的參數，用於判斷電極對主要離子選擇性的指標，評估電極相較於主要待測離子而言，其對干擾離子之選擇性，也就是干擾離子對待測離子的干擾程度。選擇性非固定常數，會隨著測定的條件

和方法而改變，因此不能用來定量校正干擾離子所引起之電勢變化，只能用於評估電極對於干擾離子響應的相對大小。

2.4 離子感測晶片

到目前為止，平面電極已被證實，其可於晶片內藉由酵素催化反應來檢測生物樣品，並發展出將酵素酶直接摻雜於感測薄膜表面，並將酵素薄膜整合於離子選擇電極上，使之能實際應用於生醫連續即時檢測[95-98]。本研究室近年發展出，利用微流體晶片整合離子選擇電極於電化學式血清中尿素檢測[50, 51]，此研究發展出一創新 PVC 離子選擇薄膜製作技術，藉由 PVC 薄膜的表面張力作用將薄膜封裝於微流體晶片中，作為水溶液之銨離子感測用，再使用電化學檢測系統量測其氧化還原訊號之電流大小。晶片結構的設計是利用一連串的菱形結構，如圖 2-12 (A) 所示，藉由幫浦的吸力使空氣流於菱形結構旁之管道產生剪切流，使空氣流夾擠薄膜於微結構之間，再利用微結構間距微小，使 PVC 薄膜因表面張力而封裝於微結構之間。研究結果顯示，固定摻雜銨離子載體的 PVC 膜於微流體晶片中，使用電化學 CV 系統量測，檢測銨離子濃度範圍從 10^{-2} 到 10^3 ppm 之間有良好的線性關係，且偵測極限可達 0.1 ppb。此研究進一步製備摻雜酵素酶的 PVC 膜，如圖 2-12 (B) 所示，尿素酶載體摻雜於銨離子選擇薄膜，並進行生物催化反應與離子選擇，實驗結果顯示，開發的微晶片感測器結合酵素酶摻雜的離子選擇薄膜，檢測尿素樣品溶液濃度範圍從 10^{-1} 到 10^3 ppm ($R^2 \sim 0.9102$) 擁有良好的靈敏度。

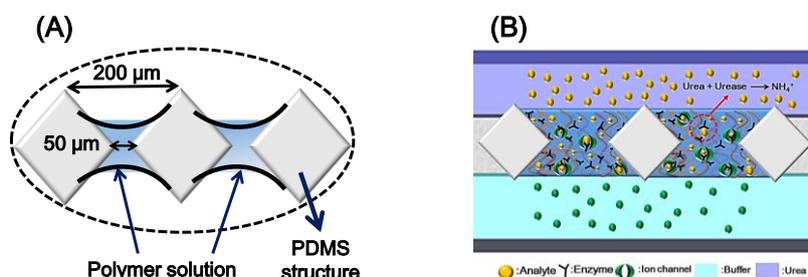


圖 2-12 離子選擇電極晶片於電化學檢測：(A) 微流體晶片結構中成型離子薄膜示意圖 (B) 於銨離子選擇 PVC 膜中摻入尿素酶載體[50, 51]

第三章 設計製作

在本章節當中，將會介紹本實驗所使用之材料、儀器與藥品，也將一併介紹實驗所設計之離子選擇薄膜的製作方式、電化學量測使用之電極的設計以及實驗之微流體晶片的設計與製程。另外，本實驗利用表面張力將薄膜固定於管道內之微結構上的方法會一併在此詳述，並解釋如何利用微結構的改變，來調整離子選擇薄膜感測面積內外的面積比。

3.1 微流體晶片

傳統的離子選擇電極架構主要包括電極、電極腔體、電解液與離子選擇薄膜，其離子選擇薄膜是外曝在環境底下，量測時將電極浸泡在電解液中，使感測薄膜像一個過濾器分隔電解液與樣品溶液。本研究設計並製作一個微流體系統，整合離子選擇薄膜於微流體晶片中，而此離子感測晶片的設計概念改良前人的架構設計，並使用電化學檢測系統進行量測。以此製作薄膜的方式，無須額外替換高單價感測膜，只需將液態薄膜固定於微流體系統之微結構中，作為微流體晶片系統之感測膜，即可應用於檢測不同離子。

此微流體晶片是利用真空幫浦及推進幫浦，管道中會有高壓力產生，所以在晶片材料之選擇上，必須採用有高機械強度及高接合強度的材料，方能承受幫浦在抽氣時所產生之壓力。一般晶片材料在選擇上會以低成本之鈉玻璃為主，而玻璃接合為熔融接合，機械性質和接合強度皆相當高[99]，故可承受幫浦所產生之壓力，但在製程上耗時且熔融接合會使微結構產生變形，因此本研究使用聚甲基丙烯酸甲酯（Polymethylmethacrylate, PMMA）塑膠基材製作微流道基板，利用電漿表面改質之晶片接合技術製作晶片[100]。

首先，使用貼紙定義出電極的圖案，接著使用濺鍍機將金屬薄膜濺鍍於 PMMA 基板上，此金屬薄膜為電化學量測之電極。再將設計之微流體結構經由玻璃微影

蝕刻後，使用 PMMA 進行翻模，接著使用電漿進行表面改質處理，處理過後即可將電極基板與微管道基板進行接合，其設計管道的兩側分別為電解液與樣品溶液之流道。

本研究使用流體成型技術於微流體晶片內，成型之薄膜厚度與各種因素有關，包括 PVC 液態膜的粘滯度、微管道的材料特性、真空吸力的大小、微結構的形狀等。因此本研究設計不同邊長之梯型結構，創造出具有不同表面積之感測薄膜。製作之離子選擇薄膜示意圖如圖 3-1 所示，管道中間部分為一連串梯形之微結構，其結構高度為 $200\ \mu\text{m}$ ，寬度尺寸會在設計部分詳細描述，結構間距皆為 $50\ \mu\text{m}$ 。製作薄膜時，將摻雜硝酸根離子載體之 PVC 液態膜於入口端注入，並於出口端使用真空幫浦吸引，藉由幫浦的吸力於管道中產生空氣剪切流，促使液態膜之表面張力將 PVC 薄膜固定於微結構上，使用此簡單的製作方式即可得到均勻厚度的薄膜，本研究開發的離子感測器於電化學檢測上有許多優勢，其優點包括可重複使用、攜帶方便、樣品需求量少外，不僅製程簡單快速，更可使用不同的市售離子載體薄膜，製作出對應需求之離子選擇電極。

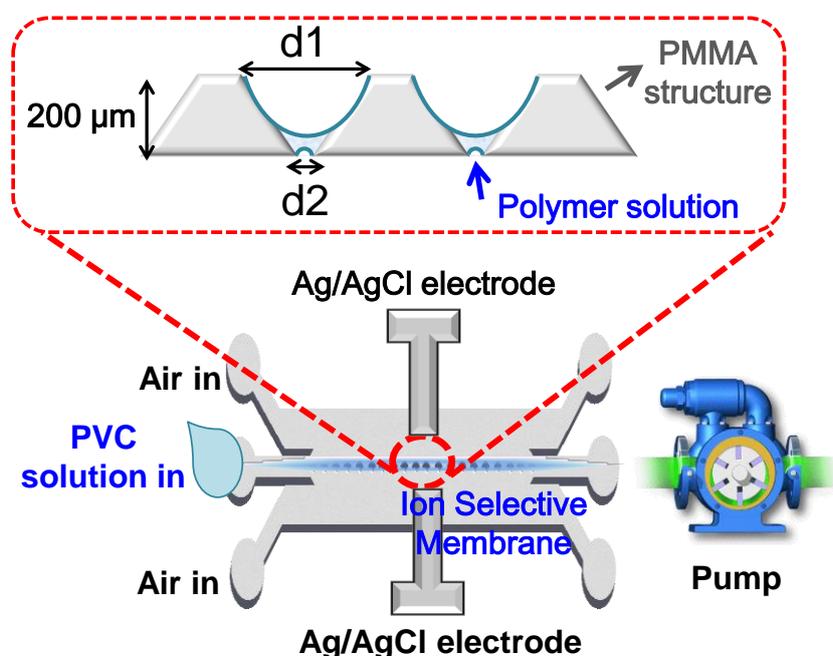


圖 3-1 使用真空幫浦使 PVC 薄膜於結構中成形示意圖

3.2 晶片設計與製作

本節將詳細介紹實驗所使用的離子選擇電極晶片製程，整個製作流程大致分為平面電極晶片加工、微流體晶片設計與晶片製程整合三大部分說明，詳細製程會於此小節中介紹。

3.2.1 感測電極

本實驗所使用之電極為平面電極，採用電化學系統之雙電極架構設計，經由繪圖軟體 CoreDRAW® 定義出電極的區域長度及大小，如圖 3-2 所示。工作電極與參考電極粗細皆為 0.5 mm 之 T 型長條狀電極，且 T 型上邊與感測薄膜對齊。為了檢測能更為方便，設計延伸出正方形電極，可連接 Slot 插槽，晶片電極與檢測儀器探針可直接連結，便可快速抽取替換感測晶片進行量測。貼紙遮罩部分使用雷射切割乙烯基 (Vinyl) 材質的卡典西德 (Cutting Sheet) 作為電極濺鍍遮罩，將其貼紙平整地黏貼於乾淨之 PMMA 基板上，再將其定義出的電極圖案部分撕下，就能直接置入真空濺鍍系統進行金屬濺鍍。一般製作方式會利用已濺鍍完成之金屬基板，再使用光阻微影製程來定義電極的圖案，但其製程繁雜費時且成本較為昂貴；以卡典西德定義電極圖案，不僅可以降低成本，更能大幅減少至少十倍的製程時間。

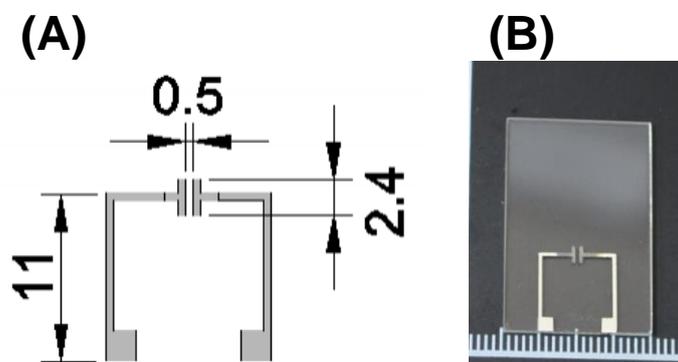


圖 3-2 使用貼紙遮罩濺鍍完成之銀/氯化銀電極基板：(A) 電極設計圖，單位為 mm (B) 銀/氯化銀電極晶片完成圖，每隔單位為 1 mm

本實驗使用之高真空濺鍍機為實驗室自行組裝機台，如圖 3-3 所示，接上直流脈衝電源供應器作為電漿游離源，於高真空狀態之腔體內通入氬氣作為轟擊靶材之分子，濺鍍所使用之金屬為銀，透過表面粗度儀量測得知厚度約 800 nm。在電化學量測中所需之電極為銀/氯化銀電極，這種電極較不會被極性化，因此可提供穩定且精準的量測資料。濺鍍完成的銀電極需要經由氯化處理，需將銀金屬轉化為量測穩定之氯化銀電極，使用氯化鐵溶液即可氯化銀金屬為銀/氯化銀電極。



圖 3-3 實驗室自行組裝之高真空濺鍍機

3.2.2 微流體管道

本研究為改良前人之設計，減少 PVC 成膜時外擴情形，讓 PVC 膜樣品能穩定地流經過微結構阻塊，使空氣流能順利夾擠 PVC 膜於中間阻塊流道，讓成膜過程更加簡單、順利。微流道設計必須保留中間薄膜流道，以及薄膜流道兩旁的樣品區域，因此在此限制下設計了四種不同的模組，如圖 3-4 所示，(A) 設計採用最簡單的概念，樣品流道入口與中間薄膜流道採取 45 度夾角，方便樣品的注入與清

洗；(B) 於樣品區入口處多增加了一個阻塊，是為了避免薄膜一開始進入流道的時候產生外擴情形；(C) 設計使氣體流場更貼近薄膜結構阻塊，避免在成膜的時候氣體流場直接從樣品管道被抽走，而無法順利讓氣體夾擠液態 PVC 薄膜；(D) 為使用前人的設計結構，拉長流道入口，使其氣體流場平行微結構。

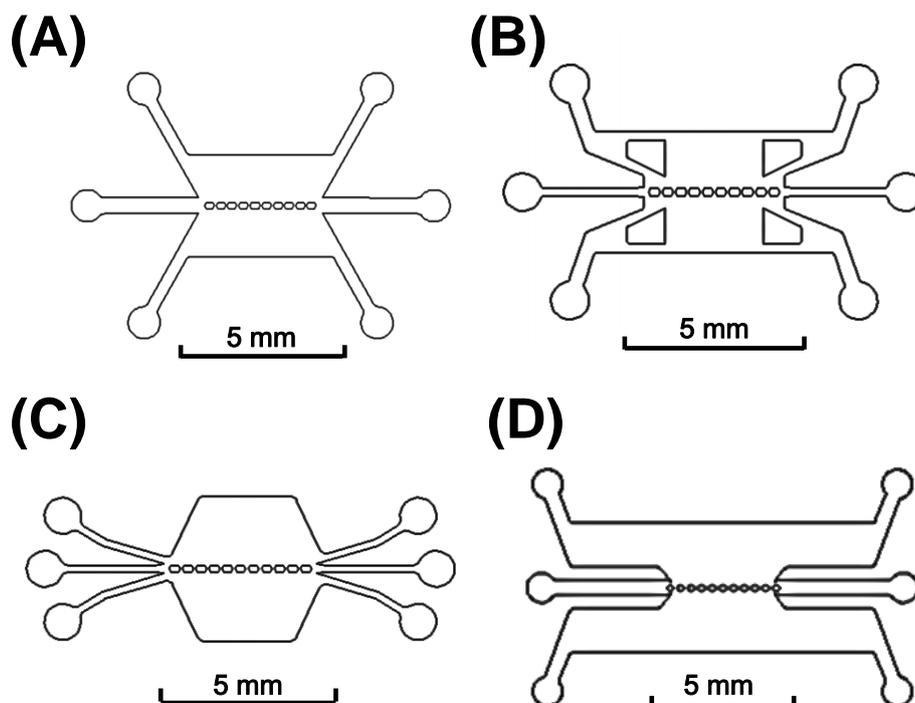


圖 3-4 微流道設計之二維模擬設計圖：(A) 最簡單之設計，流道入射角為 45 度角 (B) 增加阻塊於流道之設計，為集中氣體增強夾擠現象，也避免薄膜外擴 (C) 氣體流場貼齊微結構之設計，流道入射角為 30 度 (D) 仿造前人之設計，拉長流道入口，使其氣體流場平行微結構

本研究使用套裝軟體 ANSYS® Fluent 系統模擬，探討微流道管道之流場，其中包含速度分布以及空氣流場流線，並進行比較找出最佳微流道結構設計，主要步驟分為前處理及後處理兩部分：

1. 前處理建模部分：

主要為建立模型、網格、邊界條件及氣流區域之設定，其中可依不同之幾何形狀需求，於網格密度及粗糙度做設定處理。模型建構上，本實驗設計了四

種不同微流道結構，如圖 3-4 所示共有六個出入口，流道長度與結構長度皆為 4 mm。設計時考慮了氣體流暢度、PVC 膜外擴、以及樣品注入區，使用 AutoCAD[®] 繪圖軟體製作出微流道的二維模型，再匯入 ANSYS[®] workbench 進行網格的建立，完成後即可匯入 Fluent 開始運算。

2. 後處理分析部分：

以軟體本身設定的物理模式、邊界條件、起始條件、流體性質，定義出適當之模擬模式，並分別模擬不同設計的微流道進行分析，分析其氣體流場、流線以及氣體壓力分布，並進行比較。模擬本實驗使用之設備參數來設定邊界條件，使用之真空幫浦錶壓力為-70660 pa，於高真空壓力情況下，管道內氣體流速快，導致雷諾數大形成紊流，因此模擬使用的模組採用 Viscous：K-epsilon Turbulence Model，使用的流體採用 Density：incompressible - idea air。微流道結構共有五個入口端設定為 Pressure Inlet、一個出口端設定為 Pressure Outlet，其餘邊界設定為 Wall；入口端設定為空氣流入之通道，壓力設定為 0，出口為真空幫浦吸引之通道，壓力設定為錶壓力-70660 pa。

氣體流場模擬結果如圖 3-5 所示，(A) 設計的結構由於空間分布最適當，因此以模擬的結果來看，氣體流場能簡單順利的流動、不受其他影響，氣體流場從入口端進入後便貼齊微結構阻塊，並順利地從出口端排出。(B) 設計的樣品區域阻塊部分，從模擬結果中可發現，由於阻擋了氣體流進入的路線，雖然造成薄膜出口端之氣體流速增強，夾擠效果提升，但也導致氣體於中間薄膜管道兩側時，有向樣品區域流動的現象，氣體無法穩定的貼附於薄膜流道旁形成夾擠作用，並且氣體大部分由出口端的兩側入口吸入，使出口流速相較於其他設計快速。(C) 設計的模擬結果中可觀察出，兩旁氣體的流場雖接近平行的方式進入管道，但是樣品區域空間因真空幫浦的吸取，使得樣品區域為低壓狀態，使氣體流向樣品區，因而影響中間流道於成膜時無法產生夾擠作用，無法順利成膜。(D) 設計的模擬結果中可觀察出氣體流速平均、穩定，但是氣體於中間薄膜結構接觸時有一個平

行方向的流場，會使中間薄膜區域兩旁產生低壓，氣體由於兩旁的低壓而導致氣體往外擴散，使薄膜無法順利成膜。

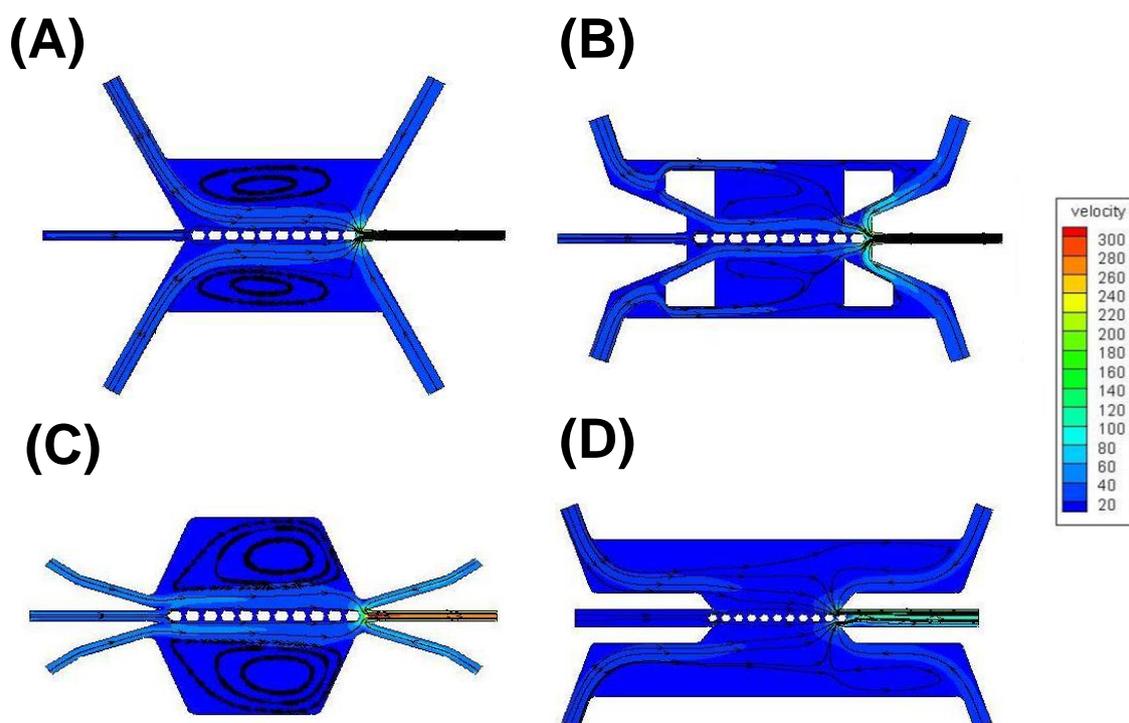


圖 3-5 微流道 ANSYS[®] Fluent 空氣流速模擬圖：(A) 流道流場平順地貼附於結構 (B) 阻塊雖使入口端流速提高，但於中間之氣流流向樣品區 (C) 樣品區相對過大，形成紊流 (D) 氣體平行流動至結構時，並無接觸到結構

3.2.3 微結構設計

目前市面上開發之離子選擇電極，其檢測之感測內外表面積都相同，而吸附型硝酸根離子選擇薄膜其感測原理，是利用薄膜內硝酸根離子載體的官能基，與液體中的硝酸根離子鍵結產生吸附現象，因而產生電位訊號輸出。因此，本研究的重點開發在於改變樣品與內部填充液的接觸表面積，改變固定濃度的內部填充液與不同濃度的外部樣品的表面積比，探討其靈敏度的變化。

