



國立中山大學機械與機電工程學系

碩士論文

Department of Mechanical and Electro-Mechanical Engineering

National Sun Yat-sen University

Master's Thesis

微流體細胞過篩晶片結合發光胺化學冷光

於尿潛血之檢測

Microfluidic Cellular-sieving Chip Integrated with Luminol

Chemiluminescence for Urine Occult Blood Detection

研究生：邱宗徽

Zong-Hui Qiu

指導教授：林哲信 教授

Prof. Che-Hsin Lin

中華民國 111 年 8 月

August 2022

# 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

研究生邱宗徽（學號：M083020047）所提論文

微流體細胞過篩晶片結合發光胺化學冷光於尿潛血之檢測  
Microfluidic Cellular-sieving Chip Integrated with Luminol  
Chemiluminescence for Urine Occult Blood Detection

於中華民國 111 年 7 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 朱訓鵬 朱訓鵬 委員 潘正堂 潘正堂  
委員 莊承鑫 莊承鑫 委員 \_\_\_\_\_

指導教授(林哲信) 林哲信 (簽名)

# 論文公開授權書

2022/8/30 下午3:15

國立中山大學博碩士論文公開授權書

## 國立中山大學博碩士論文公開授權書

etd-0722122-154344 2022-08-30 15:09:24

本授權書所授權之論文為授權人 邱宗徽 在 國立中山大學機械與機電工程學系 110 學年度 第 2 學期 取得 碩士 學位之論文。

論文題目：微流體細胞過濾晶片結合發光胺化學冷光於尿潛血之檢測

指導教授：林哲信

### 注意事項：

1. 依本校109年4月29日108學年度第2學期第6次行政會議修正通過，研究所畢業生可於上傳電子論文時，與指導教授討論後選擇學位論文紙本及電子檔之開放年限，紙本論文若選擇「四至五年後公開」者，電子論文若選擇「四至五年後公開」或「其他」者，應提供涉及機密、專利事項或依法令規定限制公開之證明資料，經指導教授及系所(學程)主管認定始能作上述選擇。
2. 因專利申請涉及論文公開時間，為避免因喪失新穎性而無法申請專利，請各位老師及同學至經濟部智慧財產局網站參考「專利各項申請案件處理時限表」後再選定論文公開時間。  
另有關著作權相關資訊，請參考「經濟部智慧財產局著作權專區」。  
若尚有任何專利申請與著作權等相關問題，歡迎洽詢本校全球產學營運及推廣處技術移轉中心，分機2651。
3. 授權書一式兩份，將簽署後論文公開授權書正本裝訂於審定書之後，辦理畢業離校時，除繳交一本論文至圖書與資訊處外，另一本繳交至教務處註冊課務組。

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

立即公開 傳輸數位檔案

因特殊原因，校內請於3年後公開、校外(含國家圖書館)請於3年後公開或上載網路公開閱覽。

※ 電子論文延後公開原因：涉及機密。

延後公開理由：本研究內容正評估申請智慧財產權保護中。

※ 電子論文公開日期：校內民國114年08月22日，校外(含國家圖書館)民國114年08月22日

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

同意 立即公開

因特殊原因，請於3年後公開陳覽

※ 紙本論文延後公開原因：涉及機密。

延後公開理由：本研究內容正評估申請智慧財產權保護中。

※ 紙本論文公開日期：民國114年08月22日

學 號：M083020047

授 權 人：邱宗徽 (簽章)

邱宗徽

指導教授：林哲信 (簽章)

林哲信

中華民國 111 年 8 月 30 日

### ※ 此授權書嚴禁塗改

- 若欲修改權限，請登入系統修改後重新列印此授權書。
- 若論文定稿核准後欲異動授權書，請洽詢etd@mail.nsysu.edu.tw或校內分機2452。
- 授權書需自行列印兩份。請於圖資處和教務處辦理離校手續時，裝訂於繳交的紙本論文內。

# 致謝

大學快畢業時，與同儕間討論的話題不外乎是繼續升學或是進入職場工作，而我也非常的迷茫，因緣際會之下，可以在大四這個階段有產業實習的機會，讓我提前熟悉職場的環境，想說藉由這樣的方式來好好考慮未來的方向，最後實習期滿後決定跟公司提離職來好好充實自己，因此開始準備碩士考試，最後很幸運可以進入生醫機電實驗室。

在碩士期間，參加許多比賽以及合作計畫，其中，與日月光合作的防水透氣模計畫著實讓我吃了不少苦，為了完成實驗不眠不休了好幾天，最後順利完成並在日月光講台上發表，當時感動的心情到現在還是令我印象深刻，有了這些經驗的累積，不僅學習到了非常多的知識，也提升很多實作以及製作投影片的技能，讓我在未來進入職場時能夠更快的上手。老師常說知識是有價的，我相信這是很對的一句話，因此我不後悔當初離職選擇報考研究所的決定。

最後要感謝的人很多，首先感謝我的指導教授林哲信博士，提供給我一個資源豐沛的環境，讓我能夠順利完成我的研究，在我的碩士路程上給我許多的建議，也感謝口試委員，傅龍明教授、朱訓鵬教授、潘正堂教授以及莊承鑫教授給與我許多論文上的指導。接著感謝研究室的夥伴們，謝謝奕韻、竣賢、群智、榆雯學長姐以及博班學姐尉馨在我對於學術上有問題時，能夠給我幫助，感謝同學奕勝與永鈞，學弟們柏賢、賢益、奕圻、昌奕、政鎧與柏遠在實驗忙碌時一起奮鬥，在閒暇之餘能夠陪我一起吃飯玩樂，為我枯燥的碩士生活增添了許多色彩。當然也要感謝一路上非常支持我的家人們，因為有你們這個堅強的後盾，我才能毫無顧慮的往前衝，最後要特別感謝女友昀霏，在我研究陷入低潮時能陪伴我與鼓勵我，讓我能夠勇敢撐過去並且順利完成學業，也很謝謝她的家人，常常會關心我並邀請我去吃飯，就像是把我當作他們的孩子一樣在照顧，讓隻身在異地讀書的我也能感受到像家一樣的溫暖。感謝曾經在碩士時期幫助過我的所有人，謝謝。

# 中文摘要

本研究開發了一新型微流體晶片，集成血細胞過濾、嵌入式光纖以及化學發光法用於尿潛血之檢測。研究中使用壓克力作為基板，透過 CO<sub>2</sub> 雷射雕刻製作微流體晶片之流道以及用於放置化學發光檢測之光纖通道，接著經過氧電漿表面處理後，以熱壓接合的方式形成一封閉流道之微流體晶片。利用兩種尺寸分別為 15 μm 及 100 μm 的玻璃珠，以過濾方式將尺寸較為大顆的紅血球阻擋於過濾流道前，而剩餘尿液與其他干擾物則被後端之負壓系統排除，因此過濾系統有提高晶片性能以及防止干擾物影響檢測之功能。本研究所使用之發光胺溶液與紅血球內的鐵離子反應後會產生發光現象，透過嵌入晶片內光纖收集反應所發出之藍光，並藉由收到的光訊號強度來分析溶液樣本中的紅血球濃度。本研究首先針對微流體晶片之製程與設計進行改善，結果表明在第二次的雷射加工離焦參數為 15 mm 時，晶片流道有最佳的平坦化效果。接著對發光胺反應溶液進行優化，發現到最佳參數為 Luminol 濃度 30.0 mM、NaOH 濃度 600.0 mM 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 450.0 mM。在晶片檢測改善中，樣本過濾時間 10 秒可達最好的檢測結果，並且晶片只需滴入 1.5 mL 的去離子水即可防止前次實驗殘留樣本之干擾。本研究也對晶片進行性能驗證，從結果顯示，於再現性量測到之信號強度平均值為 896.3 ±50.5，有著良好的再現性，且在 5 次連續不間斷量測下也有著很高的重複性，對於金屬離子也有良好的選擇性。而本研究所開發之微流體晶片成功檢測到濃度為 7.5 k(RBC/c.c.) 尿液，其濃度低於尿潛血標準濃度的一半。最後還使用食用色素模擬不同尿液顏色之干擾測試，結果表明，尿液顏色的改變，並不會影響晶片的偵測。如上所述，本研究開發之微流體晶片有體積小、可重複性使用以及檢測速度快之優點，於再現性與重複性也有不錯的表現，並且不會受到尿液顏色的干擾，這已顯示出其在檢測尿潛血方面的潛力。

關鍵字：微流體晶片、尿潛血、化學發光、玻璃珠、發光胺

# Abstract

This paper presents a novel microfluidic chip integrated blood cells filtration, embedded optical fiber and chemiluminescence emission for the detection of urine occult blood. The microfluidic chip is produced in PMMA substrates patterned with CO<sub>2</sub> laser for defining the bead-dam structure for blood cell filtering and the channel for placing the optic fiber for chemiluminescence detection. Then, after surface treatment with oxygen plasma, a microfluidic chip with closed flow channels is formed by thermal bonding. Two kinds of glass beads with sizes of 15 μm and 100 μm are used to filter the larger red blood cells in front of the filtering channel, and the remaining urine and other interferences are eliminated by the negative pressure system. Therefore, the filter system has the function of improving the chip performance and preventing interferences from affecting the detection. The blue glow emitted by the reaction of luminol and RBCs is then collected via the embedded optic fiber and analyzed with the detector. RBCs concentration in the solution sample is analyzed by the intensity of the received light signal. In this study, the process and design of the microfluidic chip are first improved. The results show that the channel has the best planarization effect when the defocus parameter of the second laser processing is 15 mm. Then, the luminol reaction solution is optimized, and the optimal parameters are found to be Luminol concentration of 30.0 mM, NaOH concentration of 600.0 mM and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration of 450.0 mM. In the improvement of chip detection, the sample filtration time of 10 seconds can achieve the best detection results, and only need to drop 1.5 mL of deionized water to prevent the interference of residual samples from the previous experiment. In this study, the performance of the chip is also verified. The results show that the average signal strength measured in the reproducibility measurement is 896.3 ±50.5, which has good reproducibility. It has high repeatability under 5 continuous

measurements, and also has good selectivity for metal ions. The microfluidic chip developed in this study successfully detect the concentration of 7.5 k(RBCs/c.c.)in urine, which is less than half of the standard concentration of urine occult blood. Finally, food coloring is used to simulate the interference test of different urine colors. The results show that the change of urine color does not affect the detection of the chip. As mentioned above, the microfluidic chip developed in this study has the advantages of small size, reproducibility and fast detection speed, and also has good performance in reproducibility and repeatability, and is not disturbed by the color of urine, which has been shown its potential in the detection of urine occult blood.

Keywords : Microfluidic chip, Urine occult blood, Chemiluminescence, Glass beads, Luminol

# 目錄

論文審定書.....	i
論文公開授權書.....	ii
致謝.....	iii
中文摘要.....	iv
Abstract.....	v
目錄.....	vii
圖目錄.....	x
表目錄.....	xiii
符號表.....	xiv
簡寫表.....	xv
第一章 緒論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.1.1 CKD 介紹及 CKD 臨床徵狀.....	2
1.1.2 尿液潛血與血尿介紹.....	3
1.1.3 醫界尿液潛血檢測方法.....	4
1.2 人體血紅素偵測方法.....	7
1.2.1 分光光度法.....	7
1.2.2 電化學法.....	8
1.2.3 螢光檢測法.....	9
1.2.4 化學發光法.....	10
1.3 血球過濾於微流體晶片.....	11
1.4 光學檢測系統於微流體晶片.....	14
1.5 研究動機與目的.....	16
1.6 論文架構.....	18

第二章 設計與原理.....	19
2.1 化學冷光特性與 Luminol 發光原理.....	19
2.1.1 化學發光原理.....	20
2.1.2 Luminol 介紹與發光原理.....	23
2.2 光纖整合於微流體晶片.....	24
2.2.1 光纖於微流體晶片分類.....	24
2.2.2 光纖於微流體晶片之應用.....	25
第三章 材料與方法.....	28
3.1 實驗架構.....	28
3.1.1 於比色管檢測.....	28
3.1.2 於微流體晶片檢測.....	30
3.2 微流體晶片之設計與製作.....	32
3.2.1 晶片設計.....	32
3.2.2 晶片製作.....	33
3.3 PDMS 導管連接器製作.....	37
3.4 光纖與 APD 連接器.....	38
3.5 Luminol 反應溶液與樣本配製.....	39
3.6 訊號強度之數據處理.....	39
3.7 實驗藥品與材料.....	40
第四章 實驗結果與討論.....	42
4.1 微流體晶片優化.....	42
4.1.1 CO <sub>2</sub> 雷射雕刻二次加工參數.....	42
4.1.2 光纖選擇.....	44
4.1.3 光纖收光位置.....	46
4.2 反應溶液優化.....	48
4.2.1 NaOH 濃度.....	48

4.2.2 Luminol 濃度.....	49
4.2.3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度 .....	50
4.3 晶片檢測改善及效能驗證.....	51
4.3.1 樣本過濾時間.....	52
4.3.2 殘留樣本清潔探討.....	53
4.3.3 檢測極限.....	55
4.3.4 金屬離子選擇性檢測.....	55
4.4 尿液實際量測.....	56
4.4.1 檢測極限.....	57
4.4.2 重複性量測.....	58
4.4.3 再現性量測.....	58
4.5 尿液顏色對晶片檢測效能影響.....	59
第五章 結論與未來展望.....	61
5.1 結論.....	61
5.2 未來展望.....	62
參考文獻.....	63
論文抄襲比對.....	72
自述.....	73

# 圖目錄

圖 1-1 2015 年全球慢性腎臟疾病患病率分布圖 .....	1
圖 1-2 慢性腎臟病分期標準圖 .....	3
圖 1-3 優利特公司所生產的目測尿潛血試紙 .....	5
圖 1-4 台灣喬聯科技公司所生產型號為 NuAncer SR-III 尿液試紙分析儀 .....	5
圖 1-5 日本 Toyobo 公司所生產型號為 UScanner(E)尿沉渣分析儀 .....	6
圖 1-6 Kampen 等人使用薑黃素奈米粒子對於人體血液中血紅素的測定 .....	8
圖 1-7 電化學法檢測血紅素之感測器 .....	9
圖 1-8 矽奈米粒子(SiNPs)螢光法檢測血紅素 .....	10
圖 1-9 魯米諾化學發光檢測血紅素 .....	11
圖 1-10 細胞分離微過濾器結構 .....	12
圖 1-11 決定性側向位移示意圖 .....	13
圖 1-12 玻璃珠於微流體通道示意圖 .....	14
圖 1-13 典型微流體晶片上的螢光檢測示意圖 .....	15
圖 1-14 用於多波長檢測的光纖和微聚焦透鏡的微流體晶片 .....	16
圖 1-15 論文架構圖 .....	18
圖 2-1 螢火蟲的發光機制 .....	19
圖 2-2 螢光棒發光原理 .....	20
圖 2-3 兩種化學發光反應途徑 .....	21
圖 2-4 Luminol 發光系統反應式示意圖 .....	23
圖 2-5 兩種光纖應用於微流體晶片方式 .....	25
圖 2-6 光纖集成到微流體晶片中的螢光測量裝置 .....	25
圖 2-7 整合螢光檢測、吸光度檢測以及散射光檢測之微流體晶片 .....	26
圖 2-8 光散射微流體晶片 .....	27
圖 3-1 比色管系統架構示意圖 .....	29

圖 3-2 比色管系統暗箱內部上視圖 .....	29
圖 3-3 微流體晶片系統架構示意圖 .....	31
圖 3-4 微流體晶片系統暗箱內部上視圖 .....	31
圖 3-5 晶片設計示意圖 .....	32
圖 3-6 本研究晶片製程示意圖 .....	33
圖 3-7 本研究所使用之氧電漿系統 .....	34
圖 3-8 熱壓接合步驟示意圖 .....	35
圖 3-9 玻璃珠於微流體晶片內之示意圖 .....	36
圖 3-10 光纖與晶片接合完成圖 .....	37
圖 3-11 PDMS 導管連接器製程 .....	38
圖 3-12 本研究設計之光纖與 APD 連接器 .....	39
圖 3-13 訊號強度數據處理示意圖 .....	40
圖 4-1 不同雷射雕刻參數之晶片流道數位顯微鏡影像圖 .....	43
圖 4-2 不同光纖種類之實體圖以及檢測結果 .....	45
圖 4-3 三種不同光纖收光位置之微流體晶片實體圖 .....	47
圖 4-4 不同光纖收光位置檢測結果 .....	48
圖 4-5 不同 NaOH 濃度量測 .....	49
圖 4-6 不同 Luminol 濃度量測 .....	50
圖 4-7 不同 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 濃度量測 .....	51
圖 4-8 不同樣本過濾時間的晶片量測 .....	53
圖 4-9 微流體晶片殘留樣本清潔度檢測 .....	54
圖 4-10 微流體晶片對於血液與生理食鹽水混合溶液之檢測極限量測 .....	55
圖 4-11 金屬離子干擾性量測 .....	56
圖 4-12 微流體晶片對於血液與尿液混合溶液之檢測極限量測重複性量測 .....	57
圖 4-13 微流體晶片對於血液與尿液混合溶液重複性之量測 .....	58
圖 4-14 五組獨立微流體晶片對於血液與尿液混合溶液再現性測試 .....	59

圖 4-15 模擬尿液顏色對晶片檢測之影響 .....	60
圖 4-16 食用色素模擬尿液顏色的干擾檢測結果 .....	60
圖 5-1 馬桶與微流體晶片結合示意圖 .....	62

# 表目錄

表 3-1 實驗材料列表 .....	40
表 3-2 實驗藥品列表 .....	41

# 符號表

c	光速	ms	毫秒
C*	物質 C 的激發態	mTorr	毫托
c.c.	立方公分	mV	毫伏
cm	公分	mW	毫瓦特
F	感光分子	nm	奈米
g	公克	Rc	臨界半徑
h	普朗克常數	s	秒
kg	公斤	T	時間
L	長度	V	伏特
M	體積莫耳濃度	μg	微克
m	公尺	μL	微升
min	分鐘	μm	微米
mL	毫升	°C	攝氏溫度
mM	毫體積莫耳濃度	%	百分比
mm	毫米		

# 簡寫表

ABS	Acrylonitrile-butadiene-styrene, 聚丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物
AUA	American Urological Association, 美國泌尿科協會
CKD	Chronic Kidney Disease, 慢性腎臟疾病
CL	Chemiluminescence, 化學發光
COVID-19	Coronavirus Disease 2019, 嚴重特殊傳染性肺炎
DI Water	Deionized Water, 去離子水
DLD	Deterministic Lateral Displacement, 決定性側向位移
FWHM	Full Width at Half Maximum, 半高寬
GFR	Glomerular Filtration Rate, 腎絲球過濾率
HPF	High Power Field, 高倍率視野
ICP	Inductively-coupled Plasma, 感應耦合電漿
ID	Inside Diameter, 內徑
IR	Infrared, 紅外光
LED	Light-emitting Diode, 發光二極體
LIF	Laser-induced Fluorescence, 雷射誘導螢光
LOC	Lab-on-a-chip, 晶片實驗室
MCVD	Modified Chemical Vapor Deposition, 改良化學氣相沉積
MEMS	Micro Electro Mechanical Systems, 微機電系統
OD	Outside Diameter, 外徑
PDMS	Polydimethylsiloxane, 聚二甲基矽氧烷
PE	Polyethylene, 聚乙烯
PMMA	Poly(methyl methacrylate), 聚甲基丙烯酸甲酯
POCT	Point of Care Testing, 定點照護檢驗
PU	Polyurethane, 聚乙烯

RBC	Red Blood Cell, 紅血球
RF	Radio Frequency, 射頻
SEM	Scanning Electron Microscope, 掃描式電子顯微鏡
SPEs	Screen-printed Electrodes, 網版印刷電極
UV Light	Ultraviolet Light, 紫外光
VIS Light	Visible light, 可見光

# 第一章 緒論

## 1.1 研究背景

因現代人飲食習慣的關係，常會攝取加工醃漬食品(如香腸、培根、火鍋料等)以及高蛋白、高鹽、高油的食物，雖然調味後的味道令人食慾大開，但這些食物吃多了容易造成腎臟的負擔，進而誘發腎臟疾病的發生[1]。而腎臟由於不同的疾病傷害導致功能漸漸喪失，並且有明確的腎臟功能異常以及結構性的問題達三個月以上，即可稱之為慢性腎臟疾病(Chronic kidney disease, CKD)[2]。腎臟主要負責過濾體內的水分以及多餘液體，進而產生尿液，腎臟疾病在初期時會因為其沒有較為明顯的症狀而導致人們忽略追蹤以及治療，倘若及早發現並接受治療，即可大幅降低腎臟疾病的發病率和死亡率[3]，

從研究結果顯示，全球的慢性腎臟疾病患者於 2017 年總人數達到約 7 億人，其中有近三分之一的慢性腎臟病患者位於中國以及印度，患病人數分別為 1.3 億人以及 1.1 億人[4]，2015 年全球 CKD 患病率的分布如圖 1-1 所示[5]，台灣平均每十萬人中約有 1.5 萬人罹患 CKD，而中國平均每十萬人口約有 1.1 萬人罹患 CKD，日本則是接近 2 萬人罹患 CKD。

