



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

微流體晶片整合離子選擇電極於電化學式
血清中尿素檢測

Microfluidic Chip Integrated with Ion Selective Electrode for
Electrochemical Detection of Urea in Serum

研究生：江庭毅

Ting-Yi Chiang

指導教授：林哲信 教授

Dr. Che-Hsin Lin

中華民國 102 年 7 月

July 2013

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

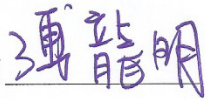
研究生江庭毅（學號：M003020024）所提論文

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
Microfluidic chip Integrated with Ion Selective Electrode for Electrochemical
Detection of Urea in Serum

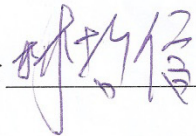
於中華民國 102 年 7 月 31 日經本委員會審查並舉行口試，符合碩士學位論文標準。

學位考試委員簽章：

召集人 傅龍明



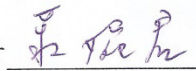
委員 林哲信



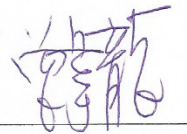
委員 李佳言



委員 莊婉君

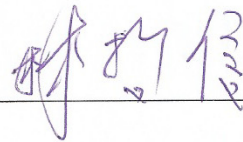


委員 曾韋龍



委員

指導教授(林哲信)



(簽名)

致謝

兩年的碩士生涯說長不長說短不短，如今就要在此畫上句點，回憶起在碩班期間的點點滴滴，既難忘又煎熬。能夠完成此研究論文，首先誠摯的感謝指導教授 林哲信博士，老師悉心的教導使我得以一窺電化學領域的深奧，不時的討論並指點我正確的方向，使我在這些年中獲益匪淺，老師對學問的嚴謹更是我輩學習的典範。老師嚴謹的訓練、獨立自主去尋找問題的答案，讓我畢業後更有信心面對未來的挑戰。本論文的完成另外亦得感謝屏東科技大學傅龍明老師、李佳言老師百忙抽空前來擔任學生的口試委員、閱讀以及修改，更要感謝中山大學曾韋龍、莊婉君老師的不吝指導，使本論文能夠更加完善。

兩年裡的日子，實驗室裡共同的生活點滴，學術上的討論、言不及義的閒扯、讓人又愛又怕的 Meeting、趕實驗進度的革命情感....。感謝眾位學長姐、同學、學弟妹的共同砥礪，你/妳們的陪伴讓兩年的研究生生活變得絢麗多彩。感謝學長姐書銘、峻維、和政、政鴻、信德、浚屹學長、歆宇、翊旂、鈺珊學姐們不厭其煩的指出我研究中的缺失，且總能在我迷惘時為我解惑；也感謝辰勳、冠維、俊傑同學的陪伴與幫忙，讓我在沉悶的實驗室生活中更加有趣，也恭喜我們順利走過這兩年。實驗室的學弟妹俊邑、必軒學弟，感謝在實驗室的午餐時刻，總是能及時幫學長外送便當，以及強者小安當然也不能忘記，感謝在我無助的時候伸出援手，你/妳們的幫忙我銘感在心，我只能說認識你們真好!!

另外很多我所愛的朋友們，感謝你們在我面臨挫折與沮喪時，能夠耐心當我的垃圾桶，適時地安慰我，謝謝你們。最後，要感謝我所親愛的家人們，爸爸、媽媽因為有你們的支持與關懷，能讓我在求學生涯中，衣食無缺能盡力追求夢想，無後顧之憂，還有哥哥的關心與陪伴。最後，我也將此論文獻給最敬愛的父母親、最愛的朋友以及所有關心我的人。

中文摘要

本研究發展一種 PVC 離子選擇薄膜製作技術，其使用表面張力將薄膜成型於微流體晶片中，做為水溶液銨離子感測之用。而摻雜了銨離子載體的 PVC，藉由表面張力的作用，將成型固化後的薄膜嵌在為結構間。在晶片微結構間成型的薄膜，隨著厚度越薄與較大的感測面積，可以明顯的提高感測器的效能。此外，本研究進一步將生物分子尿素酶，摻雜在離子選擇薄膜上，通過薄膜的尿素分子會被酵素所催化，轉換成銨離子擴散過薄膜，經由電化學檢測進行分析。

本研究為了提高離子選擇電極的感測效能，實驗進行使用較薄的感測薄膜，以及增加薄膜感測面積，從電子顯微鏡拍攝的 SEM 橫截面圖可以發現，離子選擇薄膜成功的固定到管道結構中，薄膜表面呈現多孔隙結構又利於離子擴散。此外，利用循環伏安法來檢測不同濃度下的氯化銨樣本，結果可得到明顯的氧化還原訊號，證實了將離子選擇電極整合到微流體晶片檢測銨離子的可行性，此晶片可從濃度範圍 10^{-4} 到 10^3 ppm 間，取的良好線性關係。

本研究製作出的銨離子感測器，檢測銨離子的濃度的極限為 0.1 ppb，相較於商業的離子選擇電極的檢測極限 0.1 ppm，其濃度檢測範圍下限顯著降低。且於使用感測晶片量測時，對於不同濃度下氯化銨的反應時間，其達到電流值的 95% 只需要 4 秒鐘，而反應時間也比市售電極更靈敏。

本研究進一步製備摻雜了尿素酶的離子選擇薄膜，相較於傳統的離子選擇薄膜，其薄膜的厚度更薄 ($<10 \mu\text{m}$) 而且具有更大的感測面積，基於此原因，特定離子通過薄膜的速率更加快速，並且能顯著地提升感測效能。根據實驗結果顯示，本研究開發的微晶片感測器，結合酵素酶摻雜的離子選擇薄膜，來量測尿素樣本溶液，濃度範圍從 10^{-1} 到 10^3 ppm ($R^2 \sim 0.9102$) 間，擁有良好的靈敏度。此外尿素感測器的檢測極限最低可以達到 0.1 ppm ($S/N=3$)，經本研究實驗之結果證明，在檢測濃度 1 ppm 的尿素，只需要 8 秒鐘，即可達到反應電流值的 95%，其檢測速率

高過於市售的離子選擇電極。綜觀上述，本研究開發的酶摻雜離子選擇薄膜的感測器，提供一個低成本且高性能的方法，應用於及時生物催化反應與生物樣本的檢測上。

關鍵字:離子選擇電極、微流體晶片、銨離子、離子載體、表面張力、尿素感測器、電化學偵測



Abstract

This research presents a novel technique for self-forming successive polymeric ion-selective membrane in a microfluidic chip utilizing surface tension force for detecting ammonium ions. Surface tension force on microstructures is used to trap trace amount of polymer liquid doped with ammonium ionophors to form a thin ion-selective membrane. Due to the thinner thickness and higher surface-area of the formed membrane, the sensing performance can be greatly enhanced. Since bio-reactive enzyme of urease is immobilized on the ISM, passing urea molecules are converted into ammonium ion then diffuse through the ISM for further electrochemical detection.

In order to improve the sensing performance of ISE, a thinner membrane with larger diffusion area is essential. The SEM image shows the cross-sectional views of the ion-channels where the ion selective membranes were formed. Result shows that the ion-selective membrane was successfully formed inside the ion-channel. Utilizing the cyclic voltammetry for detecting different concentrations of $\text{NH}_4\text{Cl}(\text{aq})$. Significant redox signals confirmed that the feasibility of the microchip integrated with ISE. A good linear current response was obtained for detecting ammonia ion in the concentration range of 10^{-4} to 10^3 ppm.

The sensor was measured with a detection limit of 0.1 ppb which is much lower than conventional commercial ISE products of around 0.1 ppm. The time response for the developed chip for detecting $\text{NH}_4\text{Cl}(\text{aq})$ of various concentrations reached 95% of the current response in seconds which is also faster than commercial ISE.

The produced ED-ISM has a thinner thickness ($< 10 \mu\text{m}$) and higher surface-area than typical ISM for such that the sensing performance can be greatly enhanced due to the faster ion diffusion through the membrane. Experimental results show that the

developed microchip device with the ED-ISM has good response in the concentration range from 10^{-1} to 10^3 ppm ($R^2 \sim 0.9102$). The limit of detection is measured to be as low as 0.1 ppm (S/N=3). Result also indicates that the response reached 95% in 8 s for detecting 1 ppm of urea using the developed microchip device, which is much faster than that obtained using typical commercial ion selective electrode. The developed microchip with ED-ISM provides a low-cost yet high performance way for on-site reaction and detection of bio-samples.

Keywords: Ion selective electrode, Microfluidic chip, Ammonium ion, Ionophores, Surface tension force, Urea sensor, Urease, Electrochemical detection



目錄

致謝	i
中文摘要	ii
Abstract.....	iv
目錄	vi
圖目錄	ix
表目錄	xii
符號表	xiii
簡寫表	xv
第一章 緒論	1
1.1 研究背景	1
1.2 離子感測器	2
1.2.1 離子選擇電極	2
1.2.2 離子選擇電極發展	5
1.3 電化學	6
1.3.1 電化學電極系統	7
1.4 微流體離子感測器	8
1.4.1 電化學式離子感測器	11
1.5 生物感測器	14
1.5.1 尿素生理機制	15
1.6 動機與目的	18
1.7 論文架構	20
第二章 選擇性離子感測器原理	22
2.1 銨離子選擇電極特性與應用	22

2.2	離子感測器原理	24
2.2.1	能斯特方程式	24
2.2.2	離子干擾	26
2.3	酵素薄膜固定方式	28
第三章 材料與方法		31
3.1	微流體晶片製作	31
3.2	離子選擇電極晶片設計與製作	32
3.2.1	平面電極晶片製作	32
3.2.2	微流體管道製作流程	33
3.2.3	晶片製作	35
3.3	實驗藥品	37
3.3.1	實驗溶液配置	37
3.3.2	銨離子薄膜製備	38
3.3.3	酵素感測膜製備	38
3.4	實驗架構流程	39
第四章 實驗結果與討論		42
4.1	離子選擇電極微流體晶片	42
4.1.1	離子選擇電極效能探討	42
4.1.2	管道內離子選擇膜成型	44
4.1.3	離子選擇膜電化學檢測	45
4.1.4	離子選擇電極檢測極限	46
4.1.5	離子干擾特性評估	48
4.1.6	離子選擇電極反應時間量測	49
4.1.7	離子選擇膜厚評估	50
4.1.8	不同厚度薄膜反應時間	51

4.2 生物樣本之偵測評估	52
4.2.1 尿素表面形貌探討	53
4.2.2 酵素薄膜即時催化反應評估	55
4.2.3 電化學於尿素檢測	56
4.2.4 尿素酶摻雜電極檢測極限	57
4.2.5 血清中尿素偵測	58
4.2.6 肌酐酸酶表面形貌評估	59
4.2.7 偵測極限評估	60
第五章 結論與未來展望	61
5.1 結論	61
5.2 未來展望	64
參考文獻	65
自述	71

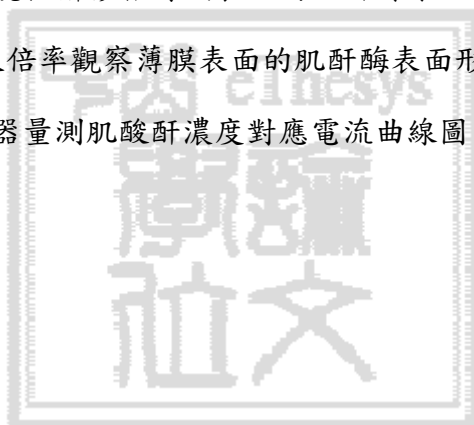


圖目錄

圖 1-1 離子選擇電極組成元件示意圖，其中離子選擇電極是由參考電極與一層離子選擇薄膜所組成。[9]	3
圖 1-2 玻璃薄膜電極之排列示意圖，其玻璃薄膜被用來量測樣品的 pH 值。.....	3
圖 1-3 固態鹵離子電極成分及交互作用示意圖	4
圖 1-4 液態膜電極組成成分示意圖	5
圖 1-5 電化學之三電極系統架設圖，分別是工作、輔助以及參考電極。.....	8
圖 1-6 使用離子感測器量測 BaCl ₂ 溶液，(A)離子感測器的微管道與出入口端設計示意圖，其量測系統架設繪至於圖上;(B)微流體晶片的流道設計圖，其晶片尺寸長寬為 12 mm × 6 mm。[44]	11
圖 1-7 使用水相及有機相的雙液相流體，來分離目標離子示意圖，(A)左邊為晶片管道與電極設計，右邊則為管道的橫截面，(B) Y 型管道的主流道與入口管道，其中可以發現電極分布在流道兩側。[46]	12
圖 1-8 使用異相層流的方式，於 X 型管道中合成化學性薄膜，(A)為使用異相層流的晶片示意圖，使用有機相與水相溶液在 X 型管道中，來合成薄膜;(B)使用電子顯微鏡拍攝管道內橫截面圖，可以發現薄膜成功地合成再管道中間，其中管道的長寬大概為 115 μm × 240 μm。[47].....	13
圖 1-9 尿素循環示意圖，身體多餘的氨基酸代謝成二氧化碳與水，再經由肝臟尿素循環產生尿素[50]。	16
圖 2-1 為不同的銨離子載體的化學分子結構圖，(A)由無活菌素(Nonactin)自然生成,即為銨離子載體，(B)TD19C6 為人工合成之銨離子載體，提高薄膜對干擾離子的選擇性[52]。	23
圖 2-2 為各種固定酵素方式的示意圖，將酵素酶固定在薄膜表面，方法分別是吸附、包埋、交聯與共價鍵結。[63]	28

圖 3-1 使用真空幫浦產生表面張力與剪切流，於結構中成型離子薄膜示意圖。	32
圖 3-2 玻璃晶片製作流程圖。[68]	34
圖 3-3 微流體晶片製作流程圖，(A)灌注 PDMS 進行翻模；(B)在玻璃基板濺鍍金屬電極；(C)將銀電極進行氯化處理，製作 Ag / AgCl 電極；(D)將金屬電極與 PDMS 使用電漿系統進行表面改質；(E)將改質後的電極與 PDMS 進行接合；(F)將配置好的離子膜，於管道內成膜。	36
圖 3-4 離子選擇感測器完成示意圖，(A)經過晶片製程組合成的微流體晶片；(B)使用電子顯微鏡觀察管道中成型的離子薄膜。	37
圖 3-5 電化學實驗架設示意圖	40
圖 3-6 酵素酶摻雜於離子選擇薄膜，進行生物催化反應與離子選擇示意圖	41
圖 4-1 測試離子電極再添加離子選擇薄膜後，評估其電極的感測效能。(A)使用循環伏安法，在沒有黏貼離子選擇薄膜狀況下，量測不同銨離子濃度的 CV 曲線圖。(B)使用循環伏安法，在黏貼離子選擇薄膜狀況下，量測不同銨離子濃度的 CV 曲線圖。	44
圖 4-2 使用真空幫浦將薄膜固定於管道結構中的 SEM 圖，(A)使用電子顯微鏡拍攝微結構橫截面示意圖(倍率 140X)，(B)使用大倍率電子顯微鏡(3000X)，觀察微結構間的 PVC 薄膜。	45
圖 4-3 製作離子選擇電極感測器，不同的銨離子濃度量測圖。	46
圖 4-4 使用離子選擇電極感測器，於不同銨離子濃度樣本溶液量測圖。	47
圖 4-5 使用銨離子選擇電極，將等比例 9:1 鈉與鉀干擾離子，添加在氯化銨樣本溶液中，進行離子干擾測試圖。	49
圖 4-6 使用銨離子選擇電極感測器，量測不同濃度的氯化銨樣本溶液，比較電流訊號的反應時間圖。	50
圖 4-7 在添加不同體積的溶劑下，其離子選擇薄膜厚度的變化量測圖。	51
圖 4-8 在添加不同溶劑下，製作的薄膜厚度相對於電流訊號反應量測圖。	52

圖 4-9 為使用真空幫浦於出口端吸取，藉由表面張力和微結構，在微流體晶片中固定有摻雜酵素酶的離子選擇薄膜示意圖。	53
圖 4-10 使用電子顯微鏡來拍攝摻雜酵素薄膜的 SEM 圖，(A)使用電子顯微鏡拍攝離子選擇薄膜的表面形貌，(B)觀察暴露在薄膜表面的尿素酶表面形貌。	54
圖 4-11 評估酵素摻雜薄膜，其催化生物樣本的反應時間圖。	55
圖 4-12 量測在不同濃度的尿素樣本的氧化還原訊號曲線圖。	56
圖 4-13 使用酵素摻雜離子選擇薄膜感測器，來量測尿素生物樣本溶液，在不同的濃度下的電流訊號。	57
圖 4-14 使用酵素感測器量測人體血清尿素濃度曲線圖。	58
圖 4-15 使用電子顯微鏡拍攝摻雜薄膜表面的肌酐酵素 SEM 圖，(A)酵素摻雜薄膜的表面形貌，(B)使用大倍率觀察薄膜表面的肌酐酶表面形貌。	59
圖 4-16 使用酵素感測器量測肌酸酐濃度對應電流曲線圖。	60



表目錄

表 1-1 一般離子感測器的流體推進機制比較[31]..... 9

表 2-1 為各種固定酵素酶的方式，比較不同固定方的優點與缺點[63]。..... 30



符號表

A	電極面積(cm^2)
\hat{a}	活度 (活度=濃度*活度係數)
\hat{a}_A	待測離子的活性
$\hat{a}_B \sim \hat{a}_D$	B 到 D 干擾離子的活性
Ba^{2+}	鋇離子
CO_3^{2-}	碳酸鹽
D	分析物擴散係數(cm^2/s)
E	電池電動勢
E^0	標準電動勢
F	法拉第常數
K	選擇性常數
$K_{A,B}$	電極對受測離子 A 與干擾離子 B 選擇性常數
M	莫爾濃度
ml	毫升
mg/dl	1 分升的毫克數
n	分子與電極交換的電子數
n_A	A 離子價數
$n_B \sim n_D$	B 到 D 干擾離子價數
nm	奈米
NH_4Cl	氯化銨
NaBr	溴化鈉
NH_4^+	銨離子
pH	酸鹼值

ppm	百萬分率
R	氣體常數(8.314J/mol-K)
T	絕對溫度
W	功率
μm	微米
Δc	分析物的濃度差
Δx	電極表面距離
ΔG^0	標準自由能變化量



簡寫表

BUN	尿素氮(Blood urea nitrogen)
BOE	氧化矽蝕刻液(Buffer oxide etcher)
Bio-MEMS	生醫微機電系統(Biological micro electro mechanical system)
CV	循環伏安法(Cyclic voltammetry)
EOF	電滲透流(Electro osmotic flow)
EMF	電動勢(Electromotive force)
HMDS	六甲基二硅氮烷(Hexamethyldisilazane)
ISE	離子選擇電極(Ion selective electrode)
LOC	實驗室晶片(Lab on chip)
MEMS	微機電系統(Micro electro mechanical system)
Micro-TAS	微全分析系統(Micro-total analysis system)
PDMS	聚二甲基矽氧烷
PVC	聚氯乙烯(Polyvinylchloride)
S/N	訊雜比(Signal-to-noise)
THF	四氫呋喃(Tetrahydrofuran)

第一章 緒論

1.1 研究背景

過去二十年來，許多研究機構和工業界發展微機電系統與元件，其中微機電系統(Micro electro mechanical system, MEMS)備受各界關注[1]，其技術與應用涵蓋了工程、科學和醫學領域，結合機械技術和新興的生物科技，建立在微控制器或感測系統中，為近年來最具發展潛力及前瞻性的研究領域。利用微機電技術發展為感測器，常見的有生物感測器[2]、化學感測器[3]與光感測器[4]。而生醫感測器和生物感測器是未來市場最有潛力的產品，生醫感測器主要用於臨床診斷分析，由於體積小只需要很少檢體即可產生報告，並且可以大量生產而降低成本。

近幾年來生醫微機電(Bio-MEMS)一詞常見於工業界及學術界，應用於生醫檢測裝置，包括生醫微流體晶片、生醫感測器，這些感測器通常含有生物分子，如抗體或酵素，與分析液互相作用。如某種形式的酵素、抗體及其他形式的蛋白質相互作用，當這些吸附在感測器上的生分子與分析液作用時，能改變感測器的輸出訊號。離子選擇電極為六十年代以來重要的發展之一，搭配電化學的分析方法來進行檢測，而離子選擇電極常當作感測器使用，應用在環境污染防治、养殖业水質監測以及生醫檢測分析上，離子選擇電極的特性之一即對特定離子有選擇性，如銨離子電極能檢測含有銨離子的分析物質，而且不需要搭配大型分析裝置。隨著科技的演進，對於身體的健康及醫療的檢測上越發的重要，因此將離子選擇電極添加上適當的生物酵素分子，針對人體內的尿素或是葡萄糖作偵測，發展出酵素感測電極，如尿素分子遇到尿素酶酵素會被水解成 CO_3^{2-} 及 NH_4^+ ，再藉由我們的離子選擇電極作定量分析，即可知道尿素含量進而得知人體的健康，可以應用於臨床診斷上。因此本研究希望藉由微機電技術製作微型的銨離子感測器，整合成一個微型的晶片，且此檢測裝置成本低廉、操作簡單、樣品需求量少，量測的解析度也能提高，不管是作為工業檢測或是醫療檢測系統，未來將為發展的趨勢。

1.2 離子感測器

1.2.1 離子選擇電極

離子選擇電極(ISE, ion selective electrode)為發展較早的化學感測器[5-8]，其廣泛地應用在臨床及生物醫學的選擇性分析上。溶解在溶液當中的特定離子，通過離子選擇薄膜，與薄膜內的離子發生離子交換，造成薄膜兩端電位的改變，而溶液中的離子濃度，決定兩個電極間電位差的大小。離子選擇電極的基本架構如圖 1-1 所示，電極內部的參考電極為 Ag/AgCl，其中離子選擇膜固定於 PVC 管的頂端，浸泡於緩衝溶液中，以保持薄膜內與參考電極電位穩定。[9]

離子選擇電極為電化學半電池，須經由外加參考電極組成完整的電化學電池，才能夠進行量測。將薄膜電極與外部的參考電極一同浸入電解液中，引起薄膜的電位發生變化，造成兩根參考電極電位的改變。而目前許多離子選擇薄膜材料紛紛被研發成功，若離子選擇電極以離子選擇薄膜的材料來分類，可以分為玻璃膜電極[10]、固態膜電極[11]與液態膜電極[12]三種。

1. 玻璃薄膜電極 (Glass membrane electrode)

如圖 1-2 為使用特定組成的玻璃薄膜，做為測定 pH 用的代表性電極，一般來說玻璃電極使用前需要浸漬，乃為了使玻璃和溶液中特定離子進行交換，並在玻璃薄膜表面產生離子交換層。此電極由一個試管形狀的玻璃管所製成，其底端之玻璃薄膜具有陽離子交換的功能，對於氫離子更具有滲透性。玻璃薄膜將兩種不同 pH 的溶液隔開，在薄膜兩邊產生的電位差與溶液的 pH 值有關，因此固定玻璃薄膜一邊溶液的 pH(如 pH7)，則可由電位差量測薄膜另一側的 pH。此外製作的球狀玻璃電極，其球內含有一固定電位之電極及固定 pH 值之溶液，例如球內放 0.1M 的鹽酸溶液及銀-氯化銀(Ag-AgCl)電極(或甘汞電極)，管口必須完全封閉。使用時將此電極浸入待測溶液中，另配甘汞電極，就能測定未知溶液的 pH 值。通常先用 pH 值的緩衝溶液來校正。優點是不受溶液中氧化物質及各種雜質的影響，通常用