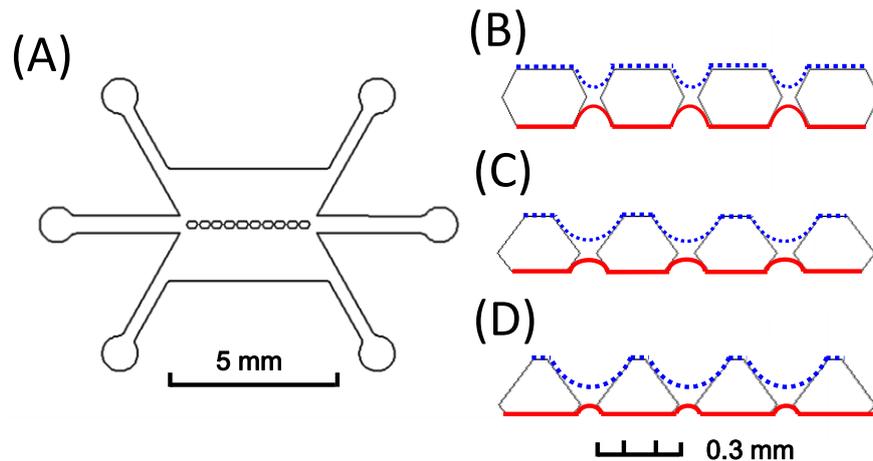


圖 3-6 微流體晶片結構設計圖：(A) 完整微流道晶片設計圖 (B) 相同面積之結構設計，薄膜面積比約為 1：1 (C) 梯形倒角之結構設計，薄膜面積比約為 1：3 (D) 三角形倒角之結構設計，薄膜面積比約為 1：5

本研究使用流體成膜技術於微流體晶片，圖 3-6 (A) 為整體微流道晶片之設計圖，採用模擬出的最佳流場設計，出口分為上中下流道兩部分，上流道與下流道設計對稱，寬度均為 0.5 mm，分別為樣品注入之出入口與內部填充液之出入口。中間管道為薄膜吸取時之注入吸取口，寬度為 0.5 mm。薄膜管道中間部分為一連串共十組的多邊形微結構，分別設計出三種不同結構，如圖 3-6 (B)、(C)、(D) 所示，其結構上方虛線與下方實線為感測薄膜面積示意圖。利用虛線與實線的感測面積比不同，創造出不同之電解液與樣品感測面積比。圖 (B) 為感測面積相同之設計，其結構為寬 0.3 mm 的六邊形阻塊，結構高度為 200 μm ，結構間距皆為 50 μm ，形成電解液感測面積與樣品感測面積比約為 1：1。圖 (C) 利用梯形結構的上窄下寬形狀，上方寬度為 0.1 mm，下方寬為 0.2 mm，結構高度為 200 μm ，結構間距皆為 50 μm ，創造出不同的感測面積，並於結構銜接部分使用倒角處理，使成膜位置能更準確，感測面積比值約為 3。圖 (D) 為感測面積比值約為 5 的設計，其結構為寬 0.3 mm 的三角形，三邊使用倒角處理，結構高度為 200 μm ，結構間距皆為 50 μm 。

3.2.4 微流道製程

本實驗之快速玻璃晶片製程技術[101]，為求晶片結構之平整性，本研究選擇使用含有 74% SiO₂、13% Na₂O、10% CaO 之鈉玻璃（76 mm × 26 mm × 1.5 mm, Matsunami, Japan）作為晶片母模之基材，將設計之結構微流道蝕刻，蝕刻之玻璃母模再透過熱壓技術將 PMMA 翻膜出微流道結構。實驗操作流程分為玻璃蝕刻母模及 PMMA 熱壓翻膜兩部分介紹：

一、玻璃母模製程（圖 3-7）

A. 清洗玻璃基板：

將市售載玻片放置於配製好之 Piranha 溶液中進行清潔，其成分為硫酸（96% H₂SO₄, Sigma-Aldrich, USA）、雙氧水（31% H₂O₂, Sigma-Aldrich, USA）以 3：1 之體積比調配，確認無玻璃片互相堆疊後，將溫度升溫至 200°C 煮沸 15 分鐘，以強氧化還原反應對玻璃試片表面之無機、有機污染物進行清潔。清潔後之玻璃基板以去離子水（De-Ionized Water）重複沖洗，再利用氣槍將玻璃基板表面之水滴除去，接著將玻璃基板放置於溫度 100°C 之加熱盤上烘烤 5 分鐘，藉此完全去除玻璃表面之水氣。

B. 光阻塗佈：

未經任何加工處理之玻璃基板上，其裸露出之 OH 官能基通常較少，為了使玻璃基板表面改質效率增加，本實驗於玻璃表面蒸鍍一薄層之 Hexamethyldisilazane（HMDS, Sigma-Aldrich, USA）作為玻璃與光阻之黏著層，增強光阻之附著力。旋轉塗佈時滴取適量之光阻（PR, AZ P4620, Clariant, Japan）於玻璃基板上，旋轉過程設定為兩階段參數，第一階段以 1500 rpm 維持 10 秒鐘，再以 4000 rpm 維持 30 秒鐘，藉此達到預期的均勻厚度約 3 μm 之光阻，作為玻璃蝕刻之遮罩。

C. 光阻軟烤及曝光：

光阻塗佈完成後，將玻璃基板靜置於 100°C 之加熱盤上，持溫 3 分鐘進行軟烤步驟，使塗佈於玻璃上之光阻固化，使光阻內大部分之有機溶劑揮發並建立曝光特性，之後將溫度慢慢降至室溫，即可進行曝光行為。將欲製作之微流道圖案光罩正面覆蓋於玻璃基板上，並用一片透明石英玻璃壓於光罩上方，使基板與光罩平整貼合減少繞射現象，再配合標準的光刻流程(Lithography)，使用 UV 曝光機(ST-2600/500, Genepro, Taiwan) 365 nm 之光源進行紫外光照射，其曝光量為 180 mJ/cm²，使光阻吸收產生化學反應，於玻璃基板上形成結構。

D. 顯影及光阻硬烤：

將曝光完成之玻璃基板浸泡於稀釋四倍之顯影液 (AZ 400K, Clariant, Japan) 中，其被紫外光照射到的部分被溶解去除，留下光刻定義出之圖案區域光阻。之後將顯影完成之玻璃基板使用去離子水清洗後，置放於 100°C 之加熱盤上，緩慢升溫至 150°C 並持溫烘烤 10 分鐘，之後將加熱盤溫度緩慢降至室溫，即可進行蝕刻行為。

E. 玻璃蝕刻：

以二氧化矽蝕刻液 (Buffered Oxide Etchant, BOE 6-1, J.T. Baker, USA) 來進行玻璃母模蝕刻，將蝕刻槽之溫度設定於 60°C，再配合使用超音波洗淨機 (D200H, Delta, Taiwan) 之振動，蝕刻過程中管道邊界易產生鎂、鈣離子之結晶狀沉澱，故每震洗 BOE 達 3 分鐘即取出以去離子水沖洗，再浸泡於 1 M 鹽酸 (37% Hydrochloric Acid, Sigma-Aldrich, USA) 中 10 秒鐘，如此重複至蝕刻完畢。本實驗室 BOE 蝕刻速率參數為每分鐘約 0.9 μm 之深度，因此進行 23 分鐘之蝕刻得到理想深度，蝕刻深度為 20 μm。

F. 去除光阻：

最後一個步驟，將蝕刻過後之玻璃基板浸泡於氫氧化鉀溶液 (KOH,

(Sigma-Aldrich, USA) 中，便能完整去除剩餘之光阻，之後以去離子水清洗玻璃基板後，為避免留下水漬，使用氣槍將表面水分去除，再放置到加熱板上以溫度 100°C 加熱使水氣蒸散，即完成管道母模的製作。

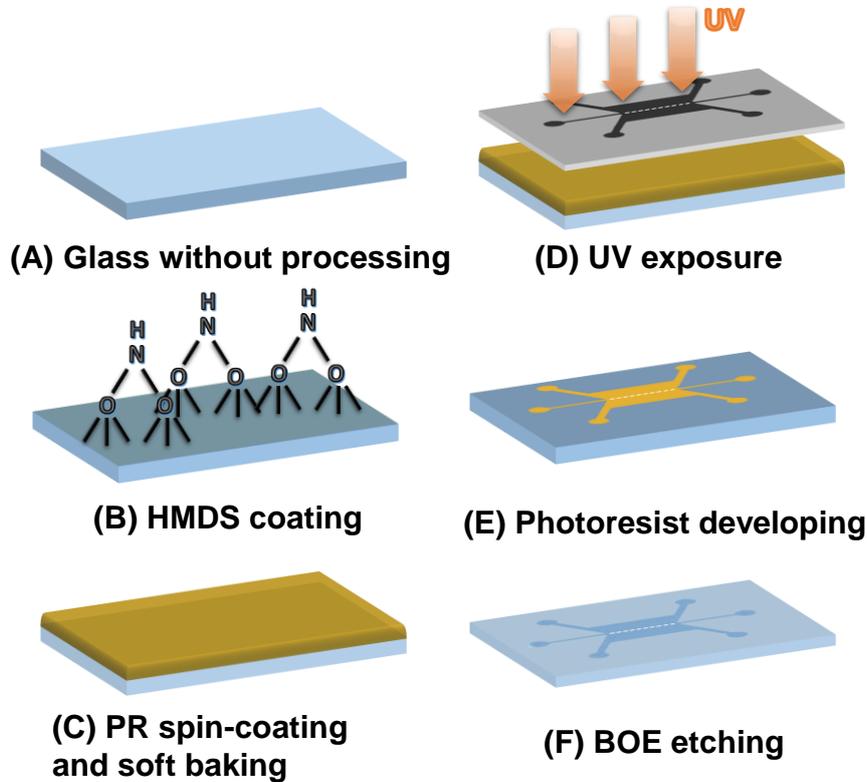


圖 3-7 微管道晶片玻璃母模製程圖

二、PMMA 熱壓翻模：

本研究所選擇之晶片為 PMMA 基材，將前述所製作完成之玻璃母模，利用微熱壓成型技術壓製翻模，便可將玻璃母模上之圖案轉印於 PMMA 基板上，完成塑膠晶片基材之微流道結構。使用之熱壓機台裝置如圖 3-8 所示，為本實驗是自行組裝之熱壓機台，其包含上下兩塊熱作模具鋼 SKD61 材質加熱板，溫度控制採用 PID 控制，加熱面積為 110 mm × 110 mm，上方加熱板之位置固定。壓力產生器採用分離式分法，加壓成型時，由下方加熱板利用油壓系統控制壓力大小，油壓器為容量 700 mL 之單段式手動油壓幫浦，最高壓力可提供至 1×10^5 psi，且加壓板誤差小於 2 inch。



圖 3-8 PMMA 晶片熱壓機台實體示意圖

在本研究中，以田口法求得最佳熱壓製程參數，操作步驟如下所示：

- A. 準備好已定義圖案且蝕刻完成之玻璃母模，以及相對應大小之 PMMA 試片，並使用氣槍做表面清潔處理。
- B. 將兩片乾淨之基板對位好後，為了提升升溫速率平均且施壓穩定，會將 10 mm 厚之鈉玻璃墊在上下兩側，再置入熱壓機加熱板中。
- C. 置入熱壓機後加壓至 1 kg/cm^2 ，加熱板由室溫開始升溫至 125°C ，達 125°C 後持溫 15 分鐘且壓力不變，此過程會使 PMMA 軟化。
- D. PMMA 軟化後加壓至 10 kg/cm^2 ，溫度仍控制在 125°C ，恆溫持壓 10 分鐘後，將溫度設定回室溫但壓力不變，再利用風扇增加空氣對流，減少製程冷卻時間。

- E. 降至室溫後即可脫膜，脫膜時盡量垂直地與玻璃母模分開，將可得到一完整翻模之 PMMA 微流道晶片。
- F. 使用鑽孔機鑽床將 PMMA 微流道晶片之出入口打洞，即為 PMMA 微流道晶片成品。

3.2.5 微晶片製作

本實驗之電漿接合製程技術[100]，使用電感耦合電漿(Inductive Coupling Plasma, ICP)進行塑膠基材表面改質，電漿設備為實驗室自行組裝如圖 3-9，電漿產生器為圓柱狀，圓柱外有設計同心圓之電線圈纏繞，出口有外接至真空幫浦以及反應氣體之氣體管路。

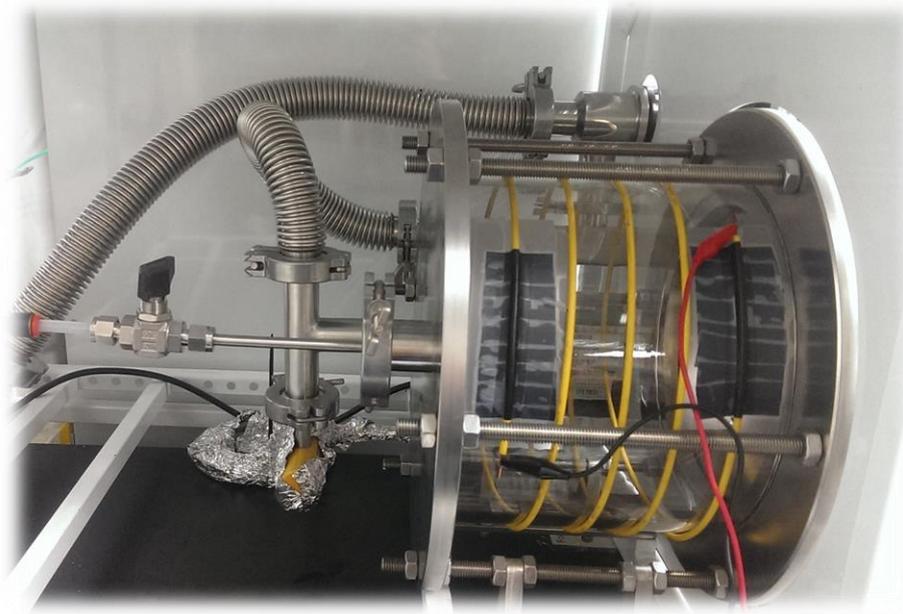


圖 3-9 電漿處理設備儀器實體圖

將已定義出電極之 PMMA 晶片視為上基板，下基板為微流道結構之 PMMA 晶片，由於微流道設計為微米等級之結構，故不採用一般的熱壓熔融接合技術或化學劑接合技術，使用電漿改質接合技術。此種接合方式屬於低溫接合，不會對

晶片上之微流道結構產生影響，且製程時間遠小於傳統熱壓接合之時間，利用酒精輔助不僅創造出更大的接合強度，更大幅縮短至少 6 倍的接合時間。

PMMA 晶片接合製程步驟如下：

A. 基板清潔：

將欲處理之 PMMA 基板（上基板為微流道晶片，下基板為電極晶片）使用清潔劑清洗乾淨，確實去除 PMMA 基材表面之油垢或髒污，避免影響接合時之效果。

B. 電漿處理：

將清潔完成之 PMMA 上下基板放置於電漿設備中，施打功率為 100 W 的氧氣電漿，處理時間為 2 分鐘，藉著電漿游離化之氣體具有高化學活性的特性，可活化或改質 PMMA 基材表面之官能基，使基板上的自由官能基能在不添加腐蝕性化學溶劑的條件下，仍可使兩聚合物完整接合。

C. 酒精輔助接合：

在製作時可選擇單純利用電漿接合，或是為增加其接合強度，添加酒精輔助電漿接合，將電漿處理後之 PMMA 基板進行表面官能基反應，將其浸泡於酒精 5 秒鐘，之後再將兩片 PMMA 對位好壓合，且確保微流道中無酒精填充。

D. 熱壓壓合：

為確保壓合壓力均勻，將處理貼合之 PMMA 晶片放入熱壓機進行壓合，壓合處理溫度為 50 度，壓合壓力為 0.45 kg/cm^2 ，持續壓合 10 分鐘，即可形成一密封的微流體管道。

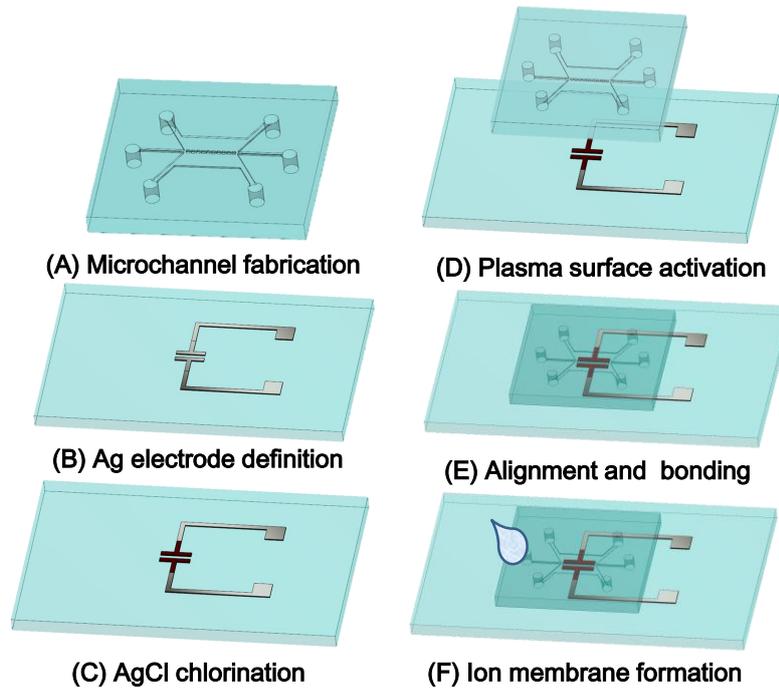


圖 3-10 微流體晶片製程圖：(A) PMMA 上基板微流道晶片翻模 (B) PMMA 下基板濺鍍銀電極 (C) 電極氯化形成銀/氯化銀 (D) 電漿表面處理 (E) 微流道晶片與電極晶片對位接合 (F) 封裝離子選擇膜

本實驗為改善傳統型離子選擇電極，減少製作電極與量測的時間，利用微結構產生的感測面積比提升感測效能，使用 PMMA 基材製作品片。完成晶片製作後，將配製好的硝酸根離子選擇膜，取 2 μl 的離子選擇膜滴加於中間管道入口端，同時在中間管道出口端接上真空幫浦，當液態薄膜一進入管道中，便會藉由真空幫浦的吸引，利用微結構之間的液體膜表面張力與空氣產生的剪切流，使薄膜穩定的封裝於中心薄膜管道結構中，晶片製作詳細流程如圖 3-10 所示。

經由製作流程完成之微流體電極晶片如圖 3-11 所示，兩側電極平行於微結構圖案，並且使電極距離非常靠近離子選擇薄膜，以減少量測時誤差。整塊晶片尺寸設計大小為 20 mm \times 30 mm，兩根電極伸入微流道內的電極長度為 2.5 mm，同時接觸溶液，構成一個電化學電池，通過測定電位變化，即可得到待測離子之濃度，其上下兩側的微通道則是用來作為電解液與樣品溶液的注入區域。

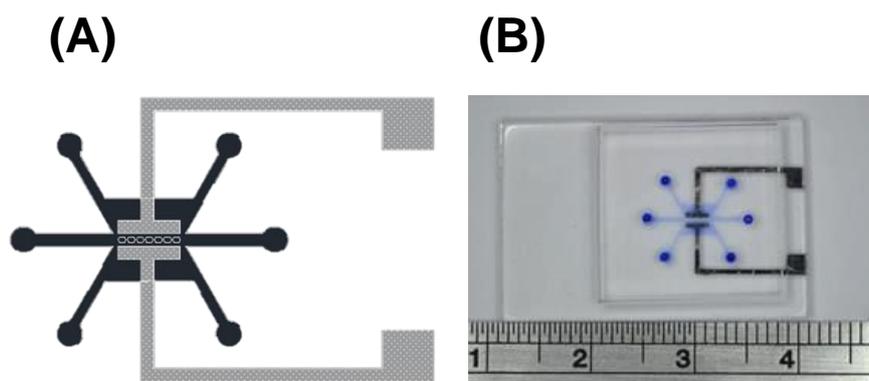


圖 3-11 微流體電極晶片圖：(A) 微流體晶片設計圖 (B) 完成晶片製程的微流體電極晶片，單位為 cm

3.3 實驗藥品

本研究所使用之藥品規格及供應商如表 3-1 所示。

表 3-1 實驗使用之藥品規格及供應商

藥品名稱	供應商	規格
赤血鹽 ($K_3(Fe(CN)_6)$)	Showa, Japan	98.0%
硝酸鉀 (KNO_3)	Scharlau, Spain	ACS reagent
硝酸鈉 ($NaNO_3$)	Acros Organics, Spain	Extra Pure
硝酸鈣 ($Ca(NO_3)_2$)	Showa, Japan	98.5%
亞硝酸鈉 ($NaNO_2$)	Sigma-Aldrich, Germany	ACS Reagent, $\geq 99\%$
碳酸氫鈉 ($NaHCO_3$)	Showa, Japan	$\geq 99.5\%$
無水醋酸鈉 (CH_3COONa)	Showa, Japan	98.0%
四氫呋喃 (THF)	Alfa Aesar, Ward Hill	HPLC Grade, 99.7+%
硝酸根離子載體薄膜 (Nitrate Ionophore)	Sigma-Aldrich, Switzerland	Cocktail A