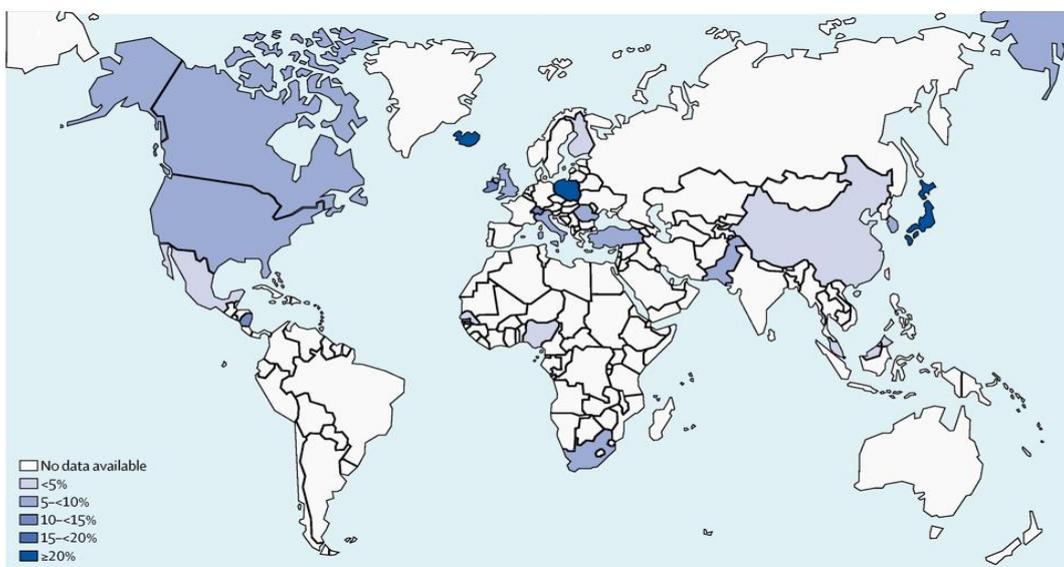


圖 1-1 2015 年全球慢性腎臟疾病患病率分布圖[5]。

自 2019 年 12 月在中國爆發疫情以來，新型冠狀病毒以恐怖的速度在全球蔓延，嚴重特殊傳染性肺炎(Coronavirus disease 2019, COVID-19)是新型冠狀病毒所引起的傳染病，主要會造成感染者發燒與咳嗽等症狀，但嚴重的甚至會危及生命，目前國內外有許多研究顯示 CKD 與 COVID-19 感染的風險增加有關[6, 7]，因此醫生需密切監測疑似 COVID-19 的 CKD 患者，以便及時發現疾病進展的跡象並且採取特別的預防措施，盡量減少接觸病毒的風險。

根據台灣衛生福利部於 2020 年的數據統計顯示，腎臟發炎、腎臟病症候群以及腎臟病變為國人十大死因中的第九名，為每十萬人中約有 21.6 人因此而死亡[8]。這些疾病的病徵除了會造成身體水腫，排尿不順、疲倦無力，還有常用於判讀腎臟疾病之一大指標尿潛血[9, 10]，尿潛血顧名思義為尿液中含有潛在微量的血液，與正常尿液的顏色沒有外觀上的差別，當尿液轉變為肉眼可見的紅色時，則稱為血尿(Hematuria)[11]，這時情況也變為較嚴重了。因此若能於日常如廁時，進行無感生理檢測，將可預期腎臟疾病。目前醫療常見之檢測方式可分為兩種，一為尿液試紙法，另一則為顯微鏡觀察法[12]，尿液試紙雖具有操作便利及快速之優點，但因其專一性較低，較易產生偽陽性之問題，通常被用來做初步篩檢。而後者雖可獲得數值化之定量結果，但因昂貴檢測設備、操作繁瑣，並且需要親自送到醫院進行檢測，容易造成 COVID-19 感染的風險，因此本研究開發一微流體細胞過濾晶片，透過偵測發光胺(Luminol)與尿液中血液反應所發出的藍光，來達到尿潛血檢測之目的，希望本研究能為腎臟疾病的預防盡一份心力，期望未來將本系統與馬桶整合，可於平時如廁時進行即時檢測，並且檢測結果可成為醫生診斷的依據，這在定點照護檢驗(Point of care testing, POCT)上有很大的潛力。

### 1.1.1 CKD 介紹及 CKD 臨床徵狀

美國腎臟基金會 (National kidney foundation, NKF) 所提出的疾病分期標準，可以透過患者的腎絲球過濾率(Glomerular filtration rate, GFR)高低將慢性腎臟病區分為一至五期，如圖 1-2 所示[13]。慢性腎臟病病患的臨床表現相當多樣，並且會

因腎臟功能受損的嚴重程度以及潛在疾病而有所不同，通常早期徵狀以尿液異常為主，到晚期嚴重時會有如食慾不振、貧血、噁心等情況發生[14]。NKF 曾提出泌尿道系統的六大警告徵象，包括血尿、水腫與蛋白尿、多尿或少尿、腰部疼痛、高血壓以及解尿疼痛。因為多數慢性腎臟病患者的臨床症狀都不明顯，因此病患必須與腎臟專科醫師詳述病情後，立即進行尿液以及抽血檢查甚至腎臟切片等檢查來做進一步病因的診斷。

台灣洗腎的盛行率常年高居全球第一，全國至少有 12%的民眾罹患慢性腎臟疾病，大約有 9.4 萬人需定期進行血液透析療程，並且每年接受血液透析療程的患者都在以約 1 萬人的驚人速度增加，而腎臟疾病的診療費用在 2020 年時已經來到了 562 億元，這在健保支出項目中高居首位，其中有 80%以上都是用來支付末期腎臟疾病患者的洗腎費用，其金額高達 470 億元以上。但因早期無明顯症狀，病人的自我認知率卻是相當低，所以預防腎臟疾病的發生以及延緩腎臟疾病患者進展到末期，是目前國家健康政策中的首要任務。

			Persistent albuminuria categories			
			A1 Normal to mildly increased <30 mg/g <3 mg/mmol	A2 Moderately increased 30–300 mg/g 3–30 mg/mmol	A3 Severely increased >300 mg/g >30 mg/mmol	
GFR categories (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	G1 Normal or high	>90	Low risk	Moderately increased risk	High risk	<ul style="list-style-type: none"> <li><span style="color: green;">■</span> Low risk</li> <li><span style="color: yellow;">■</span> Moderately increased risk</li> <li><span style="color: orange;">■</span> High risk</li> <li><span style="color: red;">■</span> Very high risk</li> </ul>
	G2 Mildly decreased	60–89	Low risk	Moderately increased risk	High risk	
	G3a Mildly to moderately decreased	45–59	Moderately increased risk	High risk	Very high risk	
	G3b Moderately to severely decreased	30–44	High risk	Very high risk	Very high risk	
	G4 Severely decreased	15–29	Very high risk	Very high risk	Very high risk	
	G5 Kidney failure	<15	Very high risk	Very high risk	Very high risk	

圖 1-2 慢性腎臟病分期標準圖[13]。

### 1.1.2 尿液潛血與血尿介紹

尿潛血為尿液中含有微量的血液，這是肉眼無法辨別，但是經過尿液檢查後發現有出血反應，這代表泌尿系統從最上端的腎臟一直到尿道可能有出血現象發生，必須及早確認出血位置以利後續的治療。與血液檢查不同的是，尿液是一種非侵入

性樣本，可以很容易地收集，過程中沒有疼痛感，也不需要特殊設備，因此，它在 POCT 領域或家庭健康監測以及診斷方面具有巨大潛力。

目前有兩種常見的尿潛血檢查方法，第一種為尿潛血試紙檢測，這可直接居家進行量測，當塗覆在試紙上之化合物與尿液中的血紅素反應產生顏色的改變時，透過肉眼進行判讀。而第二種為醫院常見的尿液常規檢查，使用尿沉渣顯微鏡檢查或尿液自動分析儀來進行檢測[15]，可判斷尿液的顏色、pH 值、比重、血球和細胞的型態等。根據美國泌尿科協會(American Urological Association, AUA)公布的潛血標準，規範了在一高倍視野 (High power field, HPF) 下，紅血球數量大於 3 顆[16]。值得注意的是在進行尿液檢測時，需要排除容易導致檢測失真的因素，例如高強度運動、動過尿路系統的手術或是侵入性檢查、細菌感染或是女性月經等，以上原因皆可能產生偽陽性的誤判情況發生[17, 18]。

如果在尿潛血初期沒有進行即時的治療，情況變的更為嚴重時，尿液則會呈肉眼可見的紅色，就是我們所謂的血尿，血尿是腎炎、腎結石、腎細胞癌、泌尿生殖系統[19]和膀胱癌[20]患者的主要病徵，在每例血尿病例中都必須定位出血部位，需要仔細與謹慎的檢查，這對於患者的疾病診斷是非常重要的[21]，因此於平常如廁時發生有血尿徵狀時，就應盡快就醫檢查。

### 1.1.3 醫界尿液潛血檢測方法

長期以來，尿液分析一直被視為患者健康狀況的指標，是健康檢查中相當普遍而且基本的篩檢項目，其有著非侵襲性與檢體容易取得之優點，是醫生在進行診斷時相當重要的檢查之一，對於腎臟、膀胱以及尿道的病變檢測有著良好的效果，主要尿液潛血檢測方法有以下幾種：

#### (一)尿潛血試紙

尿潛血試紙使用上非常簡單，只需取中段尿液並靜置 5 到 10 分鐘後將試紙放入尿液中 2 秒，以衛生紙吸乾側面多餘的尿液等待約 1 到 2 分鐘的反應時間即可進行肉眼比色判斷，其反應原理為血紅素的氧化酶活性能使試紙中的過氧化氫釋

放氧原子，接著氧化四甲基聯苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)呈藍色反應，影響檢測的因素包括前面有提到的高強度運動以及月經期的女性等。



圖 1-3 優利特公司所生產的目測尿潛血試紙。

## (二)試紙分析儀

尿液試紙檢查雖然是一項方便、便宜且不具侵入性的檢查，但尿液試紙檢測所提供的報告是以半定量的方式呈現，而無法達到更準確的定量分析，近年來臨床上常使用尿液自動分析儀來輔助我們進行尿液試紙的判讀，其原理為試紙上化合物和尿液中血紅素因發生化學反應而產生顏色變化，在顏色生成的同時使用發光二極體(Light-emitting diodes, LED)光源照射試紙，通過測量從試紙表面反射的光來檢測試紙反應顏色的強度，分析物濃度越高，顏色強度也就越強，因此反射率越低，最後由尿液試紙分析儀計算反射比值，在比較分析儀所設定之濃度值後，呈現出半定量濃度結果[22]。



圖 1-4 台灣喬聯科技公司所生產型號為 NuAncer SR-III 尿液試紙分析儀。

### (三)尿沉渣分析儀

主要原理為流式細胞儀，首先對尿沉渣做螢光染色處理後，在細胞或顆粒通過激發光源之測定區時，會被雷射光激發生成兩種分別為散射光以及螢光的不同光訊號，透過這二種光訊號可以知道細胞和顆粒的大小以及細胞核酸、細胞膜和顆粒被螢光染劑染色的程度。另外，每一種細胞擁有不同導電度，因此可透過檢測電阻變化來辨別尿沉渣內的物質，利用以上方式可以區別尿液中不同的內容物，例如紅血球數量、白血球數量、上皮細胞、圓柱體、致病性圓柱、細菌、精子以及少數的結晶體等[23]。



圖 1-5 日本 Toyobo 公司所生產型號為 UScanner(E)尿沉渣分析儀。

### (四)尿沉渣鏡檢

透過顯微鏡對尿液沉澱物進行檢查，可以辨別尿液中的紅血球、白血球、細胞、細菌與寄生蟲等成分，並根據它們的數量和形態進行分析，輔助醫生對疾病作出更精確的診讀以及預防。其檢測步驟如下，首先取刻度離心管後倒入新鮮尿液 10 mL 後，以 500 倍重力的離心力離心 5 分鐘，等待離心結束後，將離心管取出並棄去上清液，只留下 0.5 mL 之尿沉渣用做分析，接著將尿沉渣滴在載玻片上以顯微鏡進行觀察，此方法的尿液濃縮倍數為 20 倍。根據台灣醫事檢驗學會公布的尿沉渣鏡檢指引中有提到，當接目鏡視野數值為 22 並且使用 40 倍放大倍率接物鏡下，顯微鏡所觀察到的視野面積為  $0.238 \text{ mm}^2$ 。而載玻片與蓋玻片之尿沉渣鏡檢量測方法

為取尿沉渣放置於載玻片後以尺寸為 18 mm 正方形蓋玻片蓋住，其厚度為 0.046 mm，因此每一 HPF 的體積相當於蓋玻片厚度 0.046 mm 乘以顯微鏡觀察到的視野面積 0.238 mm 最後再乘以尿液濃縮倍數 20，因此每一 HPF 的體積約為 0.22  $\mu$ L 的尿液。而樣品會先經過染色處理，所以會有稀釋的情況發生，所以數值必須除以 0.9 還原為最終報告[24]。美國泌尿科協會公布的潛血標準，為一高倍視野下，紅血球數量大於 3 顆，因此可以將 3/HPF 換算為 15 k(RBC/c.c.)的尿液，後續實驗以此濃度當作尿潛血的標準檢測濃度。

## 1.2 人體血紅素偵測方法

### 1.2.1 分光光度法

自從 Kampen 與 Zijlstra 提出分光光度法(Spectrophotometry)使用於血紅素的偵測後[25]，有越來越多的研究將此方法應用於血紅素的濃度以及測量血紅素衍生物上[26-28]，分光光度計是一種用於測量樣品光吸收隨波長範圍變化的設備，其內部光源包含紫外光(Ultraviolet light, UV light)、可見光(Visible light, VIS)或紅外光(Infrared, IR)，在光束經過單色儀後，可使光源變為單一且特定波長之光線，通過樣品並由光度計進行檢測，該光度計通過使用光電二極管或光電倍增管將光轉換為電流來測量光強度，並為研究中的樣品生成吸光度對波長的吸收曲線。隨著奈米技術的蓬勃發展，許多研究將奈米粒子與分光光度法結合進行血紅素偵測並應用於尿潛血檢測[29]。如 Pourreza 與 Golmohammadi 於 2015 年提出使用薑黃素奈米粒子(Curcumin nanoparticle, CURN)來檢測血紅素之方法[30]，薑黃素是一種生物材料，具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗癌、傷口癒合等特性，並且很容易螯合金屬離子形成錯合物。其原理為薑黃素奈米粒子會在有血紅素的存在下產生聚集，這會導致薑黃素奈米粒子的吸收強度降低，透過吸收強度變化的方式來檢測血紅素的濃度，此研究還分別針對樣品溶液的 pH 值、緩衝液濃度、所需的薑黃素奈米粒子數量、平衡時間進行實驗，對此方法進行了優化以提高檢測的靈敏度。該研究稱在最佳條件下，薑黃素奈米粒子吸收強度的差異與血紅素濃度 1 到 40  $\mu$ g/mL 以及 150

到 1200  $\mu\text{g/mL}$ ，這兩個範圍呈線性比例關係， $R^2$  分別為 0.9946 以及 0.9974。在 20  $\mu\text{g/mL}$  與 600  $\mu\text{g/mL}$  的 10 次重複測量實驗中，兩個濃度的相對標準差分別為 3.6% 和 3.1%，證明該檢測方法可成功應用於人體血液中血紅素的測定。

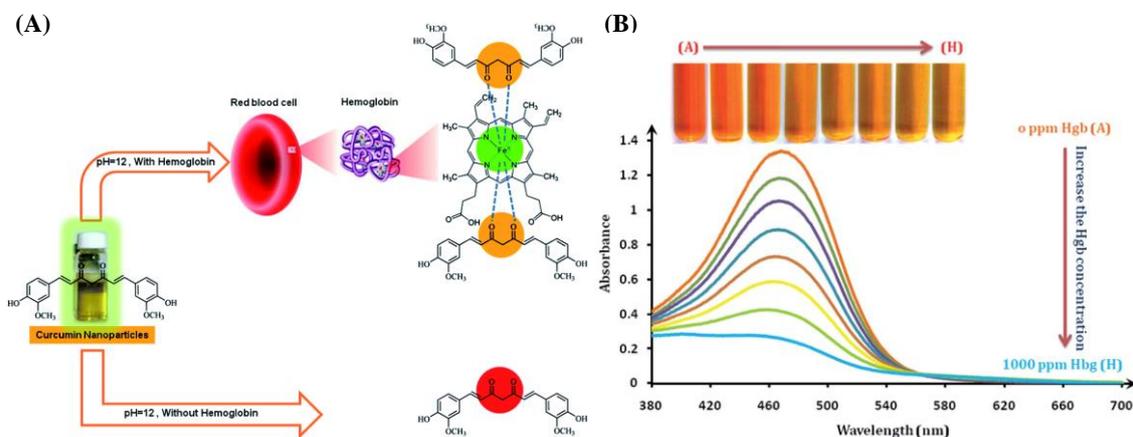


圖 1-6 Pourreza 與 Golmohammadi 使用薑黃素奈米粒子對於人體血液中血紅素的測定。(A)使用薑黃素奈米粒子測定血液中血紅素濃度的示意圖(B)添加不同濃度血紅素後，薑黃素奈米粒子的紫外-可見光譜和顏色變化[30]。

## 1.2.2 電化學法

Han 等人的研究提出了一種一次性使用電化學感測器檢測血紅素的電化學方法[31]，在這項研究中網版印刷電極 (Screen printed electrodes, SPEs) 被用作基板，金奈米粒子 (AuNPs) 沉積在基板表面後，以兩種二茂鐵(Ferrocene, Fc)衍生物的電活性材料  $\text{Fc}(\text{Cys})_2$  以及  $\text{Fc-ECG}$  進行電極修飾，製備兩個電極分別為  $\text{Fc}(\text{Cys})_2/\text{AuNPs}/\text{SPE}$  和  $\text{Fc-ECG}/\text{AuNPs}/\text{SPE}$ ，最後將不同濃度的血紅素滴在感測器上幾分鐘直到自然乾燥，通過電化學檢測法來進行優化和最終測試並實現血紅素的偵測，如圖 1-7(A)所示。

接著從圖 1-7(B)可以看出，感測器的響應電流隨著血紅素濃度的增加而減小，線性範圍 0.1  $\mu\text{g/mL}$  到 1000  $\mu\text{g/mL}$ ， $R^2$  為 0.9982，檢出極限為 0.03  $\mu\text{g/mL}$ ，此外還研究了血紅素檢測的可能干擾因素，用 300  $\mu\text{g/mL}$  HSA、葡萄糖、抗壞血酸以及免疫球蛋白 E(IgE)來研究感測器的選擇性，如圖 1-7(C)所示，這說明該感測器對於

血紅素的檢測具有良好的選擇性。

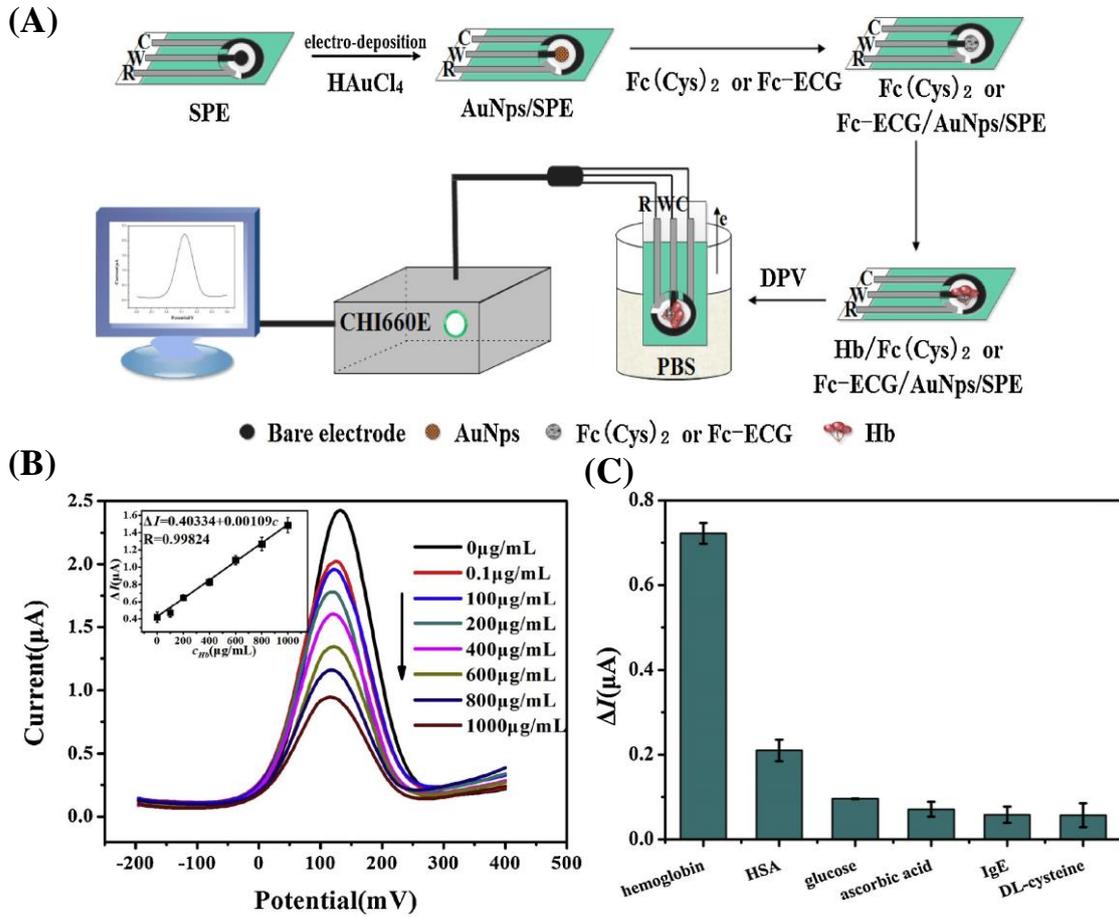


圖 1-7 電化學法檢測血紅素之感測器。(A)Fc(Cys)<sub>2</sub>/AuNPs/SPE 及 FcECG /AuNPs /SPE 製程(B)不同血紅素濃度的 Fc-ECG/AuNPs/SPE 電化學感測器的電流響應(C) Fc-ECG/AuNPs/SPE 對血紅素、HSA、葡萄糖、抗壞血酸、IgG 和 DL-半胱胺酸的選擇性，各化合物濃度為 300 µg/mL[31]。