於 pH 為 1~10 的範圍，但不適用於濃鹼性溶液，並在玻璃電極使用之前，需要在純水中浸泡使其表面充分溶脹。

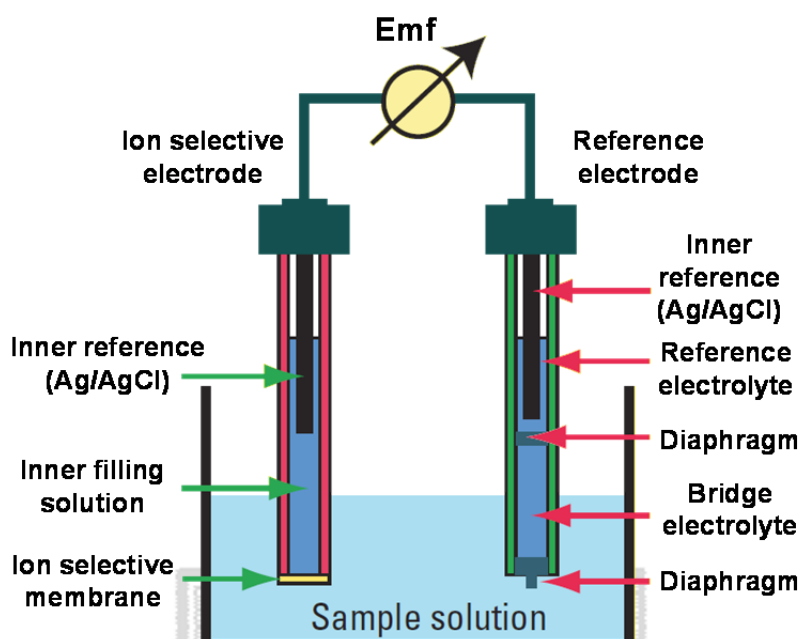


圖 1-1 離子選擇電極組成元件示意圖，其中離子選擇電極是由參考電極與一層離子選擇薄膜所組成[9]。

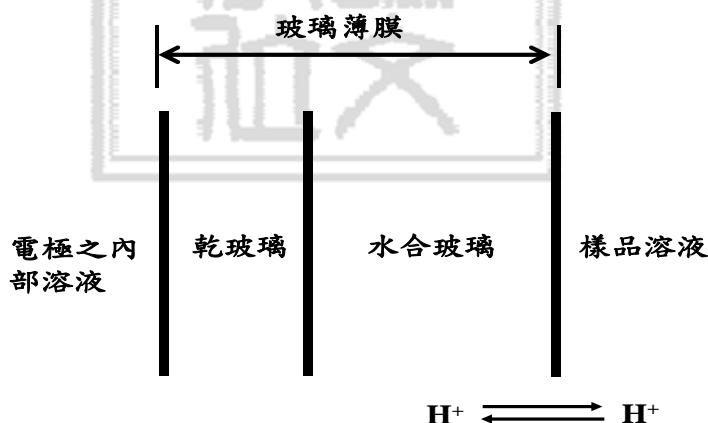


圖 1-2 玻璃薄膜電極之排列示意圖，其玻璃薄膜被用來量測樣品的 pH 值。

2. 固態薄膜電極 (Solid-state membrane electrode)

此節提到的固態電極，其薄膜包含單一晶體與固態離子交換，例如鹵化物離子敏感電極，其電極薄膜為固態銀鹽所組成，其電極之電位為

$$E = E^0 + \frac{2.3RT}{F} \log \hat{a}_{\text{Ag}^+} \quad (1)$$

其中銀離子在薄膜表面的活性，為溶液內鹵化物的活性函數，所以銀離子的活性可由鹵化銀之選擇性常數來表示

$$\hat{a}_{\text{Ag}^+} = \frac{K_{\text{AgX}}}{\hat{a}_{\text{X}^-}} \quad (2)$$

因此

$$E = E^0 + \frac{2.3RT}{F} (\log K_{\text{AgX}} - \log \hat{a}_{\text{X}^-})$$

$$E = K - \frac{2.3RT}{F} \log \hat{a}_{\text{X}^-} \quad (3)$$

Ag^+ : 銀離子

X^- : 鹵化離子

AgX : 鹵化銀

E : 電池電動勢。

E^0 : 標準電位。

R : 氣體常數(8.314J/mol-K)。

T : 絕對溫度(室溫下為 298°K)。

F : 法拉第常數

\hat{a} : 活度

K : 選擇性常數

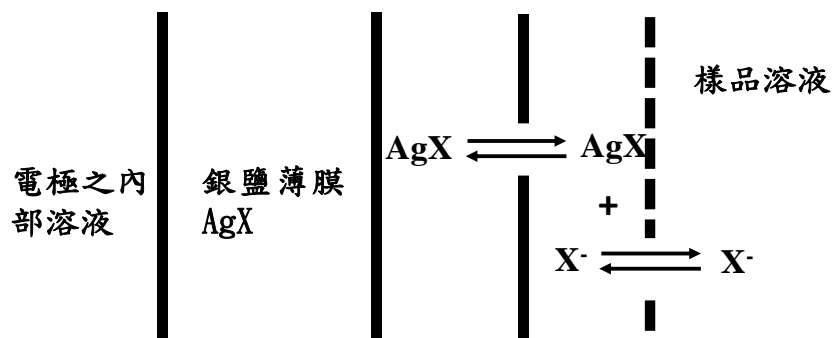


圖 1-3 固態鹵離子電極成分及離子傳遞示意圖

3. 液膜電極 (Liquid membrane electrode)

如圖 1-4 所示為液態薄膜電極的組成結構，其中的液態薄膜是由厚度薄而且多孔惰性的物質所組成，其中摻雜了一些離子交換的物質(Ionophore)在其中，這些離子交換物質多為有機材料，分別為電性載體和中性載體，而製作此薄膜時需要溶解在有機溶劑中。典型的聚合物薄膜是以具有可塑性的聚氯乙稀(PVC)所組成，其組成成分包含 66%的塑化劑、33%的聚氯乙稀以及 1%的離子載體。

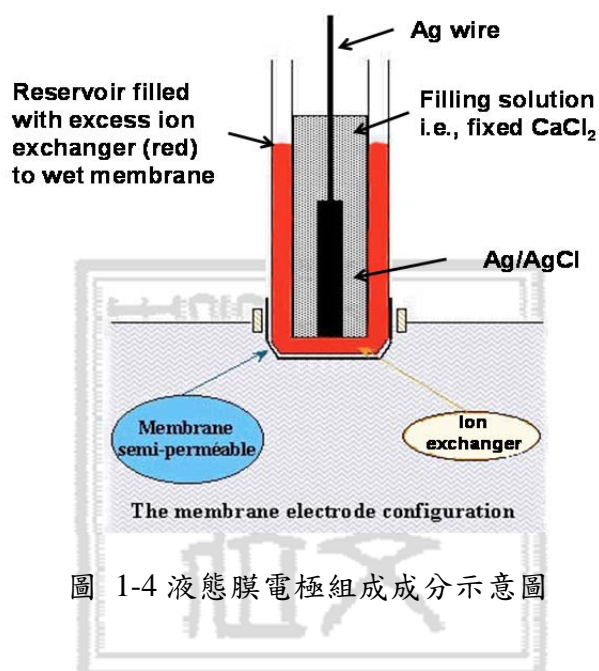


圖 1-4 液態膜電極組成成分示意圖

1.2.2 離子選擇電極發展

在電化學檢測當中，藉由氧化還原反應來分析溶液中的特定離子，是目前最具潛力的技術[13-16]。在使用方式上，一般是由樣品溶液流經離子選擇薄膜繼而滲透過去，然後量測薄膜所產生的電位變化。然而，這些方法的量測是取決於樣本流體中，待測離子與其他離子間的氧化還原電位會有明顯的差異。為了克服其他離子的干擾，離子選擇電極已經提出了使用過濾的方式，來過濾掉不需要的離子，使得只有目標離子保留下來，並且用於電化學的檢測上。一般典型的離子選擇電極，通常包含一個標準的電化學電極，然後在塗上一層離子選擇薄膜當作感測層，用於檢測樣品溶液中的特定離子，這些技術已經被廣泛的應用在食品、醫

學研究與環境檢測等領域上。

最先發展出的離子選擇電極，可以追溯到1967年，是由Rose [17]所提出來的，並且與液態離子交換膜整合在一起，用來檢測包含鈣離子的溶液。隨後許多類型的離子選擇電極陸續的發展起來，用於檢測特定離子的選擇電極，如提出的銨離子選擇電極，就使用了特定的銨離子選擇薄膜，提高對銨離子的選擇性[18]。目前銨離子選擇電極的應用層面，涉及到生物樣本的催化反應上，藉由特定樣本如尿素、肌酐酸以及胺基酸，經由酵素催化後的產物含有銨離子，進而開始量測。目前傳統的平面電極已經證明了，在晶片上可以藉由酵素催化反應，來檢測生物樣本[19, 20]，並且可以將酵素酶直接摻雜在感測薄膜表面，將酵素膜整合於銨離子選擇電極上，實現即時檢測等目標[21-25]。

1.3 電化學

電化學為涉及電子與化學反應相互關係的科學，而所謂的電化學反應牽扯到電子的轉移，同時也是表示電荷轉移前後，產生的一連串化學反應，而在發生電化學反應的過程中，可能會有新的產物產生，如氣體的產生或氧化物的形成等，而這些複雜的反應必須考慮後續產生的吸附、脫附及吸收等現象。

電化學反應中電位、電流、電量是最常量測的訊號，而其中以量測電流訊號較靈敏，也可以用來當作反應物的消耗速率，或產物的生成速率。其電化學利用電位來驅動反應的進行，來探討化學反應與電荷轉移之間的關係，可利用電位調整電極表面的電子能量，使得電活性物種與電極發生轉移[26]。其中溶液內的電活性物質傳遞進入電極表面，然後進行氧化反應，而濃度梯度為電極表面進行電化學反應時，反應物消耗形成，再擴散反應進行時，物種會朝濃度梯度的方向移動，使得分子由高濃度往低濃度方向移動。

電活性物質在接近電極表面時，於電極表面發生化學反應或物理吸附、脫附，最後待測物接觸到電極，會產生氧化還原反應產生反應電流。其公式如下：

$$I = nFAD(\Delta c / \Delta x) \quad (4)$$

A: 電極面積大小(cm^2)。

D: 分析物擴散係數(cm^2/s)。

F: 法拉第常數。

n: 分子與電極交換的電子數。

Δc : 分析物的濃度差。

Δx : 電極表面距離。

1.3.1 電化學電極系統

電化學量測中其三根電極分別為參考電極、輔助電極和工作電極，如圖 1-5 所示，其中工作電極是分析物產生氧化還原的位置，並無限定其為陰極或陽極，在工作電極發生氧化則為陽極，反之則為陰極，是以分析物在電極所發生的反應所決定。而為了維持過程中電化學反應的電中性，搭配輔助電極，亦即工作電極產生氧化反應時，則輔助電極必然為還原反應，輔助電極亦是相對於工作電極，可為陰極或陽極，其中輔助電極最大功能是維持溶液的電中性，以不影響工作電極為準則。對於參考電極來說，必須滿足下列條件，須為理想的非極化電極，並能遵守能斯特(Nernst)方程式，通常進行電化學檢測，僅需工作電極和輔助電極，參考電極的功能在於穩定工作電極之參考電位[27]。

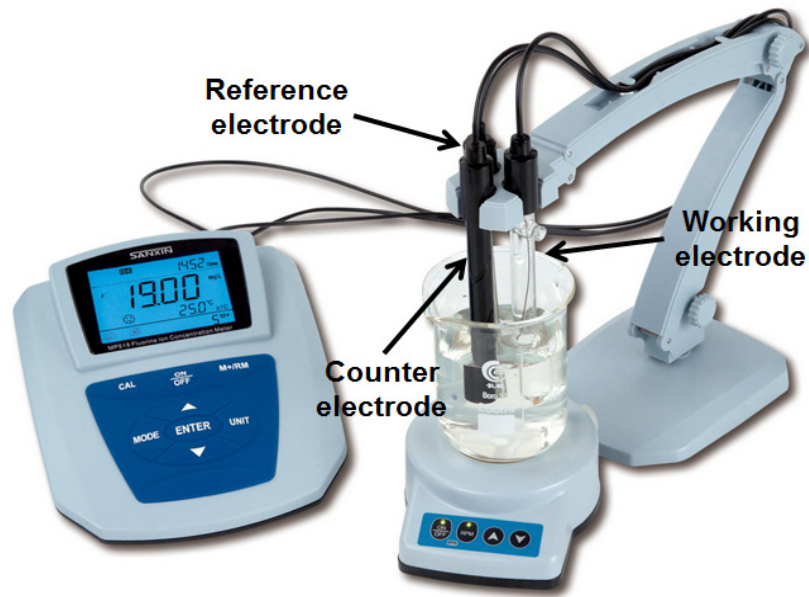


圖 1-5 電化學之三電極系統架設圖，分別是工作、輔助以及參考電極。

一般製作電極的材料主要分為兩類，一種是碳電極，另外一種則是金屬電極。其中碳的相關材料廣泛地應用於電化學檢測上，諸如奈米碳管(Carbon nanotube)、碳膠(Carbon paste)、碳纖維(Carbon fiber) [28, 29]等，其成本較低且無電極損耗問題，但此類電極有一個共同問題，如電子傳遞速率較金屬電極慢，無法長期接觸有機溶劑等。而常見的金屬電極，使用的金屬為金[30, 31]與白金，一般皆以濺鍍或蒸鍍的方式來製備，並於沉積金屬前，於基板間增加黏著層，提高金屬電極薄膜的附著能力，使的金屬電極不易剝落。

1.4 微流體離子感測器

在過去的十年中[32-35]，一個微全分析系統(μ -TAS)或是實驗室晶片(Lab on chip)的概念是非常熱門的，並且普及在分析化學的領域上。其主要的功能可以應用於樣品的處理程序上，如樣品前處理、稀釋、校準、分離以及檢測(如離子感測器)，將其整合在一個厘米尺寸大小的晶片上[36-39]。雖然微流體裝置大部分都應用於生物分析上，如在細胞和蛋白質上，探討藥物的傳遞與釋放，以及分離與分

析核酸的片段。不過，其還有許多潛在的用途，若目標分析物是小分子或離子時，可以做為環境汙染監測、空間應用與醫療診斷[40]。此外，製作的微流體移動平台，跟傳統的儀器來比較的話，其裝置的體積較小，使得攜帶變得更加方便，並且製作的成本較為低廉。

微流體裝置藉由控制與操作，完成流體的注入與傳輸，使得流體從入口端移動到另一端。一般來說，離子感測器與大多數的微流體系統主要是基於三個推進機制，分別是電滲透流(Electro osmotic flow, EOF)、流體動力(Hydrodynamic)以及離心力(Centrifugal)。表一為一般離子感測器在不同的推進力下的優點與缺點，詳細的列出於表 1-1 中。

表 1-1 一般離子感測器的流體推進機制比較[32]

推進力	優點	缺點
電滲流	<ol style="list-style-type: none"> 1. 固有的分離機制 2. 架設容易且方便用於研究 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 對酸鹼值和離子強度的檢測靈敏度。 2. 僅限於二氧化矽或處理過的塑膠材料。 3. 成本較高。 4. 需要施加高電壓。
流體動力	<ol style="list-style-type: none"> 1. 通用的推進機制。 2. 適用的材料範圍廣。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 不能分離。 2. 需要多個流體控制裝置。

離心力	<ol style="list-style-type: none"> 1. 通用的推進機制。 2. 適用的材料範圍廣。 3. 簡易的馬達即可推動流體。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 不能分離。
-----	--	--

一般來說，毛細管電泳主要是以電滲透流為基礎，以不同的遷移速度移動，其遷移速度和遷移方向受電泳和電滲透流影響，在外部高壓電場作用下，使毛細管內的帶電粒子往偵測端移動，因為粒子的荷質比不同，導致粒子遷移速率不同，達到分離的目的[41]。而電滲流式的微流體系統，在檢測上會有一些缺點，其晶片會對樣本溶液的化學性質很敏感，像一些溶液的 pH 值和離子強度。其中使用塑膠材質的基板，來實現電滲透流比較有難度，除非管道側壁經過處理修飾後，引進可離子化的溶液，因此電滲透流的檢測設備比較昂貴。

在很多的情況下，會使用流體動力來代替電滲透流，一般的驅動原理都是通過外部施加壓力來驅使流體移動，而流體的移動則取決於流體的密度和黏滯度，以及微流體通道的幾何形狀。此外相較於電滲透流，使用流體動力作為推進力，其適用的基板材料更多，但是需要將微流體晶片連接一個或多個控制端，來調控外部壓力。流體動力不同於電滲透流是其在晶片內部沒有分離的機制，為了實現流體分離於微流體系統中，可以在微管道中使用色譜分析技術進行分離。

離心力是最近興起的流體驅動的一種，使用此種方式藉由旋轉產生的徑向力，來產生流體的移動在微流體的平台。使用離心力來驅動流體的方式與流體動力推動其機制是相似的，可以應用於不同材料的樣本與裝置上。雖然離心式的平台不具備化學分離機制，但是已經提出使用具有離子交換的材料，連接在離心的裝置上[42]。流體動力驅動系統需要安裝壓力控制端，而離心式系統只需要利用一個簡單的電動馬達，控制旋轉的平台，即可以使用離心力來進行流體驅動。與其他流體驅動系統相比，離心驅動相對使用程度比較少，目前許多公司正朝著檢測蛋白、

生物標靶或基因分析等研究。

1.4.1 電化學式離子感測器

最早的電化學式的離子感測器，是量測感測電極的離子電位變化，如市售的離子檢測裝置，是通過壓力傳遞產生的流體，驅動流體滲透過離子選擇電極的薄膜，來量化分析離子濃度[43, 44]。Tantra and Manz 等人[45]提出相似的原理，是利用外部壓力來驅動流體，將單一的離子選擇薄膜直接固定於微流體管道中。此晶片感測器被設計來固定離子膜，然後允許管道內的樣本溶液，流經過薄膜繼而滲透，達到分離離子的目的。該研究製作了添加離子載體 (Ionophore) 的離子選擇薄膜，使用感測器來量測 Ba^{2+} ，可以發現其與一般常見的離子選擇電極產生的電化學行為相似。此種類型的離子感測器量測 BaCl_2 溶液，其濃度的線性範圍介於 10^{-6} 到 10^{-1} M。

如圖 1-6 所介紹為使用玻璃基板製作的離子選擇電極架設圖，此玻璃晶片的製備是使用標準的光阻微影製程、蝕刻以及熱壓接合技術處理[46]。圖中點 A 及點 B，分別是 U 型管道的入口端與出口端，而點 C 則為樣本導入的入口端，利用真空幫浦在出口端吸取的方式，可以將薄膜固定在管道的點 D 處，其中間管道的尺寸長 $500\ \mu\text{m}$ 、寬 $20\ \mu\text{m}$ 、深度為 $10\ \mu\text{m}$ 。

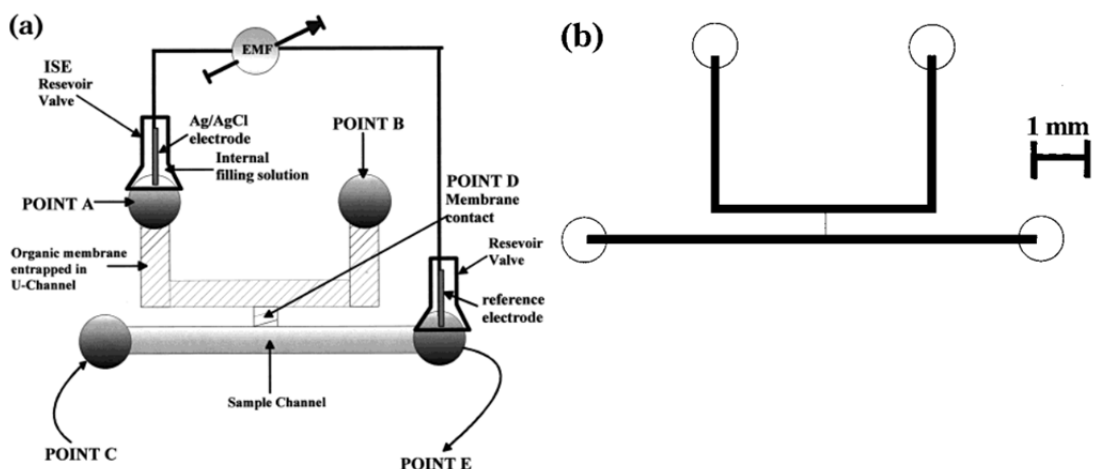


圖 1-6 使用離子感測器量測 BaCl_2 溶液，(A)離子感測器的微管道與出入口端設計

示意圖，其量測系統架設繪至於圖上;(B)微流體晶片的流道設計圖，其晶片尺寸長寬為 12 mm × 6 mm [45]。

Berduque 等人[47]提出使用雙液相流體的方式來萃取目標離子，此微流體晶片的製作，首先在矽基板上定義出白金電極的圖案(厚度 150 nm)，然後使用 SU-8 光阻在白金電極上製作微管道(深度 180 μm)，在使用 PDMS 當作基板來做接合。圖 1-7 所示為一個 Y 型的微流體管道結合了白金電極，當水相溶液與有機相之電解質溶液平行通過管道，會在雙液相之間產生一個動態的介面，貫通整個中間管道。藉由橫跨管道的白金電極電位的改變，來控制目標離子的萃取。此研究使用微流體晶片來萃取四乙基銨離子(Tetraethylammonium)，可以從量測出來的電流來得知萃取離子的比例。結果證實，使用雙液相萃取技術經施加一定流速，可以分離出濃度 25 μM 的 TEA^+ ，其萃取率介於 8% 到 11%。

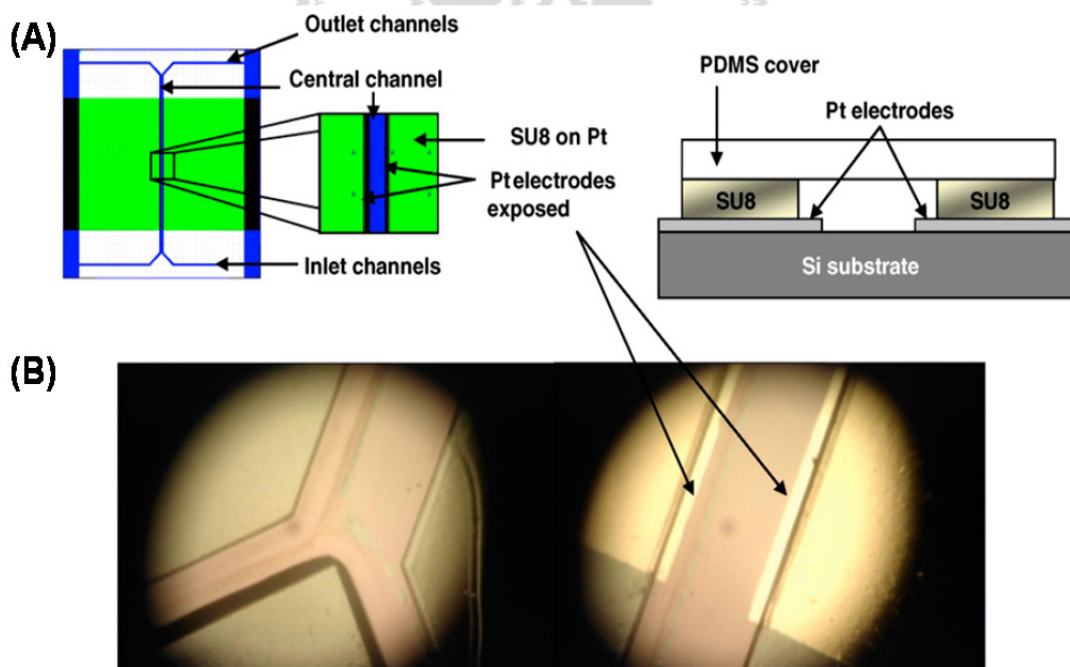


圖 1-7 使用水相及有機相的雙液相流體，來分離目標離子示意圖，(A)左邊為晶片管道與電極設計，右邊則為管道的橫截面，(B) Y 型管道的主流道與入口管道，其中可以發現電極分布在流道兩側[47]。