3.3.1 溶液配製

1. 標準緩衝溶液：

使用微量天平精確取得 0.101 g 的硝酸鉀粉末，溶解於 100 mL 去離子水中，配製出 10^{-2} M KNO_3 溶液，貯存於 4°C 備用。

2. 硝酸根原液：

使用微量天平精確取得 8.499 g 的硝酸鈉粉末，溶解於 100 mL 去離子水中，配製出 1 M NaNO_3 溶液，貯存於 4°C 備用。

3. 硝酸根標準溶液：

量取上述硝酸根標準原液，以去離子水稀釋成濃度為 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 及 10^{-1} M NaNO_3 溶液，供作標準溶液，檢測時調製。

4. 硝酸鈣緩衝溶液：

使用微量天平精確取得 16.4088 g 的硝酸鈣粉末，溶解於 100 mL 去離子水中，配製出 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液，再以去離子水稀釋成濃度為 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 及 10^{-1} M NaNO_2 溶液，檢測時調製。

5. 亞硝酸根干擾離子溶液：

使用微量天平精確取得 6.900 g 的亞硝酸鈉粉末，溶解於 100 mL 去離子水中，配製出 1 M NaNO_2 溶液，再以去離子水稀釋成濃度為 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 及 10^{-1} M NaNO_2 溶液，檢測時調製。

6. 碳酸氫根干擾離子溶液：

使用微量天平精確取得 8.401 g 的碳酸氫鈉粉末，溶解於 100 mL 去離子水中，配製出 1 M NaHCO_3 溶液，再以去離子水稀釋成濃度為 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 及 10^{-1} M NaHCO_3 溶液，檢測時調製。

7. 醋酸根干擾離子溶液：

使用微量天平精確取得 8.203 g 的無水醋酸鈉粉末，溶解於 100 mL 去離

子水中，配製出 1 M CH₃COONa 溶液，再以去離子水稀釋成濃度為 10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³、10⁻² 及 10⁻¹ M CH₃COONa 溶液，檢測時調製。

3.3.2 離子薄膜製備

本研究所開發的硝酸根離子感測晶片，是利用市售的硝酸根離子選擇薄膜作為感測膜，並使用本研究所介紹的薄膜成型方式，將薄膜固定於管道的微結構中。

其市售之硝酸根離子選擇薄膜配方為：

1.50	wt%	Tridodecylmethylammonium Nitrate
16.25	wt%	2-Nitrophenyl Octyl Ether
1.93	wt%	Nitrocellulose, 35% In Isopropanol
0.25	wt%	Methyltriphenylphosphonium Bromide
5.75	wt%	Poly(Vinyl Chloride) High Molecular Weight
74.32	wt%	Tetrahydrofuran

本實驗使用此薄膜製作離子感測晶片，取 0.1 mL 的硝酸根離子薄膜稀釋於 1.0 mL 的 THF 有機溶劑中，降低薄膜的黏滯力，便於成膜。待離子選擇薄膜攪拌均勻後即可注入管道中，液態薄膜經過 24 小時室溫自然乾燥後，即可成為本研究所使用之硝酸根離子選擇電極晶片，詳細成膜步驟於章節 4.2.1 敘述。

3.3.3 蔬菜樣品配製

本研究於市場購買販售之小葉菜類、瓜菜類共兩種蔬菜樣品，分別為小白菜 (Buk Choy) 與小黃瓜 (Cucumber)。

一、蔬菜檢體前處理分為三種方式：

1. 未處理：以紙巾將蔬菜樣品表面之水分及灰塵擦拭清除。

2. 清水處理：以去離子水清洗浸泡蔬菜檢體 1 分鐘後，擦乾備用。
3. 鹽水清洗：以 1 mM 之食鹽水清洗浸泡蔬菜檢體 1 分鐘後，擦乾備用。

二、萃取步驟：

將上述處理過的蔬菜檢體切碎後充分攪拌，平均採樣菜葉與葉梗，並使用搗碎鉢與搗碎棒將蔬菜檢體搗勻，稱取混和均勻之蔬菜檢體 10 g，以去離子水定容至 200 mL 後，以超音波震盪 5 分鐘取出搖勻，重複此步驟 6 次，共震盪 30 分鐘，確定樣品均勻分散後，於 75°C 水浴中加熱 10 分鐘，再冷卻至室溫。將冷卻後的樣品以 3600 rpm 轉速離心處理 15 分鐘，取上方澄清液，貯存於 -20°C 備用。

3.4 實驗架構

本研究使用電化學分析儀 (Model CHI611E, CH Instrument, USA) 進行電化學檢測，其分析儀外接電極分別為 WE、RE 與 CE。本研究分別探討其感測電極效能與離子選擇電極晶片效能，使用以下兩種不同系統檢測方式：

1. CV：

探討電極感測效能時，使用電化學循環伏安法檢測氧化還原電位，將本研究澱鍍之金電極連接於 WE，鉑電極連接 CE，自發性氯化之銀/氯化銀電極連接於 RE，並使用電化學 CV 系統，量測樣品溶液之氧化還原電位與電流訊號大小。

2. OCPT：

探討硝酸根離子選擇薄膜效能時，使用電化學開路電位法檢測兩根電極之電位差，將市售之硝酸根離子選擇薄膜封裝於塑膠微量吸管前端，再使用本研究製備之銀/氯化銀電極連接至 WE 作為離子選擇電極，另一根銀/氯化銀電極連接至 RE 與 CE 做為參考電極，並使用電化學開路電位-時間 (Open Circuit Potential - Time, OCPT) 系統，量測離子選擇電極與參考電極之電位差。

第四章 結果與討論

本研究使用市售之硝酸根離子選擇薄膜，應用於設計的硝酸根離子選擇電極進行量測，不同於傳統市售之離子感測器，本實驗設計的微流體晶片使用液態膜自行封裝成膜技術，整合硝酸根離子選擇薄膜於微結構中。在實際應用上，感測器必須符合以下的基本功能：(1) 長時間使用下，其量測結果誤差在 $\pm 20\%$ 的容許範圍內；(2) 具有良好之選擇性效能，量測時不受光線、氣體、物理或化學變化所影響；(3) 感測所需的反應時間快速，可達到快速檢測的需求；(4) 降低感測器成本。本研究為達成上述之目標，做了以下研究並探討結果，探討其感測電極效能、離子選擇薄膜性能、微流體晶片封裝與應用等部分，並分析其最佳電極參數、薄膜感測穩定性與選擇性、電化學偵測效能與反應時間等。

4.1 離子選擇電極

首先，本研究希望能提升離子選擇電極之工作效能，而電極為量測系統中影響數據的主要因素之一，因此利用改善電極的氯化處理方式，並探討其最佳參數以穩定工作電極，並提升量測效能。本章節敘述利用自行濺鍍之金屬銀/氯化銀電極進行電化學量測，評估電極在不同氯化參數下之效能；平面電極相對於微小電極而言，等同於在大表面的情況下製作出許多微小的電極，不僅感測面積提升，也可藉此提升靈敏度。之後再將電極應用於硝酸根離子選擇薄膜，製備出效能優於市售之硝酸根離子選擇電極。

4.1.1 電極效能探討

傳統的離子選擇電極的製作方式是利用電化學電鍍技術，將銀電極浸泡於稀鹽酸溶液中，施加電流使鹽酸溶液中的氯離子趨往陽極移動，並與正極的銀電極

產生氯化反應，使銀電極化學反應成氯化銀結晶，於銀電極表面電鍍一層氯化銀結晶，便製作出感測用的銀/氯化銀參考電極。但是這種氯化方式無法輕易方便製作，不僅需要電源供應器，且使用之溶液為強酸溶液，不易處理。因此，本實驗改變電極製作方式，使用自發性氯化反應。有別於傳統的電化學氯化法需要額外施加電，自發性氯化反應僅須將電極浸泡於 1% 氯化鐵溶液中，於計算之時間後取出沖洗乾淨，即完成銀電極氯化過程。

本研究設計氯化時間分別為 10 秒、20 秒、25 秒、30 秒、35 秒、40 秒與 50 秒，並使用電化學循環伏安法量測電極的效能。此量測使用的樣本為俗稱赤血鹽之標準樣品鐵氰化鉀，因為赤血鹽的氧化還原能力強，是循環伏安法檢測中最常作為電極效能校正之標準樣品。校正之標準樣品使用濃度為 5 mM 的赤血鹽溶液，量測不同氯化時間下電極的反應訊號，其掃描電位範圍從 +400 mV 到 -400 mV，掃描速率為 100 mV/s。為了與市售銀/氯化銀電極比較，本實驗也使用市售之電極做量測，其掃描電位範圍從 +600 mV 到 -400 mV，掃描速率為 100 mV/s。

量測結果如圖 4-1 所示，自發性氯化製作之銀/氯化銀電極可成功量測到赤血鹽溶液，形成一個相對稱的循環伏安曲線，其氧化電位大約為 +160 mV，還原電位大約為 -80 mV。數據整理如表 4-1 所示，氯化 10 秒鐘之銀/氯化銀電極的氧化還原峰明顯，但其電流訊號反應不大，電流平均值為 6.6 μA 。氯化 20 秒鐘之銀/氯化銀電極，電流平均值為 10.7 μA 。氯化 25 秒鐘時，雖其氯化時間僅比 20 秒鐘之浸泡時間多 5 秒，但是其電流平均值提升了 0.53 倍至 16.4 μA 。當氯化時間至 30 秒鐘時，其氧化還原峰值明顯且對稱，電流訊號反應顯著，電流平均值高達 24.7 μA ，可觀察出其氯化反應時間不與電流訊號成正比，但是其氯化之過程隨時間增加而提升其訊號反應。但是當氯化時間為 35 秒鐘時，其反應電流訊號下滑，訊號更低於氯化時間為 25 秒鐘，電流訊號降低至平均值為 15.7 μA 。當氯化時間為 40 秒鐘時，其氧化還原峰值較不明顯，其電流平均值為 9.9 μA 。氯化時間至 50 秒鐘時，其氧化還原訊號平滑不明顯，還原電位也飄移至 -20 mV，電流訊號持續下降，

電流平均值為 3.8 μA 。圖 (B) 為使用自發性氯化 50 秒鐘之電極，與其市售之電極相比較，結果中可發現其氧化還原能力相同，僅有電位上之改變。因為市售之銀/氯化銀電極內部填充了高濃度之電解液，因此，本研究之電極電位與市售的相比，平移了約 -160 mV。

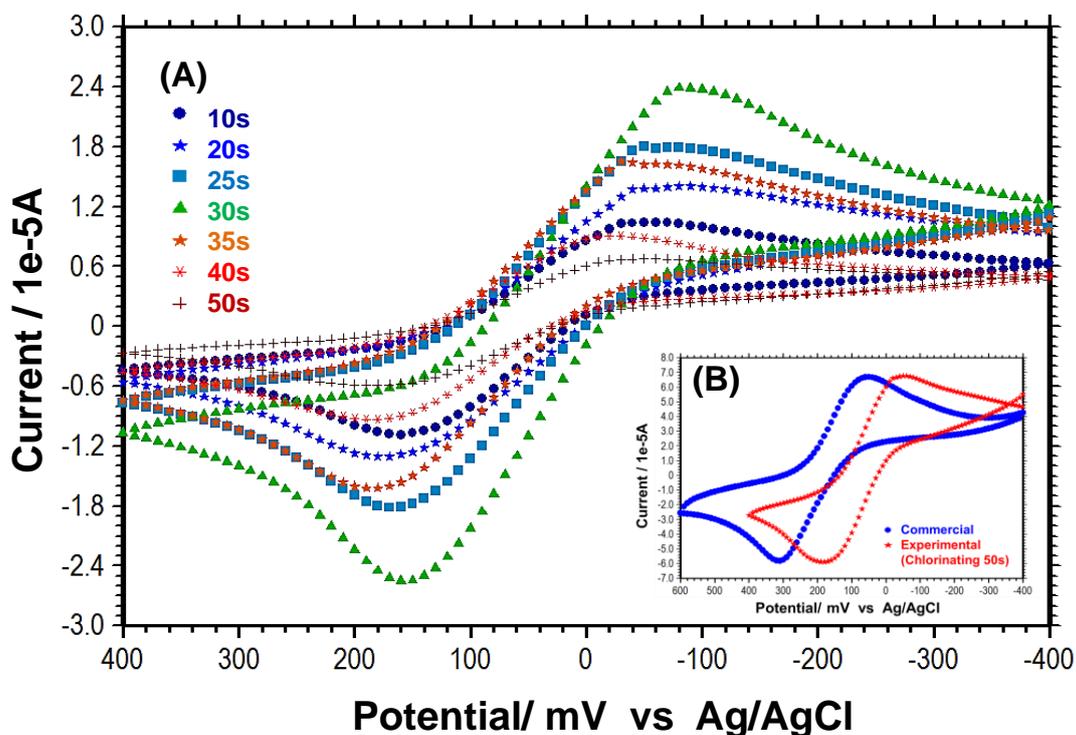


圖 4-1 使用電化學循環伏安法測試銀/氯化銀電極效能，檢測樣品為 5 mM 赤血鹽溶液：(A) 經不同時間氯化之電極 (B) 氯化 50 秒的電極與市售電極比較

表 4-1 電化學循環伏安法測試銀/氯化銀在不同氯化時間下的電流反應

氯化時間(s)	10	20	25	30	35	40	50
氧化電流(μA)	6.6	10.7	16.4	24.7	15.7	9.9	3.8

從電化學 CV 量測結果中可發現，當氯化時間高於 30 秒鐘時，雖然其電極穩定性提升，誤差值變小，但卻降低銀/氯化銀電極的電流訊號值。因此，依結果判斷氯化 30 秒鐘之銀/氯化電極為最適當參數，且銀電極若過度氯化導致導電性不佳，因而效能減弱。

4.1.2 氯化銀形貌

為了更深入地了解影響量測訊號的原因，本研究使用場發射型掃描式電子顯微鏡，拍攝氯化銀電極的表面形貌與銀/氯化銀電極的斷面，觀察不同的氯化時間情況下，銀金屬氯化為氯化銀結晶的程度。電極氯化時間從 10 秒鐘到 50 秒鐘，相同間隔取三個參數值，並取其參數之電極樣品拍攝 SEM 圖，觀察其氯化過程之表面形貌。圖 4-2 為使用場發射型電子顯微鏡拍攝銀電極經氯化後之表面形貌圖，其拍攝倍率分別為 4×10^4 倍與 1.6×10^5 倍，可判斷其氯化結晶分布情形與結晶粒徑大小形貌。圖 (A) 為浸泡氯化鐵溶液 10 秒鐘的銀金屬表面形貌圖，由倍率較小的圖中即可看出其氯化效果，表面有氯化銀結晶，且氯化結晶分布均勻；放大倍率觀察其結晶，氯化銀結晶緻密、結晶粒徑細小，且從顏色上可判斷其堆疊情況較少。圖 (B) 為浸泡 30 秒之氯化銀表面形貌，其排列分布較不均勻；放大倍率觀察其結晶，其粒徑結構明顯大於 10 秒鐘之粒徑大小兩倍以上，並有交叉堆疊的情況，但表面仍平整。圖 (C) 為浸泡 50 秒之氯化銀表面形貌，其粒徑結構明顯相較於短時間浸泡的粒徑大、氯化銀結晶粗糙，且氯化銀結晶分布不均，甚至可從圖中左下角看到氯化銀整塊剝落的現象；從大倍率來看，可發現其製作出的氯化銀表面結晶堆疊的情形嚴重，表面不平整，且顆粒堆疊情況嚴重。可由表面形貌之 SEM 圖中觀察出，其中 10 秒、30 秒與 50 秒的氯化結果中，以 30 秒以內為最適當參數。

本研究探討完表面形貌後，為細部觀察氯化 30 秒的銀/氯化銀之結晶堆疊情況，故使用電子顯微鏡拍攝較高倍率的電極斷面結構，如圖 4-3 所示。左圖為濺鍍完成的銀電極氯化 30 秒鐘之電極斷面圖，使用 1×10^5 高倍率拍攝，拍攝之電極基板材質為玻璃。由圖中可觀察出本研究室自行組裝之真空濺鍍機的品质穩定，且濺鍍之金屬厚度均勻。再使用 3×10^5 高倍率拍攝，圖 4-3 右圖為氯化 30 秒鐘之銀/氯化銀電極斷面圖，由圖中結果可看出氯化後的電極厚度約為 900 μm ，經過 30

秒鐘的氯化反應後，約有厚度為 450 μm 的上層銀金屬被氯化，形成均勻的氯化銀結晶。藉由此 SEM 圖可證明，氯化處理 30 秒鐘之電極，其銀金屬與氯化銀結晶厚度均勻，電極表面之氯化銀結晶平整且穩定包覆住銀電極。

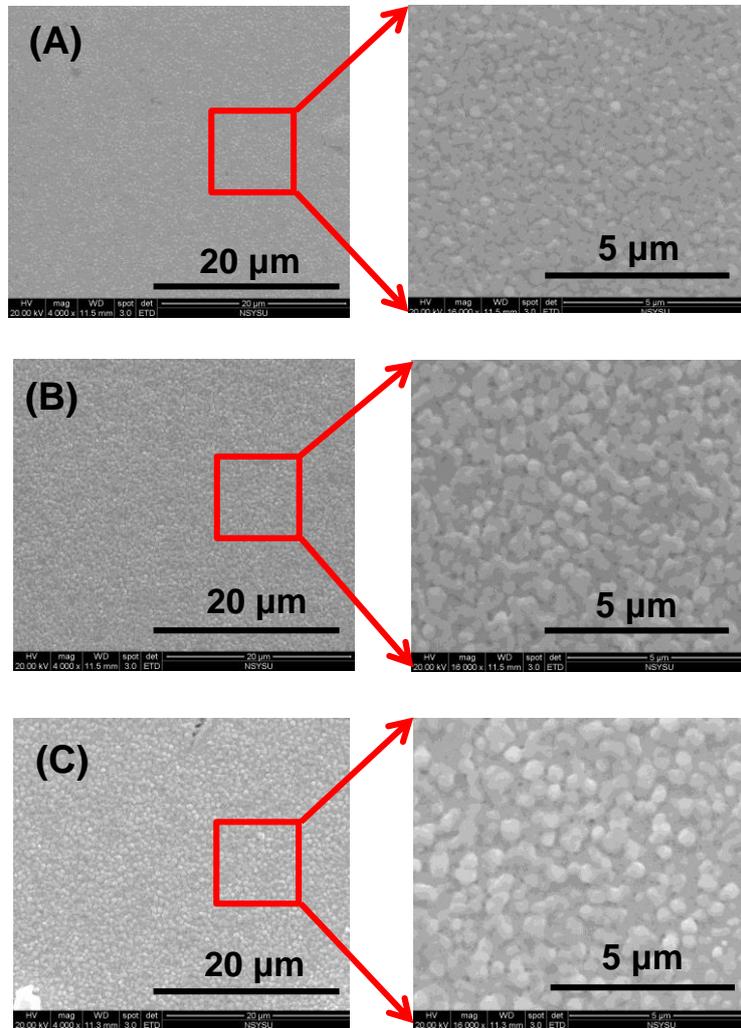


圖 4-2 使用場發射式電子顯微鏡拍攝電極表面，銀金屬經過不同氯化時間處理之氯化銀電極表面形貌 SEM 圖，拍攝使用倍率為 4×10^3 倍與 1.6×10^4 倍：(A) 氯化 10 秒之氯化銀表面 (B) 氯化 30 秒之氯化銀表面 (C) 氯化 50 秒之氯化銀表面

綜合以上結果得知，本實驗所使用之自發性氯化處理方式，使用氯化鐵溶液氯化電極，可簡易的製作出所需之銀/氯化銀電極。由結果中可說明其氯化結晶結果良好，且 30 秒時氯化時間其氯化銀結晶與銀電極厚度均等。由電化學 CV 數據

中可證實，氯化時間為 30 秒鐘之銀/氯化銀電極，其檢測訊號效能最大，其氧化還原峰值明顯，電流訊號值更比其他氯化時間多出兩倍以上。因此，本研究之離子選擇電極之製作方式，使用 1% 氯化鐵溶液浸泡銀電極 30 秒鐘為電極最佳參數。

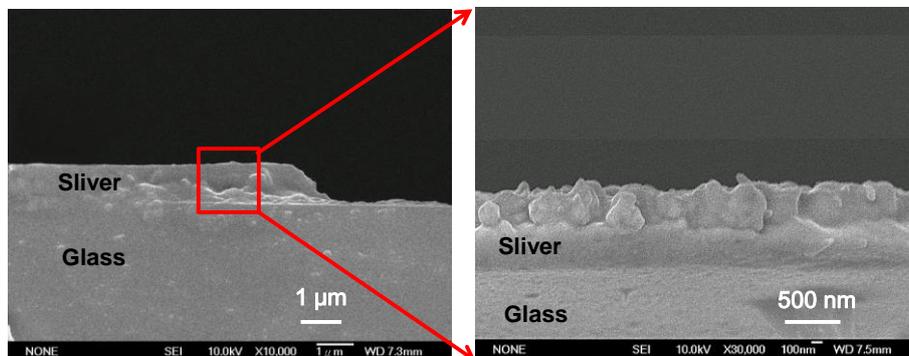


圖 4-3 使用場發式電子顯微鏡拍攝電極斷面，銀電極氯化處理 30 秒鐘之銀/氯化銀電極斷面 SEM 圖，左為使用 1×10^5 高倍率拍攝；右為使用 3×10^5 高倍率拍攝