### 1.2.3 螢光檢測法

螢光法檢測血紅素最早是由 Hirsch 等人進行相關研究[32]，螢光檢測需要透過特定波長的激發光去激發待測樣本中的螢光物質，使得待測樣本產生螢光後利用光偵測器來讀取螢光的發光強度。近幾年來，具有獨特光學和電學特性的半導體奈米晶體在血紅素的螢光檢測中一直備受關注，如碳量子點[33, 34]、硫化鎘量子點[35]、金奈米團簇[36]被應用於尿潛血的檢測。其中 Li 等人利用矽奈米粒子(SiNPs)開發

了一種簡單、高選擇性以及高靈敏的血紅素偵測方法[37]，矽奈米粒子的螢光強度會因血紅素而產生螢光猝滅(Quenching)的現象，透過這樣的方式來檢測血紅素的濃度。圖 1-8(A)為在波長 360 nm 的光源激發下，製備的 SiNPs 與不同濃度的血紅素產生的螢光光譜，它清楚地表明，隨著血紅素濃度的增加，SiNPs 的螢光強度被逐漸降低，從圖 1-8(B)可以看到，猝滅效率( $F_0/F$ )與 Hb 濃度在 0.05-4  $\mu\text{M}$  範圍內有著良好的線性關係， $R^2$  為 0.9987，其中  $F_0$  與  $F$  分別為波長 444 nm 處血紅素不存在和存在時的 SiNPs 螢光強度。

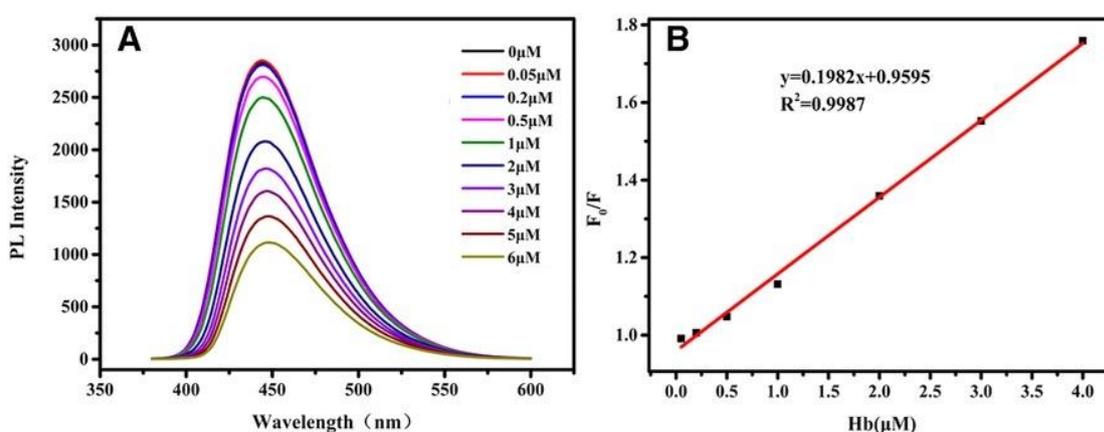


圖 1-8 矽奈米粒子(SiNPs)螢光法檢測血紅素(A) SiNPs 與不同濃度血紅素螢光光譜(波長 360 nm 激發光)(B)螢光強度比( $F_0/F$ )與 Hb 濃度之間的相關性[37]。

## 1.2.4 化學發光法

化學發光 (Chemiluminescence, CL) 是定量和分析各種大分子的重要方法，是指在固體、液體或氣體系統中產生化學反應所發出的光，與前述螢光檢測法不同的地方在於化學發光法並不需要特定波長的光源激發，其中最具代表性並且靈敏度最高的，即犯罪現場用於偵測血跡的發光胺，發光胺的 CL 特性是由 Albrecht 在 1928 年首次發現[38]，並在之後被應用於血紅素的偵測[39-41]。Fereja 等人於 2019 開發青蒿琥酯 (Artesunate) 與發光胺之化學發光系統並使用光電倍增管 (Photomultiplier, PMT) 進行血紅素的偵測[42]，檢測樣本配置步驟為將 100.0  $\mu\text{M}$  發光胺與 1.0  $\mu\text{M}$  青蒿琥酯混合，並用濃度 5.0 mM 的 NaOH 將混合物稀釋至 400.0

$\mu\text{L}$ ，然後將  $5.0 \mu\text{L}$  不同濃度的血紅素快速加入溶液中混合，並用光電倍增管進行發光強度的檢測。如圖 1-9(A)所示，當血紅素濃度越高時，化學發光所產生的光強度也就越強，該研究稱血紅素的檢測極限低至  $0.22 \text{ nM}$ ，透過圖 1-9(B)可以觀察到 CL 強度與血紅素濃度在  $0.8 \text{ nM}$  至  $1000.0 \text{ nM}$  範圍內呈線性關係， $R^2$  為  $0.993$ ，此研究方法對於血紅素檢測有不小的潛力。

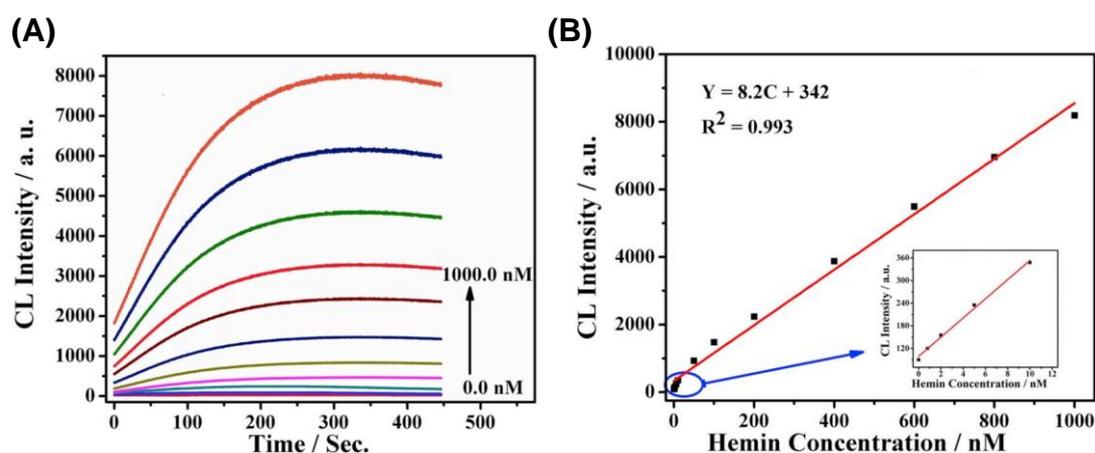


圖 1-9 魯米諾化學發光檢測血紅素。(A)青蒿琥酯/Luminol 系統在不同濃度血紅素存在下的化學發光光譜圖(B)CL 峰強度與血紅素濃度函數圖。右下圖為血紅素濃度  $0.8$  到  $20.0 \text{ nM}$  和 CL 峰強度之間的放大圖，血紅素濃度為  $0.0$ 、 $0.8$ 、 $1.0$ 、 $5.0$ 、 $10.0$ 、 $20.0$ 、 $50.0$ 、 $100.0$ 、 $200.0$ 、 $400.0$ 、 $600.0$ 、 $800.0$  及  $1000.0 \text{ nM}$ ，青蒿琥酯濃度  $1.0 \mu\text{M}$ 、發光胺濃度  $100.0 \mu\text{M}$ [42]。

### 1.3 血球過濾於微流體晶片

近幾十年來，晶片實驗室(Lab on a chip, LOC)技術有了重大進展，不管是在化學、生物學、工程和醫學上皆具有各種應用[43-45]，其中，在醫學的血液檢測上，血細胞分離是臨床診斷、治療方法和細胞生物學中必不可少的關鍵步驟，因為每種血液成分都揭示了重要的健康信息[46]。紅細胞(Red blood cell, RBC)數量與形態的變化已用於診斷溶血、瘧疾和貧血等血液疾病，而白細胞(White blood cell, WBC)是免疫系統功能的有用指標，可對各種病原體產生免疫反應，白細胞數量的異常或

變形與免疫失調、感染或血癌密切相關[47, 48]，因此對開發用於目標樣品的片上分離的微過濾器有著巨大的需求[49, 50]。在對醫學界影響越來越廣泛的新技術中，微流體和小型化晶片實驗室裝置對血液分析是極具吸引力的[51]，由於體積小並不太占空間，因此在家中或醫生辦公室內即可輕鬆使用，不僅對傳染病、癌症和發炎反應能夠進行快速準確的診斷和預防，還可以使診斷醫生在開藥時更能夠對症下藥，使患者的徵狀與藥物能夠更好地匹配，減少副作用並提高治療效率[52]。

最近先進的微細加工技術已可實現多樣的微過濾器結構，其中包含為了細胞分離而製造的孔[53, 54]、柱[55, 56]和堰[57, 58]等等結構，如圖 1-10 所示[59]。透過微過濾器結構設計明確的臨界尺寸以限制細胞通過。更具體地說，臨界尺寸以上的紅血球被保留下來，而血液中小於臨界尺寸的其他成分可以通過，從而實現紅血球的分離，具有簡單和高通量的優點。

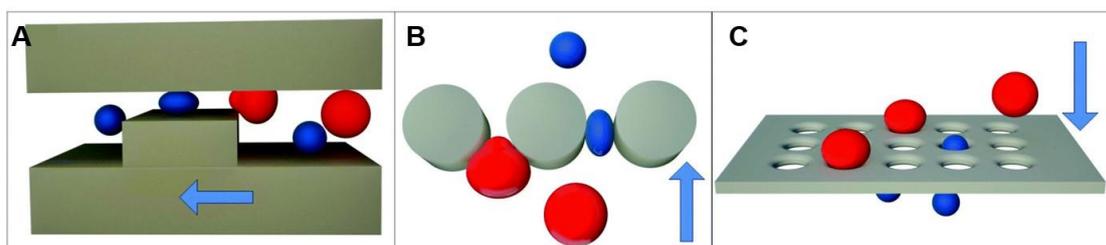


圖 1-10 細胞分離微過濾器結構。(A)堰狀結構(B)柱狀結構(C)孔狀結構[59]。

決定性側向位移(Deterministic lateral displacement, DLD)是一種按照尺寸分離顆粒的方法，是由 Huang 等人進行實驗時意外發現了這一現象[60, 61]，在發現 DLD 後不久，就確定了其在細胞分離方面的潛力。其結構是由柱狀陣列所組成，當粒子半徑小於臨界半徑( $R_c$ )時，粒子會隨流而移動，大於臨界半徑的粒子會在撞到柱子後於每一行發生橫向位移，軌跡線看起來是鋸齒形的，如圖 1-11 所示[62]。對於硬球形顆粒而言，操作與檢測是很簡單，但是，生物顆粒通常是軟的以及是非球形的，它們的可變形性和形狀都會影響 DLD 系統中顆粒的軌跡[63]。

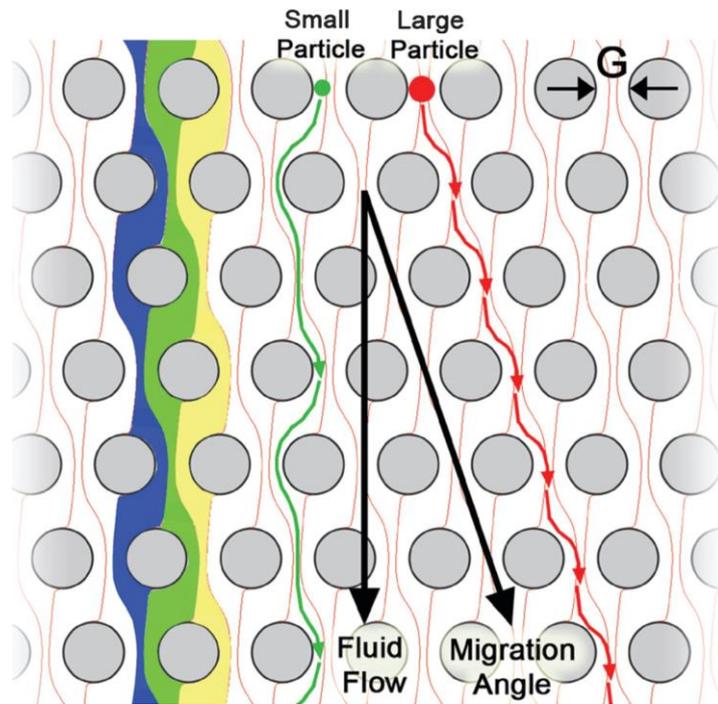


圖 1-11 決定性側向位移示意圖[62]。

為了實現用於 POC 臨床試驗的血液/血漿分離器，Joon 等人於 2010 年開發了一種在微通道入口處填充珠子用以過濾紅血球的新技術[64]，並對於之後的血液分離領域產生很大的影響[65-67]。這是透過一種簡單且適用於大面積的方法來在微通道入口處填充珠子，而不是複雜的微結構或步驟來填充珠子，因此，此種快速樣品製備的微過濾器的方法可以很容易地用於各種類型的 LOC 應用。將兩種不同的玻璃珠尺寸（ $100\ \mu\text{m}$  和  $15\ \mu\text{m}$ ）用於在微通道入口處實施血液/血漿分離，大尺寸玻璃珠的直徑為  $100\ \mu\text{m}$  以阻塞微通道的入口，而小尺寸玻璃珠的直徑為  $15\ \mu\text{m}$  用於阻擋紅血球通過並誘導血漿與紅血球的分離，示意圖如圖 1-12(A)所示。微流道的高度最初設計為  $100\ \mu\text{m}$ ，但在熱壓接合過程中會略微變形至小於  $100\ \mu\text{m}$ ，當大玻璃珠注入於微流道時，由於其直徑大於微流道的高度，因此無法進入微流道內，如圖 1-12(B)所示。接著注入尺寸為  $15\ \mu\text{m}$  的玻璃珠，由於微流道的入口已經被  $100\ \mu\text{m}$  的珠子堵住了，因此小珠子被填充在了微通道的入口處如圖 1-12(C)所示，最後加入蛋白質封閉液(Protein blocking solution, PBS)等待 5 分鐘後將溶液以負壓系統抽乾，這可強化玻璃珠與玻璃珠之間的結構，圖 1-12(D)為製作完成之微流道。隨

後將全血滴入微通道的入口，在紅血球通過填充玻璃珠之間的小孔時，紅血球的流動受到阻礙並被攔截於微流道前，玻璃珠微流道架構成功地實現了紅血球與全血的分離，而無需外部電源。

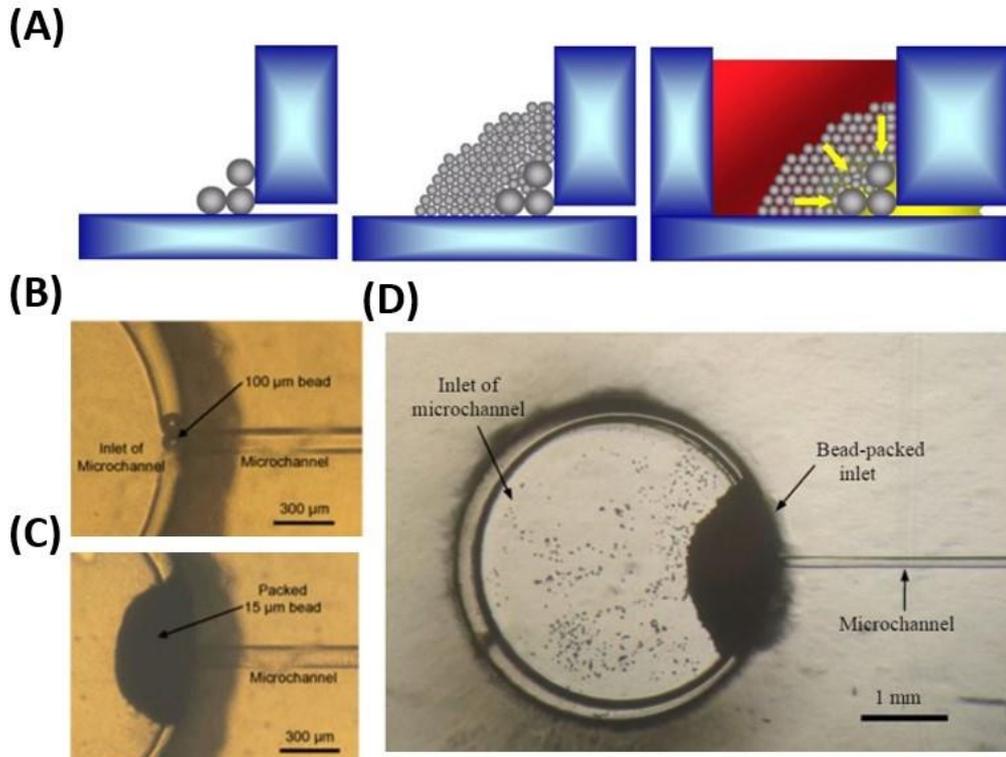


圖 1-12 玻璃珠於微流體通道示意圖。其中(A)紅血球的分離示意圖(B)注入 100 μm 玻璃珠 (C)注入 15 μm 玻璃珠(D)製作完成之玻璃珠微流道[65]。

## 1.4 光學檢測系統於微流體晶片

微流體是用於化學、生物以及醫學應用的全新一類微型分析系統的技術，對於臨床診斷是最有前途的應用之一，微流體晶片始於 1980 年代和 1990 年代，到了近幾年微機電系統(Micro electro mechanical systems, MEMS)製程技術發展，透過在矽基板或玻璃上蝕刻出細小的微流道，流道尺寸多在微米(μm)至奈米等級(nm)，再以接合技術(Bonding)形成封閉流道的微流體晶片，使我們能夠將微電子、微感測器、微閥等許多微器件集成到微流體晶片中，並將它們用於疾病檢測、新藥開發、基因檢測，以及許多其他應用。微流體晶片的目的是用少量液體樣品執行一系列化

學過程，也減少了處理時間，降低了勞動力成本，並提供了準確的檢測。為了進行精準的檢測，許多研究將光學系統結合微流體晶片，利用光學偵測的快速響應以及高靈敏度優點進行各種低濃度樣本的檢測，因此在微流體檢測方法中佔據主導地位。雷射誘導螢光 (Laser induced fluorescence, LIF) 是一種高度靈敏的光學檢測方法，典型的微流體晶片上 LIF 模式如圖 1-13 所示[68]，其與共軛焦顯微鏡原理幾乎相同，只是用微流體晶片代替顯微鏡載物台，常見的激發源包括雷射、發光二極體 (LED) 和汞燈，每種激發光源都有獨特的光譜特性，在將激發光聚焦在微通道的檢測區域後，透過靈敏的光電探測器接收激發螢光信號。

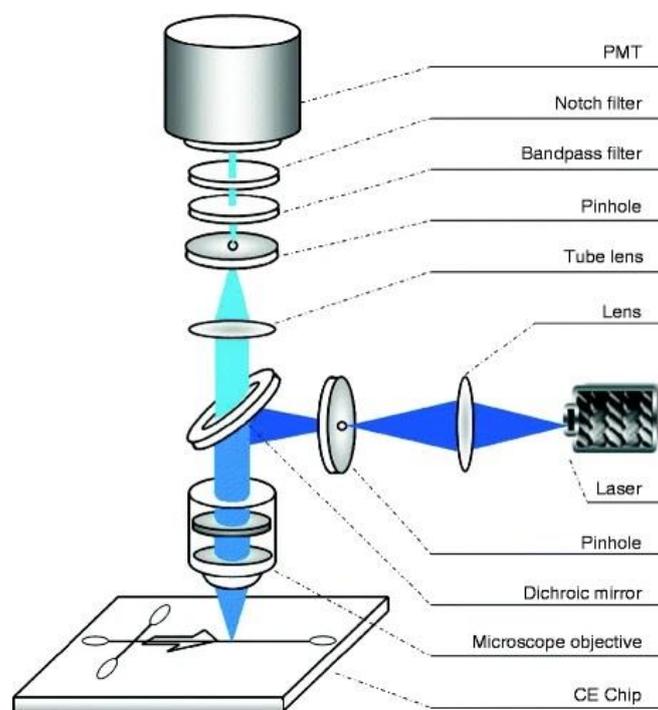


圖 1-13 典型微流體晶片上的螢光檢測示意圖。激發光通過雙凸透鏡，聚焦到針孔中，隨後被分色鏡反射，並通過顯微鏡物鏡聚焦在晶片上的通道中，螢光信號通過分色鏡，由透鏡聚焦到針孔中，並透過光電倍增管(PMT)檢測[68]。

後來有學者將光纖應用於微流體晶片上，由於其體積小、易於嵌入於微流體晶片內，因此被廣泛應用於光學檢測系統中，作為傳輸激發光和接收發光信號的載體，Hsiung 等人透過 MEMS 技術開發一種新的微流體晶片，用於生物分析的螢光檢測

[69]，其工作原理上視圖如圖 1-14(A)所示，成對的多模光纖被嵌入於微流體晶片中以進行傳輸激發光以及收光的動作，從側視圖 1-14(B)可以看到，在光纖與樣本流道之間有一微透鏡的結構，其目的為增加激發光源的強度，從而加強待測物的螢光訊號，圖 1-14(C)為微透鏡結構的掃描式電子顯微鏡(Scanning Electron Microscope, SEM)圖，放大圖 1-14(D)顯示其是由雙凸結構所組成，兩條曲線之間的距離為 120  $\mu\text{m}$ ，而圖 1-14(E)顯示嵌入式光纖的最終端與樣品流道之間的距離為 150  $\mu\text{m}$ 。由於有兩對激發光源以及光電倍增管偵測器，因此可使用不同波長的激發光源通過埋入式光纖耦合到微流體晶片內，達到單獨激發和檢測不同螢光染料標記的不同種類樣品之目的。