Hisamoto 等人[48]提出使用流體介面頸縮與多相層流的特性，在微流體管道內合成化學性聚合薄膜。藉由頸縮反應可以在有機相/水相的雙相流體，與有機相/水相/有機相的三相流體，製作出單層與雙層平行的薄膜結構。而管道內包含銨離子的溶液，可以從管道內的薄膜滲透過去，來量測到訊號。此外還可以在薄膜表面的一側，摻雜酵素酶來修飾聚合薄膜，可以即時在晶片內進行生化反應。圖 1-8 (A) 為在 X 型的管道中，使用有機相和水相溶液，於管道內合成薄膜的示意圖；圖(B) 為晶片管道的橫截面剖面圖，從圖中可以發現製作在管道內的立體薄膜，而此薄膜厚度大約是 10 μm 。使用此種方式成型的薄膜，其厚度是可以被控制的，只要控制有機相溶液與水相溶液內，參與的離子濃度即可改變成型的厚度。

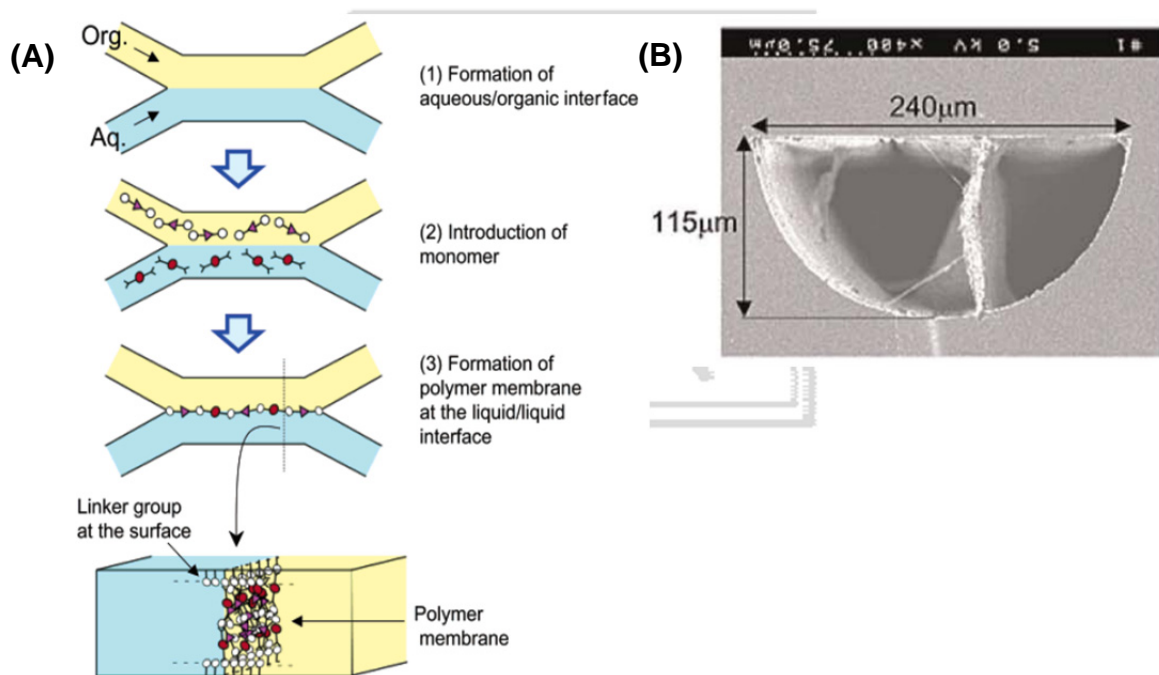


圖 1-8 使用異相層流的方式，於 X 型管道中合成化學性薄膜，(A)為使用異相層流的晶片示意圖，使用有機相與水相溶液在 X 型管道中，來合成薄膜；(B)使用電子顯微鏡拍攝管道內橫截面圖，可以發現薄膜成功地合成在管道中間，其中管道的長寬大概為 115 μm \times 240 μm [48]。

1.5 生物感測器

自 1962 年生物感測器開始發展初期，Clark 和 Lyon [49] 二位學者共同提出使用酵素電極來做檢測的概念，因此在七十年代即積極投入商品化的開發，而最早開發出來的商品為血糖測試酵素電極。而生物感測器[50]為固定生物分子，藉由生物體內或體外之化學物質與之產生特異性交互作用，再結合生物辨識的機制，將生化訊號轉換成一個可以量化的電訊號。一般來說生物感測器基本組成包含生物觸媒(Biocatalyst)部位、信號轉換器(Transducer)、放大器與信號處理系統。其中生物觸媒為催化劑的一種，能對某些特定物質發生作用，而不受外物干擾，如酵素、抗體、微生物。信號轉換器則是將產生反應後的變化訊號，包括化學物質、熱、光及電子，轉換成可讀的電子訊號。

生物觸媒包含酵素與細胞，而使用固定化生物觸媒技術，可以重複使用來降低檢測成本。依據固定的生物觸媒的不同及差異，可以分成大致分成酵素感測器、微生物感測器、胞器感測器。

1. 酵素感測器

酵素是一種蛋白質或類似蛋白質的物質，可以用來催化或加速反應的進行，其中酵素感測器所添加的酵素可以是單一酵素或複合酵。酵素感測器具有多項的優點，如具有高專一性、高敏感性與偵測時間較短，藉由合適的酵素加以催化生物樣本，產生的生化反應後在配合適當的信號轉換器，即可構成酵素感測器。

2. 微生物感測器

微生物感測器係以微生物菌體為活性物質，以其內部酵素系統與代謝系統的綜合而成的感應機制。一般而言，微生物感測器有較佳的長時間穩定性，且可反覆使用，適合工業上的應用，然而因為細胞循環所需反應時間較長，選擇能力亦較差，且其菌體酵素保存不易，容易死亡凋零。

3. 細胞及組織感測器

生物細胞內存在一些小胞器，諸如粒線體、微粒體、溶體等，這些胞器皆為複合酵素系統之集合體，不同的酵素集合在不同的胞器中，能夠有效地執行與其具有特異性之生化代謝反應，利用胞器以及組織內酵素與代謝系統反應，來推演反應物濃度。但是特別需要注意的是，從胞器分離出來的酵素，會面臨一些問題，如分離胞器的複雜度高、檢測時間長以及感測度較低。

目前發展出來的生物感測器，仍然是以臨床生化分析為主，未來隨著科技的進步驅使生物感測器的改良與微小化，方便攜帶可以日常生活中及時做篩檢，例如居家健康檢查的生物感測器或是環境保護監測的感測器等。

1.5.1 尿素生理機制

尿素是由碳、氮、氧、氫組成的有機物，分子式為 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ，人類每天從日常生活中從食物攝取的蛋白質，在消化過後會水解成胺基酸分子，在由人體吸收合成可利用之蛋白質，當身體的蛋白質過多無法儲存於體內的時候，多餘之胺基酸會被代謝成水分、二氧化碳作為能量或是轉化成其他化合物，而胺基酸在人體中代謝的最終產物則為尿素。

如圖 1-9 為尿素循環流程圖，其尿素為在肝臟的尿素循環所形成，不同之生物產生的含氮廢物不全然相同，在 2002 年由 Sidney 與 Morris [51]文中介紹人體內尿素的循環反應，此尿素循環中合成的尿素產物，其中所含的氮原子是從氨分解而來。人體中的尿素循環，是為了代謝體內蛋白質分解產生的有毒血氨。而人體的胺基酸代謝主要是在肝臟進行，一開始先經由氧化去胺作用轉變成麩胺酸鹽 (2-Aminopentanedioic acid)，然後再轉換成 L-天冬氨酸鹽 (Aspartate)，尿素則是 L-天冬氨酸的氨基轉換成鳥氨酸 (Ornithine) 的代謝物。所以若是人體內的尿素循環發生問題，造成體內代謝分解出來的血氨，無法藉由循環排出體外，血液中過高的氨會對腦部造成傷害。

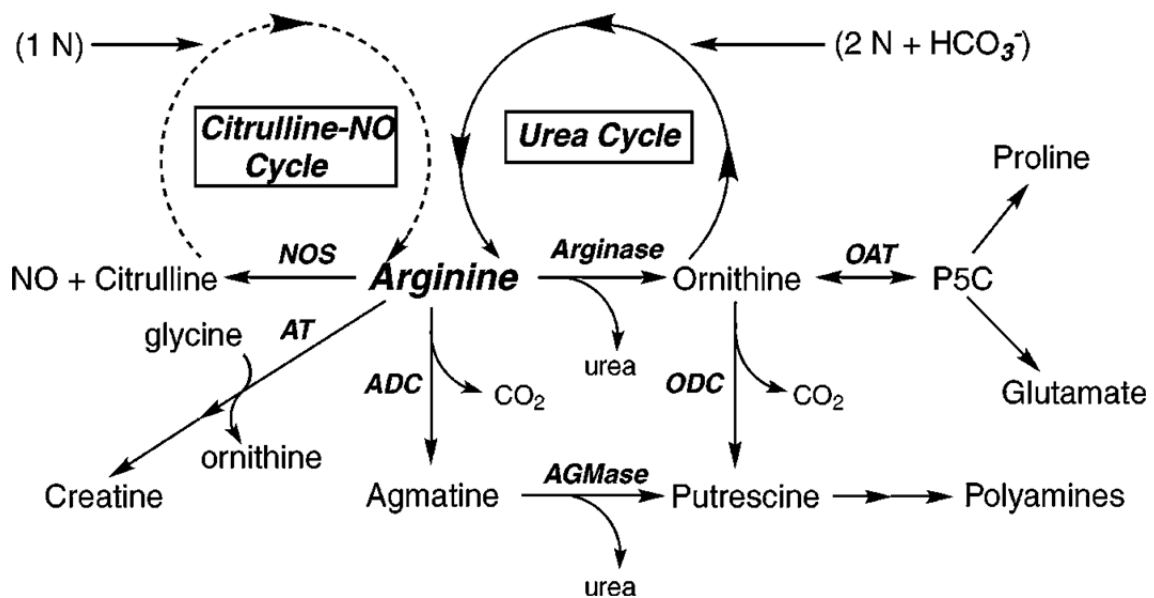


圖 1-9 尿素循環示意圖，身體多餘的氨基酸代謝成二氧化碳與水，再經由肝臟尿素循環產生尿素[51]。

尿素係蛋白質經肝臟代謝後最終產物，溶於血液中流往腎臟，經過腎臟內的腎小球過濾後，大部分會直接從尿液排泄出去，只有少部分在吸收回到血液中。因此血液中的尿素濃度，由肝臟生成的尿素和從腎臟排泄出的尿素平行來決定，而每日從尿液排泄出去的尿素為 30 克。如果腎臟的排泄機能變差，血液中尿素氮的濃度會增加。腎臟於人體代謝及維持生命活動中占有重要的地位，所以預先評估腎臟功能，關係著腎臟病人治療方法的選擇。血液中的尿素濃度，跟腎臟與肝臟功能及腎上腺內分泌機能有密切關聯，因此血液或尿液中尿素氮的濃度為關係人體健康的指標和診斷腎功能之重要參數。

血液中的尿素所含的氮，就稱為尿素氮，其中尿素測量通常以其含氮量表示，通稱為尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)，一般來說 1 mg/dl 的尿素氮相當於 2.14 mg/dl 的尿素濃度。尿素氮升高的原因如下面幾點所述：

1. 腎臟疾病

當蛋白質由食物中攝取的量固定無另外生成增加時，則須由腎臟排泄量來決定血液中的尿素濃度，因此由血液中尿素的濃度，可以判斷人體腎臟功能是否正常運作，所以當檢查發現血液中的尿素濃度升高時，表示腎臟功能受損，若以尿素的濃度來評估腎臟損傷的嚴重程度的話，當血中尿素濃度超過 50 mg/dl 時會有腎衰竭的現象，而當你濃度升高到 100 mg/dl 時，則已經是變成了尿毒症，需要考慮是否洗腎。

2. 組織蛋白

體內的蛋白質來源，除了可以從日常生活中的飲食獲得之外，另一個可能是因為身體組織大量破壞所產生，如甲狀腺機能亢進、糖尿病酸中毒，而當大量蛋白質代謝後，會產生尿素造成尿素濃度升高，也會促使血液中尿素濃度升高。

血液或尿液中所含尿素的濃度，在臨床醫學上有其代表意義，成年男性的血清尿素氮，其濃度正常範圍為 8 到 21 mg/dl，成年女性則略低，範圍介在 6 到 20 mg/dl，因此換算過後，血清中尿素濃度正常值約 15 mg/dl ~ 40 mg/dl，若當尿素濃度超過 50 mg/dl 時，血液中含氮廢物排泄障礙，遂蓄積於血液中，則產生氮值血症，表示腎小球功能受損。而當患者尿素濃度超過 180 mg/dl 時，病人會出現各種出現器官系統功能障礙，以及物質代謝障礙所引起的症狀。

1.6 動機與目的

離子選擇電極於環境污染、生化、農產養殖漁業、生醫與工業上的檢測，具有舉足輕重的地位，因此市面上已經有許多公司致力於發展離子選擇電極感測器，加上最近幾年來，離子選擇電極也積極發展於生醫檢測的領域。而酵素固定技術，將酵素分子摻雜在離子感測薄膜，使用來檢測生物樣本有明顯的成果。目前開發的生物感測器已經成功的商品化，主要是以醫藥檢測為主要市場，然而市售的生物感測器製造成本過於昂貴，而且體積大所以不方便攜帶。因此藉由微機電製程技術，在玻璃或高分子的基板上，製作出微管道結構，將傳統的離子選擇電極整合於微型晶片；亦即使用單一晶片即可進行樣本檢測，而且樣本的使用量減少，體積小且方便攜帶，進而更能製造的成本，因此整合離子選擇電極已經成為目前發展的重點。

儘管市面上已經有各種不同的離子選擇電極，且已成功於各領域廣泛使用，但是電極長期使用下來，會造成感測薄膜的使用壽命減短，需要再另外購買感測薄膜來自行更換，花費的成本相對提高。考量要在微型化的晶片中，固定離子選擇薄膜，會面臨到許多問題，包括微管道和玻璃電極的接合、離子選擇薄膜的成型技術，以及感測薄膜受到樣本溶液中其他離子的干擾，導致量測時所造成的誤差。為此，本研究目標在於解決晶片製作上所面臨的問題，將離子選擇電極整合於微流體晶片中，並且發展一種簡易的成膜技術，將離子選擇薄膜固定在晶片中，將其應用在日常與生醫檢測上。

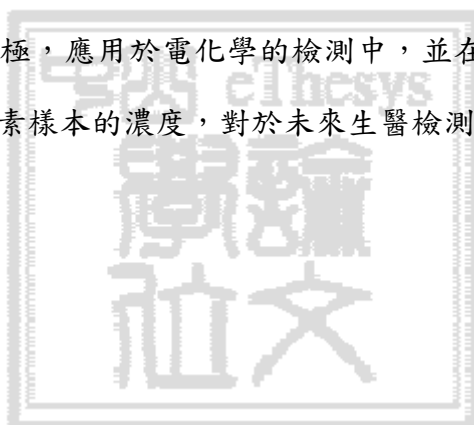
由於生醫科技的發展，醫療檢測裝置體積逐漸微型化，在攜帶上更加的方便，而改良過後的離子選擇電極，搭配酵素固定的技術，已經成功應用於生物檢測方面，如葡萄糖感測器、膽固醇感測器、乙醯膽鹼感測器等，其可以從醫學上的角度來評估人體的生理作用，得知人體的器官是否發生病變。

本研究使用 PDMS 製作微流體管道，為了將電極與微管道作接合，使用氧氣電漿系統，對 PDMS 及玻璃電極進行表面改質，表面經改質過後立即進行接合，

完成晶片的製作。微流體晶片製作完成後，欲在晶片管道中成型離子選擇薄膜，因此使用真空幫浦於管道出口端吸取，藉由微結構產生的剪切流(Sheath flow)作用，將離子選擇薄膜成功固定在晶片中。由於製作的薄膜厚度較薄，所以管道內離子交換傳遞的速率也會提高，提升晶片感測效能，而且添加銨離子載體在離子感測膜，也能夠有效降低外部離子所造成的干擾。

銨離子感測器成功實現後，本研究以離子選擇電極為基底，使用酵素固定技術，於離子選擇膜表面摻雜尿素酶物質，製做生物感測薄膜。此生物感測薄膜於生物樣本的檢測中，感測薄膜會對特定分子產生反應，藉由離子選擇電極量測方法，使用電化學來偵測生物樣本的濃度多寡。

本研究提出的微流體晶片具有製程簡單、快速成膜、成本低廉等優點，已經成功地整合離子選擇電極，應用於電化學的檢測中，並在此系統架構下添加了酵素酶，可以即時檢測尿素樣本的濃度，對於未來生醫檢測技術上將會有所貢獻。



1.7 論文架構

第一章 緒論

本章節主要著重於離子選擇電極的原理與架構，以及整合電極於微流體晶片的發展，因此從離子選擇電極包含的各種不同的種類，電極的製作方式以及所使用的電化學偵測法，其中，更詳細敘述了生物感測器的應用，與尿素對於人體健康生理作用的重要性。為了解決傳統離子選擇電極的產生的問題，於本文中提出研究的動機與目的，最後簡述本論文各章節之概要。

第二章 選擇性離子感測器原理

本章節提出，製作離子選擇薄膜的 PVC 材質的特性，以及在樣本溶液中外部離子對目標離子的干擾與薄膜的選擇性，其中也引用能斯特方程式，來解釋離子選擇電極的感測原理，然後進一步介紹酵素酶分子，摻雜在離子選擇薄膜的表面的固定方式。

第三章 材料與方法

本研究開發的離子感測器，包含了電化學電極的製作、晶片的設計理念、離子選擇薄膜的合成、酵素摻雜修飾薄膜表面、實驗架構，以及在實驗中需要用的樣品溶液的調配。在實驗架設流程中，詳細敘述了微流體系統的實驗架構，以及目標離子滲透感測薄膜的進行，最後使用電化學法來進行檢測與分析。

第四章 結果與討論

首先測試離子選擇電極工作性能，評估在沒有離子選擇薄膜的條件下，其電極感測效能，並探討整合離子選擇電極的微流體系統，應用於電化學偵測樣本溶液的效能，並對離子感測薄膜對離子的選擇性做測試。另外，當在離子感測薄膜

的一側摻雜了酵素酶分子，應用於生物樣本的檢測。

第五章 結論與未來展望

經由上一章節的實驗結果，在此章節做一個總結與歸納，並根據實驗數據結果，做為未來改進與發展的目標。



第二章 選擇性離子感測器原理

2.1 鉍離子選擇電極特性與應用

隨著科技的發展，高分子材料廣泛的使用，已經遍及了日常生活中，常見之離子選擇電極，其離子選擇薄膜也是由 PVC 的材料所製作而成，然後將離子選擇載體用高分子薄膜包埋起來，製作成鉍離子選擇電極[52]。離子選擇電極主要是藉由離子選擇性薄膜，來選擇樣品中的待測離子，並使用電化學法進行分析。然而離子選擇電極的壽命取決於電極的種類、離子選擇薄膜的性質、保存方式與待測離子的濃度，以及存在的干擾物與腐蝕物的種類與數量。一般的玻璃薄膜或晶體薄膜式的離子選擇電極，其電極壽命為 1 到 3 年，但如果在工作環境溫度較高或是流動的系統中(動態檢測)，電極壽命將減短為 1 到 3 個月，特別是在具有腐蝕性的惡劣環境下，壽命大概只會剩下幾天而已。一般使用聚氯乙炔(PVC)感測薄膜的離子選擇電極，其電極的使用壽命取決於薄膜的感測能力，一般使用時間大約為數小時到數千小時。

離子選擇電極因為由於攜帶方便、檢測濃度範圍廣、操作簡單快捷等優點，在醫療分析、血液分析以及工業污染監測上得到廣泛的應用。其中決定離子選擇電極的性能的優劣，主要的關鍵在於離子選擇的感測薄膜，此外離子選擇電極的感測薄膜有很多種類型，包含固體薄膜、有機液體薄膜與聚氯乙炔薄膜。然而因為聚氯乙炔材質製作的薄膜，具有良好的可塑性易於成型加工、透氣性，以及良好的電學特性，可以使高分子材料中摻雜的添加劑呈現多樣化的應用，並可將特殊物質溶於材料內部及表面，可用來作為替代傳統市售的感測薄膜的材料。圖 2-1 所示為鉍離子載體的化學分子結構，(A)圖與(B)圖一個為自然生成，另一個則為人工製造合成的鉍離子載體，而圖(A)為目前唯一可以使用的鉍離子載體，但是其對 K^+ 和 Na^+ 的選擇性效能較差[53]。因此開發出一種人工合成的離子載體，除了保有對鉍離子的選擇性外，也改善了對 K^+ 與 Na^+ 離子的干擾。而根據離子通透性不同

的機制，可以將離子載體分為兩種類型，分別為通道成型離子載體(Channel-forming ionophore)與離子攜帶載體(Ion-carrying ionophore)，然而通道式離子載體可以形成一個通過薄膜的通道，可以選擇陽離子通過薄膜，其離子傳遞效率高於攜帶式離子載體；因此，選擇合適且具有專一性的離子選擇載體，可以提高離子選擇電極的檢測極限與感測效能。

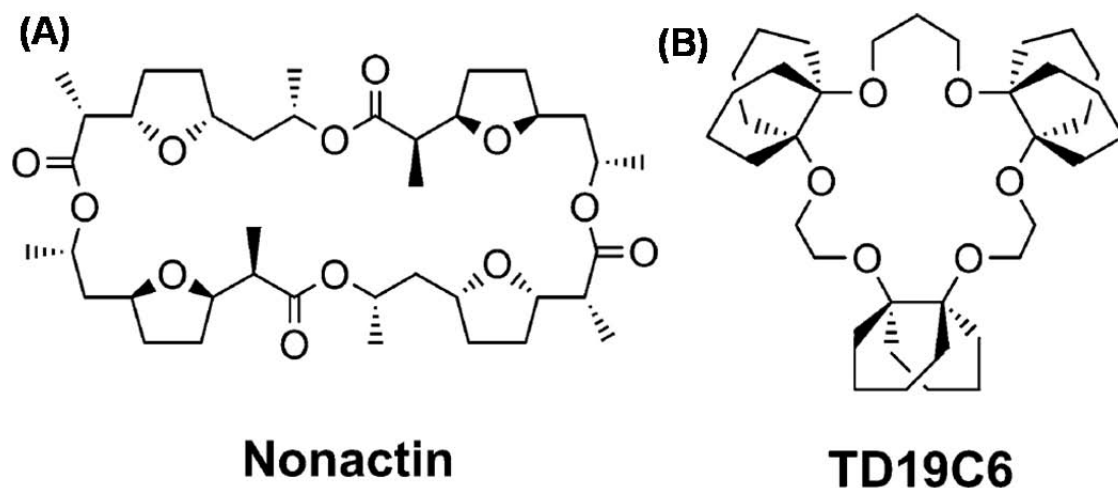


圖 2-1 為不同的銨離子載體的化學分子結構圖，(A)由無活菌素(Nonactin)自然生成，即為銨離子載體，(B)TD19C6 為人工合成之銨離子載體，提高薄膜對干擾離子的選擇性[53]。