4.1.3 硝酸鹽對不同陽離子填充及待測液量測評估

一般使用 PVC 薄膜製作的離子選擇電極，其薄膜的製備方式是將 PVC 高分子材料溶於 THF 有機溶劑中，攪拌至 PVC 完全溶解後，將 PVC 液態膜放置於乾淨的平面玻璃基板上，在室溫下放置 24 小時，待溶液揮發使薄膜成型。接著將固化的 PVC 薄膜從基板上剝離，再使用 THF 有機溶劑將固態的 PVC 膜黏貼於電極管頂端，之後將電極管注入電解液，置入一根銀/氯化銀電極，即成為一根離子選擇電極。當離子選擇電極浸泡於樣品溶液時，溶液中的離子會吸附於薄膜上，內部填充溶液與外部樣品溶液產生一膜電位差，即可藉由離子選擇電極與銀/氯化銀參考電極，量測出薄膜兩側的電位差變化，計算待測離子的濃度。

由於本研究所使用之選擇薄膜為吸附型的離子薄膜，當硝酸鹽溶於水中時會解離產生陽離子以及硝酸根陰離子，因此為探討硝酸鹽中的陽離子不同，對於吸附型薄膜對於硝酸根離子的量測影響，設計了使用三種不同陽離子的硝酸鹽作為內部填充液檢測，並選用一價陽離子與二價陽離子作探討，分別為硝酸鉀、硝酸

鈉、硝酸鈣。量測架構使用傳統之離子選擇電極製作 ISE，離子選擇電極部分使用 99% 純銀線作氯化處理製備的銀/氯化銀參考電極，搭配市售的銀/氯化銀電極當作參考電極。量測方式使用三種不同的溶液作交叉量測，內部填充液部分選用不同之電解液探討，並各別使用 10 mM、1 mM 以及 0.1 mM 的電解液濃度，並量測樣品濃度 10^{-5} 至 1 M，量測結果數據皆附圖於附錄 A1-A8 中。從結果中可觀察出，當量測樣品為單價鍵陽離子組成之硝酸鹽，其內部填充液濃度越高，其檢測出的電位值越高；然而當樣品為二價離子 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 時，其內部填充液濃度越高，其檢測出的電位值卻較低。量測結果中可觀察出，樣品濃度於 10^{-4} M 至 1 M 的範圍內成線性關係，量測斜率陳列於表 4-2 中。

表 4-2 三種不同陽離子之硝酸鹽交叉檢測

Sample \ Buffer	KNO ₃ (mM)			NaNO ₃ (mM)			Ca(NO ₃) ₂ (mM)		
	0.1	1	10	0.1	1	10	0.1	1	10
NaNO ₃ (slope)	-62.0	-67.7	-68.6	-42.1	-45.5	-46.9	-33.2	-28.2	-13.9
KNO ₃ (slope)	-46.3	-48.4	-45.4	-45.3	-48.7	-50.2	-34.3	-30.5	-14.6
Ca(NO ₃) ₂ (slope)	-39.5	-38.2	-41.8	-25.9	-33.5	-39.9	-37.7	-35.0	-17.6

本研究為比較不同電解液量測 NaNO₃ 標準樣品之結果，使用 1 mM 之電解液作為內部填充液，量測數據如圖 4-4 所示。從數據中可發現，當內部填充液使用 KNO₃ 電解液時，其對於硝酸根離子的靈敏度最高，誤差值也小，量測極限可達 10^{-5} M。而使用 NaNO₃ 電解液作為內部填充液時，由於其陽離子皆為一價離子，因此其現象與 KNO₃ 一致，但是量測靈敏度下降許多，且量測極限也變低只能量測到 10^{-4} M。當使用 Ca(NO₃)₂ 電解液作為內部填充液時，可觀察出其量測的範圍往高濃度偏，當樣品濃度低於 10^{-2} M 時，其電位變化不大，無法偵測出硝酸根離子濃度。從結果可判斷出，雖使用同樣硝酸根離子之電解液，但是其組合之陽離子不同，對於檢測之靈敏度與線性範圍是有影響的。

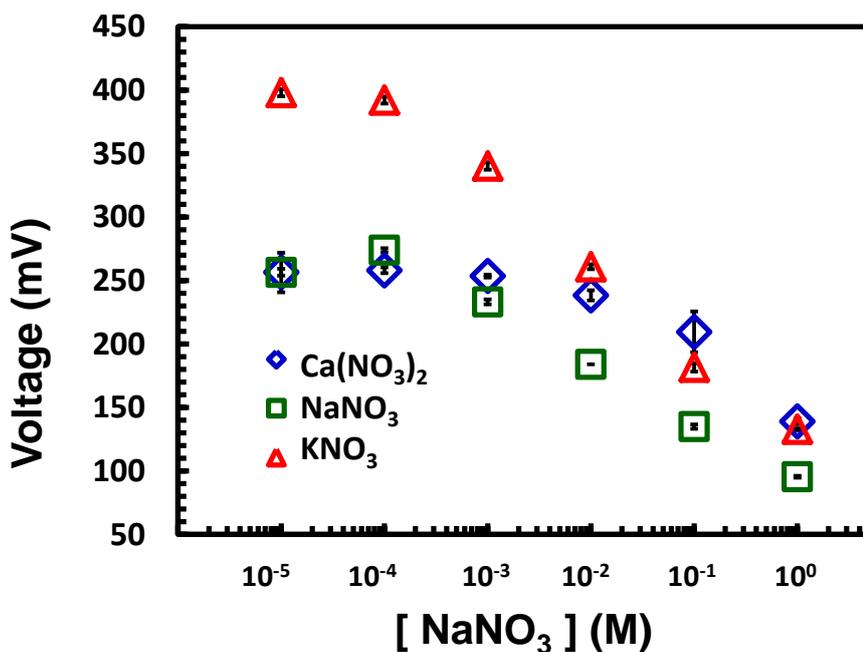


圖 4-4 使用不同陽離子之硝酸鹽檢測硝酸鈉溶液

4.1.4 硝酸根離子檢測

本研究為探討自發性氯化之銀/氯化銀電極，設計一實驗與市售之銀/氯化銀電極作比較，分析本研究製備之電極效能。由於市售之產品無法與電極晶片作比較，因此使用傳統之離子選擇電極製作 ISE，離子選擇電極部分使用 10 mM 的 KNO₃ 電解液樣品作為內部填充液，工作電極部分使用 99% 純銀線作氯化處理，製備銀/氯化銀參考電極。量測時使用製備的銀/氯化銀電極取代市售之參考電極，並直接將參考電極置放於樣品溶液中，使檢測系統與晶片設計之系統較為相符，其量測架構如圖 4-5 所示。市售之銀/氯化銀電極如圖 (A) 所示，其為一根玻璃管柱中置入一根銀/氯化銀電極，並於玻璃管柱中注入內部填充液，且為了延長電極使用壽命並穩定氯化銀品質，故內部填充液使用 3 M 的高濃度氯化鈉溶液，確保其電解液之氯離子處於飽和狀態。圖 (B) 為使用本研究製備之銀/氯化銀 RE，為符合晶片使用之架構，捨棄掉市售參考電極之高濃度內部填充液，不僅可減少不同內部填充液產生之電位變化浮動，更能準確並穩定地量測薄膜內外之電位變化。

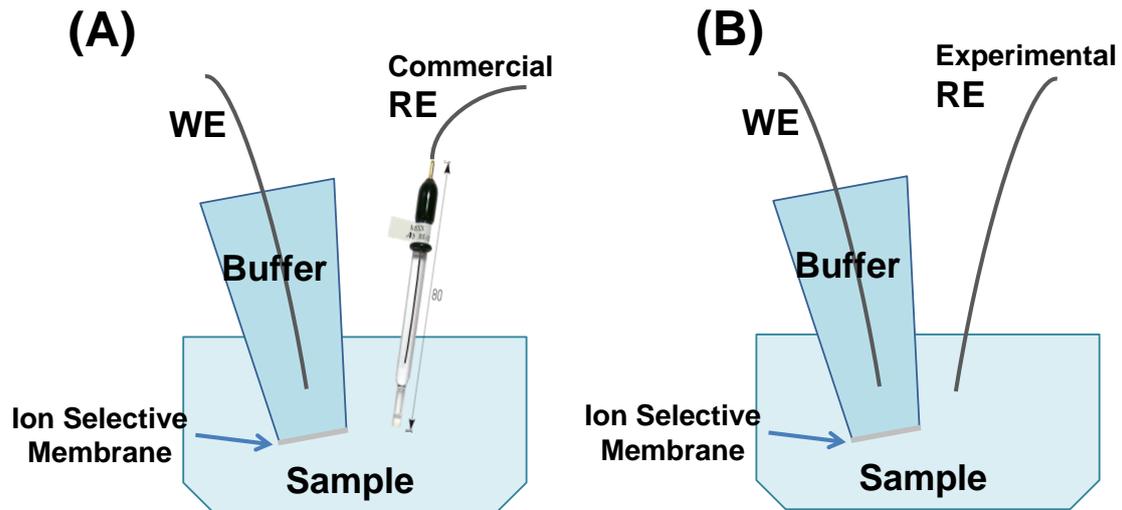


圖 4-5 離子選擇電極量測系統架構圖：(A) 使用市售之銀/氯化銀電極為 RE (B) 使用本研究製備之銀/氯化銀電極為 RE

實驗之樣品溶液為 10^{-6} M 到 1 M 的硝酸鈉溶液，選用各相差十倍的濃度做量測，使用手持式三用電表量測離子選擇電極與參考電極的電位差值。量測結果如圖 4-6 所示，從數據圖中可得知，電位值大小會隨樣品濃度的提高而有顯著的變化。當溶液中有硝酸根離子時，硝酸根離子會靠近並吸附於薄膜表面，因此薄膜表面便會累積 NO_3^- 離子團，其電位訊號值越偏向負電訊號。當 NaNO_3 溶液的濃度低於 10^{-4} M 時，量測到之膜電位差隨濃度的變化並不顯著，訊號反應變化值不超過 ± 20 mV，且訊號相對的誤差值較大，無法輕易辨別樣品濃度。反之，當硝酸根樣品濃度高於 10^{-4} M 時，可看出其訊號變化開始變大，且訊號逐漸穩定，樣品濃度介於 10^{-4} M 到 1 M 範圍內時，檢測具有良好的線性關係，其線性程度高達 $R^2=0.9992$ 。此外，於上述之濃度範圍內的檢測誤差值變化幅度微小，證明此感測器用於檢測樣品中硝酸根離子濃度具有良好的準確性。

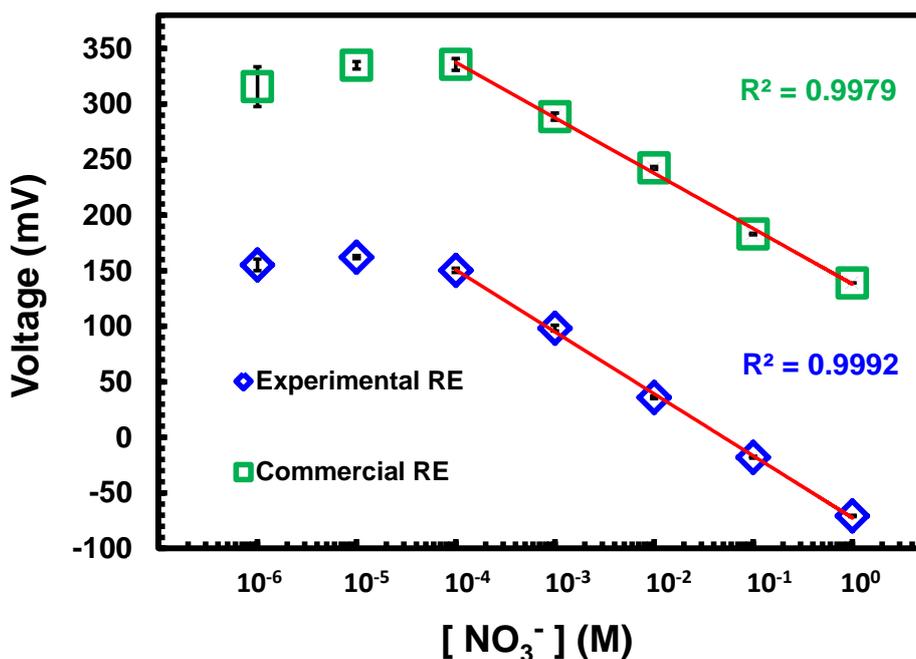


圖 4-6 使用商用的 RE 與本實驗製備之 RE，量測不同濃度之硝酸根離子樣品，對於硝酸根離子選擇電極的電位差變化

綜合上述的結果得知，使用製備之銀/氯化銀電極，雖然其檢測出的電位值，與使用市售參考電極的電位值有明顯的平移差異，但是其效能符合市售之銀/氯化銀電極，其檢測範圍從 10^{-4} 到 1 M 有極好的線性關係，且硝酸根離子濃度的偵測極限可達 10^{-5} M。總而言之，實驗結果證實了此架構之電極系統，與市售之硝酸根離子選擇電極相比，可穩定並提升其量測性能，並應用於硝酸根離子濃度檢測。

4.1.5 離子干擾評估

本研究更深入探討干擾離子對於量測的影響，以符合實際量測時之檢測樣品，而離子選擇電極最重要的議題就是其選擇性效能，但目前的離子選擇電極都無可避免地會面臨到干擾離子之影響，因為離子選擇薄膜並無絕對的專一性，量測時仍會受非待測離子訊號之干擾。因此，本研究量測常見之干擾離子造成之訊號誤差，並探討其是否會影響本實驗設計之離子選擇電極的檢測性能。硝酸根離子選

擇電極常分析之干擾源有亞硝酸根離子 (NO_2^-)、乙酸根離子 (CH_3COO^-) 及碳酸根離子 (HCO_3^-) 等，為探討干擾離子對於硝酸根離子選擇電極的影響，計算電極薄膜之選擇性係數，分析是否會因為其他離子之干擾而造成量測濃度誤差，因此將上述三種干擾離子，配製成不同濃度之樣品溶液。其量測架構如圖 4-5 所示，紀錄不同濃度之干擾離子的訊號反應，藉此判斷其對於硝酸根離子選擇薄膜之影響程度。量測樣品溶液使用去離子水配製，分別為亞硝酸鈉 (NaNO_2)，其水溶液呈弱鹼性，常作為食品添加劑於魚類、肉類等食品，可作為食品之防腐劑和染色劑；碳酸氫鈉 (NaHCO_3) 俗稱小蘇打，水溶液呈弱鹼性，常被用作食品中和劑；醋酸鈉 (CH_3COONa) 其水溶性呈鹼性，可作為酸味劑加入食品中。

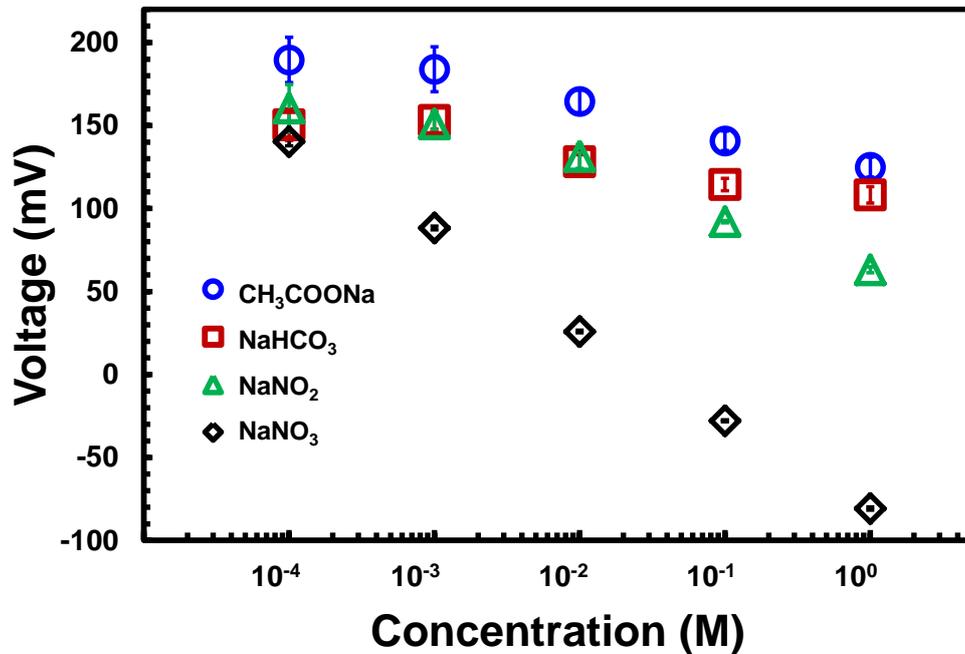


圖 4-7 使用硝酸根離子選擇電極量測不同濃度之干擾離子樣品

量測結果如圖 4-7 所示，當使用硝酸根離子選擇電極量測上述干擾離子樣品時，以碳酸根離子影響程度最低，其濃度與電位之斜率關係為 -12.3 mV/dec ，且碳酸氫鈉濃度高達 1 M 時，其電位訊號影響不超過 50 mV 。干擾離子為醋酸根離子時，其濃度與電位之斜率關係為 -17.23 mV/dec ，可看出此干擾離子影響程度不大，

當醋酸鈉濃度高達 1 M 時，其電位訊號影響不超過 65 mV。硝酸根離子選擇電極最主要的干擾離子為亞硝酸根離子，其濃度與電位之斜率關係為-25.3 mV/dec，其影響程度明顯高於其他干擾離子，但是感測斜率不及硝酸根離子的一半。

離子選擇電極的選擇性係數為干擾離子最主要的參考值，其計算方式參考市售薄膜提供之文獻[102]，取不同干擾離子之濃度樣品如表 4-3 所示，紀錄其濃度之電位值，以內差法計算出對應之主要離子濃度，並將對應之主要離子濃度除以干擾離子濃度，取 log 值後為計算出的選擇性係數。整理結果如表 4-3 所示，使用本研究之離子選擇電極量測，其選擇性係數相近，其中亞硝酸根離子之選擇性能優於傳統的離子選擇電極一個級數。

表 4-3 不同干擾離子對於硝酸根離子之選擇性係數

Interference ion	Concentration of anion (mM)	Selectivity coefficient	Selectivity coefficient ^[102]
CH ₃ COO ⁻	100	-2.68	-2.36
NO ₂ ⁻	100	-1.99	-0.98
HCO ₃ ⁻	40	-2.02	-2.17

4.1.6 再現性效能

離子選擇電極量測時的再現性效能是非常重要的，因此本研究設計了一組濃度梯度檢測實驗，離子選擇電極內部填充液使用 10 mM 濃度之 KNO₃ 電解液 0.5 mL，量測溶液使用 10⁻⁴ M 到 1 M 濃度之 NaNO₃ 樣品溶液 10 mL。實驗模擬實際應用時的方式，離子選擇電極量測前需用去離子水沖洗後，再置入樣品溶液中檢測，量測訊號穩定後，再使用去離子水沖洗離子選擇電極。連續式檢測濃度由低濃度 10⁻⁴ M 至高濃度 1 M，再由 1 M 高濃度連續量測至 10⁻⁴ M 低濃度，量測濃度各相差十

倍，每個濃度的量測時間為 50 秒鐘，沖洗電極 30 秒鐘。圖 4-8 為量測結果圖，從圖中可看出於濃度梯度量測時具有良好的再現性表現，當樣品濃度由低濃度樣品（高電位）以十倍濃度差距遞增至高濃度樣品（低電位）時，具有良好的線性反應，其線性關係為 $R^2=0.9963$ 。而當樣品濃度由高濃度樣品（低電位）遞減至低濃度樣品（高電位）時，因為本實驗使用之離子選擇薄膜為吸附型薄膜，在高濃度樣品量測後，僅使用去離子水快速沖洗無法將薄膜上的離子完全去除，因此會有濃度滯留的現象，造成再量測低濃度樣品時電位會偏低。但實驗結果顯示，濃度由高至低的連續量測值仍在誤差範圍內，且仍維持良好的靈敏度，其線性關係為 $R^2=0.9926$ 。實驗數據圖中也可觀察出，當量測樣品濃度高於 10^{-2} M 時，工作電極之膜電位與參考電極之電位達平衡的時間，僅需不到 15 秒鐘。但是當檢測樣品濃度低時，所需之反應平衡時間較長，尤其當上一個樣品濃度大於量測樣品時，其反應平衡時間約一分鐘。