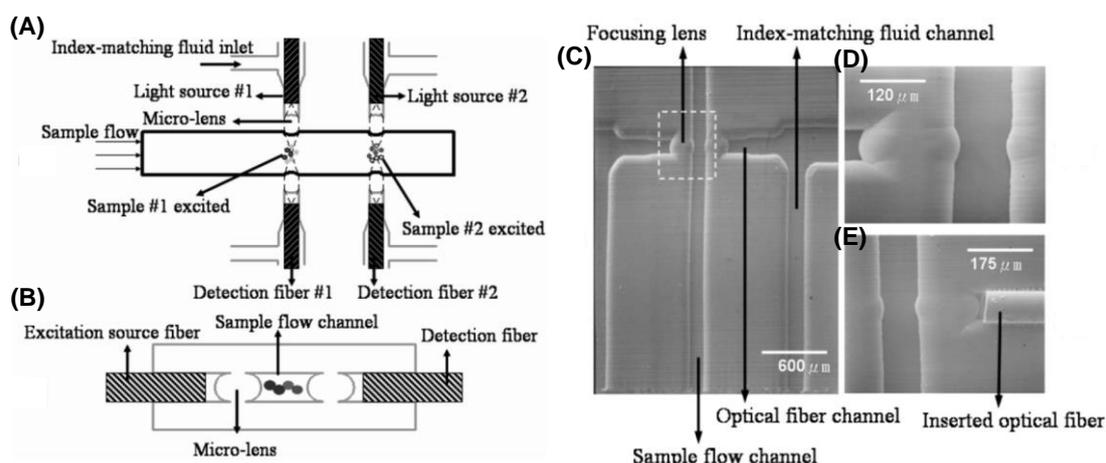


圖 1-14 用於多波長檢測的光纖和微聚焦透鏡的微流體晶片。(A)微流體晶片原理上視示意圖以及(B)側視圖，(C)微透鏡結構 SEM 圖以及(D)放大圖(E)含有光纖的嵌入式光纖通道 SEM 圖。(樣品流道寬度為 120  $\mu\text{m}$ ，通道深度為 40  $\mu\text{m}$ )[69]。

## 1.5 研究動機與目的

慢性腎臟病是目前老年化社會所需面臨的諸多慢性疾病之一，早期診斷難度很大，臨床治療往往無效或太晚。根據台灣衛福部統計，腎炎、腎病症候群及腎病變為國人十大死因中的第九名[8]，每年的死亡人數也都在不斷的上升。目前醫療上常見的尿潛血檢測方法為尿液試紙、顯微鏡觀察、試紙分析儀以及尿沉渣分析儀這幾種，尿液試紙雖然有使用方便以及快速之優點，但因缺乏專一性，容易出現偽

陽性的問題，通常當做初步的篩檢，顯微鏡觀察雖可獲得數值化之定量結果，但是有著勞動密集和過程耗時的缺點，尿液檢體還須親自送到醫院進行檢查，容易造成 COVID-19 的感染，這對生命上的安全有著很大的危害，而試紙分析儀以及尿沉渣分析儀有價錢昂貴體積龐大等問題，目前在學術上也有許多提出用於血紅素檢測的方法，如分光光度法、電化學分析、螢光檢測以及化學發光法等多種檢測方式，但設備的取得和檢測特異性以及裝置只能進行一次性的量測，仍然限制了日常家庭尿潛血檢測之可能性。

因此，本研究欲開發一體積小、可重複性使用、快速以及準確檢測尿液潛血之微流體裝置。透過本實驗室發展已久的生物微流體晶片技術，結合發光胺化學發光法與光偵測系統，達到尿潛血之檢測。由於開發的微流體晶片體積小，並且具有偵測快速、易於操作且不受尿液干擾物影響，因此易於與 POCT 系統集成，可於平時如廁時進行即時的檢測。

本研究提出一微流體晶片檢測尿潛血裝置並改善上述所提到之問題。

實驗目的如下：

(一)解決體積大以及一次性使用之問題：

設計一小尺寸並且可重複性使用之微流體晶片，透過化學發光法的優點進行尿潛血的快速檢測。

(二)解決特異性問題：

結合微米玻璃珠之血球過濾流道於微流體晶片內，由於尿液的成分複雜，在檢測時容易被干擾物影響而導致失真，因此利用血球過濾的方式，將直徑大小為 6~8 微米的紅血球攔截，並由後端負壓裝置將其他干擾物及尿液排除，此方式不僅可提升系統特異性還可提升發光反應訊號強度以降低晶片的檢測極限。

(三)開發之微流體晶片進行效能測試

在完善晶片設計以及反應溶液後，進行生理食鹽水與血液混和溶液的晶片效能驗證，最後針對實際的尿液進行尿潛血檢測。

## 1.6 論文架構

本論文的結構分為五個章節，第一章將介紹尿潛血以及目前檢測尿潛血之方法，第二章會對本研究的發光原理進行說明，第三章則會闡明本研究的微流體晶片的設計及製程以及實驗流程，第四章會找尋最佳化參數並驗證晶片效能，第五章則會整合上述之研究成果並做出結論與未來展望，詳細的系統架構如圖 1-15。



圖 1-15 論文架構圖。

## 第二章 設計與原理

### 2.1 化學冷光特性與 Luminol 發光原理

由於物體會產生光、反射光以及散射光到人的眼睛，因此我們才可以看到各種不同的顏色，而我們可以將物體發光區分為熱光以及冷光這兩種，當物體本身因為溫度升高而產生的光即為熱光，如太陽以及蠟燭等等。而冷光則是透過化學能、電能以及生物能所激發，產生一激發態物體後回到基態並以光的形式放出能量，其發出的溫度不比環境溫度高，因此被稱為冷光發光，代表性的物體為螢火蟲與演唱會常使用的螢光棒，螢火蟲的發光機制如圖 2-1 所示，螢光素 (Luciferin) 在發光酵素 (Luciferase) 的催化下發生氧化反應，產生一高能激發物 (Oxyluciferin)，當回到基態時放光，即為我們所常見的螢火蟲發光[70]。圖 2-2 為螢光棒發光原理，螢光棒外層為聚乙烯(Polyethylene, PE)塑膠材料，內部則有玻璃管的夾層。於玻璃管外裝有酯類物質，多為鄰苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate, DBP)以及草酸苯酯衍生物，並與螢光染料混合之溶液，管內則是裝有濃度 35%的過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。在經過彎曲螢光棒使玻璃管破裂後，過氧化氫會與酯類物質反應生成兩個分子的苯酚以及一個過氧化酯分子，接著過氧化酯再自行分解成二氧化碳，此步驟會提供螢光染料轉變為激發態之能量，當激發態的螢光染料回基態時，會透過發光來釋出能量，而螢光棒所發出光的顏色則是取決於不同結構的螢光染料，在所有顏色中，紫色因需要三種螢光染料結合，因此最難製作，其次為紅色以及藍色。

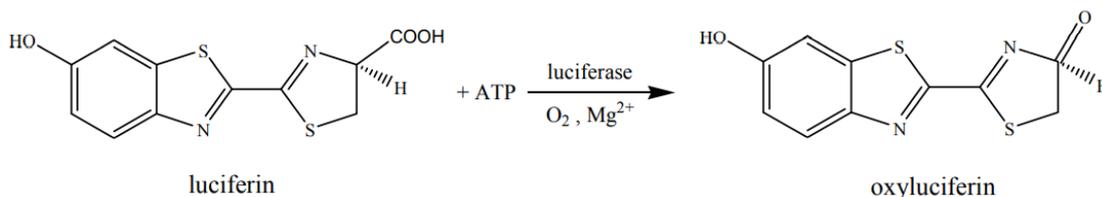


圖 2-1 螢火蟲的發光機制。

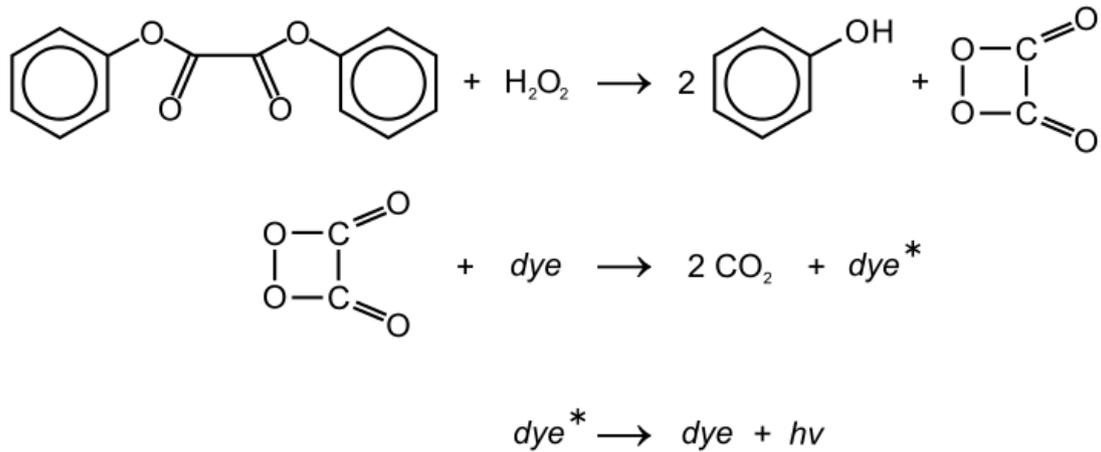


圖 2-2 螢光棒發光原理。

對於發光現象的研究從古希臘時期就有許多學者提出各種觀點，到了 1888 年 Wiedemann 才定義發光(Luminescence)這個名詞[71]。根據不同激發方式所產生的發光現象，以下舉例幾種發光方式，第一種為光致發光(Photoluminescence)，被視為冷光發光的一種，是當物質吸收光子後重新放射出光子的過程。第二種為熱發光(Thermoluminescence)，當礦物受熱激發時，將原來吸收並儲存於晶格缺陷中的電磁輻射會以光的形式釋放。第三種為電致發光(Electroluminescence)，是透過電流使物體產生發光，即電能轉換成光能的現象，如發光二極體。第四種為，電冷光(Electroluminescence)，當電流通過物質時或物質處於強電場下發光的現象。最後一種則是化學冷光(Chemiluminescence)，此為本研究所使用發光胺反應溶液之原理，主要是透過化學反應產生位於激發態的產物或中間物質，接著激發態在回到基態後以光的形式將能量放出，此過程中沒有熱能伴隨釋出。

### 2.1.1 化學發光原理

如前面提到的化學發光法，其是透過化學反應產生能量的，而在此過程中沒有熱能伴隨釋出，因此又稱為化學冷光。一般而言，化學發光反應途徑可分為兩種機制，分別為直接化學發光以及間接化學發光的形式[72]，如圖 2-3 所示。

(一)直接化學發光：

因物質 A 與 B 化學反應後，經過一步或多步的反應產生激發態  $C^*$ ，當激發態的  $C^*$  回到基態 C 時會以光的形式放出能量。

(二)間接化學發光：

也稱能量轉移發光，物質 A 與 B 化學反應生成的激發態  $C^*$  並不是發光體，反而是把能量移轉到感光分子 F 上，使 F 躍遷至激發態後回到基態時，透過光的方式釋出能量，發光物質如發光胺、光澤精(Lucigenin)以及螢光素(Luciferin)等為最常被使用，感光劑大部分為前面有介紹到螢光棒所使用的染料或螢光分子。

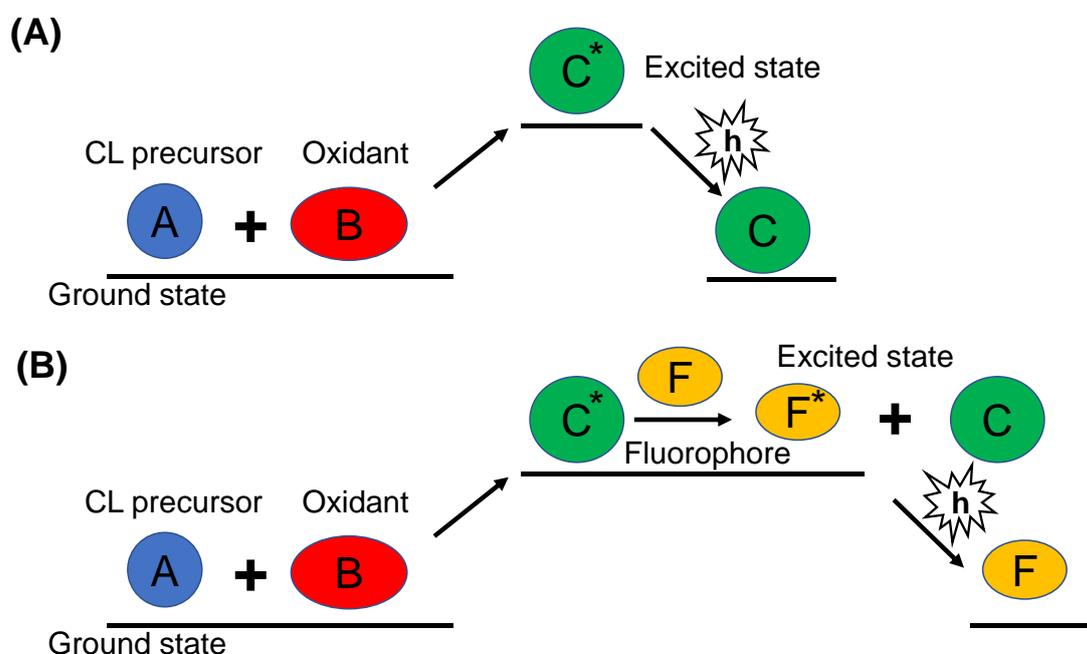


圖 2-3 兩種化學發光反應途徑。分別為(A)直接化學發光(B)間接化學發光，F 為感光劑(Fluorophore)[72]。

化學冷光與螢光最大的差別在於激發態的產生方法，化學冷光法產生激發態所需的能量是由化學反應提供，而螢光則需由外界供應光源以產生激發態之能量，因此化學冷光的優點為偵測時不需額外的激發光源系統，可防止激發光源所產生之背景干擾，所以可擁有較好的偵測極限。雖然在古希臘時期就從發光動物身上發

現化學發光的現象，但系統性的研究卻是一直到十九世紀末期至二十世紀初期才初具規模，最早是由 Radziszewski 於 1877 年所發表人造的化學冷光化合物[73]，即洛粉鹼(Lophine)，其在含氧以及強鹼性的水溶液中時，會發出綠色的光，到了 1928 年由 Albrecht 首先發表 Luminol 與氧化劑在強鹼中反應可以產生波長 425 nm 的藍光之後，科學家們才紛紛投入化學發光的領域。

化學發光的研究在早期發展是以定性的探討、發光的機制以及何種原因會影響發光的產生，還並未被應用在定量的檢測上。一直到二十世紀的初期，已經有數個化學發光反應被歸類出來，當時所發現能夠產生化學發光的化合物以有機化合物居多，一般而言反應必須在強鹼的環境下才會發生，而且訊號多半都相當微弱，同時要在高濃度的條件下才能得到明顯的訊號，其中發光胺是少數能夠在低濃度的溶液中得到明顯發光訊號的化合物，因此最常用來進行對化學發光的研究。化學發光強度達到最大值的時間約在 0.01 秒至數秒間，開始發光一直到消失約可持續 1 秒到數十秒。應用於定量分析時，訊號處理方面可以使用所產生的化學發光的最大強度乘以半高寬(Full width at half maximum, FWHM)計算出該波型積分面積，也就是發光強度對發光時間積分，而化學發光方法受到青睞的原因是因為它本身所具有的高選擇性、低雜訊干擾、與儀器簡單等優點，特別適合用於分析生化樣品。對於檢測很多化合物而言，簡單快速的化學發光分析方法是很有潛力的一項技術，已經被應用在很多領域方面，例如：生物科技、藥理學、分子生物學、臨床和環境科學等。伴隨著半導體技術的進步，光學設備的價格不如以往的昂貴，將光學系統應用於樣本的定量分析上也變得更加容易，透過偵測到的光訊號轉變為電訊號的方式，取代了原先以肉眼判讀的方式，大大降低了檢測的極限以及準確度，原先侷限化學發光方法發展之一的原因為化學發光的光強度較螢光弱，因此需要較靈敏的儀器來加以偵測，這增加儀器的設計難度與成本，如今少了這種限制，這對於化學發光的應用也日漸受到重視。

## 2.1.2 Luminol 介紹與發光原理

Luminol 為最被廣泛使用的化學發光試劑，主要原因是其配置簡單安全、有明顯發光訊號且線性範圍廣大。自從 1928 年由 Albrecht 首先發表 Luminol 與氧化劑在強鹼中反應可以產生波長 425 nm 的藍光之後就不斷有非常多樣化的分析及檢驗方法被發展出，常見的 Luminol 溶液配方有 1951 年 Grodsky 等人透過碳酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )、過硼酸鈉 ( $\text{NaBO}_3$ ) 與 Luminol 混合而成的溶液[74] 以及 1966 年 Weber 使用氫氧化鈉 ( $\text{NaOH}$ )、過氧化氫 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 與 Luminol 混合而成的溶液[40]，其簡單的反應式如下圖 2-4 所示[75]。

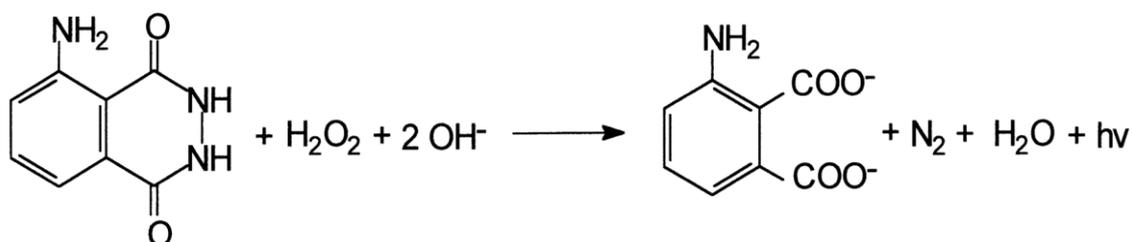


圖 2-4 Luminol 發光系統反應式示意圖[75]。

由上述 Albrecht、Grodsky 與 Weber 所開發之配方以及圖 2-4 發光系統反應式可以知道，Luminol 必須在鹼性環境中且有氧化劑的存在下，才有化學發光現象，若有催化劑或增強劑的存在則會增強發光，而在 Luminol 的化學發光機制中，有四個重要因素會影響其發光強度，分別為氧化劑的種類、催化劑、自由基以及反應條件，本研究所使用的氧化劑為最常使用的過氧化氫，其他的還有漂白水中的次氯酸根以及過錳酸根等等。而催化劑種類如本研究量測之血液中的鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )，通常會使用鐵氰化鉀 (Potassium hexacyanoferrate) 也就是俗稱的赤血鹽來代替，還有過氧化酶 (Peroxidases) 以及過渡金屬離子  $\text{Co}^{2+}$  等等，在 Luminol 發光機制中，催化劑濃度增加，即可大幅提升整體的發光效率，第三則是有無其他自由基的存在，在 Luminol 之化學發光系統中，有幾個重要的中間體如 Luminol 自由基 ( $\text{L}\cdot$ )、Luminol 過氧化物 ( $\text{LO}_2^{\cdot-}$ )，其形成速率及效率會因某些自由基或活性含氧物質如  $\text{O}_2\cdot$ 、 $\text{OH}\cdot$ 、

O<sub>2</sub>等的存在而大為增加，因而增強化學發光。最後則是反應的條件，例如 pH、溫度等等，對化學發光反應中間體之形成速率及產率、激發放光物質(Emitter)之效率及放光物質之量子產率等都有很大的影響。只要在系統中能夠影響發光且可以為限量試劑者便可加以定量，如 Luminol、氧化劑、催化劑、感光劑等等皆可以被定量分析，因此擴展了可供定量的物種數量，並增加在定量分析上的應用價值。

## 2.2 光纖整合於微流體晶片

微流體晶片將樣品提取、分離、混合以及檢測集成在一個晶片中，取代了傳統實驗室的功能，由於其顯著的優勢，微流體晶片已廣泛應用於化學、生物、物理、機械和材料等諸多領域[76-78]，微流體晶片中常用的檢測方法可以分為電學檢測法和光學檢測法。電檢測主要包括電流檢測、電導檢測以及電位檢測等等，光學檢測主要包括螢光檢測、吸光度檢測以及化學發光檢測等等。與電學檢測方法相比，光學檢測方法具有非侵入性、無電磁干擾以及靈敏等優點，而傳統的光學檢測裝置則需要顯微鏡、鏡頭等複雜的光學元件，不利於晶片小型化的發展[79]。為了更好地將光與微流體晶片集成，光纖成為了一種合適的光傳輸載體，光纖具有體積小、易於集成、抗電磁干擾、耐腐蝕以及可遠距離傳輸等優點，目前也已廣泛應用於各種光學量測上[80]。

### 2.2.1 光纖於微流體晶片分類

光纖主要有三層結構組成，由裡到外分別為纖核(Core)、纖殼(Cladding)、包覆層(Coating)，為了要侷限光訊號於纖核內，因此纖殼的折射率會小於纖核，讓光能在介面處產生全反射(Total internal reflection)，使其能在內部進行傳輸。一般來說，光纖在微流體的使用上可分為兩類，一類為近接式光纖(Proximity fiber)另一類為嵌入式光纖(Embedded fiber)，如圖 2-5 所示[81]。近接式光纖位於晶片附近，但不接觸晶片，因此方法很容易被開發，儘管可能會在訊號中引入額外的環境干擾，Han 等人已經證明了此方法在檢測大腸桿菌的能力[82]。另一方面，嵌入式光纖通常被整合於微流體晶片中，此方式提供了較佳的性能，有著較小的信號損失等優點[69,