在 1967 年，Bloch 研究團隊[54]製作出離子選擇薄膜，用來檢測含有鈣離子之樣品，其薄膜材質是使用聚氯乙烯(PVC)中摻雜磷酸三丁酯(Tributyl phosphate)或是磷酸三丁酯中再加入噻吩甲酰三氟丙酮(Thenoyl trifluoroacetone)。Moody 等學者[55, 56]則測試了各種使用 PVC 材質薄膜的離子選擇電極，探討其薄膜的選擇比例與參數，並開始進行一連串的實驗，目的在於證明薄膜的結構、評價以及使用的情況。Anker [57]等學者製作出使用中性離子載體的離子選擇電極，其感測薄膜的材質使用 PCV 製作而成，特別是在 PVC 薄膜內摻雜 ETH1001 (Calcium ionophore)，使用來檢測血液中血清內所含的鈣離子濃度。Schaller 等學者[58]研究使用 PVC 離子感測薄膜，在添加了不同的離子的樣品溶液中，探討離子選擇電極對陽離子與

陰的行為與反應。Bakker 等學者[59]則提出藉由將電極薄膜溶解於含有四苯基硼酸鹽(Sodium tetraphenyl borate)溶液中，而存在於溶液中的陽離子則會跟薄膜結合，進而改善離子選擇薄膜的選擇性。普遍來說，使用 PVC 材質製作的離子選擇電極，其著重的特點在於電極反應時間短與使用的壽命較長，為此研究薄膜的組成與特性，並添加離子載體於其中，來提升電極的感測效能於分析與偵測上。

2.2 離子感測器原理

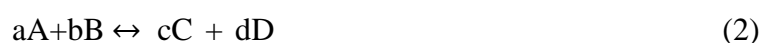
2.2.1 能斯特方程式

在許多研究中，對於電解質溶液內個別離子的活性測定，為利用離子選擇電極，來量測在不同溫度下個別離子的活性係數。在 1864 年由德國化學家能斯特提出著名之能斯特方程式(Nernst equation)，其在敘述電化學電池反應電動勢(Electromotive force, EMF)與反應物濃度關係的方程式[60]。因此，可以由方程式得知可逆電極或電池之電位，其電位除了由電極組成物質來決定外，亦與溫度與溶液活性有關，可由熱力學推倒出其相對關係。

在電化學系統中，而電極反應產生的電位為 E 供應的電量為 Q ，其電量 Q 在一莫耳電子反應下，電量等於一法拉第($1 F = 96500 \text{ Coul}$)，則電極所作的淨功為 QE ，若是有 n 莫耳電子參與反應，產生的電量變為 $Q = nF$ 。在定溫定壓下，由熱力學原理可知，化學反應自由能減少的能量應該等於電池在可逆條件下的淨電功。

$$\begin{aligned}\Delta G &= -nFE \\ \Delta G^0 &= -nFE_0\end{aligned}\tag{1}$$

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 C、D，反應的自由能變化為

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \log \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (3)$$

R 為氣體常數，T 為溫度 K， E^0 為標準電動勢， ΔG^0 為反應之標準自由能變化量，

將式(1) $\Delta G = -nFE$ 以及 $\Delta G^0 = -nFE^0$ 代入式(3)

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \log \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (4)$$

方程式(4)稱之為能斯特方程式，來表示電極或電池的電位。

在常溫下 ($25^\circ\text{C} = 298.15 \text{ K}$)，能斯特方程式可以簡化為：

$$\frac{RT}{F} \approx 0.0591$$
$$E = E^0 - \frac{0.0591}{n} \log \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (5)$$

E: 電池電動勢。

E^0 : 標準電位。

R: 氣體常數(8.314J/mol-K)。

T: 絕對溫度(室溫下為 298 K)。

F: 法拉第常數(96500 庫倫)。

n: 半反應的電子轉移數，單位 mol。

$\frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}$: 反應物濃度乘積與參與物質的濃度乘積之比。

\hat{a} : 是氧化和還原物質的活度 (活度=濃度*活度係數)。

不過由於電極內的溶液並非理想溶液，所以必須對能斯特方程式加以修正，濃度被 \hat{a} (活性，activity) 取代， \hat{a} 是濃度乘以活性係數(Activity coefficient)，所以能斯特方程式修正式為：

$$E = E^0 - \frac{0.0591}{n} \log \frac{\hat{a}[C]^c \hat{a}[D]^d}{\hat{a}[A]^a \hat{a}[B]^b} \quad (6)$$

2.2.2 離子干擾

離子選擇電極在實用上最大的困難是來自溶液中離子物種的干擾，而這些離子不是電極量測所要的目標離子，各種離子選擇電極並不是只專門對目標離子有選擇性，對共存的其他離子也會有一定程度的反應。要判斷他種離子干擾程度，造成的誤差是否在可容許的範圍內，可以使用選擇性常數 K (Selectivity coefficient) 作評估。

當其他離子干擾電極的時候，Nikolsky eisenman equation [61] 為一個合適的公式，可求得待測離子濃度的真實值。其公式如下所示：

$$E = E^0 + \frac{RT}{n_A F} \ln [a_A + K_{AB} a_B^{n_A/n_B} + K_{AC} a_C^{n_A/n_C} + K_{AD} a_D^{n_A/n_D} \dots] \quad (7)$$

\hat{a}_A : 待測離子的活性。

$\hat{a}_B \sim \hat{a}_D$: B 到 D 干擾離子的活性。

$K_{A,B}$: 電極對受測離子 A 與干擾離子 B 選擇性常數，K 值越小表示干擾越小。

n_A : A 離子價數。

$n_B \sim n_D$: B 到 D 干擾離子價數。

選擇係數 K_{AB} 為表示離子選擇電極性能的重要參數，是被用來判斷電極對目標離子選擇性的指標，評估電極相對於受測離子 A 來說，其對干擾離子 B 的選擇性，換言之為 B 離子對 A 離子的干擾程度。其值為在相同條件下，受測離子活性 \hat{a}_A 與共存離子活性 \hat{a}_B 的比值。

$$K_{A,B} = \frac{a_A}{a_B^{n_B/n_A}} \quad (8)$$

選擇性係數 K_{ij} 測定法分兩類：

1. 分開法

使用同一根電極分別量測，得到受測離子 A 與干擾離子 B 的活性，與電極電位繪製成響應曲線，然後用等活性法或等電位法求得 $K_{A,B}$ 。

2. 混合溶液法

上述的分開法是在受測離子與干擾離子單獨存在時量測得到的電位，沒有考慮實際系統中存在著離子互相干擾的情形。混和溶液法考慮當受測離子與干擾離子共存下的情況，求得選擇係數 $K_{A,B}$ ，比較符合實際的情況。

一般來說以能斯特方程式為基礎的電位式感測器，其感測器有一些缺點，從公式可以發現訊號與活性為一個對數關係，需要小心量測否則量測之小誤差會造成分析上的大誤差。此外，電流計量的感測器其量測主要是端看穩定的電流訊號，其訊號是由施加固定電位，使導體與參考電極間產生電流，而且電流比電位更容易與準確地進行量測，其訊號和樣品濃度成正比例關係。

2.3 酵素薄膜固定方式

酵素的化學專一性一直是生物感測器量測上之基礎，固定一種酵素或是複合酵素於感測薄膜上，藉由薄膜來進行催化反應，而尿素感測器則是以銨離子選擇電極為基礎，將尿素酶固定到離子感測薄膜表面，然後尿素樣本會被薄膜表面的尿素酶催化水解，其催化後的產物分別是銨離子、碳酸氫鹽與氫氧根離子，尿素催化的化學反應式如下所示；



生物酵素的固定程序，需要再適當的環境條件下進行，否則可能會導致酵素酶活性降低。固定的生物分子的活性影響因素有很多，取決於各種參數，如表面積、薄膜表面的孔隙率、親水性、反應條件和選擇的固定方式[62, 63]。固定酵素的薄膜，其薄膜厚度越薄可以提高感測的效能。在薄膜表面固定尿素酶的方法如圖 2-2 所示：

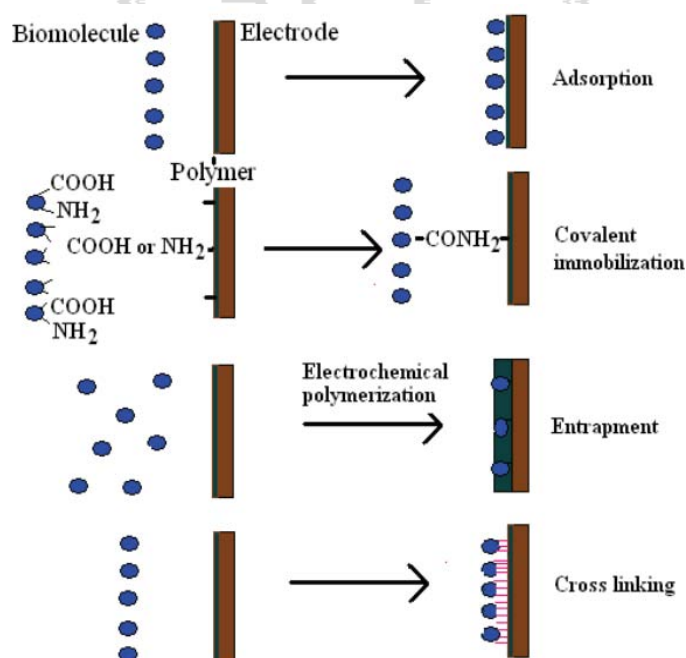


圖 2-2 為各種固定酵素方式的示意圖，將酵素酶固定在薄膜表面，方法分別是吸附、包埋、交聯與共價鍵結。[64]

1. 吸附(Adsorption)

常用載體為玻璃或離子交換樹脂，此固定方式簡單，不會破壞酵素活性，但是酵素貼附力較差，且作為吸附生物分子之材料，其容易受到 pH、溫度的影響。

2. 包埋(Entrapment)

將酵素包埋於聚丙烯胺(Polyacrylamide)，其將固定於膠體中，而此方式一般可以藉由照光或是施加電壓來使高分子聚合，然後將酵素包埋在其中，但是此方法會造成基質擴散時的阻礙，且酵素亦會從孔隙流失。

3. 交聯(Cross-linking)

為酵素與載體之間藉由試劑形成共價鍵而結合，戊二醛(Glutaraldehyde)為普遍使用之交聯劑，其利用分子上的胺基和酵素進行交聯鍵結，利用此方式能牢靠的將酵素固定在薄膜表面上，但容易破壞酵素結構影響活性。

4. 共價鍵結(Covalent bonding)

為載體表面的官能基，使官能基與酵素表面特定官能基座結合，此種固定方式使用的材料很多，如多孔性玻璃、陶瓷與纖維，通常藉由酵素分子的胺基與羰基來與載體做鍵結，此法固定的酵素較不易脫落。

其中酵素的固定方式可分為物理性與化學性，化學固定方式會在酵素與單體間形成化學鍵結，但其成本花費昂貴；而物理固定方式步驟較為簡單，但由於酵素與單體沒有共價鍵結，因此酵素經常會流失，下表為比較各種固定方式的優缺點，可以考量自身的生物分子，選擇合適的固定方式。

表 2-1 為各種固定酵素酶的方式，比較不同固定方的優點與缺點[64]。

固定方式	優點	缺點	文獻
物理吸附法	固定方法簡單而且快速，其成本便宜。	容易受到環境的溫度或酸鹼值影響，而破壞貼附效能，酵素酶回收困難。	Syu and Chang [65]
包埋法	製作步驟簡易、成本便宜。	酵素非均勻分布，且易造成擴散時的阻礙，酵素酶回收困難。	Adelojo et. al.[66]
交聯法	酵素貼附效果穩定	化學固定需要較長的反應時間，酵素酶回收困難。	Cho and Huang[67]
共價鍵結	酵素貼附效果穩定，且固定酵素酶的量較多。	化學固定需要較長的反應時間，酵素酶回收困難。	Bisht et. al.[68]

第三章 材料與方法

在本章節當中，將介紹實驗所使用離子選擇薄膜之製作方式、電化學電極之設計、微流體晶片系統的製作過程，與本實驗固定離子選擇薄膜於管道內的方式；其中在本研究裡，提出使用表面張力將離子選擇薄膜固定在微結構，而對離子選擇薄膜的成膜技術與酵素酶摻雜感測晶片的製作，將在此一併描述之。

3.1 微流體晶片製作

本研究設計了一個微流體系統，整合離子選擇電極將離子選擇薄膜製作於其中，並應用於電化學檢測系統，而此離子感測晶片的設計概念，則來自於傳統的離子選擇電極架構。傳統離子電極構造主要包括電極腔體、參考電極、電解液與離子選擇薄膜，其感測薄膜是暴露在環境底下，而量測的方式是將電極浸泡在樣品溶液裡，感測薄膜就像一個過濾器來分隔電解液與樣本溶液。以此仿造市售電極偵測裝置，無須額外替換感測薄膜，只需將此薄膜作為微流體系統的感測薄膜，並固定薄膜於微流體系統的微結構當中。

首先，將定義出圖案的電極，經由濺鍍機將金屬薄膜濺鍍於玻璃基板上，濺鍍的金屬分別是金、白金與銀，對應的分別是工作電極、輔助電極與參考電極，完成電化學電極的製作後，後將設計的微流體管道使用 PDMS 進行翻模，接著使用氧氣電漿進行表面處理，處理過後即可將電極與管道貼合，其設計管道的兩側分別是流往電解液與樣本溶液。

圖 3-1 所示為使用流體成型技術於微流體晶片內製作離子選擇薄膜示意圖，如圖所示，管道中間部分是一連串鑽石形狀的微結構，其尺寸邊長為 $50\ \mu\text{m}$ ，結構的間距是 $200\ \mu\text{m}$ ，將摻雜銨離子載體的 PVC 溶劑於入口端注入，並在出口端接上真空幫浦做吸取的動作。藉由幫浦的吸力在兩個管道產生剪切流與表面張力，促使 PVC 薄膜固定在微結構之間，成型之後的薄膜，其厚度與各種因素有關，包括微結構的形狀、PVC 溶劑的粘滯度、微管道的材料特性以及真空吸力的大小等。使

用此簡單的方法可以得到均勻厚度的薄膜，而且本研究開發的離子感測器於電化學檢測上，其優點包含生產成本低、製程簡單快速、可重複使用、攜帶方便和樣本使用量少等。

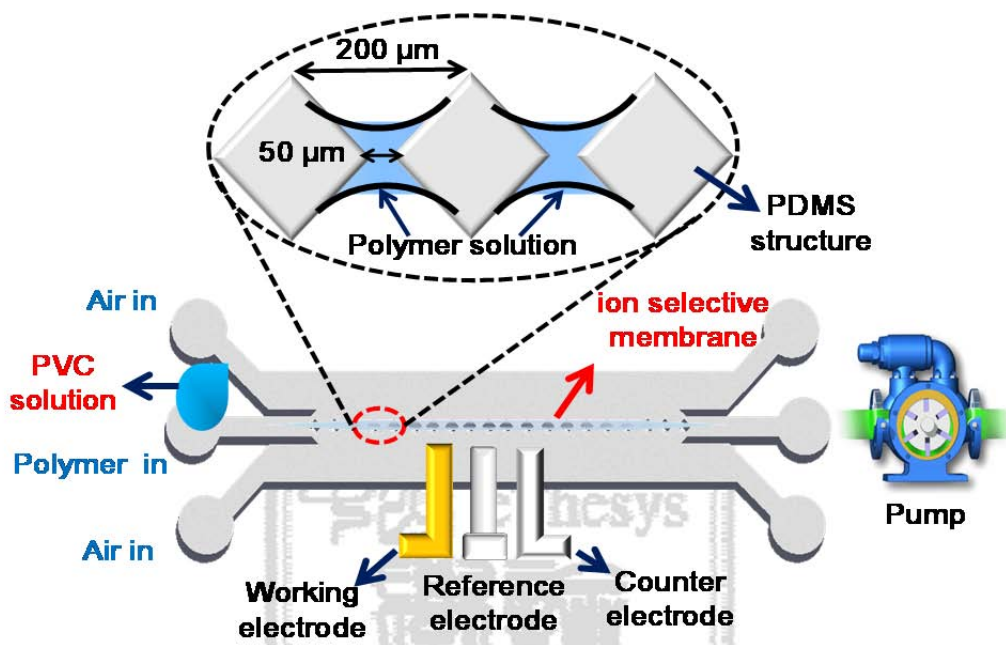


圖 3-1 使用真空幫浦產生表面張力與剪切流，於結構中成型離子薄膜示意圖。

3.2 離子選擇電極晶片設計與製作

在本節當中將介紹實驗所使用的離子選擇電極之製作方式，而使用的微流體管道係利用微影製程加工製造出來，其整個製作流程大致分為平面電極晶片、微流體管道及微流體系統整合，詳細製程介紹如下。

3.2.1 平面電極晶片製作

本實驗所使用的平面電極晶片，先是經由繪圖軟體 CoreDRAW[®]定義出電極的區域及大小，工作電極(Au)、參考電極(Ag/AgCl)與輔助電極(Pt)，在此選用金與白金當作電極，除了導電度良好，金屬表面不易氧化外，其金屬發生氧化的氧化電位較高，金的氧化電位在 1.5 伏特，白金氧化電位則 1.2 伏特，在檢測樣本時不影

響量測結果。電極寬度及間距各為 2.0 mm，由廠商出圖裁切乙烯基(Vinyl)材質的卡典西德(Cutting Sheet)作為光罩，將其黏貼至玻璃基板上，把定義出電極圖形的部分撕下後置入真空濺鍍系統。一般而言，會使用光阻製程來定義出圖形，繼而製作電極晶片，但其成本較為昂貴且製程繁雜，以卡典西德定義晶片圖案，則可以大幅降低成本，簡單且快速。

3.2.2 微流體管道製作流程

1. 光阻塗佈：

將乾淨的玻璃試片放至煮沸之piranha溶液($H_2SO_4 : H_2O_2 = 3 : 1$)維持十分鐘，使用去離子水澆淋玻璃試片，然後將表面之水珠去除，接著將清洗乾淨玻璃基板放置加熱板加熱烘烤十分鐘去除水氣，在整個實驗過程中，為了使正光組塗佈於玻璃基板上，我們於玻璃表面添加 Hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma-Aldrich, USA)。旋轉塗佈的過程為兩階段，滴管吸取適當量的光阻，分別為以 3000 rpm 維持 10 秒，在以 5000 rpm 維持 30 秒，以達到預期的均勻度與厚度。

2. 軟烤：

將塗佈好的玻璃基板放置加熱板上，持溫 100°C 持續 3 分鐘進行軟烤。使塗佈在玻璃上的光阻固化，並使光阻內所含的有機溶劑揮發，之後將溫度降至室溫，再進行下一步驟。

3. 曝光：

使用設計好的光罩進行曝光，定義曝光與未曝光的區域，之後以紫外光進行曝光。被紫外光照射到的部分，將於顯影時被顯影液去除。

4. 顯影：

曝光完成後將玻璃基板浸泡於顯影液(AZ400K)進行顯影，本實驗所使用的顯影液濃度為 AZ400K:DI water = 1:3，將被紫外光照射到的部分去除，留下定義出

的光阻圖案。

5. 蝕刻：

以 BOE (6 : 1) 來對我們的玻璃母膜蝕刻，利用 BOE 蝕刻的速率來得到理想的蝕刻深度，1 分鐘可以蝕刻的深度大約為 0.9 μm ，所以蝕刻 23 分鐘可以得到 20 μm 的深度，蝕刻完畢後，以去離子水沖洗表面，再以氣槍表面的水滴吹除，觀察蝕刻的情況。

6. 去除光阻：

最後，將蝕刻過後的玻璃母膜，浸泡於 KOH (KOH : H₂O = 4 : 1) 溶液來去除光阻，並以去離子水沖洗表面，再以氣槍表面水滴吹除，以免留下水漬，放置加熱板以持溫 100°C 加熱使水氣乾燥，即完成管道母膜的製作。

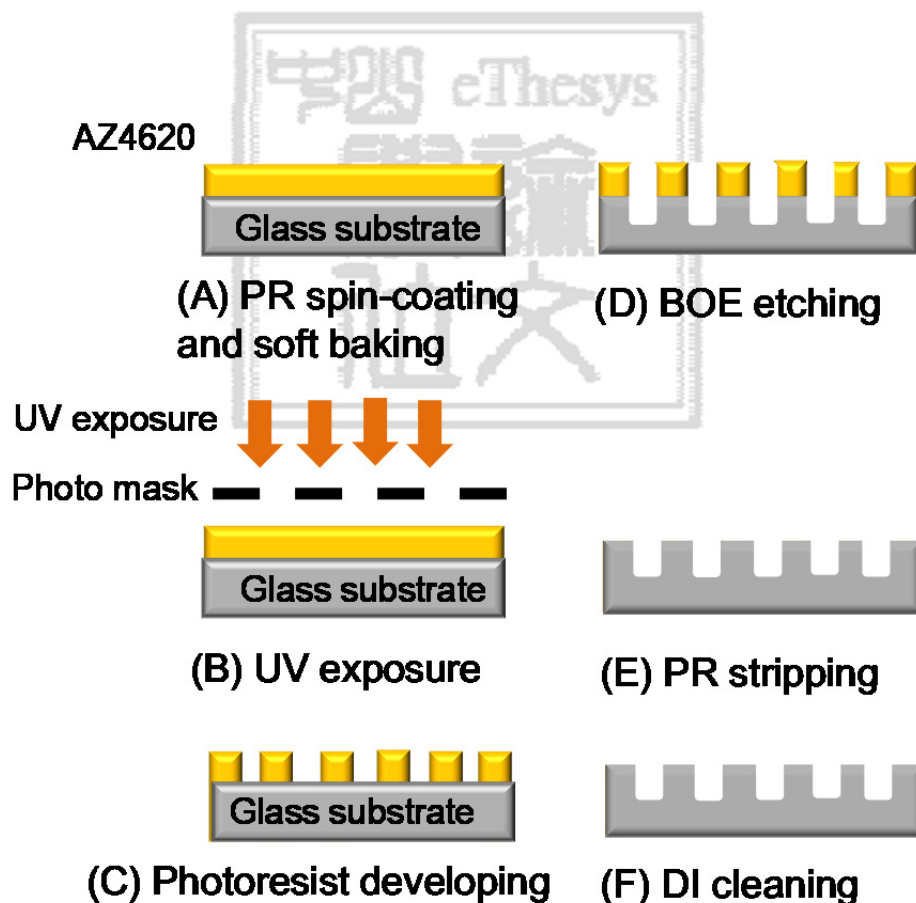


圖 3-2 玻璃晶片製作流程圖。[69]