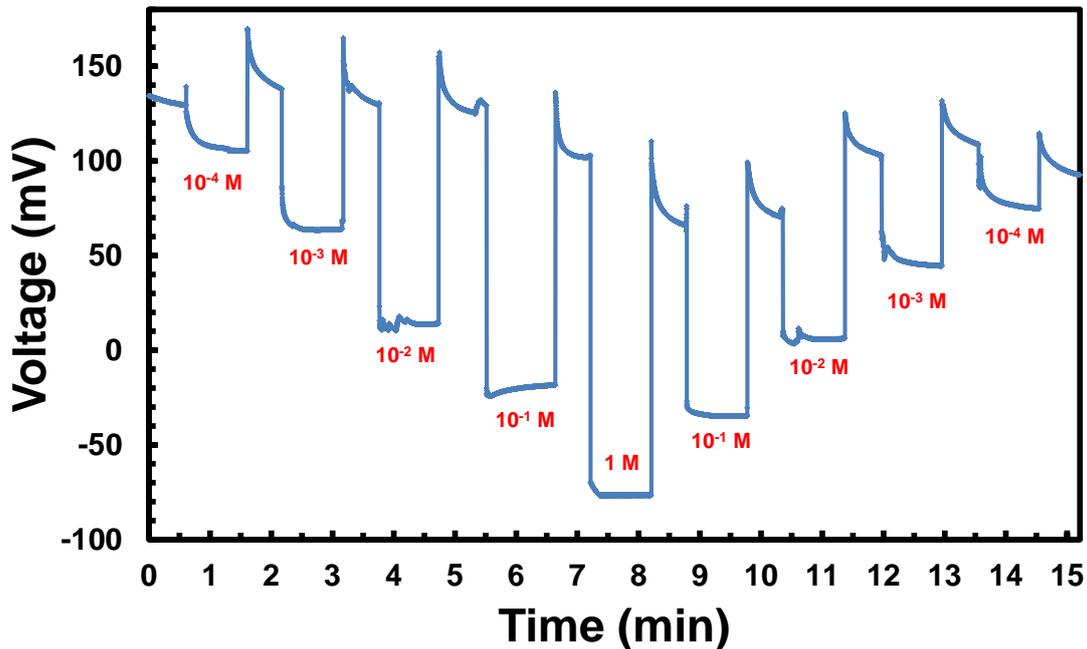


圖 4-8 硝酸根離子選擇電極於濃度梯度量測之數據圖

然而，離子選擇電極感測使用時，仍需要樣品與樣品間的電極沖洗，需要至少半分鐘的清洗時間，才能使離子選擇電極的膜電位達到平衡。除此之外，PVC

薄膜黏貼於電極管的製作步驟繁雜，且需耗費較多時間，因此為改善這些缺點，將整合 PVC 薄膜於晶片中。並且，為深入探討其感測薄膜厚度與感測面積不同的影響效能，本實驗將離子選擇薄膜製作於晶片中，改變其感測面積與感測薄膜厚度，探討硝酸根離子選擇薄膜的特性，以提升感測效能。

4.2 微流體感測晶片

本節針對製作好的離子選擇電極晶片進行電化學偵測，以評估其離子選擇電極的感測效能，利用電化學分析儀檢測，並記錄其電位訊號變化。在進行電化學檢測時，將電極晶片插入 Slot 插槽後，將工作電極與參考電極連接至電化學分析儀，以 OCPT 系統量測分析物的電位差大小，並設定其掃描速度為 0.1 秒取一個數值。本實驗檢測樣品使用不同濃度的 NaNO_3 溶液，內部填充液使用 10 mM 的 KNO_3 電解液，每次量測取樣 5.0 μL 樣品，使用注射幫浦注入填滿管道。

將 PVC 薄膜封裝於不同結構之微流道設計，並藉由 Ansys[®] 模擬改良其微流道設計，最後將電極及設計之微流道結構整合於一個微流體晶片，並利用液態薄膜自行封裝成膜技術，將市售之液態硝酸根離子選擇膜固定於晶片中。本章節探討離子選擇薄膜電極晶片之效能以及感測靈敏度，其實驗結果分別為電極測試、薄膜選擇性、電化學偵測與反應時間等分析。

4.2.1 微結構成膜

本研究為改良前人的設計，使用套裝軟體 ANSYS[®] Fluent 系統模擬，探討微流道管道之流場，其中以最簡單的設計結構為最佳設計，並且針對此設計模擬了實際注入液態薄膜時的情況。圖 4-9 為模擬空氣流場結果圖，比照實驗的操作設定，設計兩種空氣流場狀態探討。圖 (A) 設定為出口全開的情況，模擬設定將中間薄膜管道入口端設定為 Wall、中間薄膜管道出口端設定為 Pressure Outlet (壓力

設定為錶壓力-70660 pa)，其餘四個入口端設定為 Pressure Inlet (壓力設定為 0)。由模擬結果中可觀察出，當四個入口端皆為開放入口時，會造成空氣流場於中間薄膜出口端匯集，空氣流進入薄膜入口端時有往外擴的情形，且薄膜吸出狀況不夠快速，空氣剪切力效果不如預期。

為減少薄膜外擴現象，因此本研究改變出口設定，封閉薄膜出口兩旁的流場入口，探討其流場及流速的改變，模擬結果從 (B) 圖中可看出其空氣流速更為快速，且空氣流場沿著 45 度斜角的入口流入，氣流產生夾擠現象貼緊微結構，使液態薄膜成型時可減少外擴情形，薄膜從第一顆結構開始便封裝於微結構間，並無外擴現象。由結果中可看出，封閉薄膜出口端兩旁的入口時，不僅能增加氣體夾擠的效率，更使流速更為快速。

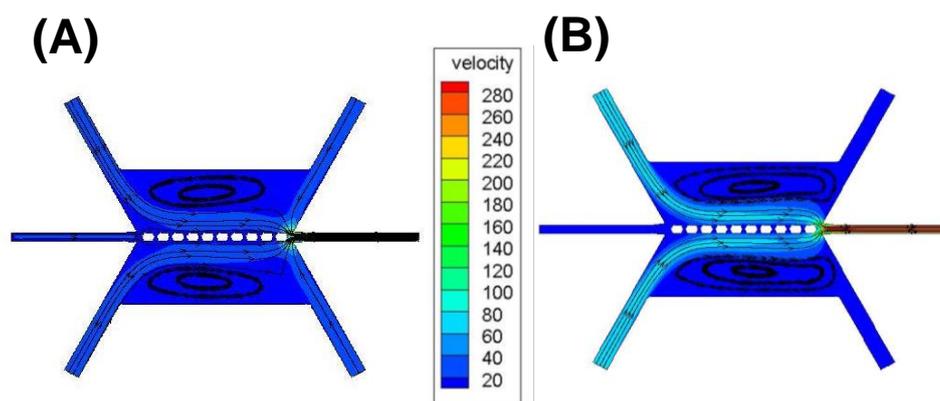


圖 4-9 微流道 ANSYS® Fluent 空氣流模擬圖：(A) 薄膜出口端設定為 Pressure Outlet、入口端設定為 Wall，其餘皆設定為 Pressure Inlet (B) 薄膜出口端設定為 Pressure Outlet、薄膜入口端與出口端兩旁的流道設定為 Wall，其餘皆設定為 Pressure Inlet

本實驗模擬結果顯示，當吸取液態薄膜時，封閉其幫浦兩側之流道出口能大幅增加氣體流速，並使夾擠效果更為顯著，為了能夠確定實際情況是否與模擬相符，本實驗使用直立式顯微鏡搭配 CCD 鏡頭攝影，拍攝其成膜影像。實驗採取上述的架設方式，於左邊中間薄膜通道中注入液體薄膜，右邊中間通道架設真空幫

浦，並將幫浦兩側的流道以膠帶封住出口。圖 4-10 為實際測試液體流場結果圖，影像是從影片中擷取的畫面圖，從圖 (A) 中可看出其液態薄膜注入時，兩旁的空氣流因流速較液體膜快，因而在吸取的過程中產生夾擠現象，使液態膜順利地於中間流道集中，並無外擴現象，大幅改善之前架構於出口時產生的突擴管現象。圖 (B) 為持續吸取薄膜，液態薄膜沿著微結構封裝，證實此薄膜自動成行技術是可行且容易操作的。圖 (C) 為薄膜完整封裝於微流道結構後，將多餘的薄膜吸取掉，可從圖中液態薄膜的表面張力將薄膜固定於微結構間。因此，本研究使用此微流道結構設計，將市售之硝酸根離子選擇電極封裝於微流體電極晶片中，並對於薄膜特性做更深入地探討。

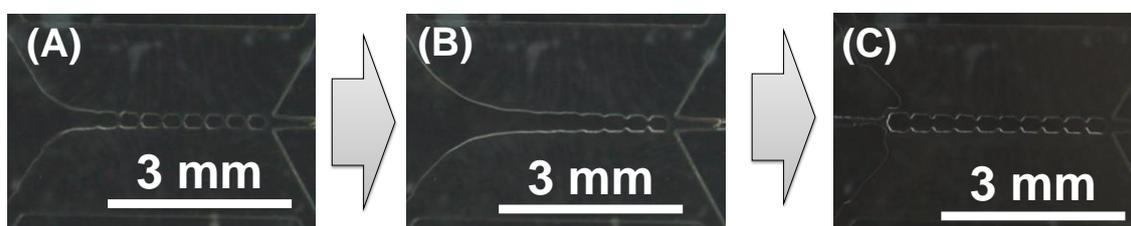


圖 4-10 液態薄膜於微流道結構成膜圖：(A) 通入離子選擇薄膜 (B) 真空幫浦吸取離子選擇薄膜 (C) 薄膜封裝於微流道結構中

4.2.2 晶片效能

本研究為檢測離子選擇薄膜封裝於電極晶片之效能，使用市售之硝酸根離子選擇薄膜封裝於電極晶片中，封裝後待液態薄膜揮發，放置 12 小時後即可使用，檢測前需於流道中填滿去離子水濕潤薄膜，再注入量測樣品。其量測架構如圖 4-11 所示，感測電極連接於電化學分析儀，WE 連接電解液區域之電極，RE 與 CE 連接至樣品區域之電極，並使用 OCPT 法測量其薄膜之電位差。

本研究使用離子選擇電極晶片，電解液使用 10 mM 硝酸鉀作為內部填充液，樣品溶液使用硝酸鈉溶液，濃度範圍由 10^{-5} M 至 1 M，選用各相差十倍的濃度樣品作量測。感測晶片量測時使用注射幫浦注入電解液與樣品，分別於流道入口注

射 2.0 μL 之電解溶液與樣品溶液，並於流道出口使用真空幫浦吸取多餘之樣品。量測結果如圖 4-12 所示，從數據圖中可發現，其樣品濃度於檢測範圍從 10^{-5} M 到 1 M 具有良好的線性關係，其線性程度為 $R^2=0.9920$ ，且偵測極限可達 10^{-5} M。

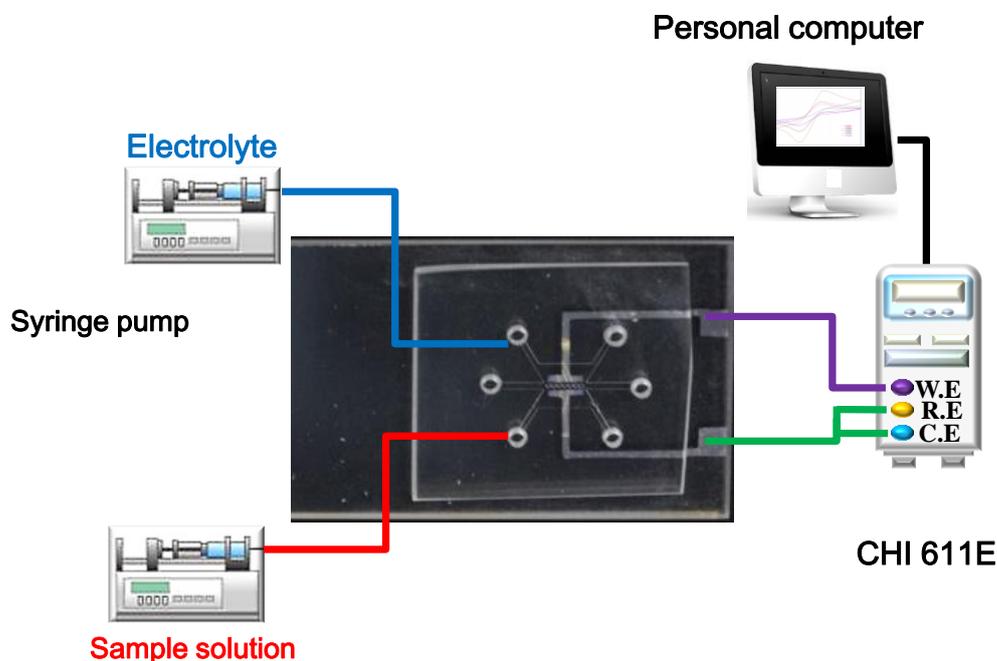


圖 4-11 電化學實驗架設示意圖

換句話說，由實驗結果可證實，本研究之成膜技術將離子選擇薄膜完整的封裝於晶片中，並提供良好的量測性能。於室內溫度的條件下，樣品溶液中的硝酸根離子，利用吸附作用將離子吸附於薄膜表面，產生膜電位差變化，並使用雙電極檢測電位訊號變化，與分析之樣品濃度成正相關。因此，可從實驗結果圖中得到良好的線性曲線，也確定在微量的樣品溶液體積下，使用 ISE 微流體系統，可成功實現高靈敏的電化學檢測。由此可知，此硝酸根離子感測微流體晶片，不僅使用樣品極少，其製作時間快速，且製作成本低廉。透過感測面積不同，可以達到放大訊號的效果，使量測硝酸根離子濃度之線性範圍從 10^{-5} M 到 1 M，其偵測濃度相較於市售薄膜提供之線性範圍從 10^{-4} M 到 10^{-1} M，提升了兩個量級。

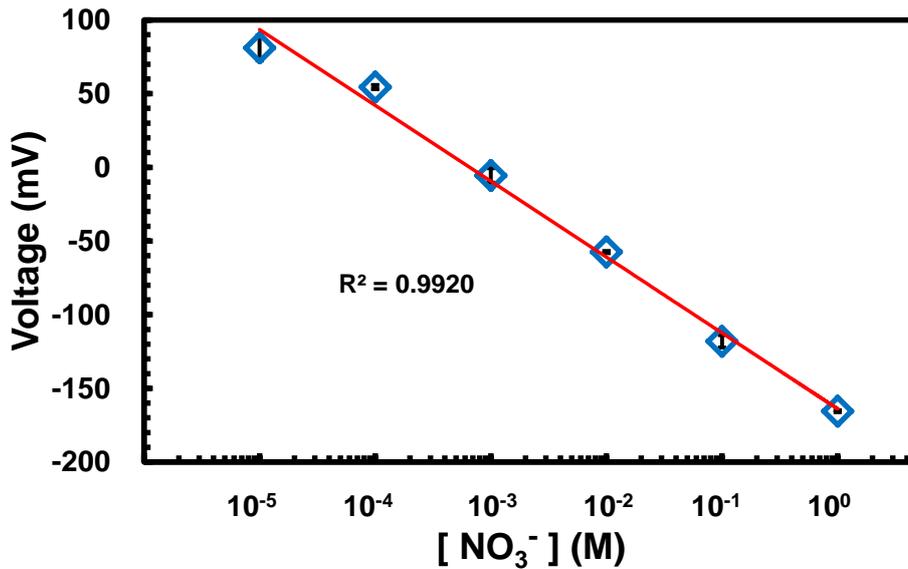


圖 4-12 使用離子選擇薄膜量測不同濃度的硝酸根離子樣品

4.2.3 連續偵測

本研究為探討感測晶片連續偵測時的再現性，設計了一濃度梯度實驗，並使用離子選擇電極晶片進行連續偵測，電極內部填充液使用 10 mM 濃度之 KNO_3 電解液，量測溶液使用 10^{-5} M 到 1 M 濃度之 NaNO_3 樣品溶液。實驗為連續式偵測樣品，使用注射幫浦注入電解液與樣品，分別於流道入口注射 5.0 μL 之電解溶液與樣品溶液，並於流道出口使用真空幫浦吸取多餘之樣品。量測時間為 100 秒鐘，100 秒鐘之後直接注射新濃度之樣品，注射樣品溶液由低濃度 10^{-5} M 至高濃度 1 M，再由 1 M 高濃度連續量測至 10^{-5} M 低濃度，最後再重複量測至 1 M 高濃度樣品，量測濃度各相差十倍。

圖 4-13 為量測結果圖，從圖中可看出本晶片系統於濃度梯度量測時具有良好的再現性效能，當樣品濃度由低濃度樣品（高電位）以十倍濃度差距遞增至高濃度樣品（低電位）時，具有良好的線性反應，其線性關係 $R^2=0.9918$ 。當樣品濃度由高濃度樣品（低電位）遞減至低濃度樣品（高電位）時，其反應電位並無完全回復至濃度電位，但是量測值仍在誤差範圍內，且濃度由高至低時仍有量好的靈

敏度，其線性關係 $R^2=0.9751$ 。由結果中可觀察出濃度滯留的現象，是因為硝酸根離子選擇薄膜為吸附型薄膜，其於濃度檢測時，樣品溶液之硝酸根離子會吸附於薄膜表面；但是當量測下個濃度樣品時，若薄膜已吸附了高濃度含量之硝酸根離子，便會經由下個樣品的注入與沖洗，將原先高於十倍之硝酸根離子脫附，並溶於下個濃度樣品中，導致樣品於高濃度檢測後，再量測低濃度樣品時電位會偏低。但是當樣品溶液再從低濃度量測回去高濃度時，其薄膜感測之電位依舊具有良好的線性表現，其線性關係 $R^2=0.9886$ 。實驗證實，本研究之硝酸根離子感測晶片，相較於傳統之離子選擇電極，需透過去離子水沖洗電極方可量測下個樣品，而離子選擇電極晶片透過注射幫浦的連續注射，可連續注入樣品進行即時偵測，適用於連續檢測樣品中硝酸根離子濃度含量。並且其於量測範圍內，不論濃度變異由高至低或由低至高，其皆有良好的再現性表現。

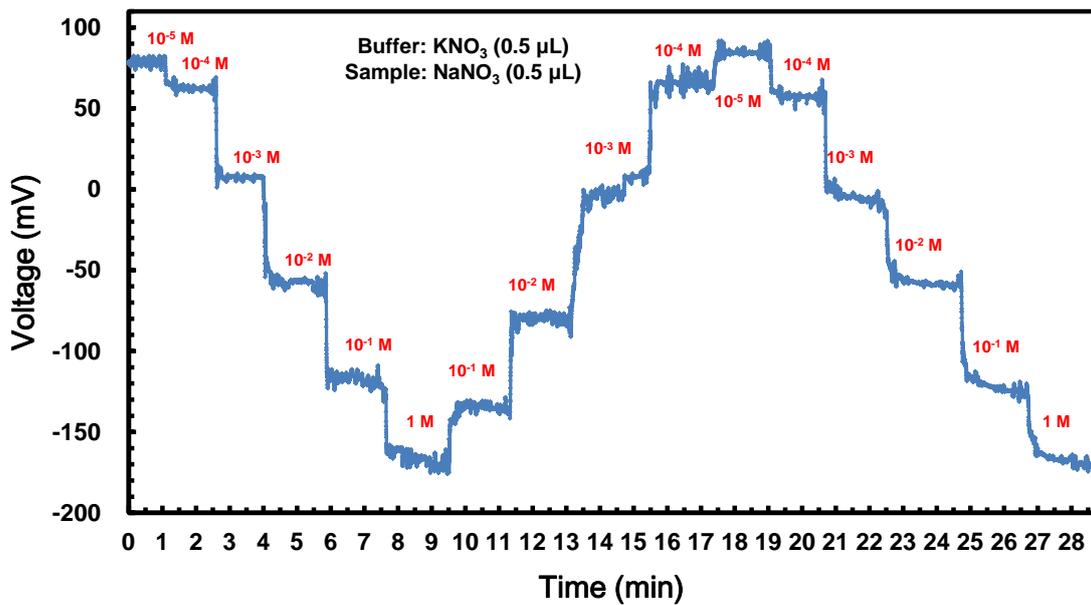


圖 4-13 硝酸根離子感測晶片於連續式濃度梯度量測數據圖

4.2.4 感測面積的影響

本研究為探討離子選擇薄膜電極之膜電位與感測面積的關係，使用不同微結構設計之晶片電極，其微結構設計於 3.2.3 小節已詳述之，利用其微結構創造出不

同的感測薄膜面積，探討其膜面積對於檢測膜電位的影響。本實驗使用不同的微結構晶片進行量測，使用 10 mM 硝酸鉀電解液作為內部填充液，樣品溶液使用硝酸鈉溶液，濃度範圍由 10^{-5} M 至 1 M，選用各相差十倍的濃度樣品作量測。感測晶片量測時使用注射幫浦注入電解液與樣品，分別於流道入口注射 2.0 μ L 之電解液與樣品溶液，並於流道出口使用真空幫浦吸取多餘之樣品。晶片感測之膜面積表示方式為電解液感測面積：樣品感測面積，其感測面積示意圖如圖 3-6 所示。離子選擇電極感測晶片之感測面積的計算方式，採用假設其薄膜成形時貼附於微結構上，並於微結構間以正圓弧形成型，因此計算其感測面積比分別大約為 5:1、3:1、1:1、1:3 與 1:5，共五種不同面積比之感測晶片。其中 5:1 與 1:5 為同一微結構之感測晶片，僅交換注入電解液與樣品區域的位置，即原本注入電解液的地方改為樣品注入區，樣品區域改成注入電解液；同理，面積比 1:3 與 3:1 也是使用相同之方法，交換電解液與樣品注入的位置。