83]。順帶一題，本研究使用此種嵌入式光纖作為傳遞光之方法，透過將光纖伸入微流體晶片來對發光物質進行收光。

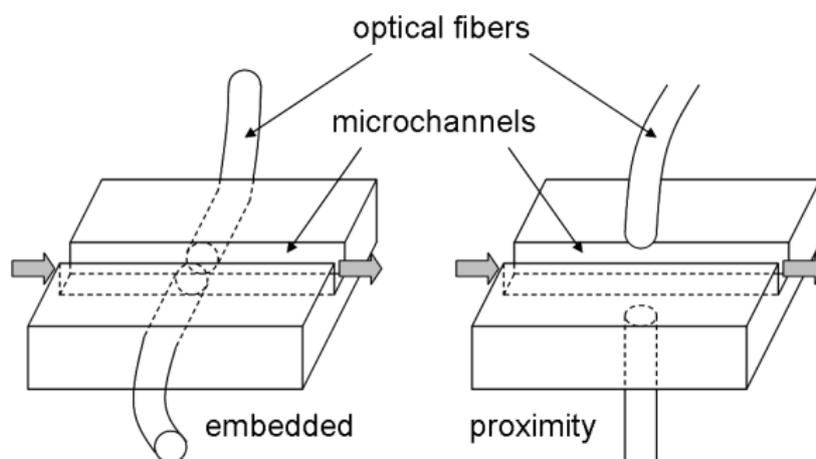


圖 2-5 兩種光纖應用於微流體晶片方式。(A)嵌入式與(B)近接式光纖[81]。

## 2.2.2 光纖於微流體晶片之應用

### (一) 螢光檢測

螢光檢測原理為使用特定波長的激發光照射螢光化合物進而發出螢光。通過測量螢光發射的特性和強度，對標記物質進行定性和定量分析。此方法是微流控芯片生化檢測中常用的一種光學檢測方法，對於流式細胞儀、蛋白質以及 DNA 等等都可以用螢光法進行檢測[84, 85]，圖 2-6 為 Vazquez 等人於 2009 年提出一種將直徑為  $10\ \mu\text{m}$  的光纖集成到微流體晶片中的螢光測量裝置[86]。

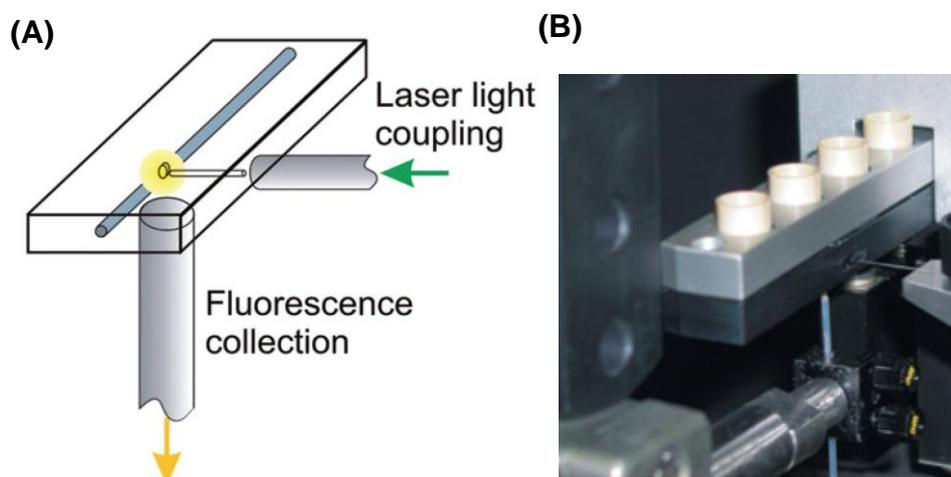


圖 2-6 光纖集成到微流體晶片中的螢光測量裝置(A)示意圖(B)實體圖[86]。

## (二) 吸光度檢測

吸光度檢測的基本原理是利用物質對光的吸收波長特性，對物質進行定性分析和定量檢測，根據分子結構的不同，物質會吸收特定波長並有自己的特徵吸收光譜，透過光譜的峰位以及強度可以反映分析物的化學特性與濃度。吸光度法已在不同的生物和化學應用中進行樣本無標記檢測及定量，包括酶的測定、pH 的測定以及臨床診斷等等[87-89]，其中 Hengoju 等人於 2020 年發表一整合螢光檢測、吸光度檢測以及散射光檢測之微流體晶片，可同時檢測不同微生物應用中的多個參數，如細胞密度測定、生長動力學和抗生素抑制等試驗，將液滴微流體的高通量潛力與光纖的易用性、靈活性和簡單性相結合，為微生物實驗提供了一個強大的平台[90]。圖 2-7(A)為晶片示意圖，圖 2-7(B)為晶片實際圖以及量測結果圖。

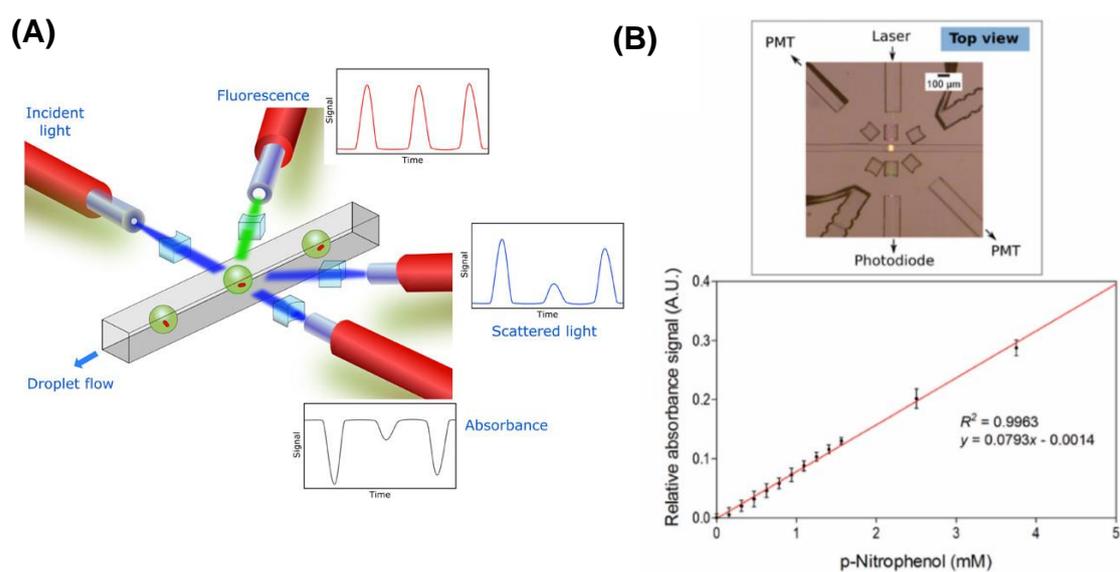


圖 2-7 整合螢光檢測、吸光度檢測以及散射光檢測之微流體晶片。(A)示意圖(B)實體圖以及量測結果[90]。

## (三) 光散射檢測

光散射是光偏離直線軌跡的過程，當樣品被入射光照射時，它會向不同的方向偏轉，根據樣品的形狀、大小以及粗糙度形成不同的圖案，不同角度的光分佈量用於識別和檢測樣品，此種也是無標記檢測方法，並已廣泛用於流式細胞儀中的細胞

分析，而此種嵌入光纖的微流體晶片已被證明具有與商業流式細胞儀相似的性能 [91]。Zhao 等人於 2016 年開發一具有集成片上光學系統的微流控細胞儀，並被用於進行紅細胞與血小板的計數，圖 2-8(A)為微流體晶片 3D 結構圖，圖 2-8(B)為微流體晶片光學系統示意圖[92]。這些小型化的微系統可以提供一種真正方便攜帶並且低成本的形式，用於無標記臨床診斷和病原微生物的鑑定。

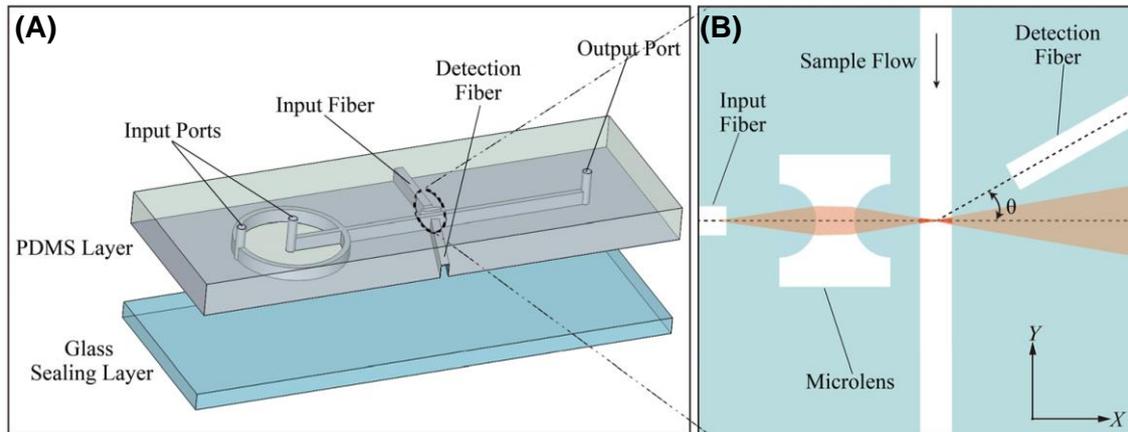


圖 2-8 光散射微流體晶片。(A)為微流體晶片 3D 結構圖，圖 2-8(B)為微流體晶片光學系統示意圖[92]。

# 第三章 材料與方法

本章節首先將於第一部分介紹本研究所使用之兩種檢測架構，分別為比色管以及微流體晶片之實驗架構，並且展示實際暗箱內部照片以及說明兩種架構的實驗流程，接下來第二部分則對於本研究所開發之微流體晶片設計及製程進行介紹，第三部分則會介紹反應溶液、樣本配置以及 PDMS 導管連接器與光纖與 APD 連接器製作。

## 3.1 實驗架構

### 3.1.1 於比色管檢測

為了初步了解光纖對於系統檢測之影響，因此設計一可方便進行參數調整與檢測之裝置，系統架構示意圖如圖 3-1 所示，首先，本研究透過一尺寸為 11.5 cm x 9.0 cm x 8.0 cm 的長方型塑膠盒來模擬一暗室，其目的為防止環境光的影響進而導致最後光纖收光的失真，以確保實驗能夠在無干擾的環境下進行，圖 3-2 為實際的暗箱內部上視圖。利用 SolidWorks<sup>®</sup>軟體設計一長、寬、高尺寸分別為 1.3 cm、1 cm 以及 2.5 cm 之模型做為比色管兩側之固定塊，並以 3D 列印機(Ultimaker 3, Ultimaker<sup>®</sup>, Netherlands)列印兩塊材質為聚丙稀腈-丁二烯-苯乙烯共聚物 (Acrylonitrile-butadiene-styrene, ABS)之模型。接著製作一固定片，其是以鋁箔紙包覆住載玻片(Elka, Assistent<sup>®</sup>, Germany)的方式防止比色管內光線散出，使用雙面膠將固定塊與固定片黏住，最後再與暗箱黏合即設置完成。

實驗步驟首先將一塑膠比色管(1960, Kartell, Italy)放進盒內，滴入 1 mL 樣本溶液於比色管內，接著將光纖一端通過事先於暗箱上蓋鑽好之孔洞伸入比色管內後蓋起上蓋，另一端則伸入本研究設計之連接器中。透過電源供應器(GPD-4303S, GWInstek, Taiwan)提供 12 V 直流電給光檢測器 APD(C5460-01, Hamamatsu, Japan)，最後連接桌上型數位電表(34410A, Agilent Technologies, USA)與電腦後即可開始進行量測。在進行實驗前，開啟桌上型數位電表所搭配之電腦軟體 Keysight benchvue，

以便將實驗數據紀錄下並且輸出到 Excel 做後續的資料分析。軟體開始偵測後從上蓋開孔處滴入 1 mL 之事先配置好的 Luminol 反應溶液於比色管內，這時待測溶液會與 Luminol 溶液反應發出藍光，透過 APD 將系統反應所收到的光訊號轉變為電訊號並利用桌上型數位電表將數值輸出到電腦。利用這樣的方式來達到檢測的效果，等待反應完全結束後，直接將比色管丟棄並放置新的比色管進長方型塑膠盒內即可接著後續的實驗。

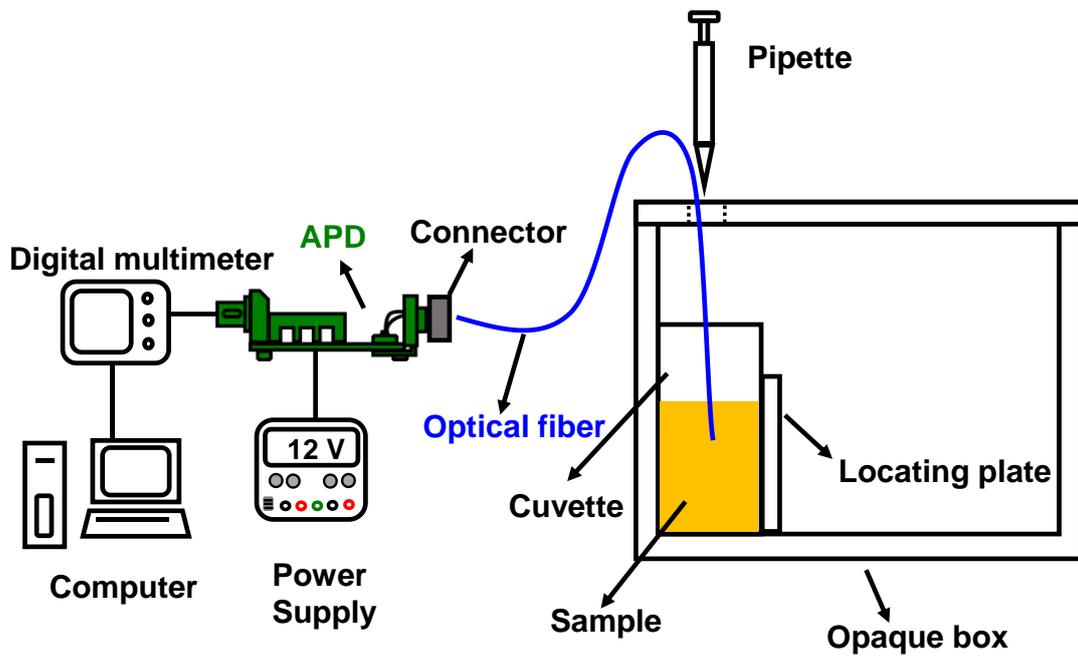


圖 3-1 比色管系統架構示意圖。

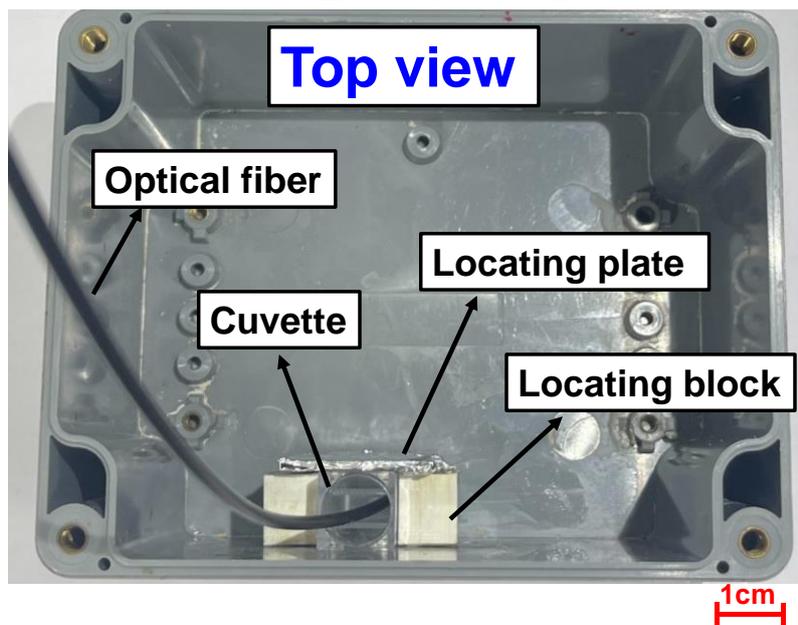


圖 3-2 比色管系統暗箱內部上視圖。

### 3.1.2 於微流體晶片檢測

接著介紹結合本研究所開發之微流體晶片系統架構，架構示意圖如圖 3-3 所示，一樣為了防止環境光的影響造成最後光纖收光的失真，因此利用長方型塑膠盒來模擬一暗室，以便實驗能夠在無干擾的環境下進行。在暗箱外部的系統架設與前述比色管檢測架構幾乎相同，微流體晶片系統架構則是多了一負壓系統用來提供微流體晶片的動力，並利用過濾瓶內填充棉花的方式，防止溶液進入泵浦 (2688CS32-273 C, Thomas, USA)內造成損壞。從圖 3-4 暗箱內部上視圖可以看到，晶片直接被放置於暗箱的底部，並將晶片上的光纖從暗箱側邊事先鑽好的孔穿出來並接上連接器，以固定塊將晶片固定住後，於微流體晶片上的三個 PDMS 導管連接器接上 PU(Polyurethane)管，分別為進樣口、反應溶液入口以及負壓系統並蓋上暗箱的上蓋，提供電壓 12 V 給光偵測器，透過桌上型萬用電表將檢測數值匯入電腦進行後續數據處理，到此準備工作完成。

實驗步驟首先開啟負壓系統中的泵浦，接著加入 1.0 mL 的待測溶液於進樣口之 PU 管，出口端的負壓會使待測溶液通過晶片過濾系統，紅血球將被攔截於此處並將剩餘不須被檢測到的溶液抽走，等待 10 秒將待測溶液完全過濾後滴入 1.0 mL 的 Luminol 溶液於反應溶液入口之 PU 管內，一樣透過出口端負壓使 Luminol 溶液與過濾系統中的紅血球反應產生藍光，利用位於過濾流道下方之光纖進行收光動作，並將光透過全反射的方式傳遞給光偵測器，最後將檢測結果匯出到電腦進行後續的數據處理。本研究為了在晶片重複使用的前提下，不讓殘留紅血球影響下一次檢測結果，在加入 1.5 mL 的去離子水(Deionized water, DI water)到微流體晶片後，透過滲透壓的方式即可將晶片內的紅血球清洗乾淨，確保下一次的量測不會有殘留紅血球的干擾，這在後續會有針對晶片的樣本清潔度進行更深入的探討。