3.2.3 晶片製作

- A. 實驗中利用微影製程，將設計的微管道圖案定義在玻璃基板上，經玻璃蝕刻的微管道用來當作翻模的模具，選用的翻模材料為 PDMS，調配比例為 PDMS : 固化劑 = 10:1，將 PDMS 灌模到模具置於加熱板上，保持溫度 70°C 持續 1 小時，即可以翻出微流體管道。
- B. 使用定義出電極圖案的乙烯基(Vinyl)基材，貼附至玻璃基板，再將電極部分的掩體撕下，而設計電極的間距與寬度尺寸為 2 mm。使用濺鍍系統在基板表面先沉積一層薄薄的 Cr 當作黏著層，厚度約為 170 nm，在依序濺鍍上金屬薄膜，如白金、金與銀來當作電極薄膜，其薄膜厚度分別是 600 nm、660 nm 與 1 μm ，用來當作電化學檢測的輔助電極、工作電極與參考電極。
- C. 濺鍍完成後的銀電極需要經過氯化處理，將銀轉換成氯化銀，將一個電源供應器的陽極接上銀電極，陰極則接上銀線，在施加 1.5 伏特的電壓，將其浸泡在 0.1 M HCl 溶液裡，大約維持 3 秒即可完成氯化，形成 Ag/AgCl 電極。
- D. 將入口和出口挖洞鑽孔，使用電漿系統將 PDMS 和玻璃基板進行表面改質，電漿使用的功率為 50 W，施加時間持續 5 分鐘，即可將 PDMS 和玻璃基板進行接合，形成一個密封的微流體管道。
- E. 配置好離子膜的溶劑，滴加 10 μm 於管道入口，另外在管道出口端接上為幫浦，只要溶劑一進入管道，就打開出口端的幫浦吸引，藉由表面張力與剪切流，把薄膜固定在中心管道結構中，完成晶片的製作。

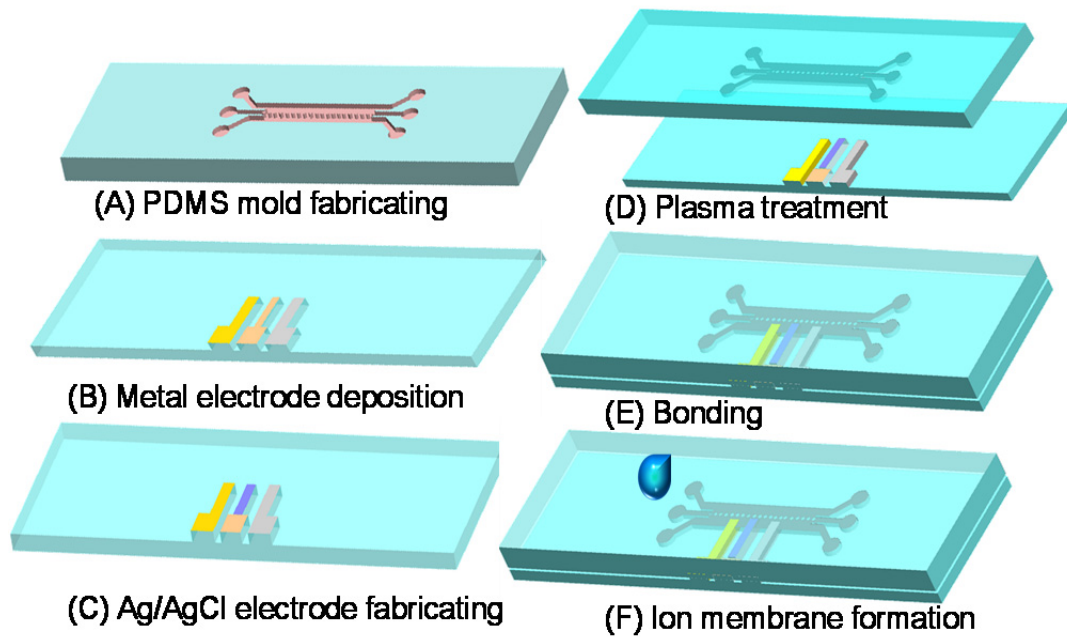


圖 3-3 微流體晶片製作流程圖，(A)灌注 PDMS 進行翻模；(B)在玻璃基板濺鍍金屬電極；(C)將銀電極進行氯化處理，製作 Ag / AgCl 電極；(D)將金屬電極與 PDMS 使用電漿系統進行表面改質；(E)將改質後的電極與 PDMS 進行接合；(F)將配置好的離子膜，於管道內成膜。

經由晶片製作流程後，最後完成感測晶片，如圖 3-4 所介紹的(A)與(B)圖，分別為組裝好的微流體晶片與使用電子顯微鏡拍攝離子膜的 SEM 圖。從(A)圖可以發現微流體晶片中包含了一個中央微流道(尺寸: $150 \times 150 \mu\text{m}^2$)，其中有菱形的微結構圖案與固定在微結構的離子薄膜，其兩側的微通道則是用來當作電解液及樣本溶液的區域。從電子顯微鏡的 SEM 圖中可以發現，(B)圖中薄膜的表面形貌呈現多孔狀的結構，因此有利於銨離子從樣本溶液的管道擴散過去，進而進行電化學檢測。此外，也可以從圖中證明 PVC 膜與 PDMS 的微結構間保持良好的接觸。

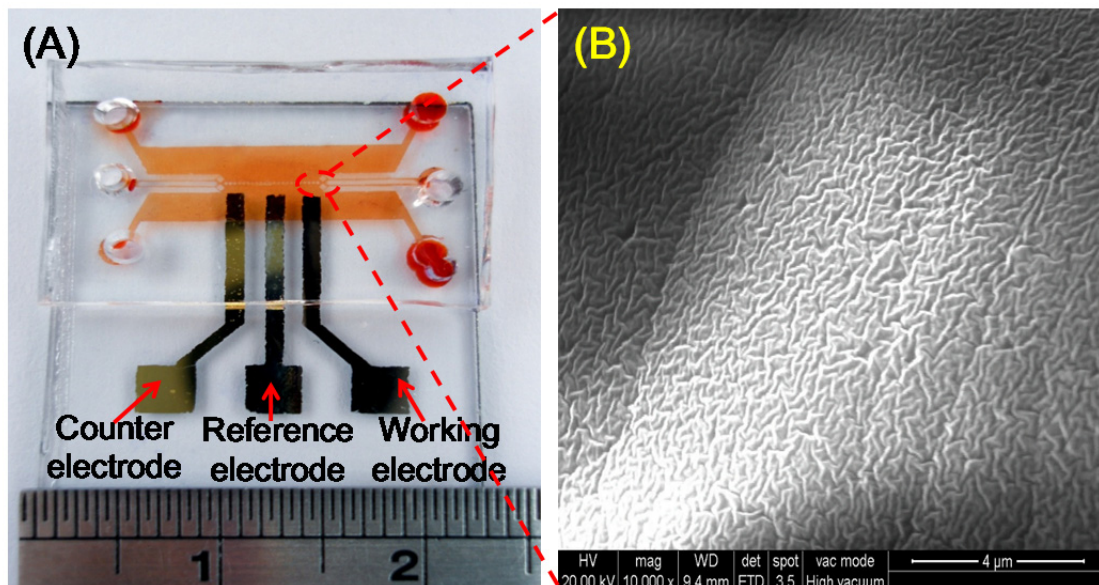


圖 3-4 離子選擇感測器完成示意圖，(A)經過晶片製程組合成的微流體晶片；(B)使用電子顯微鏡觀察管道中成型的離子薄膜。

3.3 實驗藥品

在本節當中將介紹實驗中所使用的藥品，其中包含感測晶片內引入的電解液與樣本溶液的配置、離子選擇薄膜的合成材料與製作以及酵素感測膜的配置與摻雜，其內容於下面小節詳細敘述。

3.3.1 實驗溶液配置

1. 實驗中所使用的電解液為 NaCl (Sodium chloride, Showa, Japan)，使用純水配置濃度為 15 mM 備用。
2. 量測的樣本溶液 NH_4Cl (Ammonium chloride, Showa, Japan)、NaBr (Sodium bromide, Showa, Japan)、KCl (Potassium chloride, Showa, Japan)，以 DI water 配置成不同的濃度，分別為 0.01 ppm、0.1 ppm、1.0 ppm、10 ppm、100 ppm 及 1000 ppm 進行量測。

3. 另外生物樣本檢測所使用的尿素 (Urea, Sigama-aldrich,USA) 與肌酸酐 (Creatinine, Sigama-aldrich,USA) 樣本溶液，以 DI water 配置成不同的濃度，分別為 0.01 ppm、0.1 ppm、1.0 ppm、10 ppm、100 ppm 及 1000 ppm 進行量測。

3.3.2 銨離子薄膜製備

本研究所開發的銨離子感測器，係利用製備的銨離子選擇薄膜作為感測膜，並使用本研究提出的薄膜成型方式，固定離子選擇膜於中心管道微結構中，做為檢測銨離子之感測器，於下列將描述銨離子選擇膜之製作方式。

1. 感測器中的離子選擇膜是由聚氯乙稀 (PVC, Fluka, Switzerland)、癸二酸二丁酯 (Dibutyl sebacate, Fluka, Switzerland) 和銨離子載體 (Ammonium ionophores, Fluka, Switzerland) 等藥品配製而成，使用有機溶劑四氫呋喃 (Tetrahydrofuran, Alfa Aesar, Germany) 來溶解薄膜組成藥品。
2. 本實驗根據薄膜製作配方標準製程，依照重量百分比把聚氯乙稀 (33 wt%)、癸二酸二丁酯 (66 wt%) 與銨離子載體 (1 wt%)，大約 400 mg 要溶解在 5 ml 的 THF 有機溶劑中，持續攪拌後即可注入管道，薄膜於室溫下即可成型，詳細成膜步驟在晶片製作以敘述。

3.3.3 酵素感測膜製備

本實驗所使用的酵素感測器為利用開發的銨離子選擇電極作為基體，於感測薄膜上摻雜了生醫用的酵素酶，在薄膜的一側即可與樣本進行催化反應，作為檢測的酵素感測器，下面將描述酵素樣本溶液的配置與酵素感測膜的製作方式。

1. 實驗中所使用的酵素酶樣本分別為尿素酶(31 units/mg, Urease type III, Sigma, USA)與肌酐脫氨酶(20 units/mg, Creatinine deiminase, Sigma, Japan)，以 DI

water 配製成濃度為 10 mg/1ml，用來摻雜樣本溶液。

2. 將配置好的酵素溶液取 20 μl 的量，添加到 PVC 膜的溶劑，溶劑的量為 200 μl ，均勻混和後使用本研究提出的方式，即可將酵素膜固定在管道結構中。

3.4 實驗架構流程

1. 銨離子選擇電極之電化學檢測
 - a. 先將製備好的 PDMS 管道使用丙酮與酒精，於超音波震盪機中震洗維持 5 分鐘，將清潔乾淨的 PDMS 於加熱版上去除水氣之後，將進行電漿處理，來貼合電極與 PDMS。
 - b. 本研究所使用的電漿系統設備，為本實驗室自行架設組裝，施加反應氣體為氧氣，進氣量為 8 ml，使用的功率為 50 W 持續 5 分鐘，將整個 PDMS 與金屬電極的表面進行電漿改質，表面改質後即可進行接合。
 - c. 製作好的晶片會使用真空幫浦在管道中固定離子薄膜，其已於 3-1 節作敘述。其中進行實驗前，會先在微管道內填入 DI water，用來濕潤離子選擇薄膜，時間大約維持 10 分鐘。
 - d. 離子薄膜濕潤完成後，使用注射幫浦於兩側管道分別填入電解液與樣本溶液，其電化學的架設如圖 3-5 所示。在進行電化學檢測時，先將晶片上的工作電極、參考電極與輔助電極連接到電化學分析儀(Model CHI 611C, CH instrument, USA)，以循環伏安法(Cyclic voltammetry, CV)量測分析物的氧化還原電流大小。首先設定其掃描電位範圍為 0.6V ~ -0.6V，掃描的速率則為 0.1 V/s。
 - e. 在電化學分析儀檢測下，分析樣本的氧化還原訊號會隨著濃度的升高而有顯著的變化。

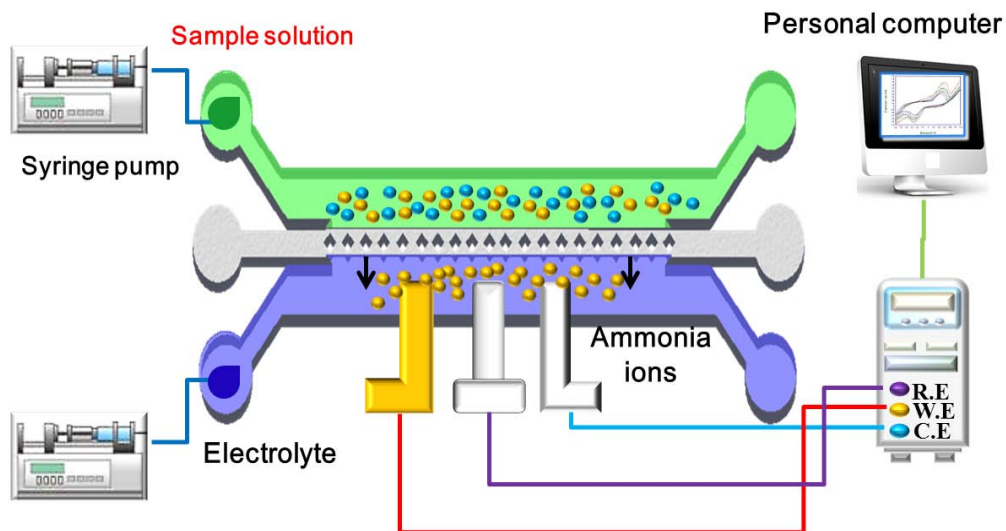


圖 3-5 電化學實驗架設示意圖

2. 酵素晶片於電化學檢測

如圖 3-6 所示，為離子選擇薄膜摻雜酵素工作示意圖，從圖中可以發現，將酵素摻雜到薄膜上面，會於薄膜的另一側進行生物催化反應與銨離子的滲透。實驗中使用一個三極式的金屬電極，藉由酵素酶催化反應，於離子選擇薄膜的另一側，量測尿素轉換成銨離子通過薄膜，所得到的電流值變化。

使用本研究提出的簡單薄膜成型方式，並且將有添加銨離子載體與摻雜酵素的 PVC 薄膜，固定在管道的微結構間。而且 PVC 材質的薄膜具有良好的化學穩定性和可撓性，使的薄膜可以提供穩定的表面固定離子通道和酵素酶。在此研究中，離子通道和當作生物催化劑的酵素酶，同時嵌入在薄膜當中，固定在生物感測膜裡。因此，摻雜了酵素酶的薄膜，會在管道內形成一層薄薄的薄膜，用以隔離樣本溶液和電解液，來進行電化學檢測。而尿素樣本與肌酐酸樣本會被轉化成銨離子，在經由離子選擇薄膜滲透過去，由電化學分析儀進行即時檢測。

此外為避免樣本溶液殘留於分離管道中，造成樣品交互汙染，因此在檢測完畢後，會使用 DI water 重複沖洗管道，避免檢測受到干擾造成誤差。

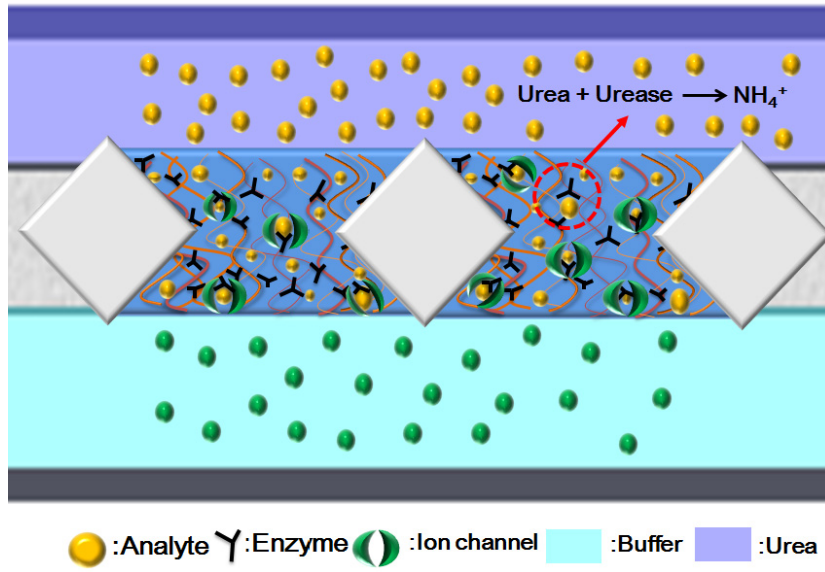


圖 3-6 脲素酶摻雜於離子選擇薄膜，進行生物催化反應與離子選擇示意圖



第四章 實驗結果與討論

本研究利用離子選擇電極(Ion selective electrode, ISE)來進行銨離子的量測，有別於傳統市售離子感測器，除了發展晶片成膜技術外，整合離子感測薄膜於微流體晶片中，可以即時檢測樣本中化合物或受測離子。

在現實生活中，感測器必須符合以下的基本功能：(1)長時間使用下，其量測結果不會產生誤差；(2)具有良好的選擇性，於量測時不受到氣體、光線、物理或化學變化所影響；(3)其感測的反應時間快；(4)感測器價格低廉；本研究為了達到此目標作了以下研究結果。

4.1 離子選擇電極微流體晶片

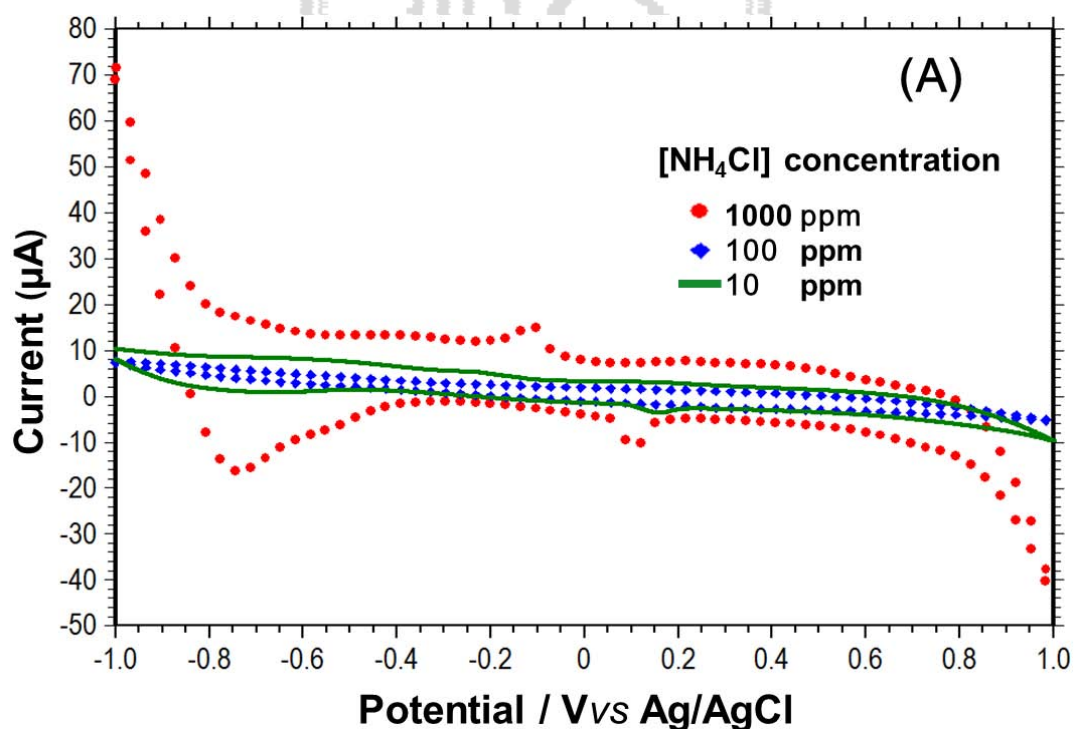
本章節敘述將傳統的離子選擇電極，包含感測的電極、電解液以及感測薄膜等，整合至一個微流體晶片，並使用銨離子電極來進行實驗，評估設計的感測晶片其效能以及感測靈敏度，其實驗結果分別為電極測試、薄膜選擇性、電化學偵測與反應時間等分析。

4.1.1 離子選擇電極效能探討

本研究一開始量測離子選擇電極的工作性能，評估在沒有使用離子選擇薄膜下的電極感測能力。一般藉由電化學的方式量測樣本，大部分使用循環伏安法(Cyclic voltammetry)來進行實驗；因此，本研究量測三種樣本濃度，其分別是 10^3 ppm、 10^2 ppm 以及 10^1 ppm 的 NH_4Cl (掃描速率為 0.1 V/s)，來量測樣品溶液在電極表面電解產生的氧化還原訊號。結果如圖 4-1 (A)所示，掃描的電位範圍從 0.6 V 到 -0.6 V，可以量測到一個相對稱的循環伏安曲線。在 CV 圖中可以發現，在低的銨離子濃度下(10^1 與 10^2 ppm)，從正電位掃描到負電位，其 CV 曲線沒有明顯的訊號變化，無法作為分辨樣本濃度的證明。然而，感測電極對於高濃度的樣本溶液，雖然可以觀察到明顯的電流變化，但是從圖中可以發現，在高濃度下的電流

訊號出現明顯的不穩定性。

在傳統的電化學檢測過程中，其中 PVC 薄膜的製備，是將 PVC 材料與 THF (四氫呋喃)有機溶劑混合，等待 PVC 完全溶解後，放置於乾淨的玻璃基板上，在室溫下等其蒸發成型。然後，將固化的薄膜從玻璃基板剝離，在使用 THF 有機溶劑，把固化後的薄膜黏貼在電解槽的頂端。當樣本溶液滴在薄膜上，溶液中的離子會經由薄膜滲透到電解質溶液中，而藉由量測工作電極上的相對電流變化，可以決定待測離子的濃度。如圖 4-1 (B)所示，為使用上述方法，量測不同樣本濃度的 CV 曲線圖，其樣本溶液中的銨離子濃度，範圍從 10^2 ppm 到 10^3 ppm。從結果可以發現，在不同的銨離子濃度下，其電流訊號會有明顯的區別。並且在較高的銨離子濃度下，其得到的電流反應訊號，也比圖 4-1 (A)訊號更加的穩定。因此，PVC 薄膜用來過濾干擾的離子上，其效能是可以被證實的。除了可以大大提升電極感測極限，也能避免其他離子的干擾，而得到好的量測結果。然而，此種感測器需要長達數分鐘的時間，才能使離子滲透至薄膜達到平衡；此外，薄膜黏貼於電解槽的製作步驟繁雜，並且需要耗費比較多的時間。



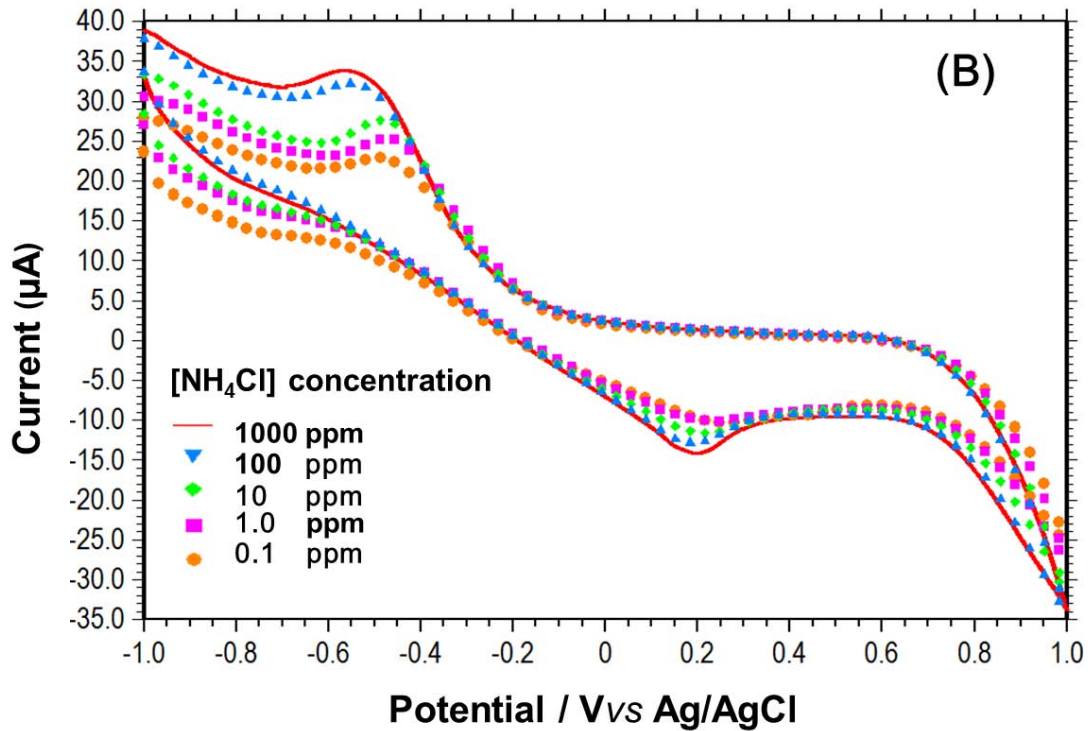


圖 4-1 測試離子電極再添加離子選擇薄膜後，評估其電極的感測效能。(A)使用循環伏安法，在沒有黏貼離子選擇薄膜狀況下，量測氯化銨樣本於不同銨離子濃度的 CV 曲線圖。(B)使用循環伏安法，在黏貼離子選擇薄膜狀況下，量測氯化銨樣本於不同銨離子濃度的 CV 曲線圖。