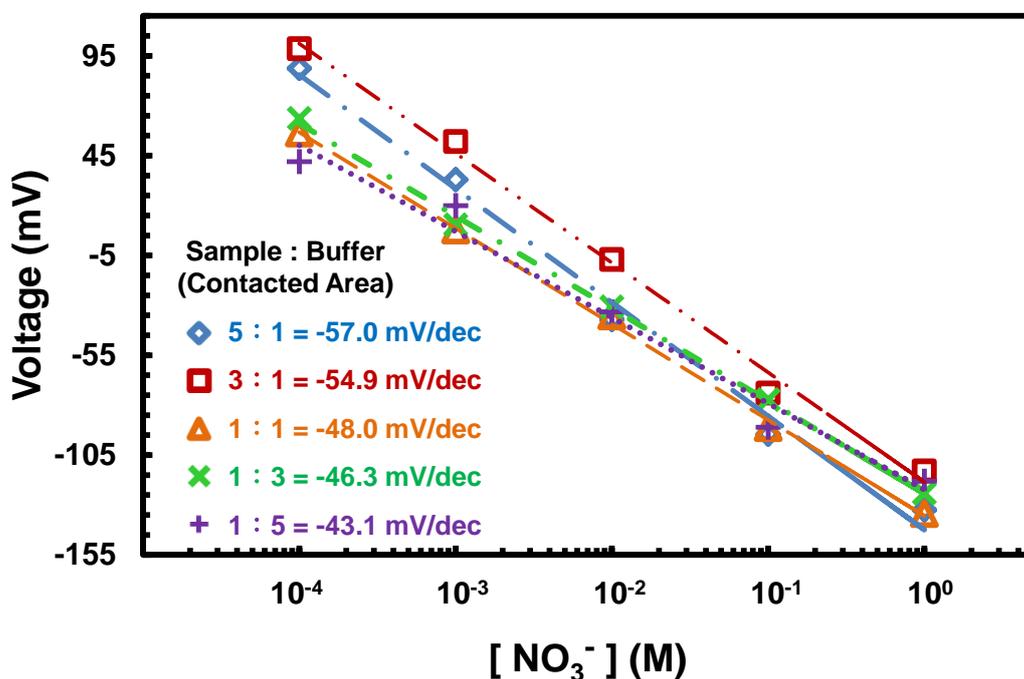


圖 4-14 利用微結構設計創造出不同感測薄膜面積，比較不同膜面積的電極晶片檢測硝酸根離子樣品的響應程度

量測結果如圖 4-14 所示，由結果可推斷，由於此感測薄膜為吸附型薄膜，因此當填入 10 mM 的 KNO_3 內部填充液時，其吸附的電位量藉由感測接觸面積傳遞出訊號至 WE；同時注入不同濃度的 NaNO_3 樣品溶液，其電位量也藉由感測薄膜吸附上的硝酸根離子濃度不同而改變，並將其電位量傳遞至 RE。因此，本實驗藉由改變感測面積探討其感測靈敏度，當內部填充液感測面積與樣品感測面積比約為 1:1 時，其感測靈敏度為 -48.0 mV/dec 。當內部填充液感測面積與樣品感測面積比約為 1:3，量測的電位變化也較顯著，其感測靈敏度為 -54.9 mV/dec 。當內部填充液感測面積與樣品感測面積比約為 1:5 時，其量測之電位差變化更為顯著，其感測靈敏度提升至 -57.0 mV/dec 。本實驗也量測其樣品感測面積比例不變，提高電解液之感測面積比例，探討其對於硝酸根離子感測之影響。當內部填充液感測面積與樣品感測面積比約為 3:1 時，其濃度改變之感測面積比例不變，提升固定濃度之電解液之感測面積比例，其感測靈敏度為 -46.3 mV/dec 。當內部填充液感測面積與樣品感測面積比約為 5:1 時，其硝酸根離子的感測靈敏度降低至 -43.1 mV/dec 。由結果中得知，其兩側感測薄膜之面積比與量測硝酸根離子濃度成正相關，當樣品區之感測面積相對提高時，相比於固定濃度之電解液，其樣品溶液中的硝酸根離子吸附於薄膜的面積相對提升，因此其 NO_3^- 離子的吸附量就越多，電位變化也就越靈敏。相比之下，濃度固定之電解液區域薄膜，與不同濃度之樣品區域薄膜，當樣品溶液感測面積與電解液感測面積越大時，薄膜兩側吸附之硝酸根離子含量差異，造成其膜電位的感測靈敏度提升。

由此可推斷，本研究設計之不同微結構晶片，可成功創造出薄膜兩側不同之感測面積，並藉由其感測面積之變化影響靈敏度。實驗結果顯示，當樣品感測薄膜面積相對大時，其感測靈敏度可達 -57.0 mV/dec ；當電解液感測薄膜面積相對大時，其感測靈敏度降為 -43.1 mV/dec 。

4.2.5 反應時間量測

硝酸根離子選擇薄膜為吸附型薄膜，其反應時間為硝酸根離子吸附於薄膜達訊號穩定所需的時間。因此，為探討本研究之感測晶片的反應時間，量測其感測薄膜之吸附時間與脫附時間，計算出吸附前至吸附後各別的平衡速率，即可得知此感測晶片的反應時間。實驗使用電化學分析量測，並設定以每一毫秒鐘記錄一個電位值。量測使用 10 mM 之硝酸鉀電解液作為內部填充液，樣品溶液使用 1 mM 之硝酸鈉溶液作量測，溶液使用注射幫浦注入，分別同時於流道入口注射 2.0 μL 之電解溶液與樣品溶液，並於流道出口使用真空幫浦吸取多餘之樣品。量測方法為，將晶片注入去離子水量測至穩定後，注入 1 mM 之硝酸鈉樣品溶液，並記錄其電位值變化至穩定，量測時間為 30 秒鐘，此為硝酸根離子吸附於感測薄膜表面的特性表現。測量薄膜脫附硝酸根離子時，注入去離子水溶液於樣品區，紀錄其電位值變化至穩定，量測時間同樣為 30 秒鐘，此現象則為硝酸根離子脫附於感測薄膜表面的特性。

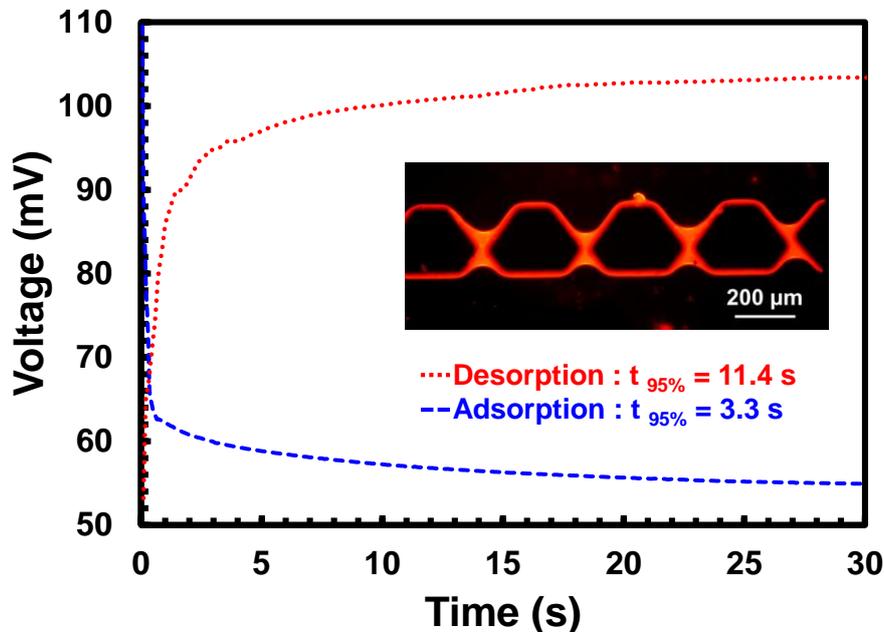


圖 4-15 感測晶片於量測 1 mM 硝酸根離子之吸附與脫附的反應時間

量測結果如圖 4-15 所示，當硝酸根離子薄膜吸附於薄膜表面時，由於硝酸根離子為攜帶負電之離子，其電位值訊號極度敏感且快速，由一開始去離子水偵測到的電位值約 110 mV，迅速的趨向相對負電位值約 55 mV，達平衡電位的 95% 僅需 3.3 秒鐘。反之，當硝酸根離子薄膜要脫附薄膜表面，於連續偵測中有觀察到其濃度滯留的情況，因此也可推斷離子脫附薄膜表面時，也需要一定的時間才可脫附完全。由結果中可觀察出，硝酸根離子脫附於離子表面時，其電位值由原先電位值約為 53 mV，相對緩慢但仍快速的脫附硝酸根負離子團，薄膜表面電位往正電位值約 103 mV，達平衡電位的 95% 也僅需 11.4 秒鐘。

由此可知，吸附型離子選擇薄膜雖然清洗薄膜需較多的時間，但相較於通透型離子選擇薄膜，吸附型薄膜的反應時間仍相對快速許多。並且，與市售之離子選擇電極相比，其需約 30 秒鐘之平衡反應時間，感測晶片僅需約十分之一的時間即可完成檢測。再加上，感測晶片使用時無須額外的清洗步驟，因此更減少了使用上花費的總時間。由此可知，本研究之硝酸根離子感測晶片，不僅大幅縮減了檢測花費的總時間，且於價格成本上也更為低廉，再現性表現優異，已可取代市售之離子選擇電極於應用。

4.3 蔬菜檢測

硝酸鹽含量近期被廣泛的注意，環保團體主婦聯盟於 2010 年公布，從隨機購買的蔬菜硝酸鹽檢測結果中，發現有機小白菜和青江菜硝酸鹽含量高達 20000 ppm，比歐盟規定成人容許值 2500 到 4000 ppm 高出許多。台北市衛生局也於 2012 年也針對市售蔬菜進行硝酸鹽檢測，公布 47 件抽檢結果，其中小白菜和小松菜也幾乎達到 7000 ppm 的數值，而小黃瓜的含量低於 280 ppm。由此可知，不同品種的蔬菜，其硝酸鹽含量均不同，一般來說，葉菜類含量較高；蘿蔔類也有偏高的含量；其他蔬菜中，特別是瓜果類的含量較低。因此，本研究為探討其感測晶片於實際之應用效能，選用兩種蔬菜進行硝酸鹽含量檢測，分別為高含量之葉菜類中的小

白菜與低含量之瓜果類的小黃瓜。

本研究為探討硝酸根離子感測晶片於實際應用之效能表現，使用 10 mM 之硝酸鉀電解液作為內部填充液，樣品溶液使用小白菜與小黃瓜之檢體作量測。蔬菜檢體分為三種處理方式，探討其清洗方式不同，對於蔬菜中硝酸鹽含量是否能清除，處理方式分別為未處理、清水洗、1 mM 之食鹽水清洗。檢測方式使用注射幫浦分別取用 2.0 μL 之電解液與檢體溶液，並同時注入於感測晶片中，並於流道出口使用真空幫浦吸取多餘之溶液。檢測使用電化學分析儀量測，紀錄其檢測不同蔬菜檢體量測到的電位差，並使用於 4.2.2 小節中感測晶片於硝酸根離子檢測之檢量線，將量測到的電位值對應到相對的濃度值，量測結果範圍落在濃度 10^{-4} 到 10^{-1} M 之範圍內。

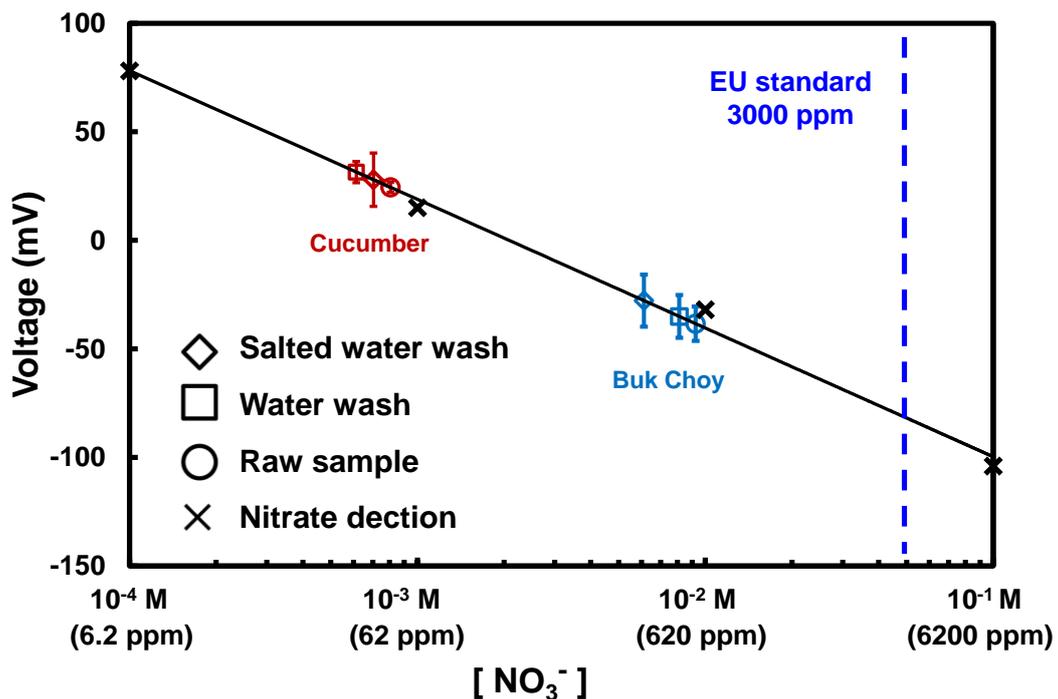


圖 4-16 硝酸根離子感測晶片於蔬菜檢體之檢測

量測結果如圖 4-16 所示，以小白菜來說，其本身的硝酸鹽含量就偏高，未處理之硝酸根離子含量約為 573.5 ppm，硝酸根離子含量仍低於歐盟規定之標準 3000 ppm 以下。使用去離子水洗沖洗 1 分鐘之小白菜，其硝酸根離子含量約為 503.4 ppm，小白菜為葉菜類蔬菜，故可從結果中得知，藉由清水洗可減少約 12% 的硝酸鹽含量。並且，以鹽水清洗之小白菜含量最低，其硝酸根離子含量約為 379.5 ppm，比未處理時降低了約三成的硝酸鹽含量。而小黃瓜本身的硝酸鹽含量就偏低，由量測數據中得知，未處理之小黃瓜硝酸根離子含量約為 38.0 ppm，明顯低於小白菜之硝酸鹽含量許多。其中，使用去離子水洗沖洗 1 分鐘之小黃瓜，其硝酸根離子含量約為 50.0 ppm；而使用鹽水清洗之小黃瓜，其硝酸根離子含量約為 43.6 ppm。由此結果得知，其小黃瓜為瓜果類蔬菜，其硝酸鹽含量分布主要累積於蔬果核心，因此即便透過不同的清洗方式，仍無法有效的降低其硝酸鹽含量。

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

本研究所開發的改良版微流體感測晶片，利用套裝軟體 ANSYS® Fluent 系統模擬微流道之流場，改善並設計出薄膜成形時不易外擴之微管道設計，成功地將離子選擇薄膜順利的封裝於感測晶片中，提升晶片的薄膜製程良率。此外，本研究也改良微流體感測晶片之銀/氯化銀電極製程，使用自發性氯化反應製作，此製程不需要任何額外儀器設備的使用，或是複雜的操作，透過銀電極的自發性化學反應即可完成。本實驗利用電化學偵測訊號，量測自發性氯化電極的氧化還原效能，與其量測於硝酸根離子的電位感測效能。數據分析結果顯示，自發性氯化電極的氧化還原能力，其不同氯化時間之氧化還原峰對稱，並且反應電位一致，尤其是氯化 30 秒鐘之銀/氯化銀電極，其氧化還原電流訊號高出市售的銀/氯化銀電極約 6.5 倍。而電位量測結果中也證實，自發性氯化電極與市售電極之感測行為相符，僅電位平移了約 0.16 V 的電位飄移。

另外，本研究利用快速自動封裝成膜技術，將硝酸根離子選擇薄膜封裝於感測晶片中，並透過其晶片微結構的設計，創造出不同感測膜內外之面積比，藉由吸附性薄膜的感測特性，提升對於硝酸根離子的感測靈敏度。實驗結果顯示，樣品溶液與電解液的感測面積比值越高，可有較高的感測靈敏度。其中，以 5：1 之感測面積比晶片的靈敏度最高，其對於硝酸根濃度之感測靈敏度達 -57.0 mV/dec ；相較於面積比為 1：5 之感測晶片，整整提升了約 30% 以上的感測效能。並且，感測晶片於硝酸根濃度範圍 10^{-5} M 到 1 M 內，具有良好的線性關係 ($R^2=0.9920$)。

自動連續偵測上，連續注射樣品進行濃度梯度量測，檢測範圍從 10^{-5} M 至 1 M 硝酸根濃度，並且重複量測三次循環。其結果顯示，本研究之感測晶片具有良好的再現性表現，但由於吸附性感測薄膜的特性，其前次量測樣品濃度較高時，其脫附之較高濃度硝酸根離子會溶於樣品中，導致連續量測時產生濃度滯留現象。

而硝酸根離子選擇薄膜為吸附型薄膜，吸附與脫附硝酸根離子所需要的反應時間不同，因此分別探討。由量測結果得知，1 mM 之硝酸根離子吸附於感測薄膜時，僅需花 3.3 秒鐘就可達到 95% 的反應平衡；而相同濃度之硝酸根離子的脫附反應時間，也只需要花 11.4 秒鐘即可達到 95% 的反應平衡。本研究從注入樣品開始至檢測結束取得數據，僅需不到 30 秒的時間，相較於其他任何精準度高的感測儀器，包括離子層析、試紙呈色等，本研究之感測晶片之感測時間大幅縮短。

最後，本研究量測不同的干擾源，分別量測醋酸根離子、碳酸根離子以及亞硝酸根離子，探討其干擾離子於感測薄膜的影響。由量測結果中可看出，醋酸根的干擾影響程度最低，選擇性係數為-2.68；而碳酸根離子與亞硝酸根離子的影響程度較大，碳酸根離子的選擇性係數為-2.02，亞硝酸根離子的選擇性係數為-1.99。換句話說，這三種干擾離子對於硝酸根感測薄膜來說，皆不會影響超過 10^2 倍的濃度訊號影響。

本研究開發之微流體晶片整合硝酸根離子選擇膜，透過感測面積的改變，證實對於吸附型薄膜確實有感測之影響，可以提升靈敏度，並能成功地檢測蔬菜中的硝酸鹽濃度。蔬菜檢體使用硝酸鹽濃度含量高的小白菜，與硝酸鹽濃度含量低的小黃瓜，並使用不同的清洗方式作處理，其檢測結果顯示，市場販售之有機小白菜的硝酸鹽含量介於 6.12 mM 到 10 mM 之間，且可發現葉菜類蔬菜經過清洗後能降低硝酸鹽含量。小黃瓜檢測出的硝酸鹽含量介於 0.8 mM 到 0.6 mM 之間，而瓜果類蔬菜的硝酸鹽主要存在於蔬菜的內部，因此透過不同的清洗方式，並無法明顯地減少硝酸鹽含量。

5.2 未來展望

目前市面上，最廣泛被一般人使用的硝酸鹽檢測方式是使用硝酸鹽檢測試紙，其檢測方法非常簡單，且價格合理。使用時僅需要將試紙沾取蔬菜汁液，便可藉由試紙的顏色變化判斷其硝酸鹽含量，但是其準確性偏低，需約一分鐘的呈色時

間變化，而且無法重複使用。本研究成功地將硝酸根離子選擇膜整合於微流體感測晶片中，從研究結果顯示，此感測晶片除了能夠有效地提高感測效能，並大幅縮短其檢測時間，僅需不到 10 秒鐘的時間即可完成檢測。而且，感測晶片僅需 2.0 μL 的樣品體積即可測量，使用者可輕易取得樣品，並即時地得知其蔬菜之硝酸鹽含量，並藉此控制每日攝取硝酸鹽的含量。因此，隨著科技進步，人們越來越注重身體的健康，希望未來可將感測晶片量產化。使用者可自行購買感測晶片，使用氯化鐵溶液氯化銀電極，並透過手持式三用電表量測其電位差，並可推算其硝酸鹽含量。

在科技的進步下，目前智慧型手機已是必需品，因此，若能發展一套分析硝酸鹽訊號 APP 軟體，搭配遠紅外線訊號傳遞其感測器的電位變化，並於手機介面顯示出其硝酸鹽含量，並同時於介面顯示其含量是否於正常範圍內，或甚至過高。感測晶片使用注射幫浦連續注入樣品進行檢測，即可隨時隨地作硝酸鹽含量的監控。重點是，本研究之感測晶片檢測硝酸鹽範圍廣泛，對於養殖業、農業、工業、食品業或是醫學等都十分實用。未來研究上，希望能創造出雙重感測或多重感測之晶片，可發展一套更為完整的檢測晶片，如圖 5-1 所示，可同時檢測硝酸鹽與亞硝酸鹽含量，或其他食安檢測之有害物質之含量。