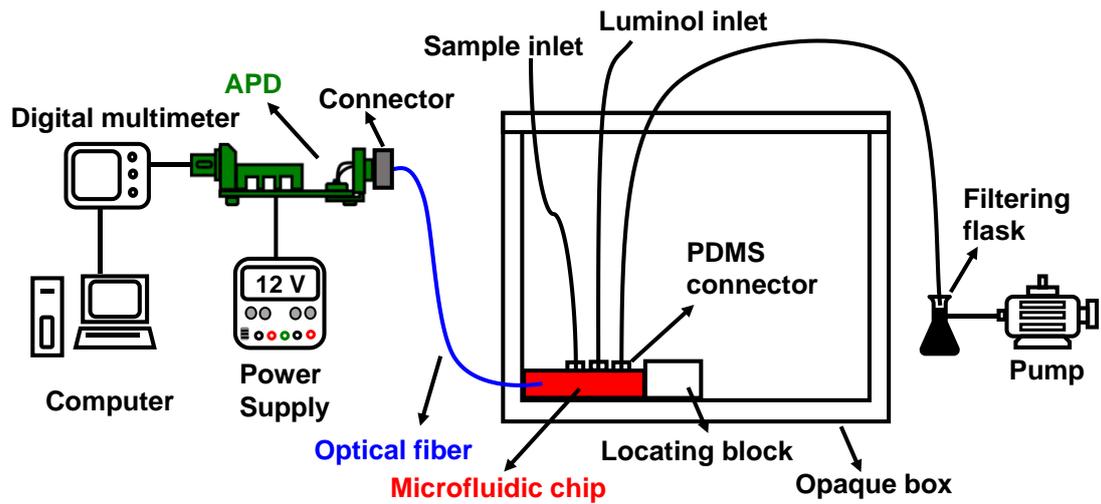


圖 3-3 微流體晶片系統架構示意圖。

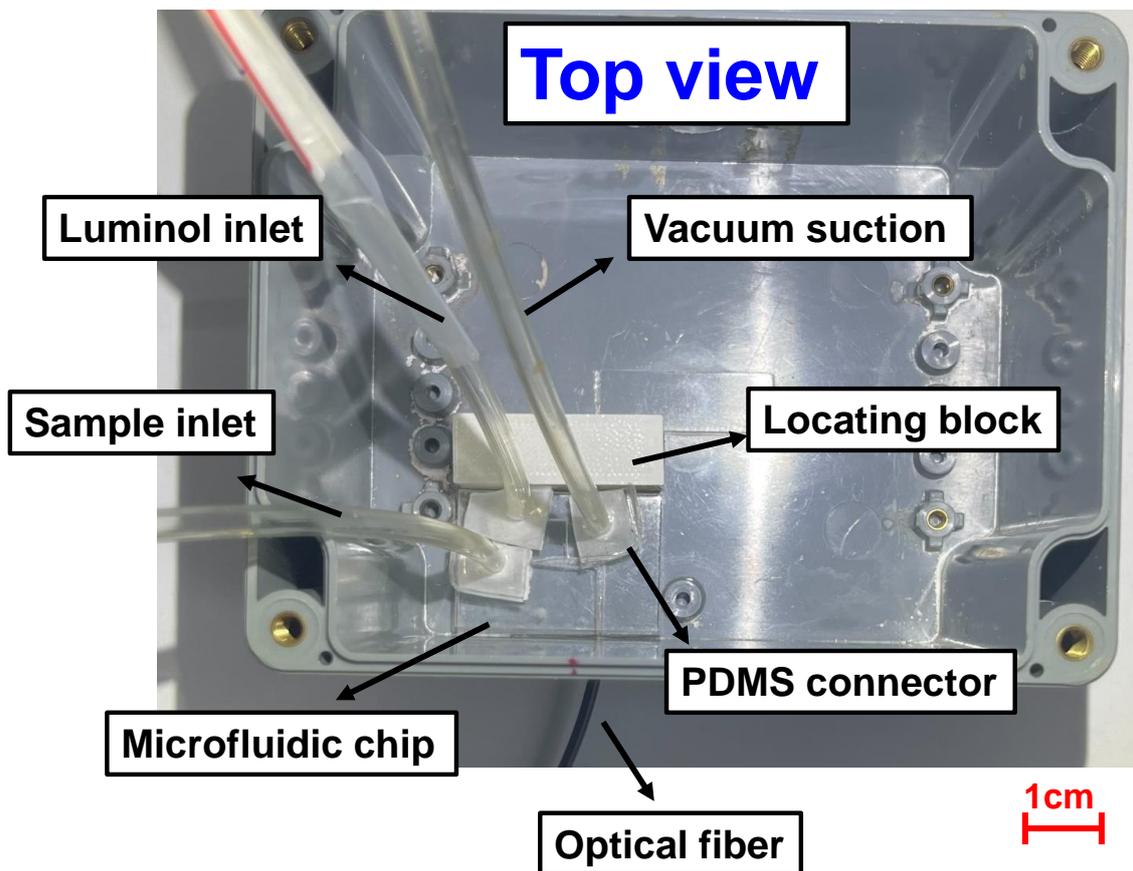


圖 3-4 微流體晶片系統暗箱內部上視圖。

## 3.2 微流體晶片之設計與製作

### 3.2.1 晶片設計

本研究所設計之微流體晶片結構及詳細的尺寸如圖 3-5 所示，晶片長與寬分別為 35 mm 與 25 mm，主流道為尺寸為 200  $\mu\text{m}$ 、過濾流道為 100  $\mu\text{m}$  以及光纖流道為 1 mm，進樣口、反應溶液入口與負壓系統出口大小皆為直徑 3 mm。由於熱壓接合微流體晶片的關係，使原本寬度為 100  $\mu\text{m}$  之過濾流道會縮小成尺寸小於 100  $\mu\text{m}$ ，因此在注入直徑為 100  $\mu\text{m}$  玻璃珠時，會因為寬度縮小之過濾流道而被攔截並堆積，這也進一步防止後續注入直徑為 15  $\mu\text{m}$  小顆玻璃珠時通過晶片之過濾流道，本研究透過這兩種不同尺寸的玻璃珠來阻擋紅血球的通過以達到提升本研究設計之微流體晶片檢測效能。最後將光纖伸入預留的晶片流道位置內，等待 Luminol 溶液與紅血球反應後產生藍光，光纖即可對過濾流道直接收光並傳遞於光偵測器，以判斷系統發光情形的方式，來達到尿潛血之檢測。

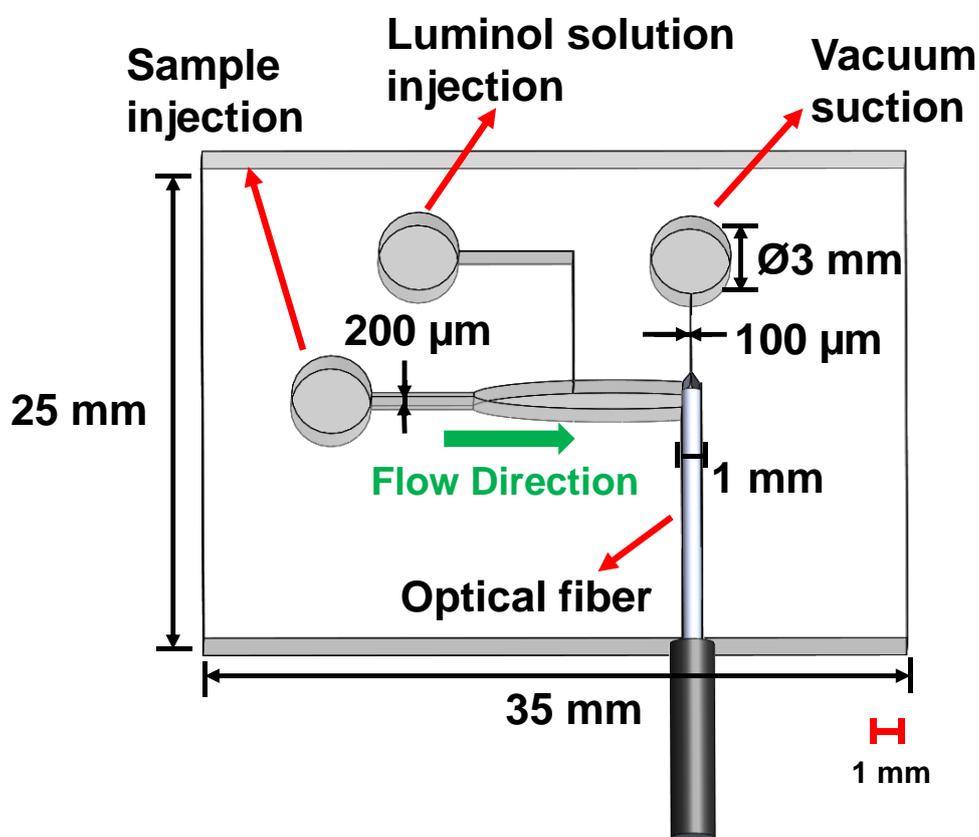


圖 3-5 晶片設計示意圖。

### 3.2.2 晶片製作

前面介紹完晶片設計之後，接下來帶到本研究之晶片製程，示意圖如圖 3-6，下面將會從使用 PMMA 做為基板，透過雷射雕刻的方式雕刻流道開始一直到與最後光纖與微流體晶片接合完畢之製程，針對每個步驟做進一步的詳細介紹。

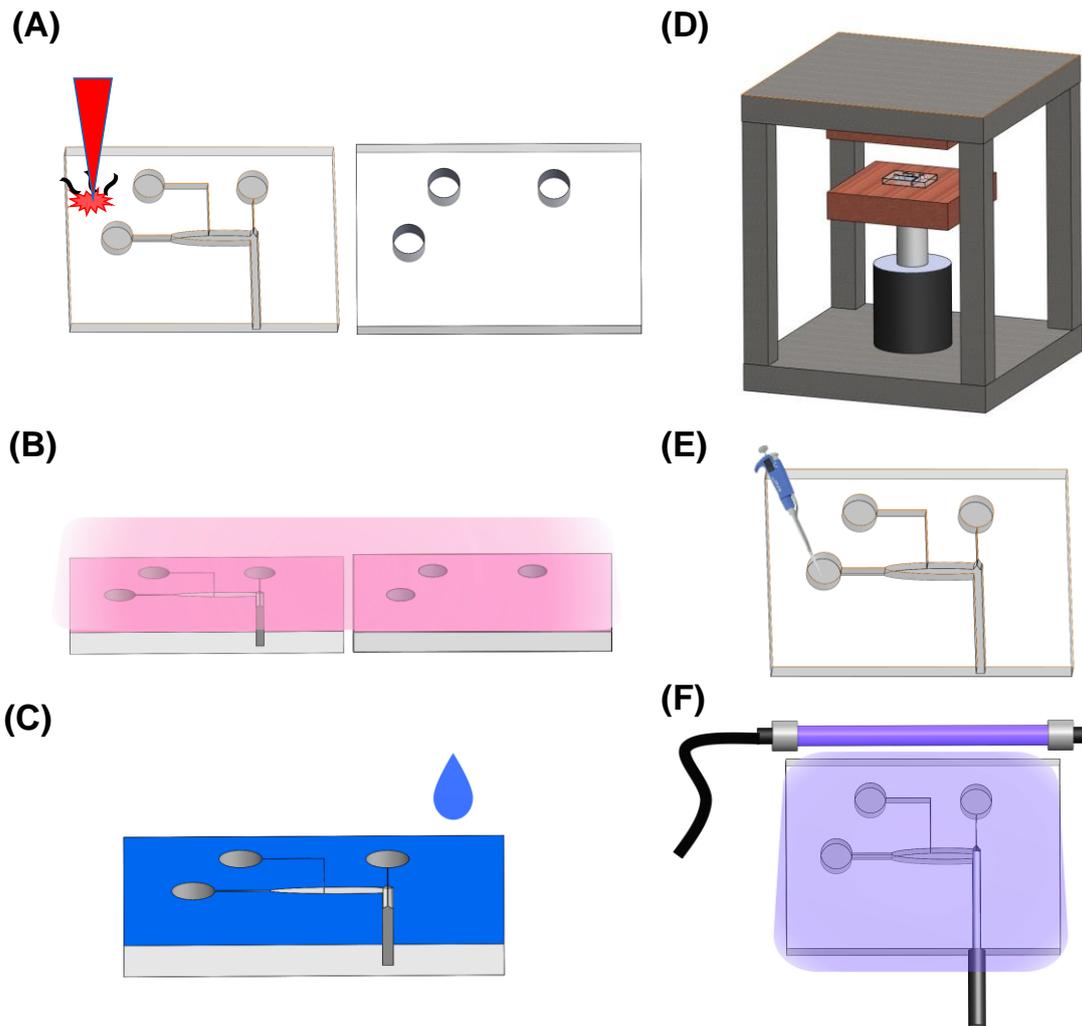


圖 3-6 本研究晶片製程示意圖。

#### (A) 晶片圖案雕刻:

本研究採用俗稱壓克力的聚甲基丙烯酸甲酯 (Poly(methyl methacrylate), PMMA) 當作微流體晶片主要材料，透過雷射機 (LaserPro, Venus II, GCC, Taiwan) 進行流道的製作，本研究之微流體晶片會進行兩次的雷射加工，首先會於壓克力基板

上進行第一次加工，目的為刻畫出流道的輪廓，雷射的輸出功率為 2.4 W、光點的移動速度每秒 50.8 mm，微流道輪廓完成之後，雷射機工作平台高度會向下平移 15 mm，以離焦雷射的方式對 PMMA 的表面進行第二次的雷射加工，以提升結構表面的平滑度，一方面可以減少流動的阻力，一方面可防止後續注入微玻璃珠溶液時阻擋住微玻璃珠的流通，離焦雷射參數將於第四章進行更深入的探討。

### (B) 氧電漿表面處理：

本研究使用氧電漿系統對晶片進行表面改性，以提升晶片熱壓接合後的強度，該電漿系統由寶林泰科技所提供之電漿處理腔體以及一台高頻電源供應器(Force State Aurora IPE300)組成，如圖 3-7 所示。其輸出功率可使用旋鈕進行無段調整，並能進行全自動阻抗匹配(Impedance matching)。處理流程為雕刻好的 PMMA 晶片與上蓋經過酒精表面仔細擦拭後，將需做表面處理的那面朝上擺放入真空腔體之中，關緊腔門後開始抽真空，待到達 300 mTorr 的真空度後將氧氣通入腔體之中，開啟 RF 射頻電源供應器以產生感應耦合電漿 (Inductively coupled plasma, ICP)，對晶片處理時間為 10 分鐘，使用功率為 100.0 W，在這 10 分鐘內，每 2 到 3 分鐘會進行補充氧氣的動作，避免腔體內的氧氣濃度過低，進而使表面處理的效果降低，待處理完成後破真空將晶片取出即可。

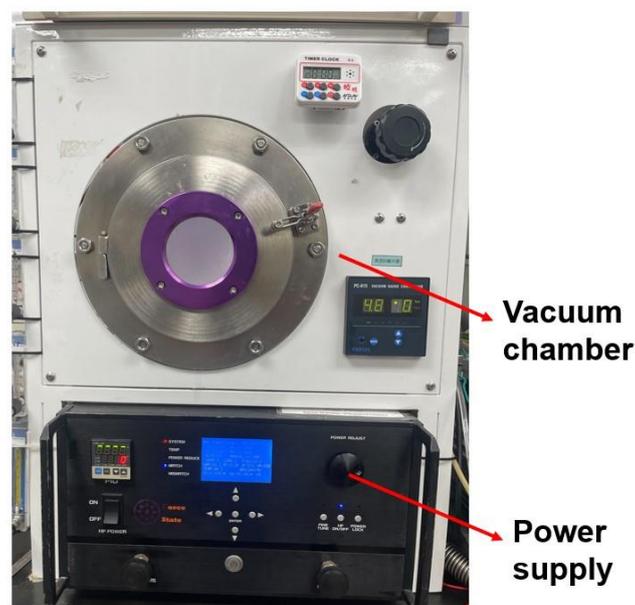


圖 3-7 本研究所使用之氧電漿系統。

### (C) 滴酒精溶液於表面:

由於滴入未經稀釋的酒精於表面進行熱壓接合後，發現晶片微流道會有嚴重縮小現象，導致本研究所設計之微流道消失，因此需要經過酒精稀釋的動作來防止微流道大幅變形的情况發生。本研究使用 DI Water 來進行酒精的稀釋，酒精與 DI Water 以 2:1 的比例混和成酒精溶液後，以移液器吸取 1 mL 的酒精溶液均勻滴於經過氧電漿處理的晶片上，並蓋起上蓋後將晶片放入熱壓機中。

### (D) 熱壓接合:

透過手動泵浦(SP392, Chu Lun Sing Co., Ltd. , Taiwan)使加熱板塊下方之油壓缸(RSCH-202, Chu Lun Sing Co., Ltd. , Taiwan)上升直到晶片碰觸到上方加熱板塊，壓力為  $1 \text{ kg/cm}^2$  並升溫至  $60^\circ\text{C}$ ，待溫度達到  $60^\circ\text{C}$  後持溫 10 分鐘，接著加壓至  $10 \text{ kg/cm}^2$ ，此時溫度一樣維持在  $60^\circ\text{C}$ ，經過 10 分鐘關掉加熱器使晶片自然降溫後即可拿出，此步驟如圖 3-8 所示。

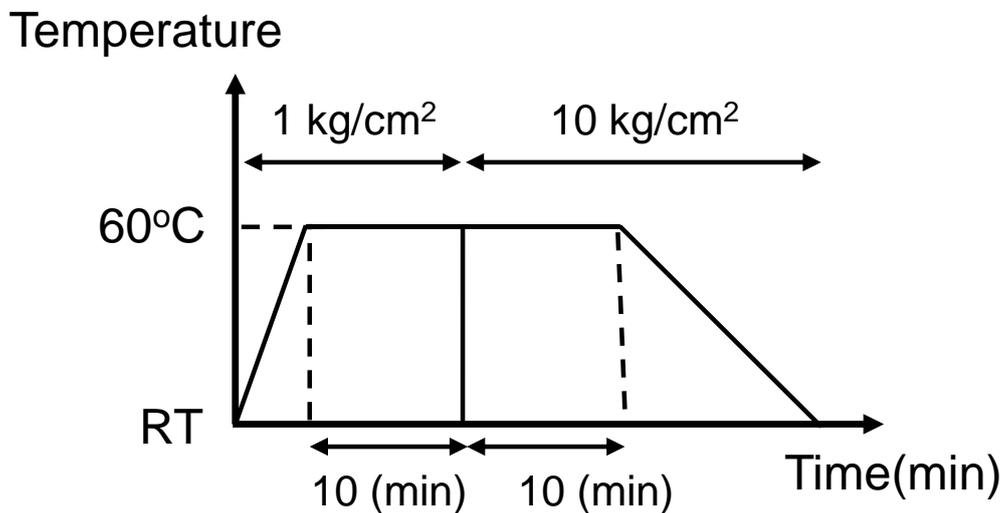


圖 3-8 熱壓接合步驟示意圖。

### (E) 注入微玻璃珠溶液:

首先將直徑 100  $\mu\text{m}$  玻璃珠 (Glass Beads 0.1 mm, Biospec Inc. , USA) 與 DI Water 以濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的比例混和, 接著配置直徑 15  $\mu\text{m}$  玻璃珠 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此外, 為了增強抽真空的效果, 在灌入微玻璃珠之前, 可將 Luminol 的入口端以及光纖端的孔洞以無痕膠帶貼住增加負壓的壓力, 先灌入大直徑 100  $\mu\text{m}$  玻璃珠於進樣口後, 持續給負壓 10 分鐘將晶片內 DI Water 清除, 如圖 3-9(A)所示。接著注入小直徑的 15  $\mu\text{m}$  玻璃珠於進樣口, 小顆玻璃珠會堆積於過濾流道前並將大顆玻璃珠掩埋, 一樣持續給負壓 10 分鐘將晶片內 DI Water 清除, 如圖 3-9(B), 關掉泵浦後加入 1 mL 的 PBS 等待 5 分鐘再重新開啟泵浦 20 分鐘, 將晶片內的水分完全排除乾淨。

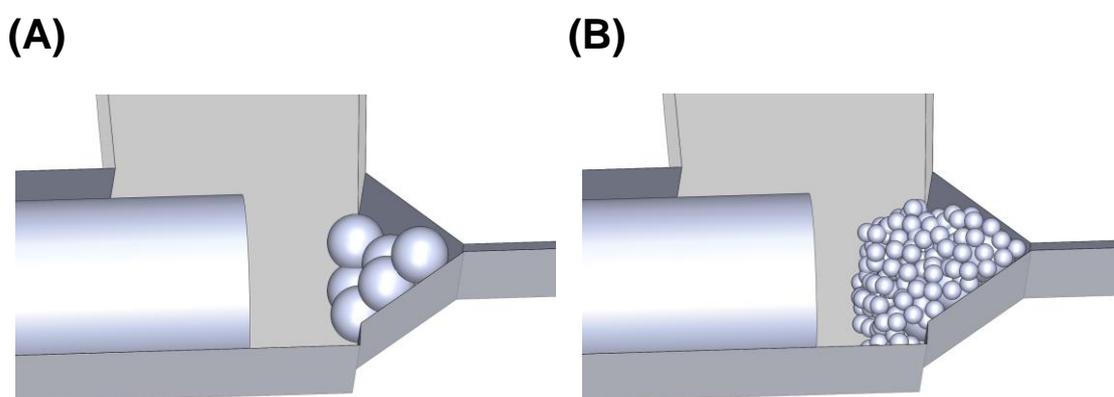


圖 3-9 玻璃珠於微流體晶片內之示意圖。(A)注入尺寸 100  $\mu\text{m}$  玻璃珠, (B)注入尺寸 15  $\mu\text{m}$  玻璃珠。

### (F) 光纖與晶片接合:

在微流體晶片的製程結束後, 最後一步為光纖的嵌入, 只需將光纖去除最外層保護套後, 直接伸入預留的光纖流道內即可, 為了防止於檢測過程中光纖的脫落, 因此會在流道內以及洞口處上一層光固化膠(OP-4-20632, Dymax, China), 接著以功率 1.65 mW 的紫外光燈照射約 15 秒的時間, 光固化膠即可固化, 晶片完成圖如圖 3-10。此步驟還有一方便將光纖伸入微流體晶片之方法, 只需將壓克力上蓋寬度尺寸縮小 1 到 2 mm, 使晶片預留之光纖流道超出上蓋的範圍即可, 這對於伸入光纖有非常大的幫助。

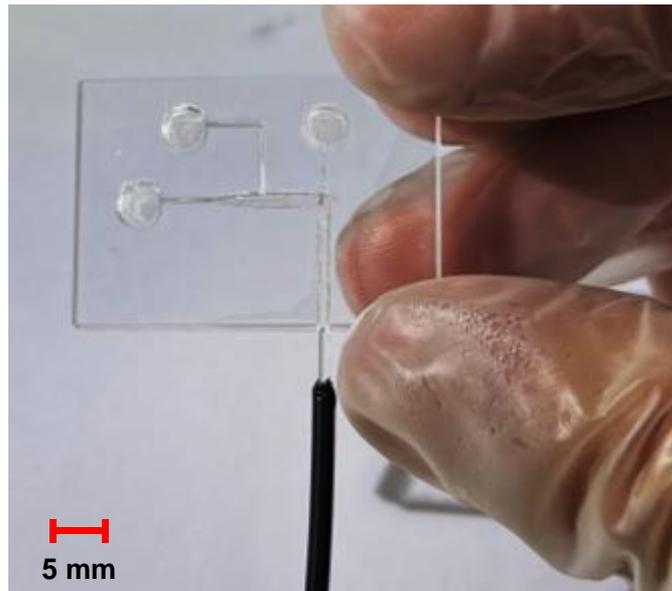


圖 3-10 光纖與晶片接合完成圖。

### 3.3 PDMS 導管連接器製作

由於本研究所使用的 PU 管需要連接到微流體晶片的孔內進行待測物以及反應溶液的進樣動作，因此本研究會製做 PDMS 導管連接器，將 PU 管與微流體晶片牢牢固定，以防止在量測時 PU 管的鬆脫。首先把雙面膠(669, 3M Scotch<sup>®</sup>, USA)貼於用在過濾雜質的濾紙上(1443-090, Whatman<sup>™</sup>, UK)，並將其裁切至 25 x 75 mm<sup>2</sup> 的大小以便進行後續的步驟(圖 3-11(A))。接著在長與寬為 25 x 75mm<sup>2</sup> 載玻片的周圍貼上膠帶作為灌模用的模具(圖 3-11(B))。再來將紙片以濾紙的那面朝上放置於模具底部，並灌入事先混和好的 PDMS 膠體(圖 3-11(C))。PDMS 膠體是 A 劑與 B 劑(SYLGARD<sup>™</sup> 184, Sil-More Industrial Ltd., Taiwan)以重量比 10:1 的比例混合而成，置於振動混合器(VM-200, Digisystem<sup>®</sup>, Taiwan)上 5 min 以均勻混合後放入抽真空腔體，目的是為了將 PDMS 膠體內的空氣抽出，破真空後將 PDMS 膠體注入模具中，接著放於加熱板並且溫度設定為 60°C，等待 PDMS 固化完畢後(圖 3-11(D))，再將其從模具取出並裁切成 8 x 8 mm<sup>2</sup> 的小塊。接著以打洞器於小塊 PDMS 中打出直徑 2 mm 的小孔，使 PU 管可以穿過並固定(圖 3-11(E))。最後再將底部雙面膠的離形紙撕開，並對準晶片的開孔貼上，便可以作為導管連結器(圖 3-11(F))。