4.1.2 管道內離子選擇膜成型

為了改善前面敘述的方法，所造成製作上與量測的不方便，在晶片的出口端架設真空幫浦，利用幫浦吸取造成管道內表面張力與流體剪切的物理現象，將離子選擇薄膜固定於管道的微結構中。圖 4-2 為使用電子顯微鏡，拍攝微流體管道的 SEM 圖；如圖 4-2 (A)所示，可以看到晶片管道橫截面的剖面圖，而上下兩層斷面分別是 PDMS 與玻璃基板，其中從 SEM 圖觀察到的橫截面，為管道內的菱形結構斷面與固定在微結構的 PVC 薄膜。圖 4-2 (B)為使用大倍率(3000X)拍攝的 SEM 圖像，從中觀察固定在微結構中 PVC 薄膜的表面形貌。從圖像中可以發現，其表面形貌呈現多孔隙的結構，與所要固定的 PVC 薄膜符合，因此藉由 SEM 圖可以證明，本實驗提出使用真空幫浦吸取的方式，將製作的離子選擇薄膜固定於管道中，

可以成功的實現。並藉由此方法產生的表面張力和流體剪切效應，可以沿著管道微結構的中心，製作出一系列均勻厚度的薄膜，其中 PVC 薄膜厚度約為 50 μm 。

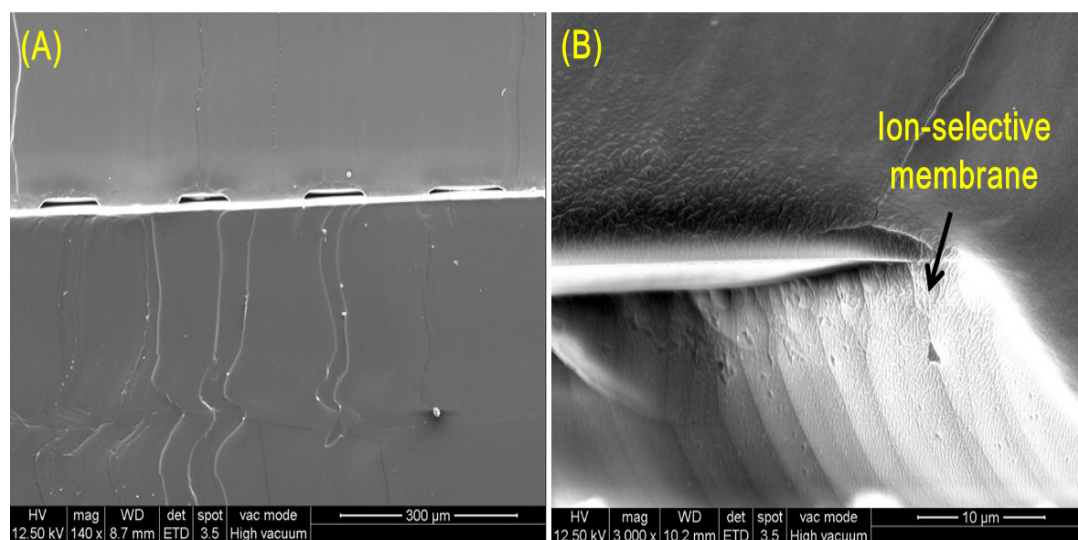


圖 4-2 使用真空幫浦將薄膜固定於管道結構中，(A)使用電子顯微鏡拍攝微結構橫截面示意圖(倍率 140X)，(B)使用大倍率電子顯微鏡(3000X)，觀察微結構間的 PVC 薄膜。

4.1.3 離子選擇膜電化學檢測

製作好的離子選擇電極微流體裝置，須先進行電化學訊號分析，方可評估離子選擇電極的感測性能，本實驗檢測樣本為不同濃度的 NH_4Cl 溶液，利用循環伏安法來偵測樣本溶液中銨離子的濃度。圖 4-3 所示為使用離子選擇電極感測器，偵測氯化銨樣本溶液，掃描所得的 CV 曲線圖，其樣本濃度範圍從 10^{-2} 到 10^3 ppm。曲線圖中的氧化與還原波峰，為氯化銨樣本氧化還原時所產生之電流訊號，而實驗進行中所使用的電位掃描速率為 0.1 V/s。從實驗量測曲線圖中可以發現，在不同的樣本濃度下，其得到的氧化還原電流訊號也明顯的不同。因此從量測的結果得知，證明此感測器於樣本的濃度範圍內，對銨離子濃度變化有良好的感測能力。如同一開始預期，藉由此晶片所量測到的電流訊號，會隨著樣本溶液濃度的增加，

也隨之升高。這也證明了，製作的離子選擇薄膜具有足夠的孔隙度，可以允許管道內大量的銨離子，經由薄膜孔隙快速的擴散到另一側。最終，於施加的電位 ± 0.28 伏特時，可以從 CV 圖上明顯地觀察到，在不同的銨離子濃度下，其電流訊號會隨之濃度而變化，而此電位則為樣本溶液發生氧化還原反應的氧化還原電位。結果證明，使用製作的離子選擇電極量測氯化銨溶液，可以得到穩定的氧化還原訊號。

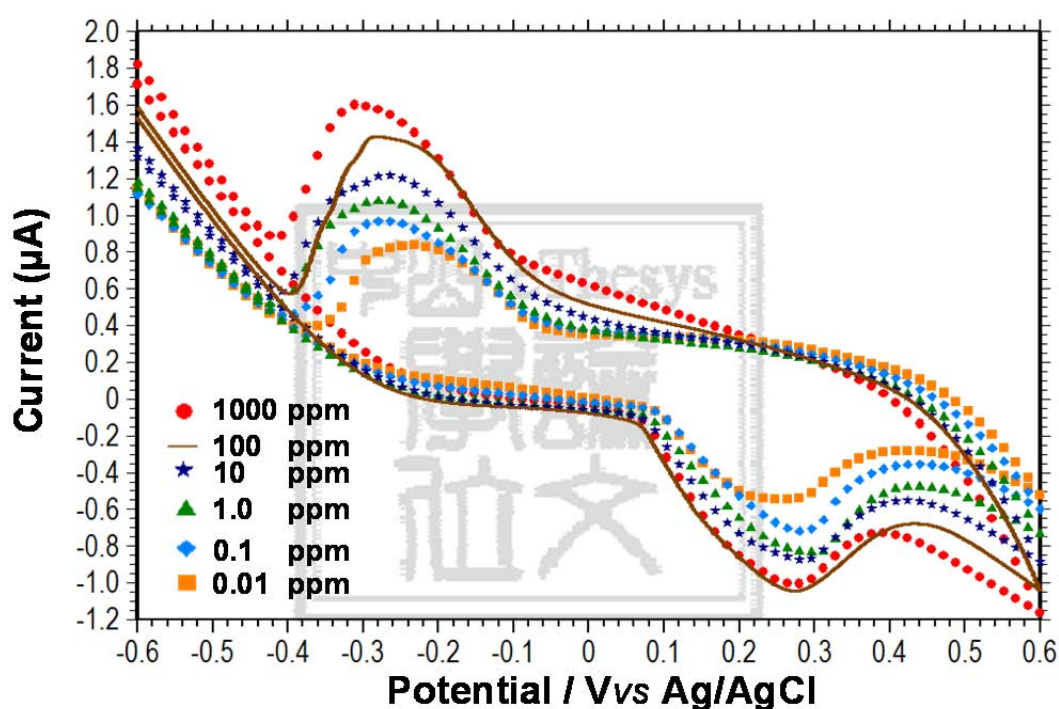


圖 4-3 製作的離子選擇電極感測器，經由循環伏安法來量測不同的銨離子濃度。

4.1.4 離子選擇電極檢測極限

本研究使用離子選擇電極進行電化學偵測，如圖 4-4 所示，在不同銨離子濃度下，量測樣本電流訊號變化，其中樣本溶液的濃度從 10^{-4} 到 10^3 ppm。其中，在實驗進行過程中，每一組樣本濃度所量測到的誤差線，都是取了超過四個的電流訊號變化作紀錄。從數據圖中的檢量線可以發現，本研究所使用的離子感測器，在

其量測的濃度範圍內，具有良好的線性關係，其線性程度達 $R^2=0.9689$ 。此外，每一個樣本濃度，其誤差線的變化幅度很小，證明了本研究提出的感測器於濃度範圍內，具有良好的再現性。值得注意的是，本研究製作的感測器，其檢測濃度範圍，比起傳統商業化的離子感測器，其檢測的極限大大的提升，而傳統 ISE 的檢測範圍介於 10^{-1} 到 10^4 ppm。特別是本研究提出的感測器的最小偵測極限是 0.1 ppb，相比市售感測器的檢測極限 0.1 ppm，其偵測濃度遠遠的小於大部分商業離子感測器。換句話說，實驗結果證實了在管道內，固定的離子選擇薄膜，其薄膜厚度越薄及薄膜感測區域越大，可以顯著的改善感測的性能。樣本溶液中的銨離子，於室內溫度的條件下，滲透到離子選擇薄膜，而造成的電流訊號變化，與分析樣本濃度成正相關。因此，從實驗結果圖可以得到好的線性曲線，也確定在微量的樣本溶液體積下，使用 ISE 微流體系統，可以成功實現高靈敏的電化學檢測。

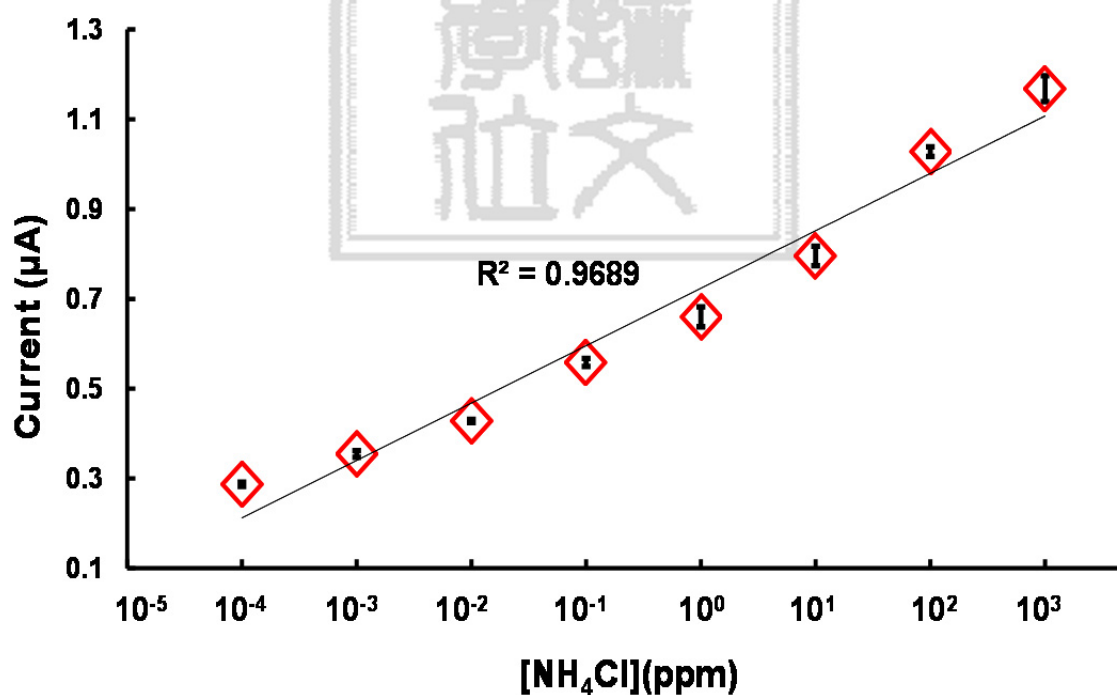


圖 4-4 使用離子選擇電極感測器，來量測不同銨離子濃度的氯化銨樣本溶液。

4.1.5 離子干擾特性評估

離子的選擇性是離子感測器的一個重要議題，其中製作的離子選擇薄膜不容易做到，只針對特定離子選擇，而不受其他混和離子的影響。因此，需要評估它種離子的干擾程度所造成的誤差，是否會影響其檢測性能；本實驗的目的在於討論離子選擇電極在不同離子干擾的條件下，其電流訊號的反應特性。故使用不同的干擾源，分別為鈉離子與鉀離子，將其配製成不同比例的離子溶液，而五個樣本溶液分別是氯化銨、氯化鉀、溴化鈉、氯化銨:氯化鉀(9:1)以及氯化銨:溴化鈉(9:1)，來進行一系列的感測實驗，固定干擾離子濃度而改變受測離子濃度，來量測不同濃度比例之變化。

圖 4-5 所示，在量測氯化鉀和溴化鈉兩個離子溶液時，可以由曲線圖中發現，氯化鉀在濃度 0.1 到 1 ppm 間，其電流訊號變化不大；而溴化鈉溶液則是在濃度 0.1 到 10 ppm 之間，其電流反應的值變化不大，但兩個干擾離子溶液在高濃度 100 ppm 範圍下，其電流反應會隨著濃度的提高有著明顯增加，間接證明了離子選擇薄膜，對於氯化鉀和溴化鈉的鈉與鉀離子，在低濃度的範圍內，受到干擾離子的影響比較小，但是隨著濃度的提高，干擾離子數量增加，鈉離子與鉀離子會滲透到離子選擇薄膜，而擴散過去造成電流的變化。

因此，本研究做了一組離子干擾對比實驗，一個是不添加干擾離子的氯化銨溶液，另外兩個離子干擾溶液的配製，則是以比例 9:1 來混和氯化銨跟兩個干擾源溴化鈉與氯化鉀，因為上述實驗發現在干擾離子濃度 100 ppm 時，離子選擇薄膜會受干擾離子滲透，造成電流訊號變化；因此，固定添加的干擾離子溶液濃度為 100 ppm，預期所量測到的離子混和溶液，其濃度對應到電流訊號的變化，應該要小於無添加干擾離子的氯化銨溶液。最後，從實驗結果圖發現，量測三個離子混和液得到的曲線圖，與所預期的趨勢符合，兩個添加干擾離子的混和液的電流訊號皆低於氯化銨溶液，可以證明此離子選擇薄膜對鈉與鉀干擾離子的選擇性，在大於

濃度 100 ppm 時，會對量測的電流訊號造成誤差。因此，研究結果證實此離子選擇薄膜具有良好的選擇性，而且可以應用到電化學檢測電極。

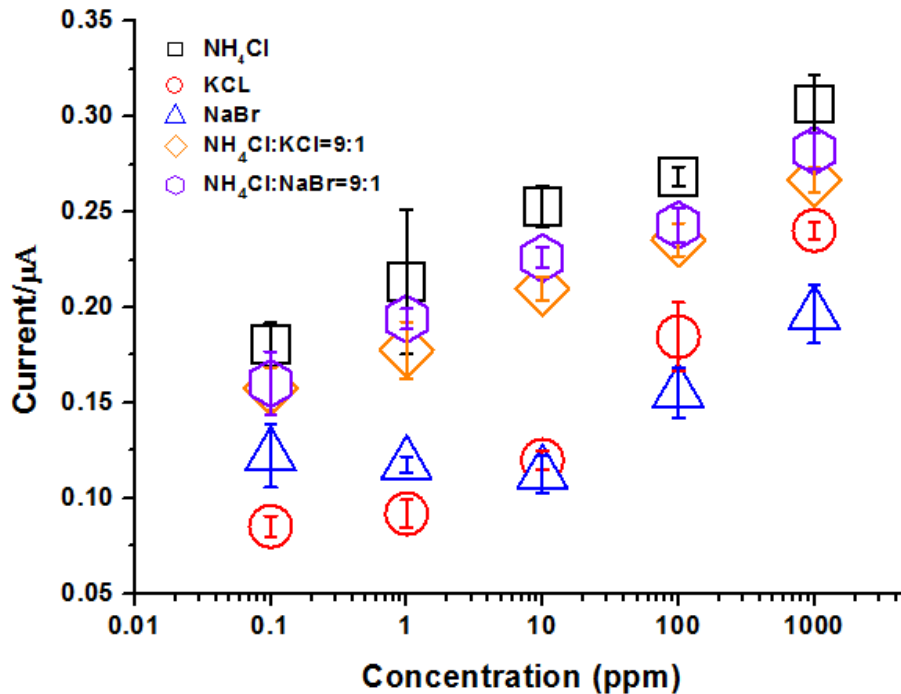


圖 4-5 使用銨離子選擇電極，將等比例 9:1 鈉與鉀干擾離子，添加在氯化銨樣本溶液中，進行離子干擾測試。

4.1.6 離子選擇電極反應時間量測

圖 4-6 所示為電流訊號對應反應時間曲線圖，使用製備離子選擇薄膜的微流體晶片，進行樣本溶液的量測，量測氯化銨溶液，濃度範圍從 0.01 到 1 ppm。實驗進行過程中需要注意，於樣本量測完後引入下個樣本前，需要先使用去離子水將晶片管道沖洗乾淨，避免管道殘留廢液。實驗結果顯示了，使用晶片量測氯化銨樣本溶液，於濃度 1 ppm 下，其反應達到 95% 的電流值的時間只需要 2.4 秒，而其餘樣本濃度下的電流反應時間，皆小於 4 秒。證明了隨著樣本溶液的濃度上升，其電流響應的反應時間提高，相比於商業的感測設備，其所需花的時間可能為幾

十秒鐘甚至幾分鐘，電極反應速度明顯提升。

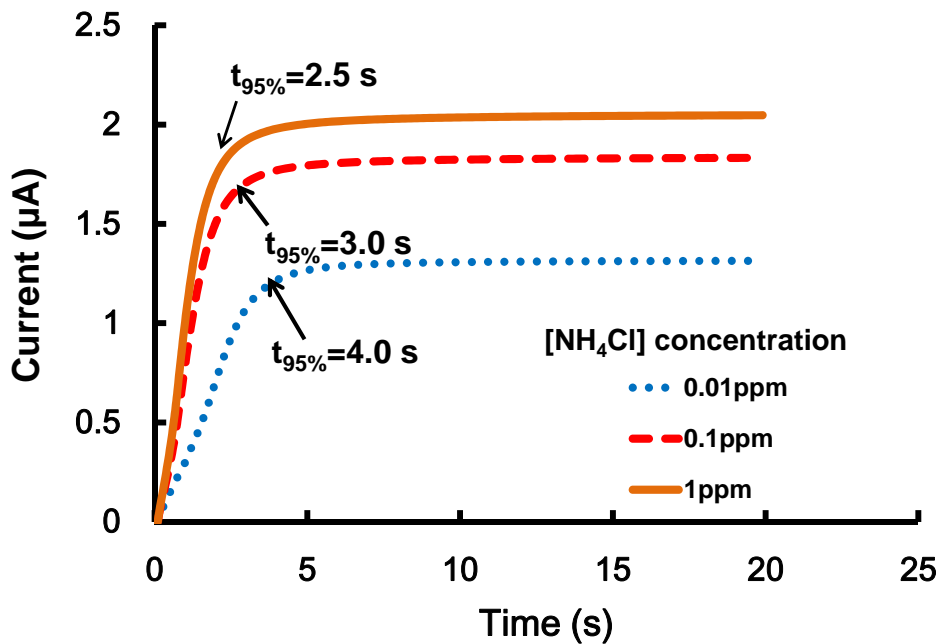


圖 4-6 使用銨離子選擇電極感測器，量測不同濃度的氯化銨樣本溶液，比較電流訊號的反應時間。

4.1.7 離子選擇膜厚評估

在使用感測器偵測樣本時，其感測能力與靈敏度是很重要的，因此改善離子選擇薄膜厚度，促使離子通過薄膜的時間減短，來提升晶片感測效能。本研究的薄膜製備，是將總重 400 毫克的組成薄膜的藥品，溶解在不同量的 THF 溶劑中，一般來說，添加 THF 到 PVC 薄膜的量，會直接影響到成形的離子選擇薄膜的厚度。因此，本研究使用不同體積的 THF 溶劑，添加到 PVC 配方中製作不同厚度的薄膜，而添加溶劑的量範圍分別從 2.0 ml ~ 8.0 ml。其所添加的 THF 體積，從 2.0 ml 到 8.0 ml，其佔總 PVC 薄膜的重量百分比為 84% 到 95%。藉由 PVC 薄膜的特性，只需要控制添加的溶劑量，即可以改變在晶片中固定的薄膜厚度。圖 4-7 所示，為在不同體積的 THF 溶劑下，所量測到不同的薄膜厚度圖，圖中可以觀察到使用顯微

鏡拍攝的薄膜厚度，最薄可以到小於 $10\ \mu\text{m}$ ，而管道內兩個微結構的間距為 $20\ \mu\text{m}$ 。從上視圖可以明顯地觀察到薄膜的厚度，並隨著添加得溶劑增加而變薄，而且其成形的薄膜厚度與 THF 溶劑添加的體積呈正相關。實驗結果顯示，製作成型的離子選擇薄膜的厚度，經由控制添加溶劑的量，可以得到的一系列不同的薄膜厚度，其薄膜厚度的範圍從 $40\ \mu\text{m}$ 到 $10\ \mu\text{m}$ 。