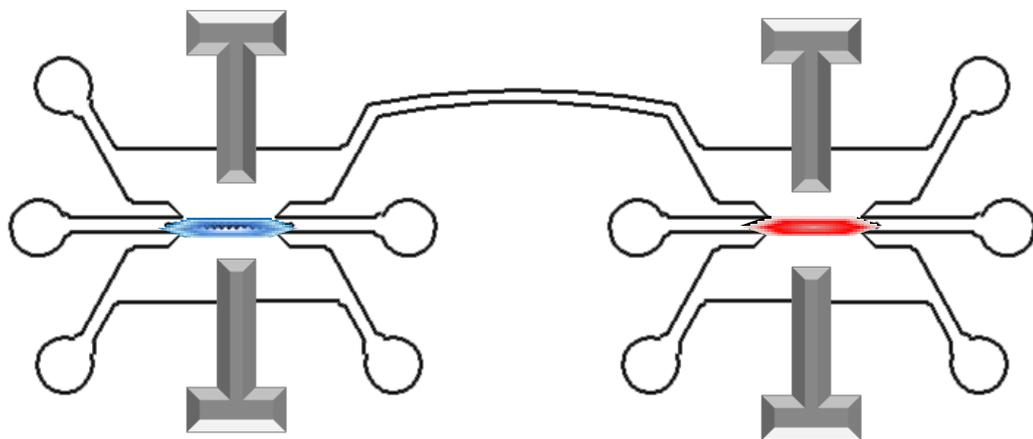


圖 5-1 雙重離子選擇薄膜之感測晶片

參考文獻

- [1] H. Lorenz, M. Despont, N. Fahrni, N. LaBianca, P. Renaud, and P. Vettiger, "SU-8: a low-cost negative resist for MEMS," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 7, pp. 121-124, 1997.
- [2] B. A. Cornell, V. Braach-Maksvytis, L. King, P. Osman, B. Raguse, L. Wieczorek, and R. Pace, "A biosensor that uses ion-channel switches," *Nature*, vol. 387, pp. 580-583, 1997.
- [3] P. D'Orazio, "Biosensors in clinical chemistry," *Clinica Chimica Acta*, vol. 334, pp. 41-69, 2003.
- [4] C. Eggenstein, M. Borchardt, C. Diekmann, B. Gründig, C. Dumschat, K. Cammann, M. Knoll, and F. Spener, "A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium-sensitive transducer," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 14, pp. 33-41, 1999.
- [5] G. Dimeski, T. Badrick, and A. St John, "Ion selective electrodes (ISEs) and interferences-A review," *Clinica Chimica Acta*, vol. 411, pp. 309-317, 2010.
- [6] D. Keeney, B. Byrnes, and J. Genson, "Determination of nitrate in waters with the nitrate-selective ion electrode," *Analyst*, vol. 95, pp. 383-386, 1970.
- [7] "Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants," *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, 1993.
- [8] T. T. Mensinga, G. J. Speijers, and J. Meulenbelt, "Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds," *Toxicological Reviews*, vol. 22, pp. 41-51, 2003.
- [9] I. S. Babiker, M. A. Mohamed, H. Terao, K. Kato, and K. Ohta, "Assessment of groundwater contamination by nitrate leaching from intensive vegetable cultivation using geographical information system," *Environment International*, vol. 29, pp. 1009-1017, 2004.
- [10] J. C. Liu, Y. Q. Chen, and H. Jin, "A review of nitrate pollution in domestic vegetable production," *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 18, pp. 59-63, 2002.
- [11] P. Santamaria, "Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 86, pp. 10-17, 2006.
- [12] R. Walker, "Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: A review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications," *Food Additives and Contaminants*, vol. 7, pp. 717-768, 1990.
- [13] S. D. Gangolli, P. A. Van Den Brandt, V. J. Feron, C. Janzowsky, J. H. Koeman, G. J. Speijers, B. Spiegelhalder, R. Walker, and J. S. Wishnok, "Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds," *European Journal of Pharmacology: Environmental*

- Toxicology and Pharmacology*, vol. 292, pp. 1-38, 1994.
- [14] J. Lundberg, E. Weitzberg, S. Nordvall, R. Kuylenstierna, J. Lundberg, and K. Alving, "Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome," *European Respiratory Journal*, vol. 7, pp. 1501-1504, 1994.
- [15] S. H. Ralston, D. Todd, M. Helfrich, N. Benjamin, and P. S. Grabowski, "Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase," *Endocrinology*, vol. 135, pp. 330-336, 1994.
- [16] B. Spiegelhalder, G. Eisenbrand, and R. Preussmann, "Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds," *Food and Cosmetics Toxicology*, vol. 14, pp. 545-548, 1976.
- [17] A. S. Pannala, A. R. Mani, J. P. Spencer, V. Skinner, K. R. Bruckdorfer, K. P. Moore, and C. A. Rice-Evans, "The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 34, pp. 576-584, 2003.
- [18] D. B. Kim Shapiro, M. T. Gladwin, R. P. Patel, and N. Hogg, "The reaction between nitrite and hemoglobin: the role of nitrite in hemoglobin-mediated hypoxic vasodilation," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 99, pp. 237-246, 2005.
- [19] I. R. Epstein, K. Kustin, and L. J. Warshaw, "A kinetics study of the oxidation of iron (II) by nitric acid," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 102, pp. 3751-3758, 1980.
- [20] D. Jenkins and L. Medsker, "Brucine method for the determination of nitrate in ocean, estuarine, and fresh Waters," *Analytical Chemistry*, vol. 36, pp. 610-612, 1964.
- [21] A. P. H. Association and A. W. W. Association, "Standard methods for the examination of water and wastewater," 1965.
- [22] D. Langmuir and R. L. Jacobson, "Specific-ion electrode determination of nitrate in some fresh waters and sewage effluents," *Environmental Science and Technology*, vol. 4, pp. 834-838, 1970.
- [23] K. M. Miranda, M. G. Espey, and D. A. Wink, "A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite," *Nitric Oxide*, vol. 5, pp. 62-71, 2001.
- [24] E. Morcos and N. P. Wiklund, "Nitrite and nitrate measurement in human urine by capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 22, pp. 2763-2768, 2001.
- [25] C. Merusi, C. Corradini, A. Cavazza, C. Borromei, and P. Salvadeo, "Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary

- electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal," *Food Chemistry*, vol. 120, pp. 615-620, 2010.
- [26] M. Ximenes, S. Rath, and F. Reyes, "Polarographic determination of nitrate in vegetables," *Talanta*, vol. 51, pp. 49-56, 2000.
- [27] S. Prasad and A. A. Chetty, "Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing," *Food Chemistry*, vol. 106, pp. 772-780, 2008.
- [28] W. E. Morf, *The principles of ion-selective electrodes and of membrane transport*. vol. 246: Elsevier, 2012.
- [29] E. Bakker, P. Bühlmann, and E. Pretsch, "Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. general characteristics," *Chemical Reviews*, vol. 97, p. 3083, 1997.
- [30] P. Bühlmann, E. Pretsch, and E. Bakker, "Carrier-based Ion-selective electrodes and bulk optodes. 2. ionophores for potentiometric and optical sensors," *Chemical Reviews*, vol. 98, p. 1593, 1998.
- [31] E. Bakker, P. Bühlmann, and E. Pretsch, "Polymer membrane ion-selective electrodes—What are the limits?," *Electroanalysis*, vol. 11, pp. 915-933, 1999.
- [32] J. Koryta, "Ion-selective electrodes," *Annual Review of Materials Science*, vol. 16, pp. 13-27, 1986.
- [33] E. Bakker and E. Pretsch, "Peer reviewed: The new wave of ion-selective electrodes," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 420 A-426 A, 2002.
- [34] C. M. Chen, G. L. Chang, and C. H. Lin, "Performance evaluation of a capillary electrophoresis electrochemical chip integrated with gold nanoelectrode ensemble working and decoupler electrodes," *Journal of Chromatography A*, vol. 1194, pp. 231-236, Jun 20 2008.
- [35] Y. T. Chuang, S. P. Ju, and C. H. Lin, "Novel palladium nanorod electrode ensemble for electrochemical evaluation of hydrogen adsorption," in *16th International Solid-state Sensors, Actuators and Microsystems Conference*, 2011, pp. 166-169.
- [36] Y. C. Wei, L. M. Fu, and C. H. Lin, "Electrophoresis separation and electrochemical detection on a novel thread-based microfluidic device," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 14, pp. 723-730, 2013.
- [37] J. W. Ross, "Calcium-selective electrode with liquid ion exchanger," *Science*, vol. 156, pp. 1378-1379, 1967.
- [38] J. E. W. Davies, J. D. R. Thomas, and G. J. Moody, "Nitrate ion selective electrodes based on polyvinyl-chloride matrix membranes," *Analyst*, vol. 97, pp. 87-&, 1972.
- [39] C. C. Rundle, "A beginners guide to ion-selective electrode measurements,"

Enligne]. Disponible sur: <http://www.nico2000.net/Book/Guide1.html>. [Consulté le: 14-sept-2013], 2000.

- [40] "Hach > Meters and probes: sension+ meters and probes > Sension+ probes," <http://www.hach.com/sension-meters-and-probes/sension-probes/family?productCategoryId=35547408096>.
- [41] "Coleparmer > pH Meters and Water Quality Products > Electrodes Laboratory," <http://www.coleparmer.com/Search/ISE?navstate=/ /N-1z12inz>.
- [42] "Electrode and sensors," <http://www.nico2000.net/datasheets/electrodes.html>.
- [43] "Home > ion selective," <http://www.vl-pc.com/default/index.cfm/ion-selective>.
- [44] K. A. Erickson and P. Wilding, "Evaluation of a novel point-of-care system, the i-STAT portable clinical analyzer," *Clinical Chemistry*, vol. 39, pp. 283-287, 1993.
- [45] E. Jacobs, E. Vadasdi, L. Sarkozi, and N. Colman, "Analytical evaluation of i-STAT Portable Clinical Analyzer and use by nonlaboratory health-care professionals," *Clinical Chemistry*, vol. 39, pp. 1069-1074, 1993.
- [46] R. Tantra and A. Manz, "Integrated potentiometric detector for use in chip-based flow cells," *Analytical Chemistry*, vol. 72, pp. 2875-2878, 2000.
- [47] D. Qin, Y. Xia, J. A. Rogers, R. J. Jackman, X.-M. Zhao, and G. M. Whitesides, "Microfabrication, microstructures and microsystems," in *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science*, ed: Springer, 1998, pp. 1-20.
- [48] A. Berduque, J. O'Brien, J. Alderman, and D. W. Arrigan, "Microfluidic chip for electrochemically-modulated liquid | liquid extraction of ions," *Electrochemistry Communications*, vol. 10, pp. 20-24, 2008.
- [49] H. Hisamoto, Y. Shimizu, K. Uchiyama, M. Tokeshi, Y. Kikutani, A. Hibara, and T. Kitamori, "Chemifunctional membrane for integrated chemical processes on a microchip," *Analytical Chemistry*, vol. 75, pp. 350-354, 2003.
- [50] T. Y. Chiang, L. M. Fu, C. H. Tsai, and C. H. Lin, "Ion-selective membrane formed in a microfluidic chip utilizing surface tension force for high sensitive ammonia ion sensing," in *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, Okinawa, Japan, 2012, pp. 848-850.
- [51] T. Y. Chiang and C. H. Lin, "Enzyme-doped ion selective membrane (ED-ISM) formed with surface force and microstructures for high performance urea detection," in *26th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, 2013, pp. 1171-1174.
- [52] A. J. Bard, and Larry R. Faulkner., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. New York: Wiley, 1980.
- [53] P. D. Voegel and R. P. Baldwin, "Electrochemical detection in capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 18, pp. 2267-2278, 1997.

- [54] U. Oesch, D. Ammann, and W. Simon, "Ion-selective membrane electrodes for clinical use," *Clinical Chemistry*, vol. 32, pp. 1448-1459, 1986.
- [55] D. R. Crow, *Principles and applications of electrochemistry*: CRC Press, 1994.
- [56] W. Vielstich, *Cyclic voltammetry*: Wiley online library, 2010.
- [57] M. J. Gissera, D. Hueso, J. R. Procopio, and M. T. Sevilla, "Ion-selective carbon paste electrode based on tetraethyl thiuram disulfide for copper (II) and mercury (II)," *Analytica Chimica Acta*, vol. 524, pp. 347-353, 2004.
- [58] G. A. Crespo, S. Macho, and F. X. Rius, "Ion-selective electrodes using carbon nanotubes as ion-to-electron transducers," *Analytical Chemistry*, vol. 80, pp. 1316-1322, 2008.
- [59] J. Wang, B. Tian, and E. Sahlin, "Integrated electrophoresis chips/amperometric detection with sputtered gold working electrodes," *Analytical Chemistry*, vol. 71, pp. 3901-3904, 1999.
- [60] E. M. Richter, J. A. Fracassi da Silva, I. G. R. Gutz, C. L. do Lago, and L. Angnes, "Disposable twin gold electrodes for amperometric detection in capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 25, pp. 2965-2969, 2004.
- [61] e. R.A. Durst , et al., *Ion-selective Electrodes*. Washington: NBS Spec.Pub., 1969.
- [62] N. Lakshminarayanaiah, *Membrane electrodes*: Elsevier, 2012.
- [63] D. Gourley, "Glass electrodes for hydrogen and other cations. Principles and practice," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 10, pp. 990-990, 1967.
- [64] A. H. S. Głab *Ion-selective electrodes / Glass*, 2005.
- [65] C. Fuchs, "Solid-state ion-selective electrodes in clinical chemistry," *Medical and Biological Applications of Electrochemical Devices*, pp. 93-108, 1980.
- [66] E. Bakker, "Selectivity of liquid membrane ion - selective electrodes," *Electroanalysis*, vol. 9, pp. 7-12, 1997.
- [67] B. Muller, K. Buis, R. Stierli, and B. Wehrli, "High spatial resolution measurements in lake sediments with PVC based liquid membrane ion-selective electrodes," *Limnology and Oceanography*, vol. 43, pp. 1728-1733, Nov 1998.
- [68] K. Sollner, "Ion exchange membranes," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 57, pp. 177-203, 1953.
- [69] J. A. Cox and N. Tanaka, "Application of ion-exchange reactions between membranes and resins," *Talanta*, vol. 32, pp. 34-6, Jan 1985.
- [70] W. E. Morf, *The principles of ion-selective electrodes and of membrane transport* vol. 2: Elsevier, 2012.
- [71] M. S. Frant, "Where did ion selective electrodes come from? The story of their development and commercialization," *J. Chem. Educ*, vol. 74, p. 159, 1997.
- [72] Y. Tanaka, *Ion exchange membranes: fundamentals and applications*: Elsevier, 2015.

- [73] A. Yartsev, "Ion-selective electrode membranes," *Deranged Physiology*, vol. Chapter 5.0.2, 2015.
- [74] R. S. K. Erin M. Gross, Donald M. Cannon, Jr., "Analytical electrochemistry: potentiometry," *Enligne*. *Disponibile sur: <http://www.nico2000.net/Book/Guide1.htm>*, 2010.
- [75] A. Craggs, G. Moody, and J. Thomas, "PVC matrix membrane ion-selective electrodes. Construction and laboratory experiments," *Journal of Chemical Education*, vol. 51, p. 541, 1974.
- [76] R. Bloch, A. Shatkay, and H. Saroff, "Fabrication and evaluation of membranes as specific electrodes for calcium ions," *Biophysical Journal*, vol. 7, pp. 865-877, 1967.
- [77] G. Moody and J. Thomas, "Selectivity ratios/coefficients of selective ion sensitive electrodes," *Talanta*, vol. 18, pp. 1251-1252, 1971.
- [78] P. Anker, E. Wieland, D. Ammann, R. E. Dohner, R. Asper, and W. Simon, "Neutral carrier based ion-selective electrode for the determination of total calcium in blood serum," *Analytical Chemistry*, vol. 53, pp. 1970-1974, 1981.
- [79] U. Schaller, E. Bakker, U. E. Spichiger, and E. Pretsch, "Ionic additives for ion-selective electrodes based on electrically charged carriers," *Analytical Chemistry*, vol. 66, pp. 391-398, 1994.
- [80] E. Bakker, "Determination of improved selectivity coefficients of polymer membrane ion-selective electrodes by conditioning with a discriminated ion," *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 143, pp. 83-85, 1996.
- [81] R. G. Zhen, S. J. Smith, and A. J. Millar, "A comparison of nitrate-selective microelectrodes made with different nitrate sensors and the measurement of intracellular nitrate activities in cells of excised barley roots," *Journal of Experimental Botany*, vol. 43, pp. 131-138, 1992.
- [82] A. S. Watts, V. G. Gavalas, A. Cammers, P. S. Andrada, M. Alajarín, and L. G. Bachas, "Nitrate-selective electrode based on a cyclic bis-thiourea ionophore," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 121, pp. 200-207, 2007.
- [83] S. Wakida, M. Yamane, A. Kawahara, S. Takasuka, and K. EQgashi, "Durable poly (vinyl chloride) matrix ion-selective field effect transistors for nitrate ions," *Bunseki Kagaku*, vol. 38, p. 510, 1989.
- [84] R.-G. Zhen, H.-W. Koyro, R. A. Leigh, A. D. Tomos, and A. J. Miller, "Compartmental nitrate concentrations in barley root cells measured with nitrate-selective microelectrodes and by single-cell sap sampling," *Planta*, vol. 185, pp. 356-361, 1991.
- [85] M. Knoll, K. Cammann, C. Dumschat, J. Eshold, and C. Sundermeier, "Micromachined ion-selective electrodes with polymer matrix membranes,"

- Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 21, pp. 71-76, 1994.
- [86] M. Knoll, K. Cammann, C. Dumschat, C. Sundermeier, and J. Eshold, "Potentiometric silicon microsensor for nitrate and ammonium," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 18, pp. 51-55, 1994.
- [87] L. Campanella, C. Colapicchioni, G. Crescentini, M. Sammartino, Y. Su, and M. Tomassetti, "Sensitive membrane ISFETs for nitrate analysis in waters," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 27, pp. 329-335, 1995.
- [88] P. C. Hauser and S. S. Tan, "All-solid-state instrument for fluorescence-based fibre-optic chemical sensors," *Analyst*, vol. 118, pp. 991-995, 1993.
- [89] M. Alajarín, P. Molina, P. Sánchez-Andrada, and M. Concepción Foces-Foces, "Preparation and intramolecular cyclization of bis (carbodiimides). Synthesis and X-ray structure of 1, 3-diazetidino-2, 4-diimine Derivatives," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 64, pp. 1121-1130, 1999.
- [90] J. A. Ortuño, R. Expósito, C. Sánchez-Pedreño, M. I. Albero, and A. Espinosa, "A nitrate-selective electrode based on a tris (2-aminoethyl) amine triamide derivative receptor," *Analytica Chimica Acta*, vol. 525, pp. 231-237, 2004.
- [91] D. Wegmann, H. Weiss, D. Ammann, W. Morf, E. Pretsch, K. Sugahara, and W. Simon, "Anion-selective liquid membrane electrodes based on lipophilic quaternary ammonium compounds," *Microchimica Acta*, vol. 84, pp. 1-16, 1984.
- [92] H. Hara, Y. Kondoh, O. Mitani, and S. Okazaki, "Solid solvent membrane coated wire electrodes and their response to nitrate, p-toluenesulfonate, chloride, calcium, and potassium," *Analytical Chemistry*, vol. 62, pp. 1139-1143, 1990.
- [93] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/72549?lang=en®ion=TW>.
- [94] D. G. Hall, "Ion-selective membrane electrodes: a general limiting treatment of interference effects," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 100, pp. 7230-7236, 1996.
- [95] D. Martorell, E. Martinez-Fabregas, J. Bartroli, S. Alegret, and C. Tran-Minh, "Urea potentiometric biosensor based on all-solid-state technology," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 16, pp. 448-452, 1993.
- [96] A. Senillou, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, and S. Cosnier, "A miniaturized urea sensor based on the integration of both ammonium based urea enzyme field effect transistor and a reference field effect transistor in a single chip," *Talanta*, vol. 50, pp. 219-226, 1999.
- [97] M. J. Syu and Y. S. Chang, "Ionic effect investigation of a potentiometric sensor for urea and surface morphology observation of entrapped urease/polypyrrole matrix," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, pp. 2671-2677, Apr 15 2009.
- [98] I. Isildak, O. Cubuk, M. Altikatoglu, M. Yolcu, V. Erci, and N. Tinkilic, "A novel conductometric creatinine biosensor based on solid-state contact ammonium

- sensitive PVC–NH₂ membrane," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 62, pp. 34-38, 2012.
- [99] L. M. Fu and C. H. Lin, "Numerical analysis and experimental estimation of a low-leakage injection technique for capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 21, pp. 107-115, 2000.
- [100] Y. F. Lin, "The applications of atmospheric plasma systems on microfluidic chip fabrication and surface modification," 93, Mechanical and Electro-mechanical Engineering, National sun yat-sen university, 2005.
- [101] 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.
- [102] A. J. Miller and R. G. Zhen, "Measurement of Intracellular Nitrate Concentrations in Chara Using Nitrate-Selective Microelectrodes," *Planta*, vol. 184, pp. 47-52, 1991.