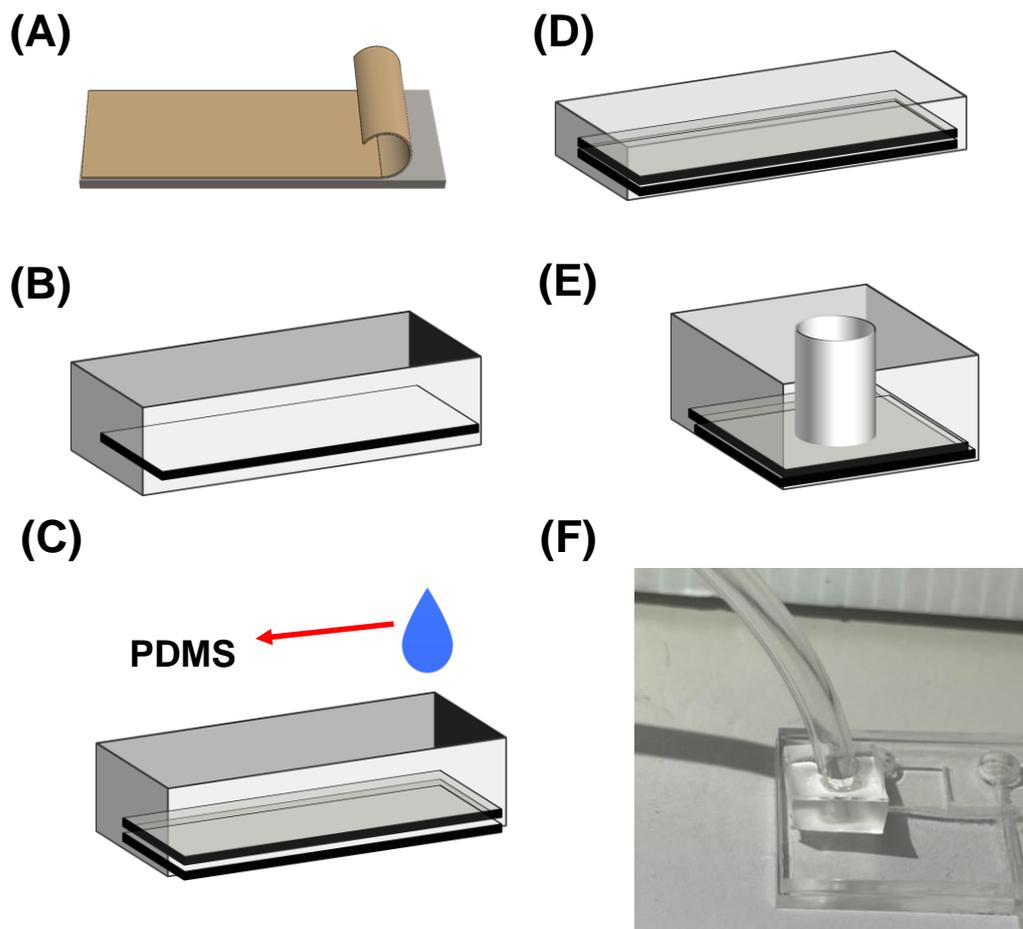


圖 3-11 PDMS 導管連接器製程。圖(A)-(E)為製作過程，圖(F)為 PU 管、連接器以及微流體晶片實際連接圖。

### 3.4 光纖與 APD 連接器

為了將晶片內光纖所收到的光訊號完整傳遞給光偵測器，因此製做一連接器將光纖與 APD 對位固定，以提升光纖收光的效能。本研究使用 3D 列印機(Ultimaker 3, Ultimaker<sup>®</sup>, Netherlands)製做光纖與 APD 之間的連接器，為防止環境光的干擾，材料選擇以碳黑修飾的 ABS(Conductive ABS Filament 3.0 mm, ALIEN 3D, China)製作，利用 SolidWorks<sup>®</sup>軟體設計一尺寸為 20 x 40 x 10 mm 之模型做為連接器使用，詳細尺寸如圖 3-12(A)所示。接著使用 Ultimaker Cura 軟體進行列印參數的設定，完成後以 G-code 檔案的格式儲存並輸出至 3D 列印機，3D 列印機的噴頭溫度設定為 260°C，列印加熱板溫度設定為 80°C，精度為 0.06 mm，並以 50.0 mm/s 的速度進行列印，圖 3-12(B)為實際連接圖。

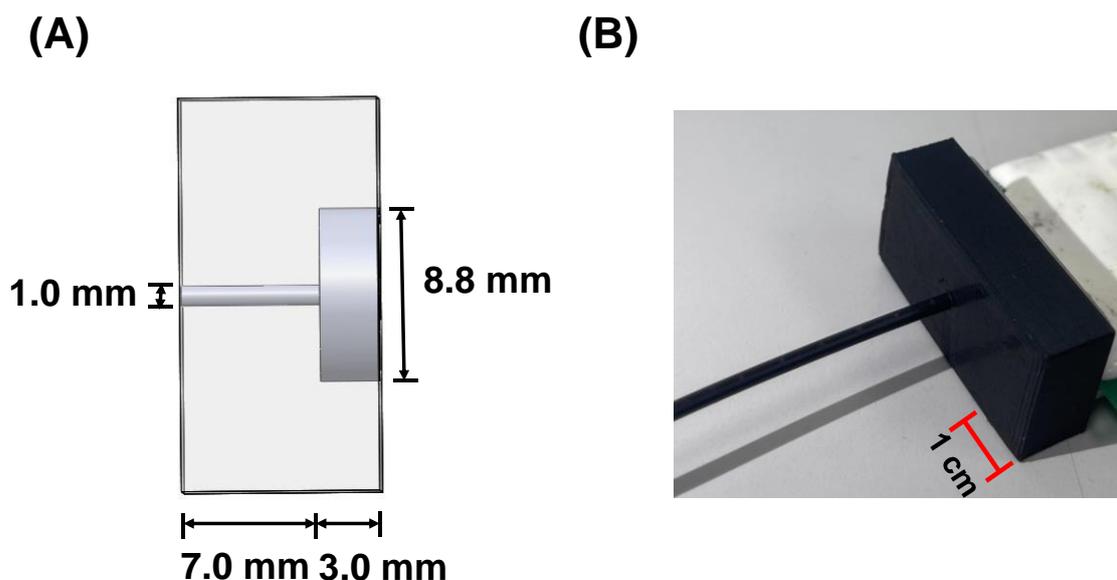


圖 3-12 本研究設計之光纖與 APD 連接器。(A)連接器之示意圖，(B)實體圖。

### 3.5 Luminol 反應溶液與樣本配製

本研究所配置的最佳化反應溶液配方為在容量為 50 mL 的 Luminol 溶液下，各成分濃度分別為 Luminol 濃度 30.0 mM、NaOH 濃度 600.0 mM 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 450.0 mM，這會於第四章做更深入的探討。而樣本溶液則是使用成人血液進行各濃度的調配，成人血液數量為 400 萬到 600 萬顆紅血球/mm<sup>3</sup>[93]，本研究之實驗以中間值 500 萬顆紅血球/mm<sup>3</sup> 來進行樣本的配置。

### 3.6 訊號強度之數據處理

在光偵測器將光訊號轉變為電訊號後，透過桌上型萬用電表將電壓數值輸出到電腦，其是以每 43.5 ms 取一個電壓值的方式進行數據蒐集，最後繪製出橫軸為時間，縱軸為電壓值之座標圖，等待反應結束後停止蒐集並將檢測結果做後續的數據處理。首先透過 10 個點取移動平均的方式對數據進行平滑化處理，使用 Excel 的 SUM 函數將電壓值第 1 個數據累加到第 10 個數據後，其總和除以 10 當作移動平均後的第 1 個點，接著第 2 個數據累加到第 11 個數據後總和除以 10 當作移動平均後的第 2 個點，以此類推，最後重新做圖即可得平滑後之座標圖，如圖 3-13(A) 所示。接下來是對訊號強度計算進行講解並以圖 3-13(A)為例子，在進入檢測實驗

前，會先量測背景值約 30 秒的時間，將圖 3-13(A)電壓數值扣掉移動平均之背景值後，將電壓對時間進行積分，也就是計算此波型之面積，透過最大電壓值乘以半高寬的方式進行計算，即可得訊號強度，如圖 3-13(B)。

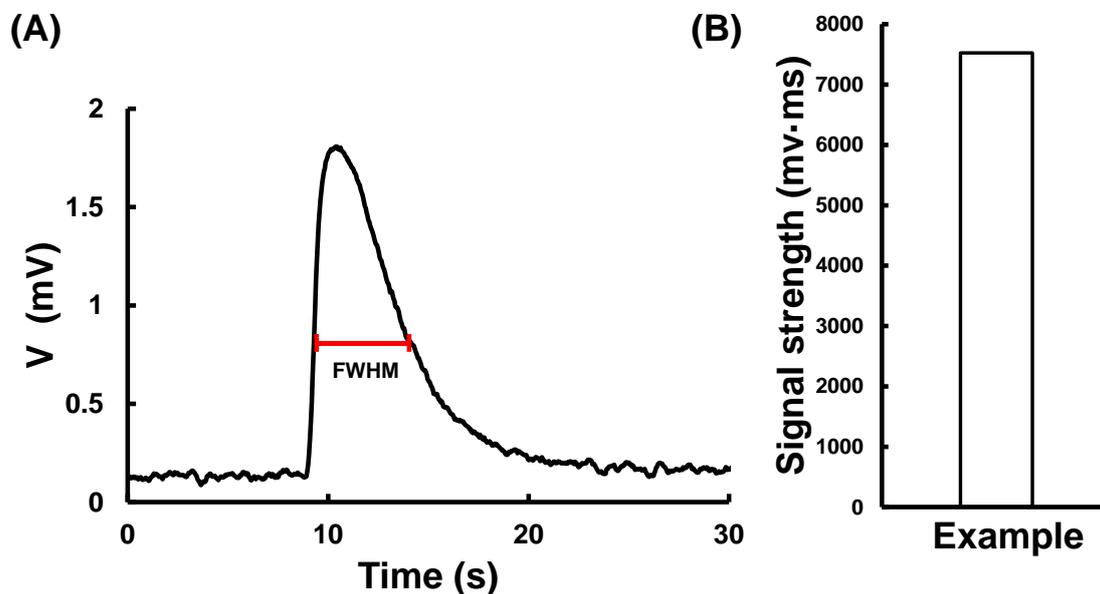


圖 3-13 訊號強度數據處理示意圖。(A)電壓取移動平均後之示意圖，(B)訊號強度示意圖。

### 3.7 實驗藥品與材料

本研究實驗耗材皆列於表3-1，所使用之化學藥品則列在表3-2。

表 3-1 實驗材料列表。

品名	型號/規格	製造商/供應商	國籍
PU管	3 × 4 mm (ID × OD)	膠王橡膠塑膠行	台灣
載玻片	76 × 26 × 1 mm	Assistent®	德國
壓克力	厚度 1.8 mm	大川	台灣
雙面膠	669	3M™	美國
濾紙	1442-090	Whatman™	英國
比色管	1960	Kartell	義大利
光纖	GH-4001-P	Mitsubishi	日本
光固化膠	OP-4-20632	Dymax	中國

表 3-2 實驗藥品列表。

品名	型號/規格	製造商/供應商	國籍
氯化鈉	99.5%	Showa Chemical Industry	日本
氯化鉀	99.5%	Aencore Chemical	澳洲
硝酸銀	99%	景明化工	台灣
氯化鎂	98%	Showa Chemical Industry	日本
硫酸銅	97.5%	Katayama Chemical Industry	日本
氯化鈣	95%	Showa Chemical Industry	日本
六水合氯化鎳	96%	日本試藥	日本
氫氧化鈉	98%	Avantor	美國
氯化亞鐵	98%	蒂一化工	台灣
九水合硝酸鉻	98.5%	Alfa Aesar	美國
鐵氰化鉀	98%	Showa Chemical Industry	日本
硫酸鎘	99%	Alfa Aesar	美國
六水合氯化鈷	98%	島久試藥	日本
Luminol	97%	Sigma-Aldrich	美國
酒精	99.5%	景明化工	台灣
過氧化氫	31%	景明化工	台灣
PDMS	SYLGARD™ 184	Sil-More Industrial Ltd.	台灣

## 第四章 實驗結果與討論

本研究所開發的尿潛血檢測晶片在進行實際尿液量測前，需先進行晶片檢測效能的優化，首先會對雷射雕刻製程的離焦參數進行探討，接著使用前一章 3.1.1 所提到的比色管實驗架構，針對光纖的選擇以及光纖於晶片內的收光位置進行探討，最後則是對 Luminol 反應溶液的配置進行優化。在完善晶片與反應溶液後，本研究會先以生理食鹽水與血液的混合溶液作為樣本進行晶片的檢測改善，包括樣本過濾時間以及殘留樣本清潔探討，接著為晶片的效能驗證，針對晶片的檢測極限、再現性與金屬離子選擇性進行探討最後則是尿液的實際量測。

### 4.1 微流體晶片優化

#### 4.1.1 CO<sub>2</sub> 雷射雕刻二次加工參數

CO<sub>2</sub> 雷射雕刻為本研究製作品片圖案以及流道的製程，只需於個人電腦使用繪圖軟體繪畫好雕刻圖案，並將檔案輸出到雷射雕刻機後，調整好速度及功率即可開始雕刻。製作上相較於玻璃蝕刻的方法是較為簡單以及方便，但雷射加工後的流道容易有毛邊及表面粗糙度較高的問題，因此我們會進行第二次的雷射加工來對晶片流道做平坦化的動作，以防止後續注入尺寸 15  $\mu\text{m}$  及 100  $\mu\text{m}$  的玻璃珠時產生空隙導致過濾紅血球的效果降低。圖 4-1(A)-(D)為晶片進行不同離焦距離的第二次雷射雕刻後的鏡下顯微鏡照片，其參數分別為未離焦、離焦 10 mm、離焦 15 mm 以及離焦 20 mm，將雕刻完成的晶片傾斜 60 度進行晶片流道的數位顯微鏡 (VHX-700F, Keyence, Japan) 拍攝。圖 4-1(E)-(H)為晶片在進行二次雷射雕刻參數分別為未離焦、離焦 10 mm、離焦 15 mm 以及離焦 20 mm 後，使用自動研磨機 (P20FS, Toptech, Taiwan) 從 180 號圓盤砂紙 (Wetordry™ 734, 3M™, USA) 研磨 1 分鐘換到 400 號圓盤砂紙研磨 3 分鐘，接著 1000 號砂紙 10 分鐘最後 2000 號砂紙 (Wetordry™ 401Q, 3M™, USA) 砂紙研磨 20 分鐘並拋光，將晶片翻轉 90 度使流道斷面朝上後進行斷面的數位顯微鏡影像拍攝。

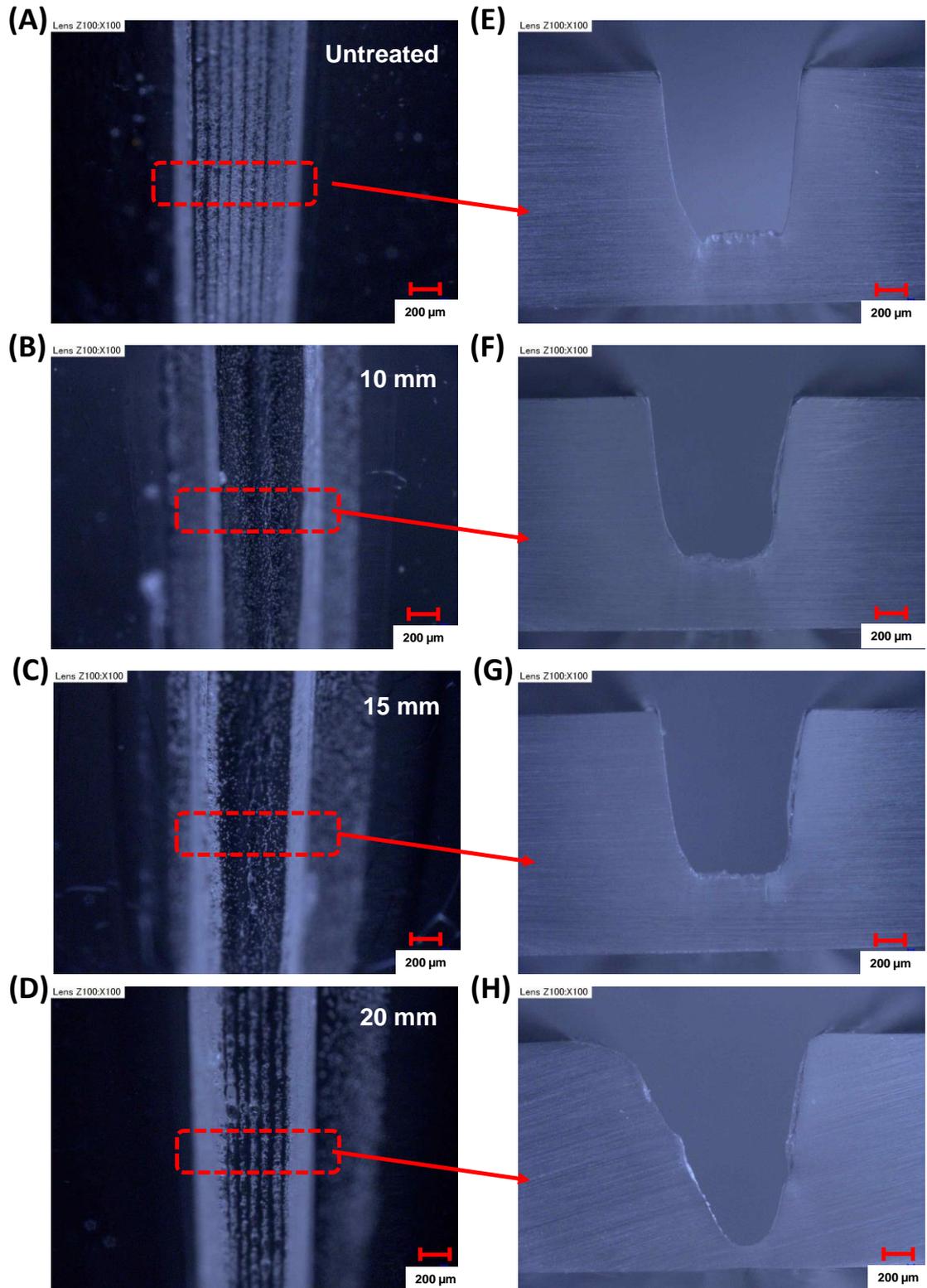


圖 4-1 不同雷射雕刻參數之晶片流道數位顯微鏡影像圖。(A)-(D)流道表面顯微鏡圖，(E)-(H)流道斷面顯微鏡圖。其中圖(A)與(E)為未離焦之晶片，(B)與(F)為離焦 10 mm 之晶片，(C)與(G)為離焦 15 mm 之晶片，(D)與(H)為離焦 20 mm 之晶片。

從圖 4-1(A)可看到微流體晶片在未進行第二次的雷射加工時，流道有明顯的雕刻軌跡，搭配斷面圖 4-1(E)可以看到流道底部是非常參差不齊的，直到離焦 10 mm 圖 4-1(B)雕刻軌跡才明顯減少，斷面圖 4-1(F)可以看到流道底部參差不齊的狀況改善非常多，在離焦 15 mm 圖 4-1(C)則是幾乎沒有雕刻的軌跡存在，圖 4-1(G)流道底部也是最為平坦的，最後在離焦來到 20 mm 的時候，從圖 4-1(D)可以看到流道痕跡又重新出現，並透過圖 4-1(H)看到流道的形狀已完全變形，因此本研究微流體晶片的製程，使用的第二次的雷射加工離焦參數為 15 mm 來使流道平坦化。

#### 4.1.2 光纖選擇

本小節要來探討光纖對於本研究的影響，光纖依材質有分玻璃光纖與塑膠光纖，依模態有分單模與多模等等，不同種類光纖的收光效果也都不一樣，因此光纖的選擇非常重要。此次實驗所使用之架構為比色管量測系統，實驗用的反應溶液配方為 Luminol 濃度 22.5 mM、NaOH 濃度 500.0 mM 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 450.0 mM，量測的樣品皆為高於標準濃度 1000 倍的血液與生理食鹽水混合溶液，挑選三種不同規格的光纖來進行實驗，第一種為 Active-FO Inc.光纖，纖核尺寸為 62.5 μm，量測結果如圖 4-2(A)所示，第二種為 Ocean Optics 公司所生產的光纖，型號為 QP600-2-SR，纖核尺寸為 600 μm，量測結果如圖 4-2(B)所示，最後一種為 Mitsubishi 公司所生產的光纖，型號為 GH-4001-P 的塑膠光纖，其纖核尺寸為 980 μm，量測結果如圖 4-2(C)所示。