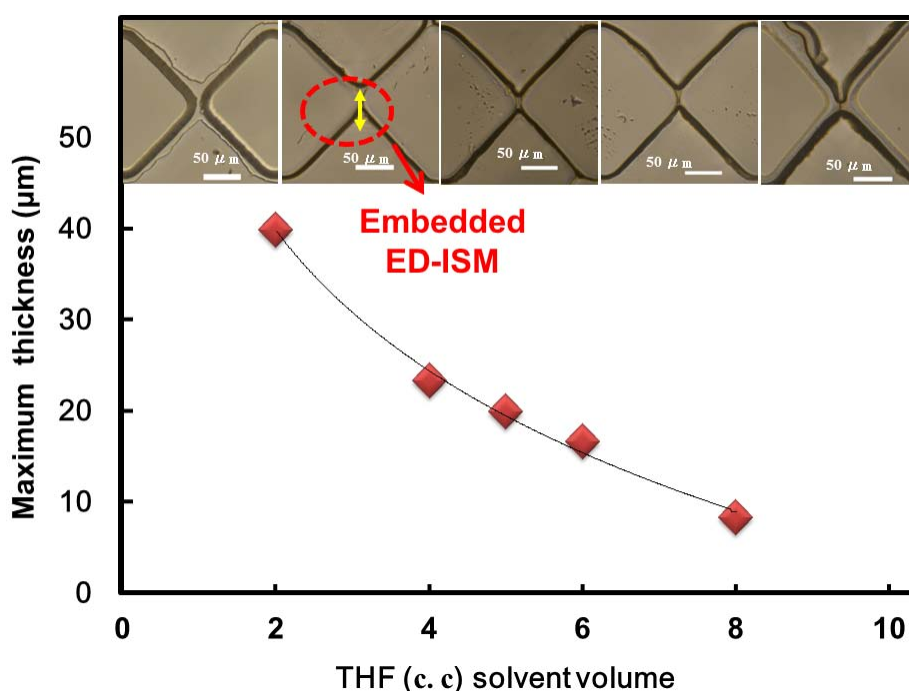


圖 4-7 量測在添加不同體積的溶劑下，其離子選擇薄膜厚度的變化，OM 圖則為在不同條件下所成形的薄膜厚度。

4.1.8 不同厚度薄膜反應時間

本章節量測於添加不同溶劑在 PVC 薄膜中，所製造出不同的薄膜厚度，其在電化學檢測時對電流訊號有無影響，如圖 4-8 所示，所添加的 THF 溶劑量分別是 2 ml 與 8 ml，從圖 4-7 的曲線可以得知其薄膜厚度應為 $40\ \mu\text{m}$ 與 $10\ \mu\text{m}$ ，而實驗過程中量測的樣本濃度為 1.0 ppm 的尿素溶液。從實驗結果可以得知，在厚度較薄的薄膜條件下，檢測濃度 1 ppm 的尿素，其電流值達到反應的 95% 只需要 8 秒，跟

市售的離子選擇電極量測比起來，明顯比較快速(大約 1 分鐘)。而在厚的薄膜下，檢測濃度 1 ppm 的尿素，其電流值達到反應的 95% 需要 22 秒，明顯反應較厚度較薄的薄膜慢。然而，於薄膜添加的溶劑體積超過 10 ml 下，其薄膜特性會變得不穩定而且會有洩漏的可能，因此製作薄膜所添加的溶劑體積，在 8 ml 以內是比較穩定可靠的。

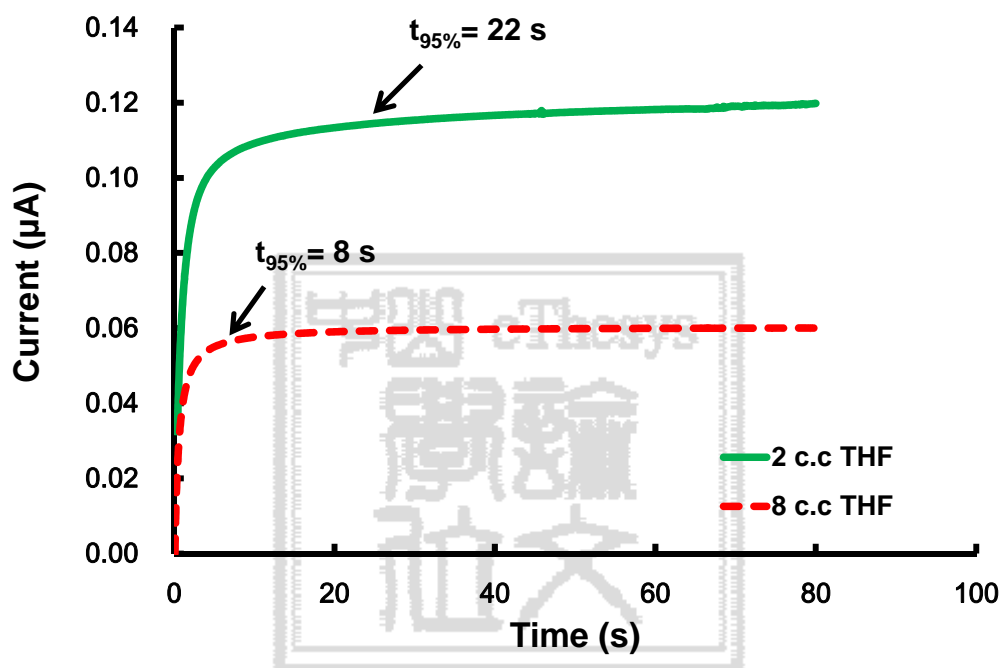


圖 4-8 量測在添加不同溶劑下，所製作的薄膜厚度相對於電流訊號反應。

4.2 生物樣本之偵測評估

本研究在進行生物樣本檢測時，使用特定酵素酶來催化生物樣本，因此，本實驗使用製作的離子選擇薄膜，在薄膜一側摻雜酵素酶，於生物樣本通過時即時進行生化反應，量測其催化生成的產物造成的電流訊號。而酵素摻雜的優點在於酵素可以重複使用，固定化之後酵素的活性也可以保持穩定，以及酵素不會殘留在產物當中而造成實驗的量測誤差，使酵素反應可以連續進行，實現晶片製程自動化。圖 4-9 所示為在離子選擇薄膜內摻雜酵素，藉由表面張力和管道內的微結構，

將酵素與離子選擇薄膜固定在晶片中。將定量的 PVC 溶劑摻雜尿素酶與銨離子載體，藉由幫浦的真空吸力與剪切流的輔助，附著到微結構上並形成一層薄薄的 PVC 薄膜。晶片設計的上下兩管道分別是作為樣品溶液和電解液，在進行電化學實驗後，會使用去離子水來沖洗管道，避免廢液殘留。藉由此方法，進行實驗時於入口端注入生物樣本，樣本接觸有摻雜酵素的離子薄膜時，給予樣本催化反應時間，反應完全產生的產物經由薄膜滲透，經由電化學可以檢測到電流訊號。

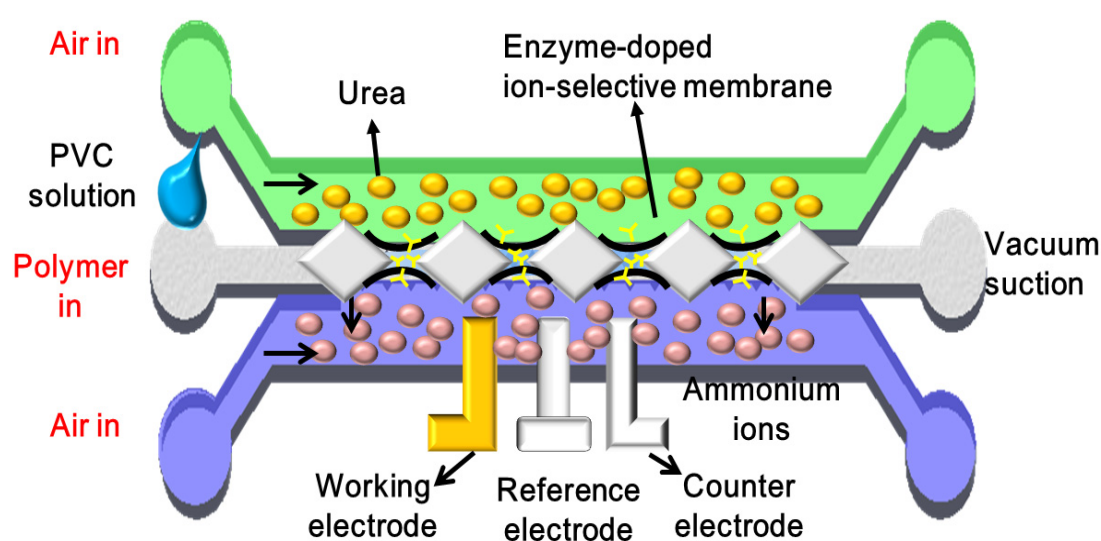


圖 4-9 為使用真空幫浦於出口端吸取，藉由表面張力和微結構，在微流體晶片固定有摻雜酵素酶的離子選擇薄膜示意圖。

4.2.1 尿素表面形貌探討

在本節討論將具有生物催化功能的酵素固定於感測的薄膜內，藉由觀察 SEM 圖來確認，摻雜的酵素酶在薄膜表面的分布情形，以及酵素固定在薄膜表面的穩定程度。圖 4-10 (A)所介紹的是從有摻雜酵素酶的薄膜表面，利用電子顯微鏡觀察薄膜表面形貌，從圖中除了可以發現，薄膜的表面結構呈現先前 PVC 材質的多孔隙的樣貌，使用不同倍率觀察薄膜表面，可以觀察到表面均勻的分布了摻雜的尿

素酶。在圖 4-10 (B)可以從 SEM 圖中明顯的看到，與離子選擇薄膜固定在一起的尿素酶結構，圖中也可以發現有大量的尿素酶於薄膜表面，可以增加接觸的表面積，讓尿素樣本能快速且完全的進行生化反應，將尿素轉換成銨離子產物，證實可以在薄膜內摻雜酵素，之後可以利用電化學來量測生物樣本。

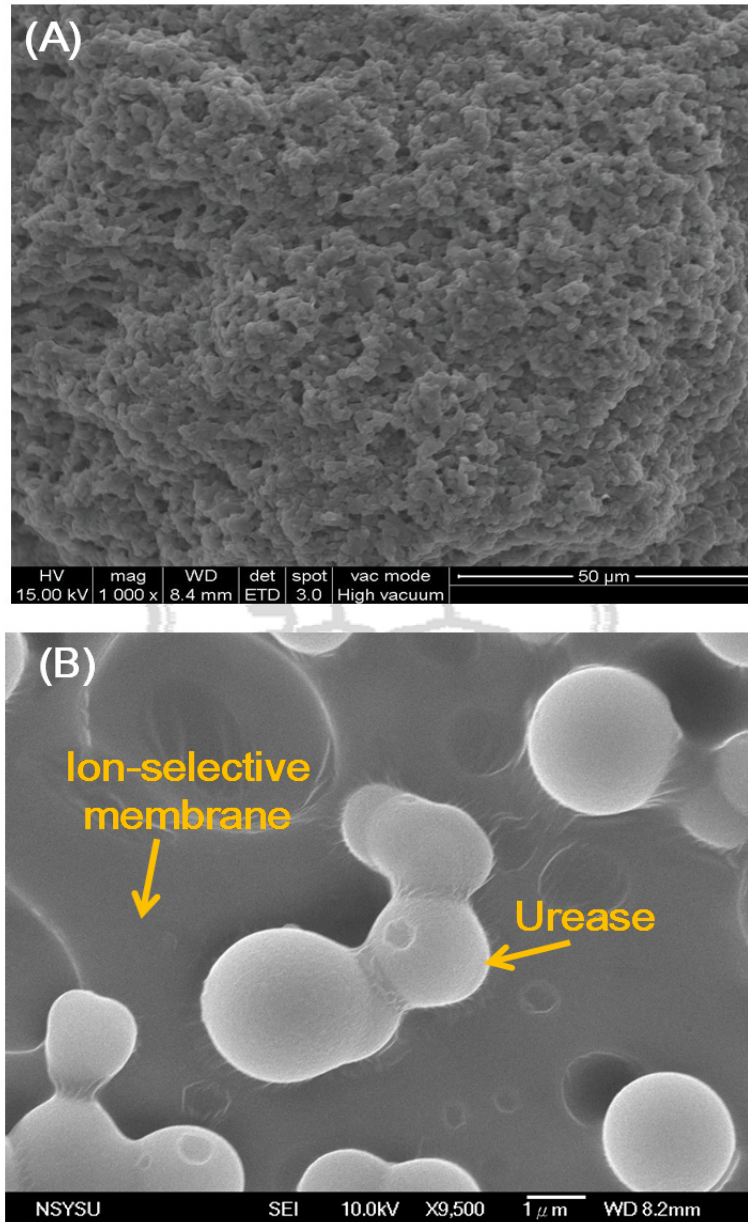


圖 4-10 為使用電子顯微鏡來拍攝摻雜酵素的離子選擇薄膜，(A)使用電子顯微鏡拍攝離子選擇薄膜的表面形貌，(B)觀察暴露在薄膜表面的尿素酶表面形貌。

4.2.2 酵素薄膜即時催化反應評估

酵素感測器其所添加的酵素對其生物樣本產生催化反應，需要足夠的反應時間才能反應完全，而這關係到感測器的感測的效能以及靈敏度，因此在本章節將氯化鉀、氯化銨與尿素配成四個不同的混和溶液，固定混合後的濃度為 1 ppm，分別是氯化銨與尿素跟氯化鉀混和，與尿素及氯化鉀溶液。圖 4-11 為使用摻雜尿素酶的離子選擇薄膜，量測不同樣本混和溶液的電流訊號圖，由圖中曲線可以發現，於氯化鉀溶液時其反應時間需要很長時間才滲透過離子選擇薄膜，但在量測尿素時，經由尿素酶催化需要 9 秒達到反應的 95% 電流值，從這邊也可以得知氯化銨混和液，因為少了催化作用所需的反應時間，因此較尿素反應時間更快，也可以比較曲線的反應時間，從而得知酵素催化反應所需要的時間。

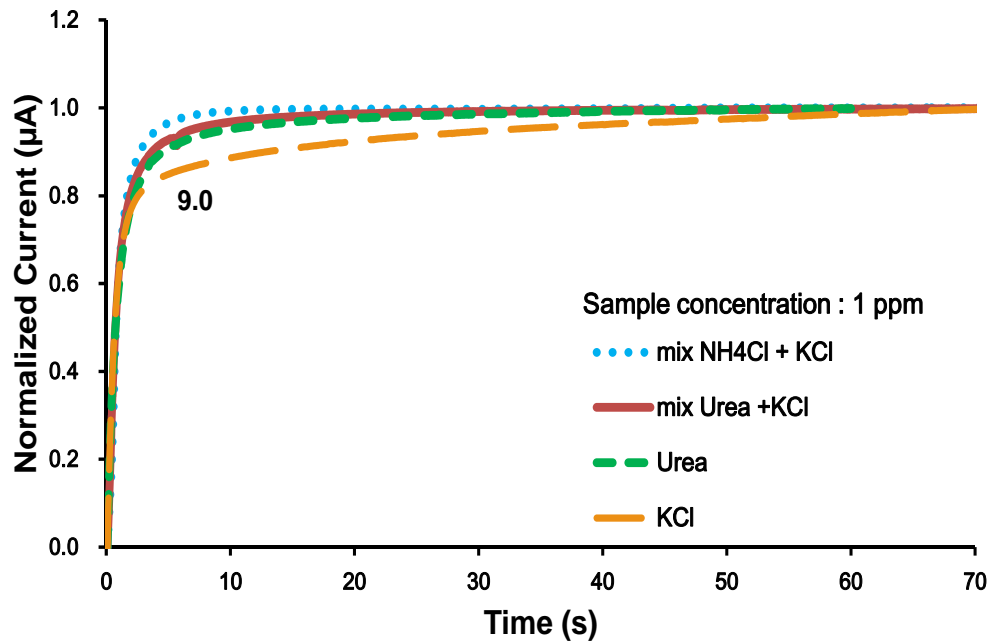


圖 4-11 評估酵素摻雜薄膜，其催化生物樣本的反應時間。

4.2.3 電化學於尿素檢測

製作酵素摻雜的離子選擇電極系統，須先進行電化學訊號分析，方可評估其量測的感測效能，本章節檢測的生物樣本為不同濃度的尿素溶液，利用循環伏安法來偵測樣本溶液的濃度。圖 4-12 所示為離子選擇薄膜感測器，使用循環伏安法掃描偵測尿素樣本溶液，其尿素濃度範圍從 10^{-1} 到 10^3 ppm。圖中為尿素樣本氧化還原時產生之電流訊號，掃描的電位範圍是從 0.6 伏特掃到 -0.6 伏特，圖中可以明顯看到氧化還原的訊號，從實驗數據的曲線中可以發現，於不同的樣本濃度下，其得到的氧化還原電流訊號也明顯的不同，證明了摻雜酵素於離子選擇薄膜在微流體晶片中，可以即時進行生物催化進而量測尿素溶液。實驗進行中，量測的尿素樣本濃度範圍是從 0.1 ppm 到 1000 ppm，再經由工作和參考電極來獲得電流訊號。從圖中也可以觀察到，隨著樣本溶液的濃度增加，其產生的氧化還原電流也會隨著增加。

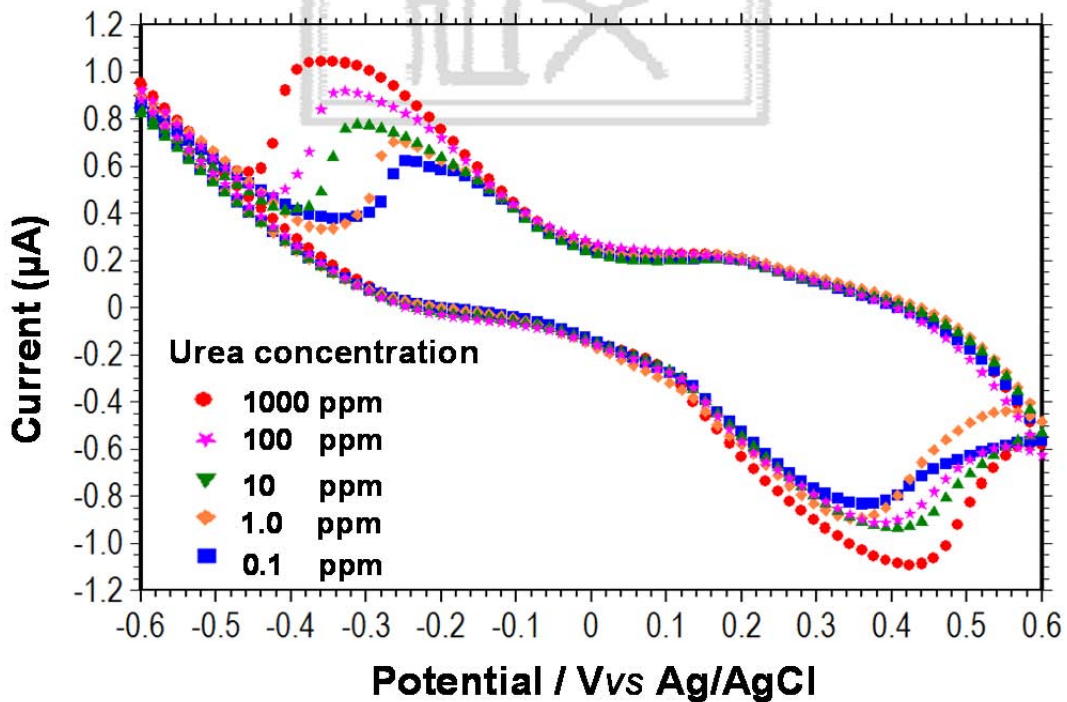


圖 4-12 使用循環伏安法量測在不同濃度的尿素樣本的氧化還原訊號。

4.2.4 尿素酶摻雜電極檢測極限

本節敘述尿素經電化學檢測後，經循環伏安法掃描過後的尿素樣本訊號整理成樣本濃度對應到電流值的檢量線，如圖 4-13 所示為不同濃度的尿素樣本對應電流值的曲線圖，從圖中可以發現，尿素濃度範圍從 0.1 ppm 到 1000 ppm 間，每一組樣本濃度量測到的誤差線，都是取了超過四個的電流訊號變化作紀錄，存在一個良好的線性關係，而且其誤差線的變化幅度很小，也證明了使用電化學檢測，可以在很大的濃度範圍下進行檢測，且本研究提出的感測器於濃度範圍內具有良好的再現性。其濃度曲線線性範圍($R^2 = 0.9102$)介於 0.1 到 1000 ppm，所以其檢測極限最低可以到 0.1 ppm，而且 S/N 的訊雜比為 3。此研究結果顯示，對於這個開發的晶片來說，添加的酵素酶與製作的離子選擇薄膜的厚度，對感測器的效能在反應時間與線性範圍曲線有明顯的影響。

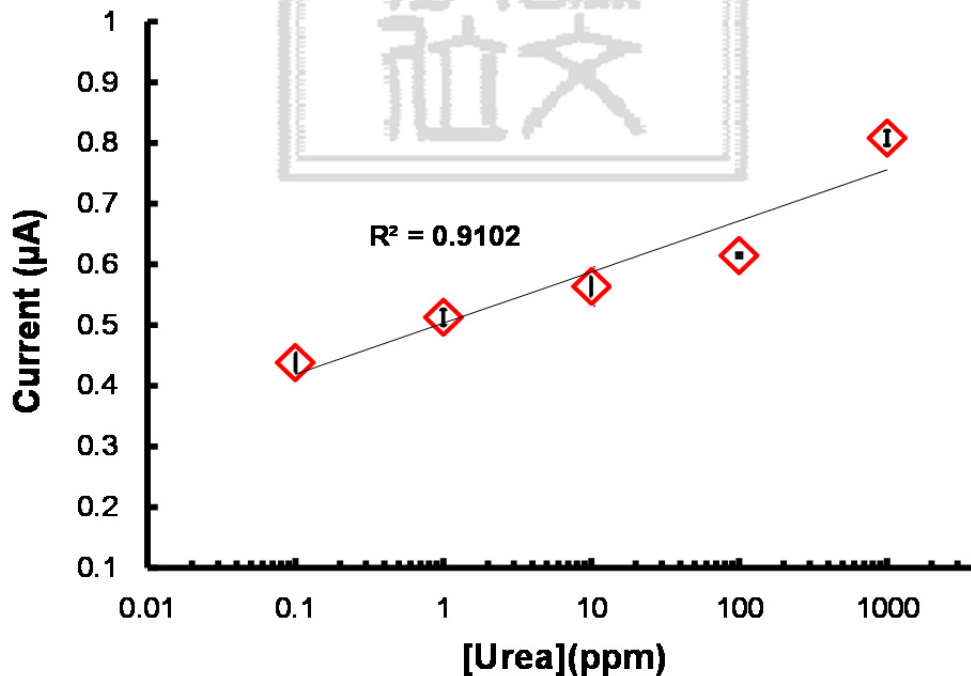


圖 4-13 使用酵素摻雜離子選擇薄膜感測器，來量測尿素生物樣本溶液，在不同的濃度下的電流訊號。

4.2.5 血清中尿素偵測

本研究開發的尿素感測器，終極目標是能應用於人體血清內的尿素濃度即時檢測，因此先前實驗證明能在尿素溶液裡成功檢測到訊號，所以在此章節採用三位人體血清樣本，希望能成功量測到血液中尿素濃度，與其對應電流訊號的檢量線。在此先將三個血清樣本送至醫檢所，經由精密的儀器檢測得到各個血清內的尿素濃度，濃度分別是 128 ppm、231 ppm 及 278 ppm。將已知濃度的血清樣本，使用酵素感測器進行量測，將得到的電流訊號繪製於圖 4-14，而因為正常人體內血清內的尿素濃度一般不超過 500 ppm，因此將血清樣本經過 spike 過後，其濃度分別為 512 ppm、578 ppm 及 768 ppm，將所得的電流訊號對應到血清的尿素濃度繪製成檢量線，其檢測濃度範圍從 128 ppm 到 768 ppm，從圖中可以發現其量測曲線在濃度範圍內有良好的線性關係($R^2 = 0.9741$)，也證明了使用電化學檢測可以檢測血清樣本內的尿素濃度，顯示製作的感測器於人體血清尿素檢測的潛力。