附錄

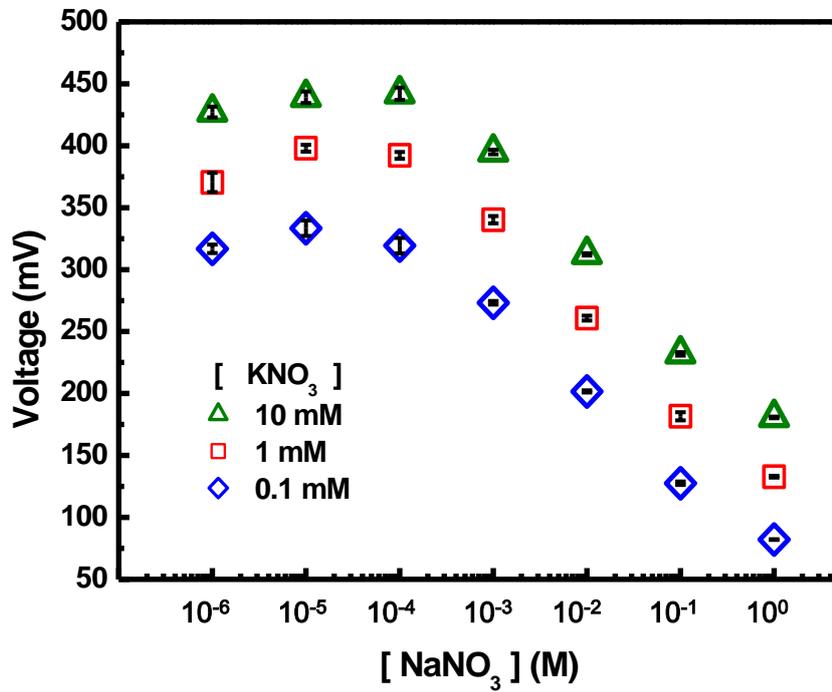


圖 A1 使用硝酸鉀電解液作為內部填充液量測硝酸鈉樣品溶液

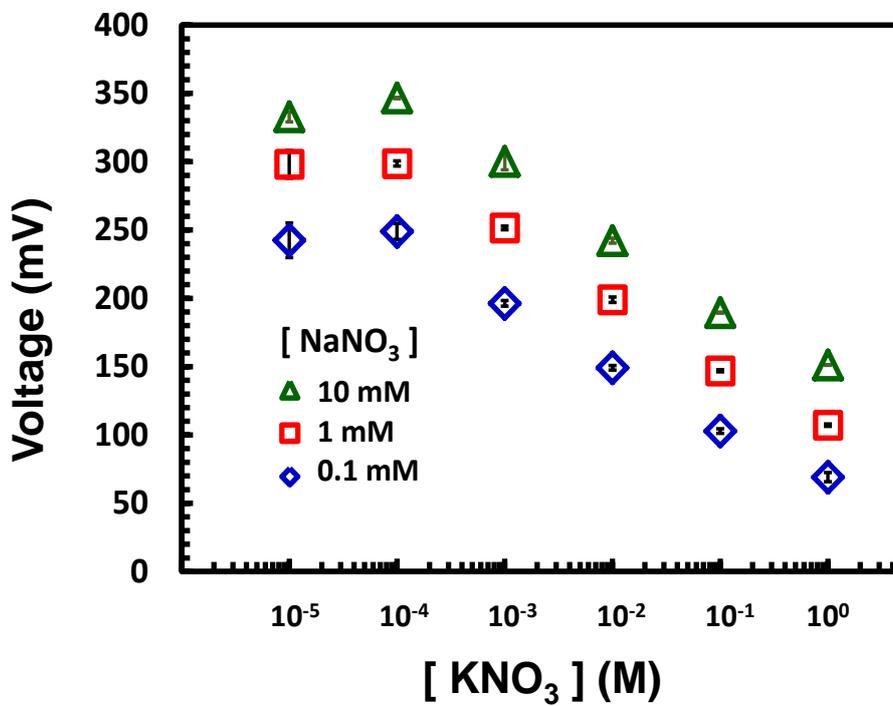


圖 A2 使用硝酸鈉電解液作為內部填充液量測硝酸鉀樣品溶液

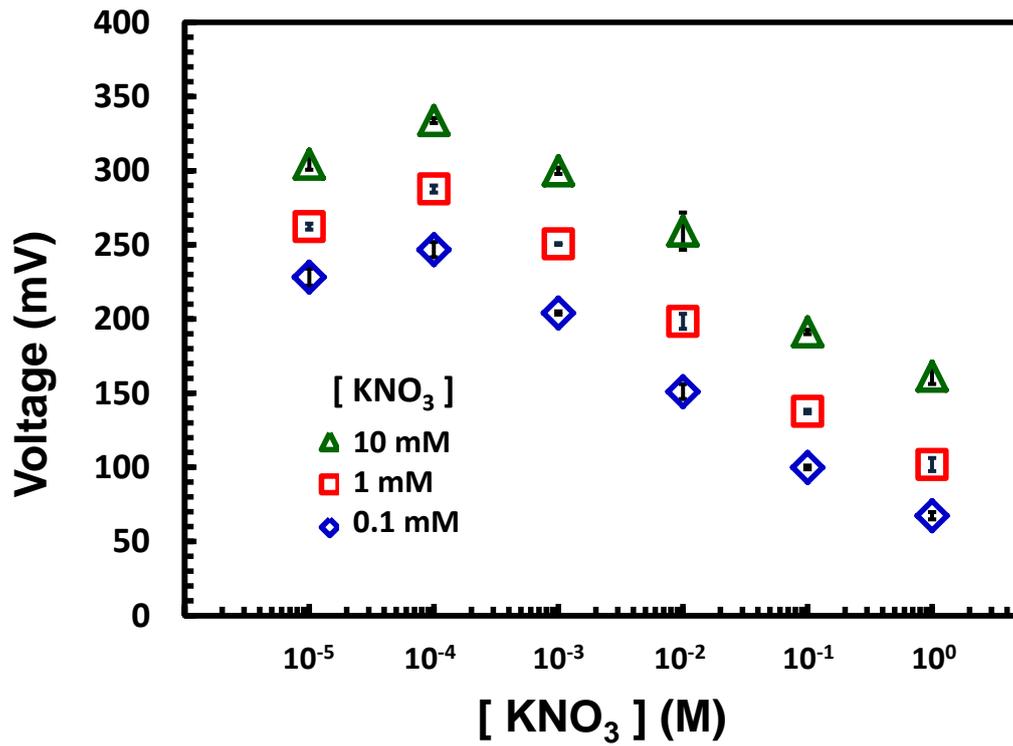


圖 A3 使用硝酸鉀電解液作為內部填充液量測硝酸鉀樣品溶液

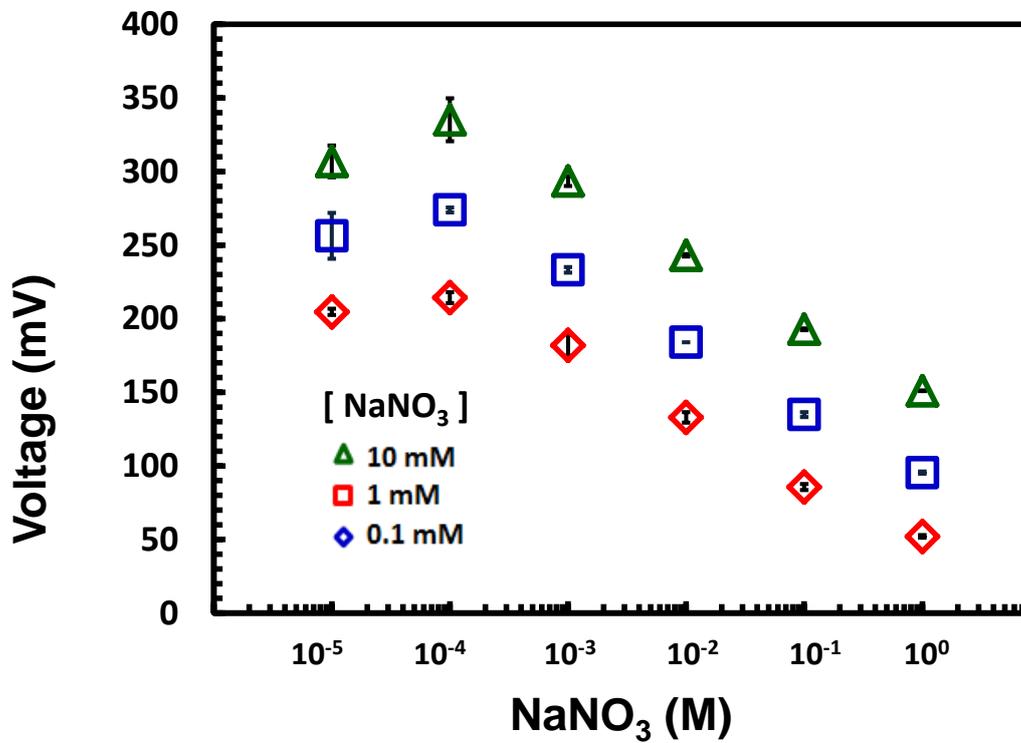


圖 A4 使用硝酸鈉電解液作為內部填充液量測硝酸鈉樣品溶液

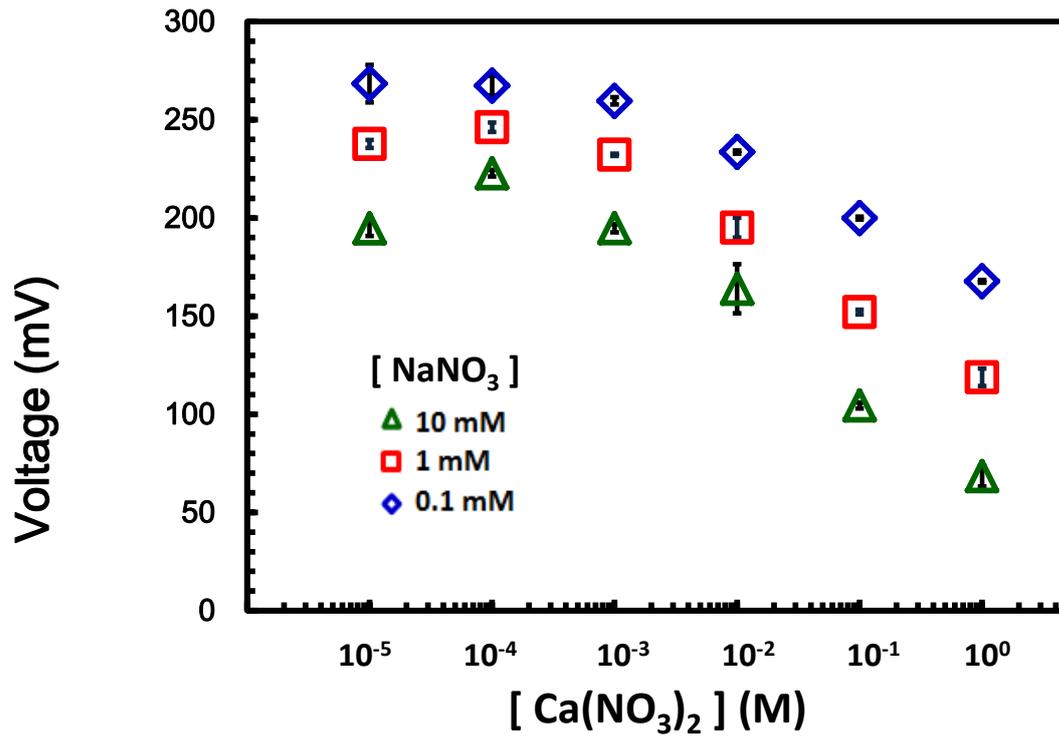


圖 A5 使用硝酸鈉電解液作為內部填充液量測硝酸鈣樣品溶液

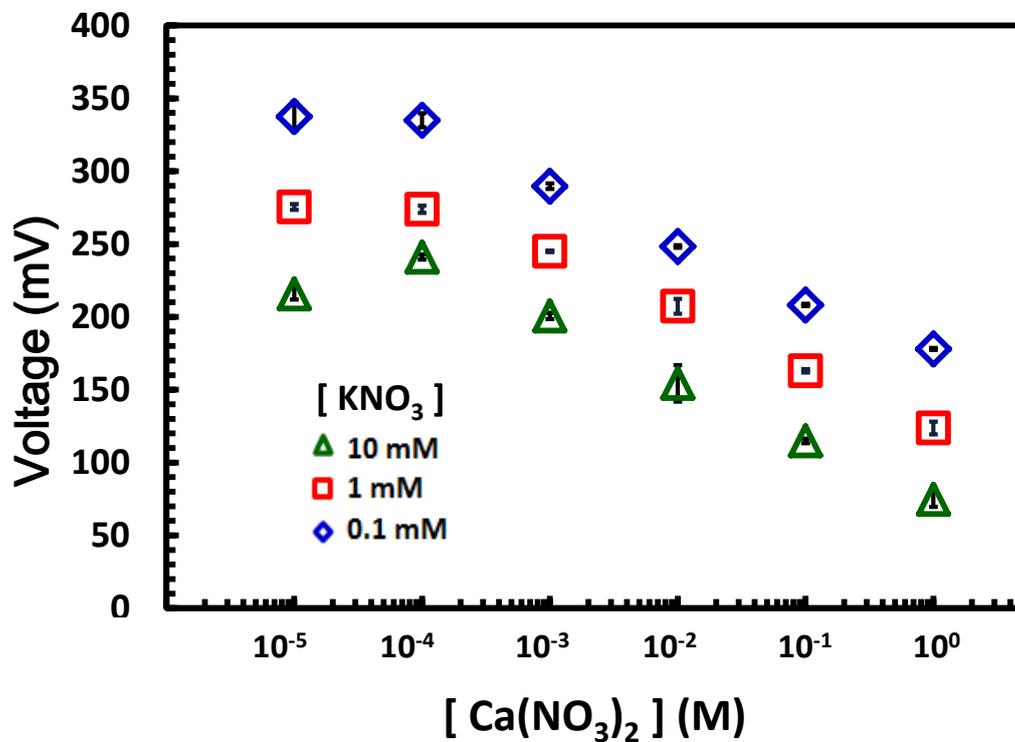


圖 A6 使用硝酸鉀電解液作為內部填充液量測硝酸鈣樣品溶液

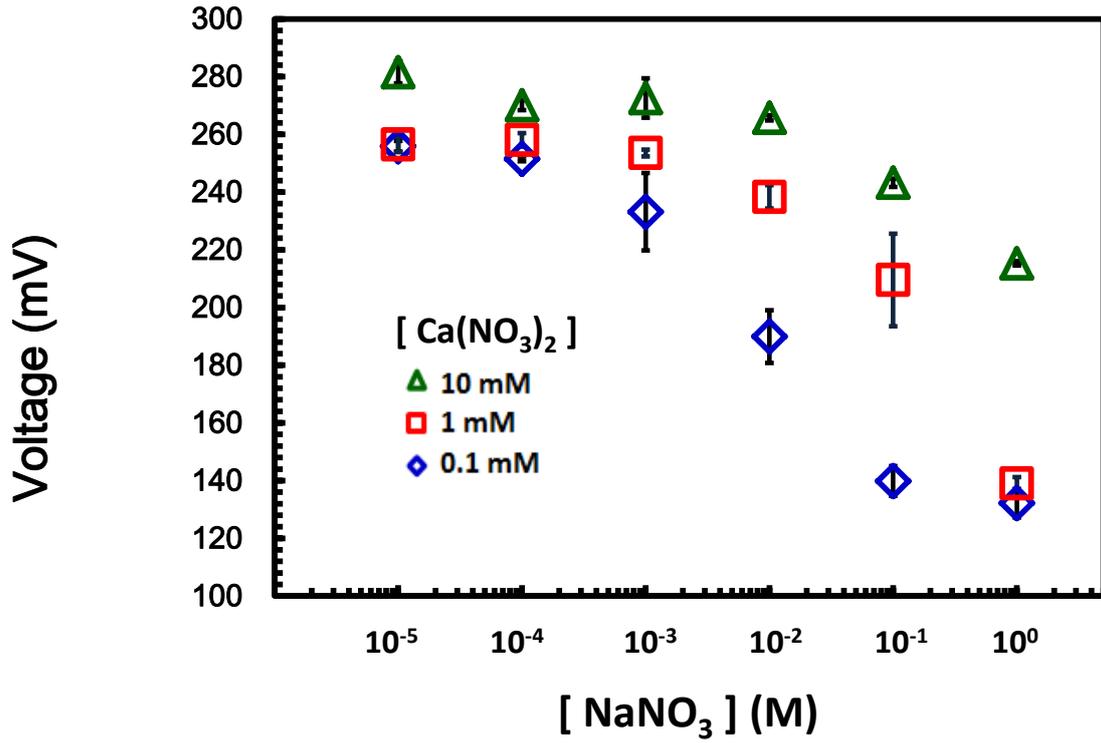


圖 A7 使用硝酸鈣電解液作為內部填充液量測硝酸鈉樣品溶液

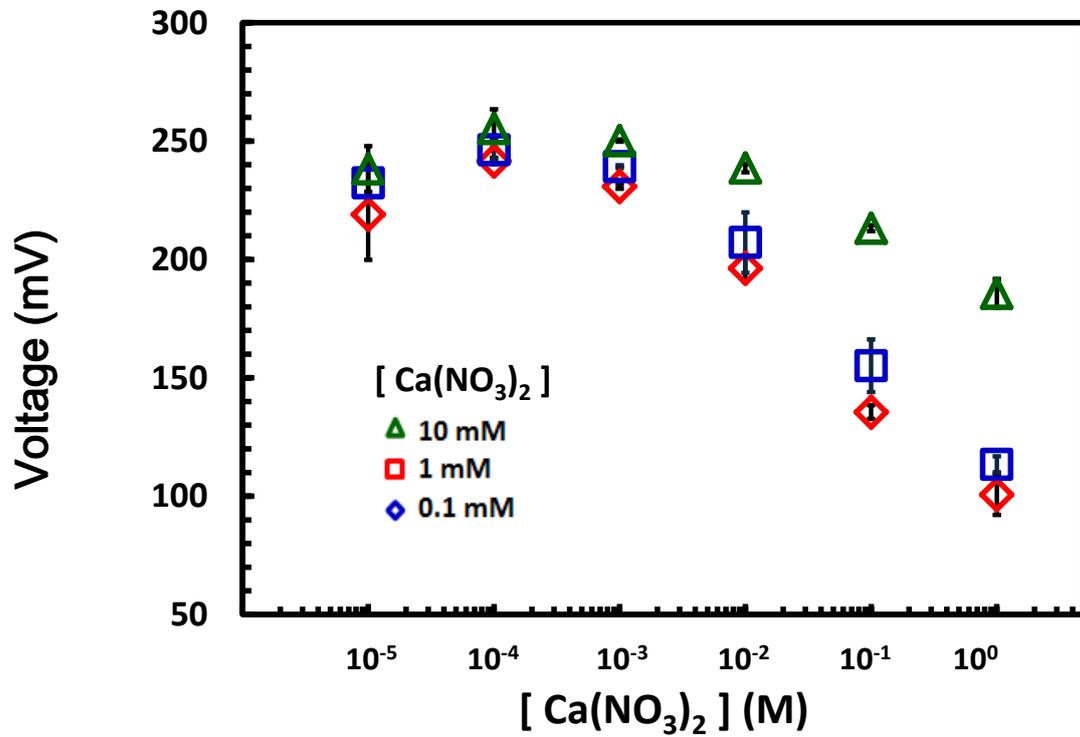


圖 A8 使用硝酸鈣電解液作為內部填充液量測硝酸鈣樣品溶液

自述

姓名：蘇佩宇 (Pei-Yu Su)

出生日期：1990/09/11



學歷：

國立中山大學 機械與機電工程研究所 碩士 2013.09-2016.10

國立嘉義大學 生物機電工程學系 學士 2009.09-2013.06

發表著作：

國內研討會：

1. Pei-Yu Su, Che-Hsin Lin, “Ion-selective membrane forming technology applied in the nitrate detection on microfluidic chip, ” *The 40th National Conference on Theoretical and Applied Mechanics, Hsinchu, Taiwan, ROC, Nov 25-26, 2016*
2. Ting-Yi Chiang, Pei-Yu Su, Che-Hsin Lin, “Enzyme-doped ion selective membrane (ED-ISM) formed with surface force and microstructures for high performance urea detection,” *Proceedings of the 30th National Conference on Mechanical Engineering of CSME, Ilan, Taiwan, ROC, Dec 6-7, 2013*

獲獎經歷：

1. 參加高雄市第八屆國際儀器展(2015KIIS) 研究論文壁報比賽獲得**優等**。