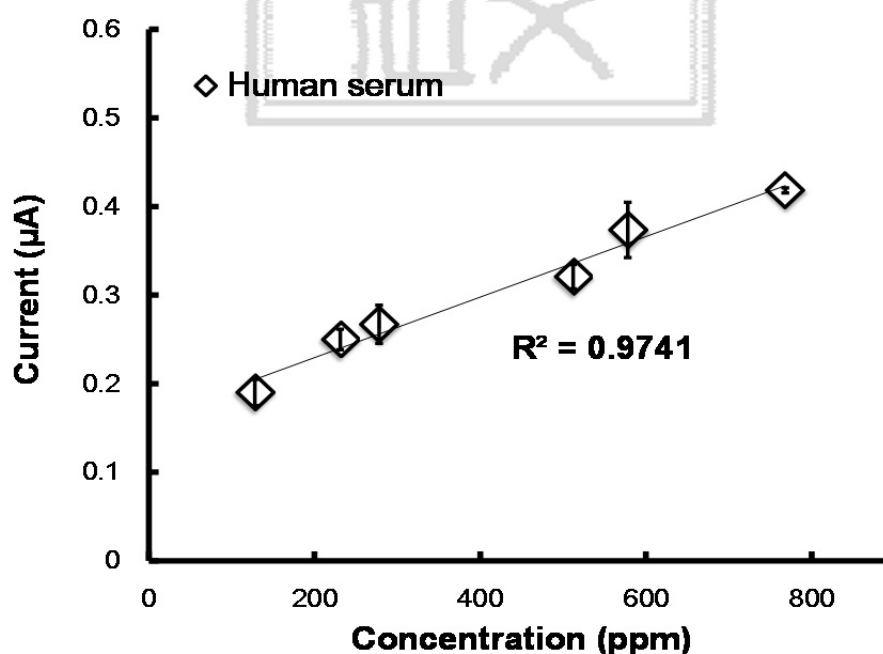


圖 4-14 使用酵素感測器評估於人體血清尿素檢測的效能，量測尿素濃度對於電流響應之檢量線。

4.2.6 肌酐酸酶表面形貌評估

在本章節討論生物樣本肌酐酸的檢測，而血液中的肌酐酸主要是來自於身體肌肉活動的代謝產物，且全都經腎臟由尿液排泄。因此，腎功能有問題，無法完全排出每日所產生的肌酐酸，即會造成血中肌酐酸濃度上升的現象。本實驗將肌酐酸的酵素酶固定於感測的薄膜內，藉由觀察 SEM 圖來確認肌酐酸酶有無均勻分布於薄膜表面。圖 4-15 (A) 所介紹的是從有摻雜酵素酶的薄膜表面，利用電子顯微鏡觀察薄膜表面形貌，從圖中除了可以發現薄膜表面均勻的分布摻雜的肌酐酶於其中，在圖 4-15 (B) 可以從 SEM 圖中明顯的看到，跟離子選擇薄膜固定在一起的肌酐酶結構，圖中也可以發現有大量的肌酐酶站在薄膜表面，因此可以增加接觸的表面積，讓肌酐酸樣本能快速且完全的進行生化反應，證實薄膜內摻雜酵素的方法也能應用在其他酵素酶上。

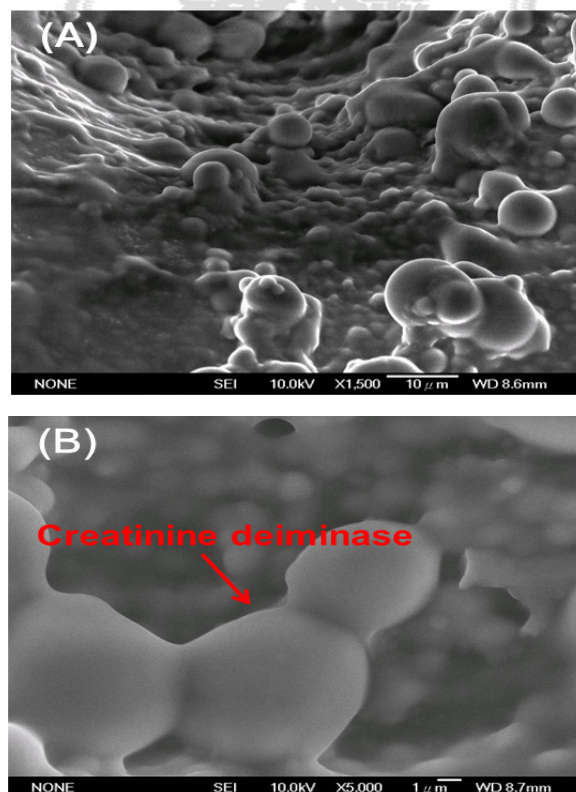


圖 4-15 使用電子顯微鏡拍攝摻雜在薄膜表面的肌酐酵素，(A)酵素摻雜薄膜的表面形貌，(B)使用大倍率觀察薄膜表面的肌酐酶表面形貌。

4.2.7 偵測極限評估

由圖 4-16 曲線所知肌酸樣本經過電化學檢測後，將其氧化的訊號與樣本濃度繪製成線性的曲線，從圖中可以發現，肌酸酐的濃度範圍從 0.1 ppm 到 1000 ppm 間，期間每一組樣本濃度量測到的誤差線，其誤差線的變化幅度很小，存在一個良好的線性關係，也證明了使用電化學檢測可以成功量測到肌酸酐樣本溶液。目前酵素感測電極相比本實驗室開發的可酵素摻雜的離子選擇電極，本研究提出較方便且快速的方法而且有效提升電化學偵測靈敏度，也可成功檢測人體血清樣本，未來有機會於全血樣本進行檢測分析。

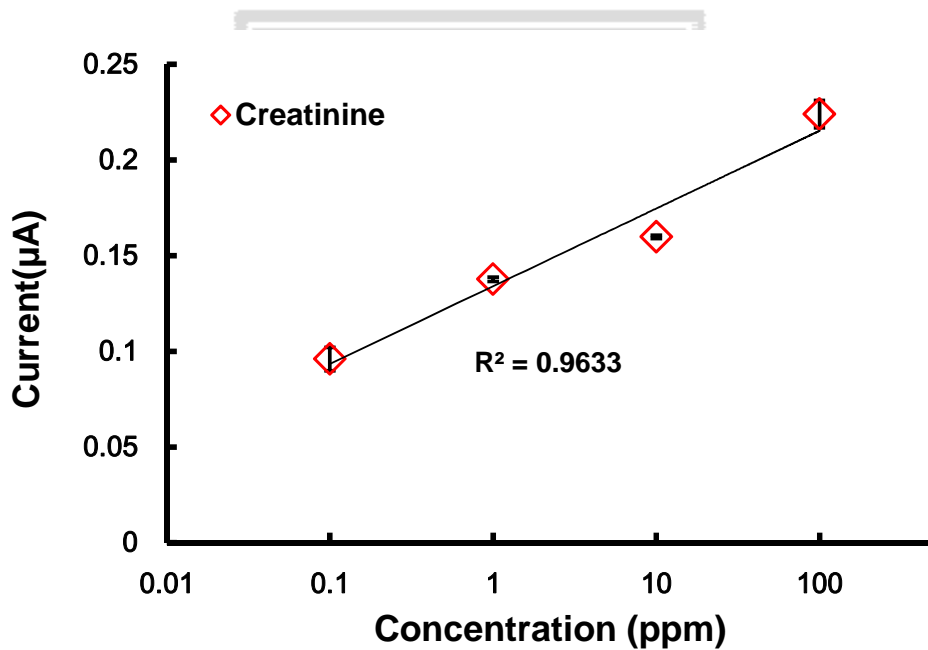


圖 4-16 使用酵素感測器評估肌酸酐檢測的效能，量測肌酸酐濃度對於電流響應之檢量線。

第五章 結論與未來展望

5.1 結論

本研究提出一個低成本與創新的微流體感測器，結合多種離子載體摻雜於PVC材質的離子選擇薄膜，應用於偵測銨離子。本研究成功發展一個微流體系統，將離子選擇電極微型化整合於管道系統中，其中離子選擇電極的感測薄膜部分，藉由管道內微結構的設計與微幫浦吸取產生的表面張力，將離子選擇薄膜固定在晶片中，應用電化學檢測系統。

製作好的銨離子選擇電極，除了可用於檢測銨離子的濃度外，本研究進一步的將生物分子披覆在離子選擇薄膜表面，而晶片內尿素樣本會被尿素酶所催化，反應後生成的產物中含有銨離子，經由離子選擇薄膜滲透過去，並於晶片電極處進行電化學偵測。

本實驗分析離子選擇電極效能，觀察離子選擇薄膜結構與表面形貌，使用電化學量測樣本濃度、感測晶片的檢測極限，以及評估共存離子造成的干擾誤差，並對薄膜厚度與反應時間做量測。藉由尿素酶摻雜離子選擇薄膜，可即時進行尿素的量測，除了對感測晶片做電化學檢測、反應時間以及感測器的檢測極限外，使用人體的血清量測尿素值進行驗證。

1. 本研究量測離子選擇電極的工作性能，評估在沒有使用離子選擇薄膜下的電極感測能力，經由電化學來分析樣品在電極產生的氧化還原訊號，經實驗證實，在不使用離子選擇薄膜的情況下，晶片量測結果明顯不穩定，因此於晶片中固定離子感測薄膜，使用循環伏安法檢測下，可以得到明顯的氧化還原訊號，結果表示添加離子感測膜可以增加晶片對離子的選擇性，也可以有效提高晶片的感測能力。

2. 架設微幫浦利用管道內表面張力與剪切流，將離子選擇薄膜固定在管道微結構間，從電子顯微鏡拍攝的 SEM 圖可以發現，離子選擇薄膜有成功的固定在管道內，其中薄膜的表面呈現多孔隙的結構，有利於離子的擴散。
3. 本研究製作好的銨離子選擇電極，經電化學循環伏安法的量測結果發現，於氯化銨樣本溶液下，在不同的樣本濃度，其得到的氧化還原電流訊號也明顯的不同，量測到的電流響應，會隨著樣本溶液濃度的增加，也隨之升高。從實驗量測得知，在濃度範圍 10^{-4} 到 10^3 ppm 內，具有良好的線性關係，其濃度的檢測極限為 0.1 ppb，感測能力較一般離子電極更好。
4. 本研究使用不同的干擾源，如鈉離子與鉀離子來調配成不同比例的離子溶液，進行一系列的感測實驗，固定干擾離子濃度而改變受測離子濃度，來量測不同濃度比例之變化，從實驗結果得知干擾離子在低濃度範圍 0.1 到 1 ppm 間，對感測晶片影響不大，此離子選擇薄膜對鈉與鉀干擾離子的選擇性，在大於濃度 100 ppm 時，會對量測的電流訊號造成誤差。
5. 本研究使用製作的感測晶片，量測濃度範圍 10^{-2} 到 1 ppm 的氯化銨溶液，於濃度 1 ppm 的氯化銨溶液，銨離子通過選擇薄膜只需要 2.4 秒，其餘兩個樣本濃度下的電流反應時間，其反應時間平均皆小於 4 秒，相比商業設備的反應時間，反應速度明顯提升。進一步改善離子選擇薄膜的厚度，減短離子通過薄膜的時間，提升感測晶片效能，藉由控制添加的溶劑體積，製作出的薄膜厚度，最薄厚度可以達到 10 μm 。

6. 本研究於銨離子選擇薄膜上摻雜尿素酶，而添加的酵素會對生物樣本發生反應，使用電化學檢測來分析訊號，對其感測效能進行評估，藉由循環伏安法可以在濃度範圍 10^{-1} 到 10^3 ppm，得到明顯的氧化還原電流訊號，其濃度曲線的線性範圍 $R^2 = 0.91$ 。
7. 本研究開發的尿素感測器，能成功的檢測人體血清內的尿素濃度，其檢測的濃度範圍從 128 ppm 到 768 ppm，因為人體血清裡面含有很多干擾物質，然而製作出的離子感測器能穩定的量測到訊號，證明離子選擇薄膜有良好的選擇性，量測的結果有良好的線性關係($R^2 = 0.9741$)，未來可以應用到生醫檢測上。



5.2 未來展望

本研究中，以製作的銨離子選擇薄膜組合金屬電極，發展一銨離子選擇感測器。其研究結果顯示，使用 PVC 材質製作的離子選擇薄膜，藉由真空幫浦固定於感測晶片中，除了能夠有效提高感測的效能，減少外部干擾離子造成的誤差。可以應用的層面包含工業分析與環境檢測等，而且隨著科技進步，大部分人越來越注重身體的健康，因此可以將銨離子感測器，在感測薄膜中摻雜酵素分子，發展多功能型的生物感測器。其感測器中摻雜的尿素酶與肌酐酶，可以製作成尿素與肌酐感測器，整合對於腎臟器官的檢測分析。

目前市面上，最成功的生物感測器應屬血糖感測器，其檢測方法非常簡單，僅需要將一滴血，置於可拋式電極晶片上即可完成檢查，使的病患願意積極配合治療，有利欲對病情的控制。因此，發展快速、準確、攜帶方便，且易於使用的生物感測器，對於疾病的檢測為不可或缺的工具，具有市場的潛力。

因此，在本研究感測器架構底下，希望搭配摻雜的酵素的感測薄膜，直接量測血液中尿素與肌酐酸的含量，提供病患關於病情控制的資訊，做為可以連續偵測的生物感測器。拜科技之賜，目前智慧型手機已是人手一隻，若是能發展一套分析血液訊號的 App 軟體，搭配感測器的讀取電極，插入感測器讀取元件，即可以隨時隨地做自我檢查，有助於預防極減緩病症發作。

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, 1997.
- [2] 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.
- [3] P. D'Orazio, "Biosensors in clinical chemistry," *Clinica Chimica Acta*, vol. 334, pp. 41-69, 2003.
- [4] 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.
- [5] W. E. Morf, "The principles of ion-selective electrodes and of membrane transport," vol. 246: Elsevier New York:, 1981.
- [6] E. Bakker, P. Bühlmann, and E. Pretsch, "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics," *Chemical Reviews*, vol. 97, pp. 3083-3132, 1997.
- [7] 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, pp. 1593-1687, 1998.
- [8] E. Bakker, P. Bühlmann, and E. Pretsch, "Polymer Membrane Ion-Selective Electrodes—What are the Limits?," *Electroanalysis*, vol. 11, pp. 915-933, 1999.
- [9] E. Bakker and E. Pretsch, "Peer Reviewed: The new wave of ion-selective electrodes," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 420-426, 2002.
- [10] D. Gourley, "Glass Electrodes for Hydrogen and Other Cations. Principles and Practice," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 10, pp. 990-990, 1967.
- [11] C. Fuchs, "Solid-state ion-selective electrodes in clinical chemistry," *Koryta, J.: Medical and biological applications of electrochemical devices*, pp. 93-108, 1980.
- [12] E. Bakker, "Selectivity of liquid membrane ion - selective electrodes," *Electroanalysis*, vol. 9, pp. 7-12, 1997.
- [13] 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.
- [14] 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 *Proceedings MicroTAS '12 Conference*, 2012.
- [15] 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, 2008.
- [16] Y. Chuang, S. Ju, and C. Lin, "Novel palladium nanorod electrode ensemble for electrochemical evaluation of hydrogen adsorption," in *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference (TRANSDUCERS), 2011 16th International*, 2011, pp. 166-169.
- [17] J. W. Ross, "Calcium-Selective Electrode with Liquid Ion Exchanger," *Science*, vol. 156, pp. 1378-1379, 1967.
- [18] G. Goodfellow and H. Webber, "The determination of ammonia in boiler feed-water with an ammonium-selective glass electrode," *Analyst*, vol. 97, pp. 95-103, 1972.
- [19] J. Wang, M. P. Chatrathi, B. M. Tian, and R. Polsky, "Microfabricated electrophoresis chips for simultaneous bioassays of glucose, uric acid, ascorbic acid, and acetaminophen," *Analytical Chemistry*, vol. 72, pp. 2514-2518, 2000.
- [20] K. T. Liao, C. M. Chen, H. J. Huang, and C. H. Lin, "Poly(methyl methacrylate) microchip device integrated with gold nanoelectrode ensemble for in-column biochemical reaction and electrochemical detection," *Journal of Chromatography A*, vol. 1165, pp. 213-218, 2007.
- [21] 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.
- [22] 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, 2009.
- [23] 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 *Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2013 IEEE 26th International Conference on*, 2013, pp. 1171-1174.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] P. D. Voegel and R. P. Baldwin, "Electrochemical detection in capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 18, pp. 2267-2278, 1997.
- [27] W. Vielstich, *Cyclic voltammetry*: Wiley Online Library, 2010.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] R. D. Johnson, V. G. Gavalas, S. Daunert, and L. G. Bachas, "Microfluidic ion-sensing devices," *Analytica Chimica Acta*, vol. 613, pp. 20-30, 2008.
- [33] P. S. Dittrich and A. Manz, "Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 5, pp. 210-218, 2006.
- [34] M. J. Madou, *Fundamentals of microfabrication: the science of miniaturization*: CRC Press LLC, 2002.
- [35] D. R. Reyes, D. Iossifidis, P. A. Auroux, and A. Manz, "Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 2623-2636, 2002.
- [36] H. Kido, M. Micic, D. Smith, J. Zoval, J. Norton, and M. Madou, "A novel, compact disk-like centrifugal microfluidics system for cell lysis and sample homogenization," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 58, pp. 44-51, 2007.
- [37] E. Dikici, L. Rowe, E. A. Moschou, A. Rothert, S. K. Deo, and S. Daunert, *Luminescent proteins: applications in microfluidics and miniaturized analytical systems*: Wiley VCH: Weinheim, Germany, 2006.
- [38] D. C. Duffy, H. L. Gillis, J. Lin, N. F. Sheppard, and G. J. Kellogg, "Microfabricated centrifugal microfluidic systems: characterization and multiple enzymatic assays," *Analytical Chemistry*, vol. 71, pp. 4669-4678, 1999.
- [39] S. C. Jakeway, A. J. de Mello, and E. L. Russell, "Miniaturized total analysis systems for biological analysis," *Fresenius' journal of analytical chemistry*, vol. 366, pp. 525-539, 2000.

- [40] P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M. R. Tam, and B. H. Weigl, "Microfluidic diagnostic technologies for global public health," *Nature*, vol. 442, pp. 412-418, 2006.
- [41] C. S. Effenhauser, G. J. Bruin, and A. Paulus, "Integrated chip-based capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 18, pp. 2203-2213, 1997.
- [42] E. A. Moschou, A. D. Nicholson, G. Jia, J. V. Zoval, M. J. Madou, L. G. Bachas, and S. Daunert, "Integration of microcolumns and microfluidic fractionators on multitasking centrifugal microfluidic platforms for the analysis of biomolecules," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 385, pp. 596-605, 2006.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] R. Tantra and A. Manz, "Integrated potentiometric detector for use in chip-based flow cells," *Analytical Chemistry*, vol. 72, pp. 2875-2878, 2000.
- [46] D. Qin, Y. Xia, J. A. Rogers, R. J. Jackman, X. M. Zhao, and G. M. Whitesides, "Microfabrication, microstructures and microsystems," *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science*, vol. 194, pp. 1-20, 1998.
- [47] 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.
- [48] H. Hisamoto, Y. Shimizu, K. Uchiyama, M. Tokeshi, Y. Kikutani, A. Hibara, and T. Kitamori, "Chemicofunctional membrane for integrated chemical processes on a microchip," *Analytical Chemistry*, vol. 75, pp. 350-354, 2003.
- [49] L. C. Clark and C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 102, pp. 29-45, 1962.
- [50] M. Gronow, "Biosensors," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 9, pp. 336-340, 1984.
- [51] M. Sidney. Jr. Morris, "Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism," *Annual Review of Nutrition*, vol. 22, pp. 87-105, 2002.
- [52] G. Palleschi, M. Mascini, E. Martinez-Fabregas, and S. Alegret, "Urea determination in human sera with an ammonium ion selective electrode made with solid inner electric contact and immobilised urease," *Analytical Letters*, vol. 21, pp. 1115-1129, 1988.

- [53] S. I. Sasaki, T. Amano, G. Monma, T. Otsuka, N. Iwasawa, D. Citterio, H. Hisamoto, and K. Suzuki, "Comparison of two molecular design strategies for the development of an ammonium ionophore more highly selective than nonactin," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 4845-4848, 2002.
- [54] 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.
- [55] G. Moody and J. Thomas, "Selectivity ratios/coefficients of selective ion sensitive electrodes," *Talanta*, vol. 18, pp. 1251-1252, 1971.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] 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. L83-L85, 1996.
- [60] U. Oesch, D. Ammann, and W. Simon, "Ion-selective membrane electrodes for clinical use," *Clinical Chemistry*, vol. 32, pp. 1448-1459, 1986.
- [61] 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.
- [62] R. Singhal, A. Gambhir, M. Pandey, S. Annapoorni, and B. Malhotra, "Immobilization of urease on poly (N-vinyl carbazole)/stearic acid Langmuir-Blodgett films for application to urea biosensor," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 17, pp. 697-703, 2002.
- [63] S. Xu, M. Wen, J. Li, S. Guo, M. Wang, Q. Du, J. Shen, Y. Zhang, and S. Jiang, "Structure and properties of electrically conducting composites consisting of alternating layers of pure polypropylene and polypropylene with a carbon black filler," *Polymer*, vol. 49, pp. 4861-4870, 2008.
- [64] B. Gupta, S. Singh, S. Mohan, and R. Prakash, "Urea Biosensor based on Conducting Polymer Transducers," *Biosensors, InTech, Rijeka*, pp. 302, 2010.
- [65] 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, 2009.
- [66] S. B. Adeloju, S. J. Shaw, and G. G. Wallace, "Polypyrrole-based amperometric flow injection biosensor for urea," *Analytica Chimica Acta*, vol. 323, pp. 107-113, 1996.
- [67] W. J. Cho and H. J. Huang, "An amperometric urea biosensor based on a polyaniline-perfluorosulfonated ionomer composite electrode," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 3946-3951, 1998.
- [68] V. Bisht, W. Takashima, and K. Kaneto, "An amperometric urea biosensor based on covalent immobilization of urease onto an electrochemically prepared copolymer poly (N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 3683-3690, 2005.
- [69] 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.



自述

姓名:江庭毅 (Chiang, Ting-Yi)

出生日期:1989/04/05

學歷:



國立中山大學	機械與機電工程研究所	碩士	2011.09-2013.06
國立嘉義大學	生物機電工程學系	學士	2007.09-2011.06

發表著作:

International conference

1. 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 ammonium ion sensing", The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2012), Okinawa Convention Center Ginowan City Okinawa, Japan, Oct 28 - Nov 1, 2012.
2. T. Y Chiang, C. H. Lin, "Enzyme-doped ion selective membrane (ED-ISM) formed with surface force and microstructures for high performance urea detection", The 26th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2013), Taipei, Taiwan, Jan 20-24, 2013.

國內研討會

1. T. Y. Chiang and C. H. Lin, "微流體晶片之離子選擇薄膜成形技術應用於銨離子檢測", 2012 Conference on Precision Machinery and Manufacturing Technology (PMMT 2012), Pingtung, Taiwan, May 18-20, 2012.
2. 江庭毅、傅龍明、蔡健雄、林哲信, "使用表面張力整合離子選擇薄膜應用於靈敏的銨離子檢測於微流體晶片", 2012 Chinese Society of Mechanical

Engineers, Kaohsiung, Taiwan, Dec 7-8, 2012.

3. T. Y Chiang and C. H Lin, “使用表面張力和微結構成型酶摻雜之離子選擇薄膜於高效尿素檢測”, 2013 Conference on Precision Machinery and Manufacturing Technology, Kenting, Taiwan, May 25-26, 2013.
4. T. Y Chiang and C. H Lin, “Utilizing the surface force and microstructures to embed the ED-ISM in the microfluidic chip for urea detection”, The 17th Nano and Microsystem Technique Conference, Taichung, Aug 22-23, 2013.