結果圖的橫軸為時間座標軸，縱軸為光偵測器將光訊號轉變為電訊號的電壓數值，從檢測結果來看第一種光纖 Active-FO Inc.光纖所量測到的最高電壓值為 0.2 mV，第二種光纖 QP600-2-SR 所量測到的最高電壓值為 11.2 mV，這已經比第一種光纖量測到的電壓值高了 5.6 倍，最後第三種型號為 GH-4001-P 的塑膠光纖為 GH-4001-P 光纖，量測到的最高電壓值為 52.4 mV。由於本研究的 Luminol 化學發光所發出的光是沒有方向性的，因此纖核尺寸越大會越容易收到反應所發出的藍光，並透過實驗結果可以再次證明，纖核尺寸為 980 μm 的 GH-4001-P 光纖對於本研究的

系統有著最好的檢測效果，並且 GH-4001-P 材質為塑膠光纖，成本較玻璃光纖便宜，因此本研究使用 GH-4001-P 塑膠光纖來進行後續微流體晶片收光的動作。

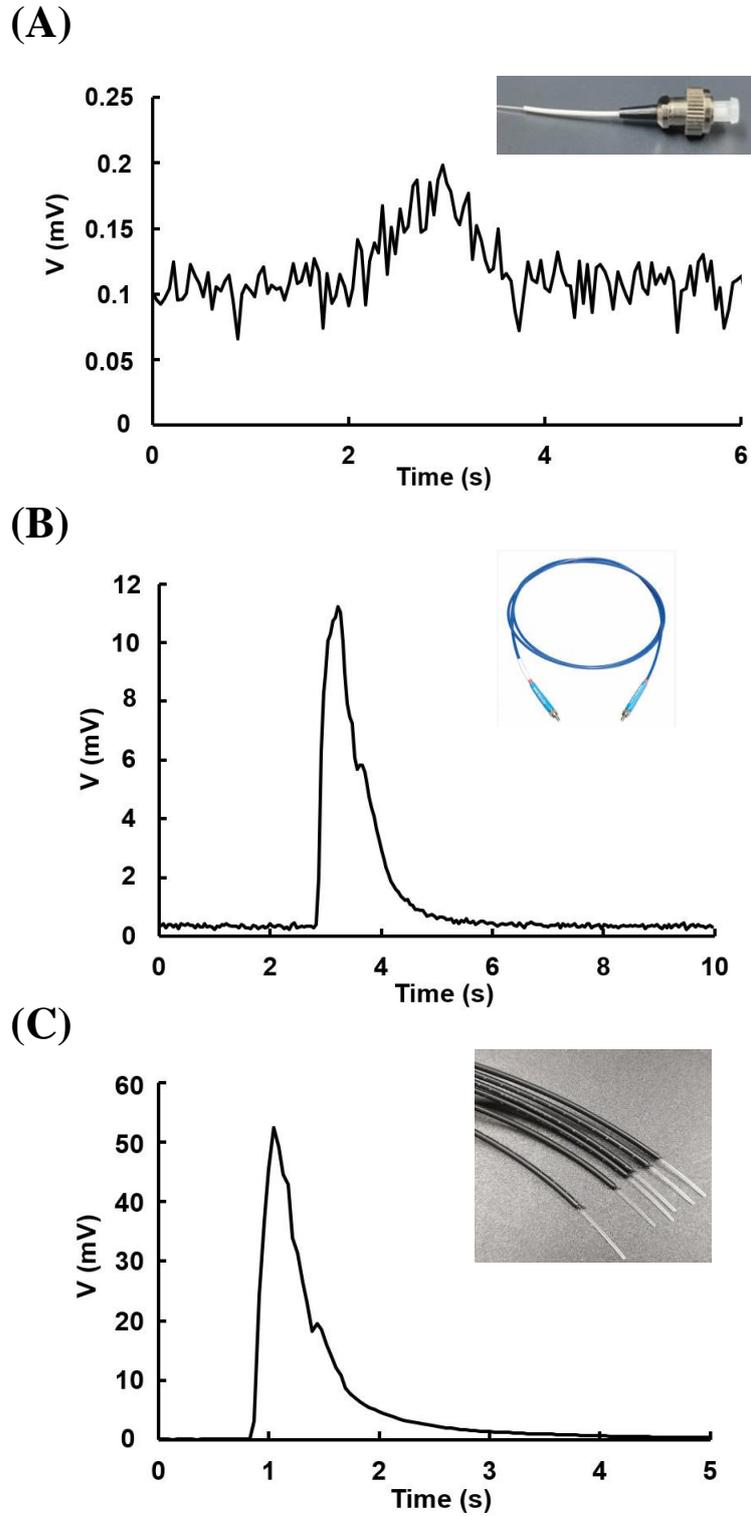


圖 4-2 不同光纖種類之實體圖以及檢測結果。(A) Active-FO Inc.光纖(B) QP600-2-SR 光纖(C) GH-4001-P 光纖。

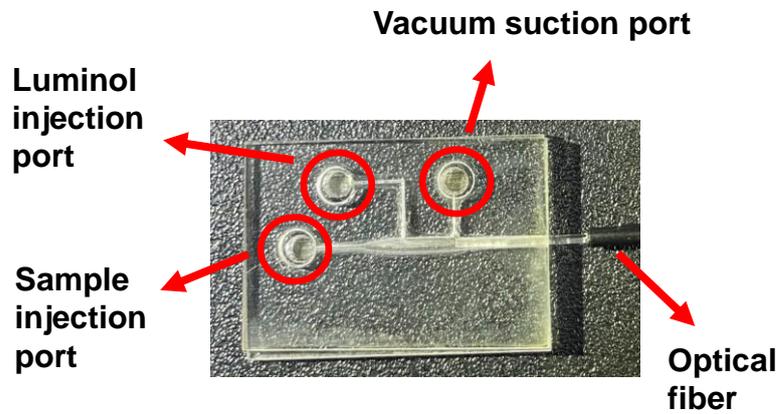
### 4.1.3 光纖收光位置

在完成晶片最佳化後，此小節要來探討光纖收光位置對檢測結果的影響，因此本實驗設計三種不同收光位置的微流體晶片，圖 4-3(A)為光纖於晶片右方收光，圖 4-3(B)為光纖於晶片上方收光，圖 4-3(C)為光纖於晶片下方收光，在經過相同的製程製做三種晶片後，進行 Luminol 化學發光反應來觀察各種晶片的發光情形。量測樣品為標準濃度的血液與生理食鹽水混合溶液，實驗用的反應溶液配方為 Luminol 濃度 22.5 mM、NaOH 濃度 500.0 mM 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 450.0 mM，在每種晶片進行各 3 次的實驗後可得圖 4-4。

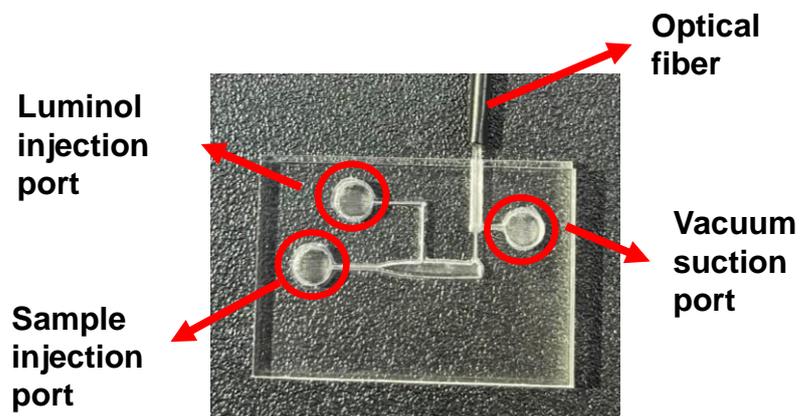
結果圖的橫軸為三種不同收光位置的晶片，分別對應圖 4-3(A)、圖 4-3(B)以及圖 4-3(C)，縱軸為訊號強度，透過前一章 3.6 的方式進行計算，偵測器量測到的電壓數值扣掉背景電壓值後，將電壓與時間所圍波形的半高寬乘以最大電壓值即可得到該波型的積分面積，即為訊號強度。從結果可以看到，位置(A)光纖於晶片過濾流道右方所偵測到的訊號強度數值平均為 706.7，標準差為 69.8，位置(B)光纖於晶片上方所偵測到的訊號強度數值平均為 639.6，標準差 76.7，最後於位置(C)光纖在晶片過濾流道下方所偵測到的訊號強度數值平均為 835.1，標準差為 65.1。

根據實驗結果可以很明顯的觀察到，光纖位置位於過濾流道的下方進行收光時，有著最好的檢測效果，光纖在下方收光比右方好的原因推測為 Luminol 發光反應所發出的藍光是沒有方向性的，而光纖位於下方時有較大的收光面積，因此光會較容易被光纖透過全反射的方式傳輸到偵測器上。而 Luminol 發光反應後之藍光在經過玻璃珠時會產生光散射的現象，導致在圖 4-3(B)光纖位置之檢測結果訊號強度為三種收光位置最低。總而言之，光纖位於過濾流道下方可以進行及時偵測系統所發出之藍光並且收光面積最大，因此可得到最強之訊號強度，本研究在後續微流體晶片實驗中，使用光纖於過濾流道下方的位置進行收光的動作。

**(A)** **Type A**



**(B)** **Type B**



**(C)** **Type C**

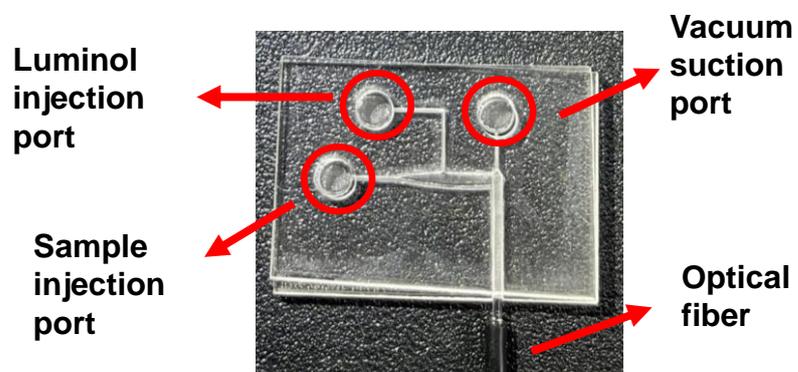


圖 4-3 三種不同光纖收光位置之微流體晶片實體圖。(A)微流體晶片右側(B)微流體晶片上方(C)微流體晶片下方。

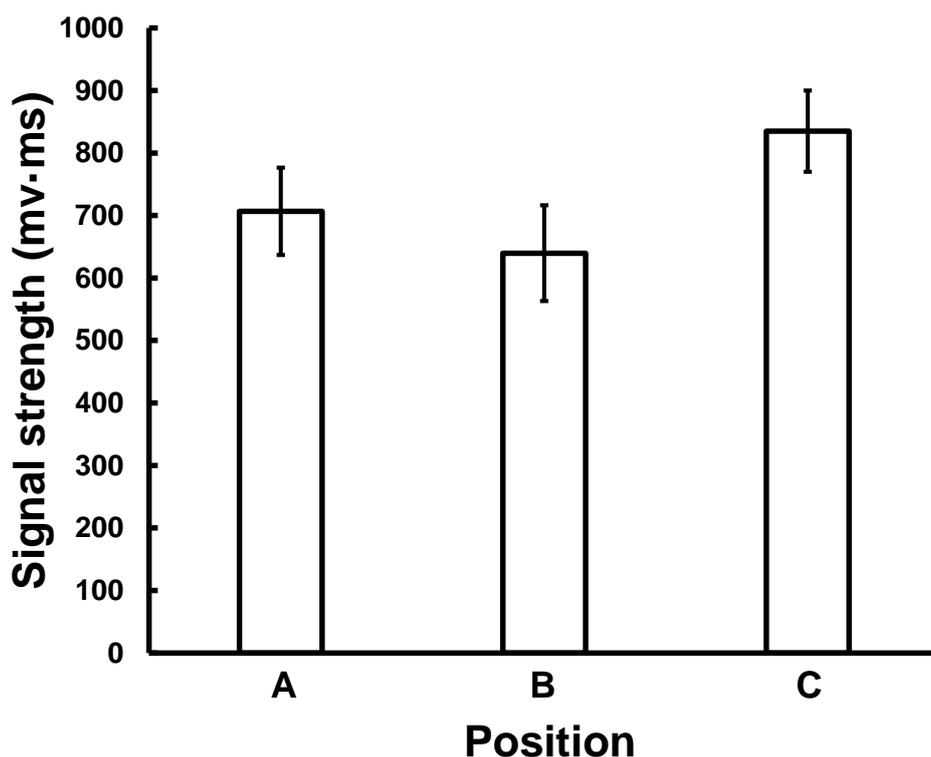


圖 4-4 不同光纖收光位置檢測結果。(A)微流體晶片右側(B)微流體晶片上方(C)微流體晶片下方。

## 4.2 反應溶液優化

前一節改良微流體晶片的設計後將應用於之後的實驗，而本節將對此研究中所使用的反應溶液配方進行優化，分別針對 NaOH、Luminol 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 進行溶液最佳化的量測，並應用在後續的各種血液檢測上。

### 4.2.1 NaOH 濃度

此小節為探討 NaOH 濃度對檢測結果的影響，此次實驗所使用的架構為改良設計後的晶片量測系統，將實驗用反應溶液配方中的 Luminol 與 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度固定，只改變 NaOH 的濃度來量測標準濃度的血液與生理食鹽水混合溶液。因此配置 Luminol 濃度 22.5 mM、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 450.0 mM 以及 NaOH 濃度分別為 200.0 mM、300.0 mM、400.0 mM、500.0 mM、600.0 mM、700.0 mM、800.0 mM 配置成 Luminol 溶液進行量測，各濃度皆量測三次後計算平均值以及標準差，如圖 4-5 所示。

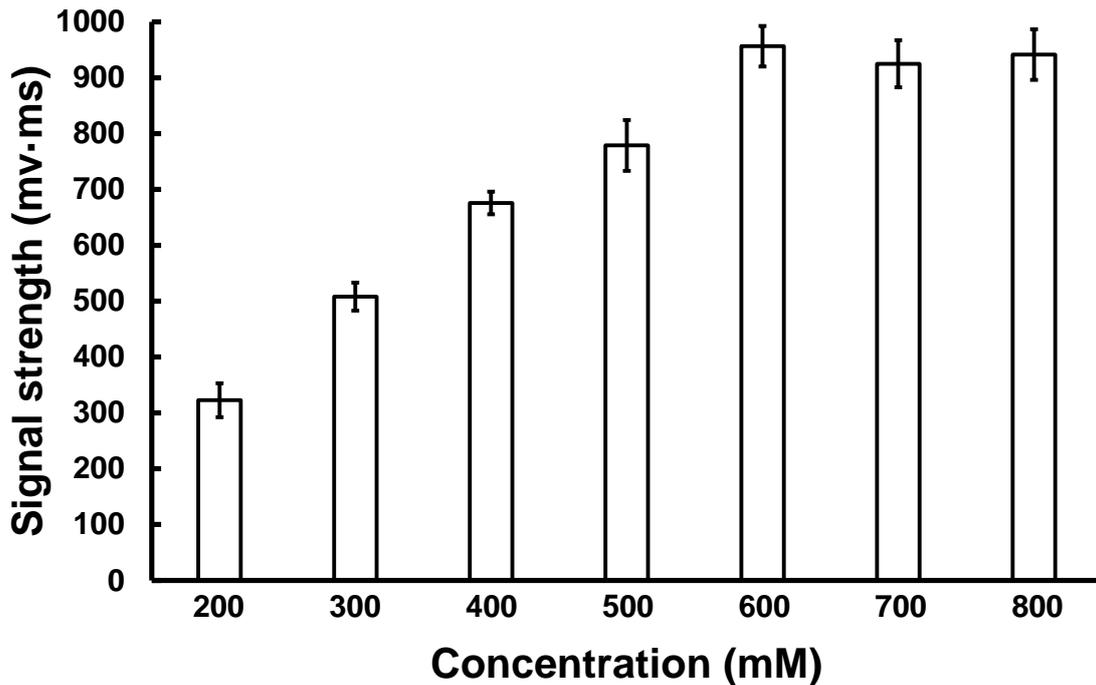


圖 4-5 不同 NaOH 濃度量測。固定 Luminol 與 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度配置 NaOH 濃度分別為 200.0 mM、300.0 mM、400.0 mM、500.0 mM、600.0 mM、700.0 mM、800.0 mM 反應溶液。

實驗結果圖的橫軸為 NaOH 濃度，縱軸為訊號強度值，光檢測器將光訊號轉變為電訊號的電壓數值後，再對波形進行積分即可得訊號強度。結果顯示，NaOH 濃度從 200.0 mM 一直到 600.0 mM，訊號強度的數值隨著 NaOH 濃度增加，數值也跟著增加，在 600.0 mM 的時候即可達到較好的檢測結果，而 NaOH 濃度增加到 700.0 mM 與 800.0 mM 時，訊號強度不再增加，因此本研究選用 NaOH 濃度 600.0 mM 來當作後續 Luminol 溶液優化及尿潛血檢測的參數。

#### 4.2.2 Luminol 濃度

此小節為探討 Luminol 濃度對檢測結果的影響，本研究所使用的架構一樣為晶片量測的系統，實驗用的反應溶液配方為前一小節確認 NaOH 的濃度 600.0 mM 搭配 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 450.0 mM 以及 Luminol 濃度分別為 10.0 mM、20.0 mM、30.0 mM、40.0 mM、50.0 mM 以及 60.0 mM 的反應溶液進行量測，量測樣品一樣為標準濃度的血液與生理食鹽水混合溶液，各濃度皆量測三次，可得圖 4-6。

結果顯示，Luminol 濃度在 10.0 mM 與 20.0 mM 時，訊號強度數值隨著 Luminol 濃度增加數值也跟著增加，直到 30.0 mM 的時候即可達到較好的檢測結果，而 Luminol 濃度增加到 40.0 mM、50.0 mM 與 60.0 mM 時，雖然訊號強度有略微增加，但變化並不大，由於 Luminol 價錢昂貴，考量成本問題，因此本研究選用 Luminol 濃度 30.0 mM 來當作後續 Luminol 溶液優化及尿潛血檢測的參數。

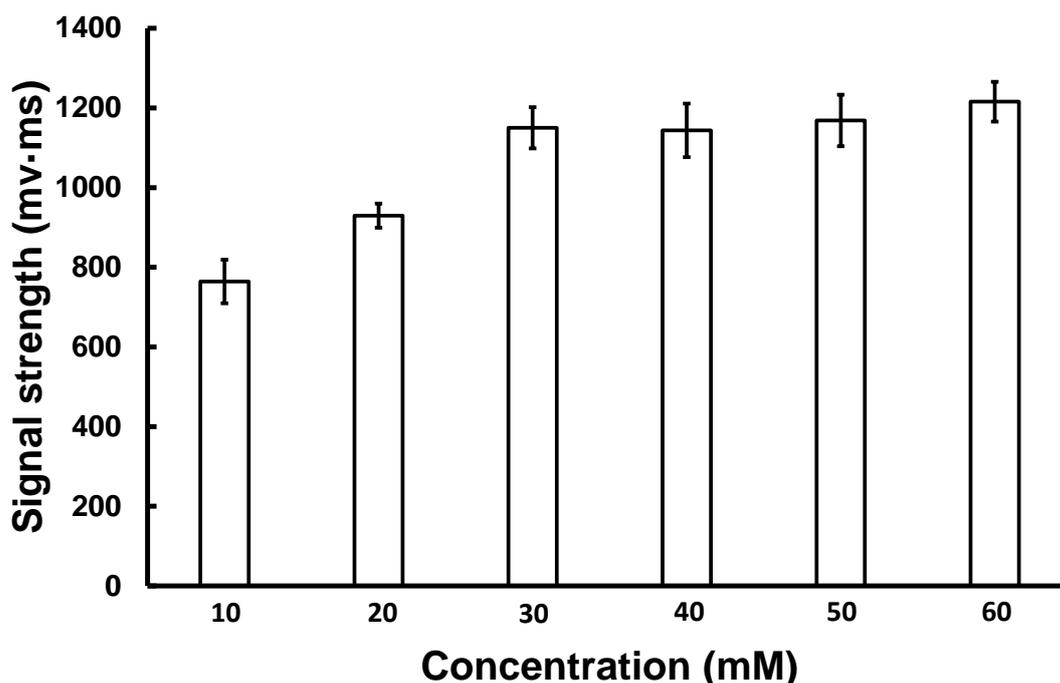


圖 4-6 不同 Luminol 濃度量測。固定 NaOH 與 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度配置 NaOH 濃度分別為 10.0 mM、20.0 mM、30.0 mM、40.0 mM、50.0 mM 以及 60.0 mM 反應溶液。

### 4.2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度

最後在此小節要來探討 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度對檢測結果的影響，由於前面確認了 NaOH 的濃度以及 Luminol 濃度，因此配置 NaOH 的濃度 600.0 mM、Luminol 濃度 30.0 mM 以及濃度分別為 150.0 mM、300.0 mM、450.0 mM、600.0 mM、750.0 mM 以及 900.0 mM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度配製成 Luminol 溶液進行量測，量測樣品一樣為標準濃度的血液與生理食鹽水混合溶液，各濃度皆量測三次，可得圖 4-7。

結果顯示， $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度在 150.0 mM 與 300.0 mM 時，訊號強度數值隨著  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度增加，數值也跟著增加，到 450.0 mM 時即可得最好的檢測結果，而  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度再增加到 600.0 mM、750.0 mM 以及 900.0 mM 時，訊號強度變化並不大，因此本研究選用  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度 450.0 mM 來當作檢測的參數。最後透過本節的實驗，可配置出本研究優化後的 Luminol 溶液，各濃度為 Luminol 濃度 30.0 mM、NaOH 濃度 600.0 mM 以及  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度 450.0 mM，後續的實驗皆以此優化後的配方配置 Luminol 反應溶液進行。

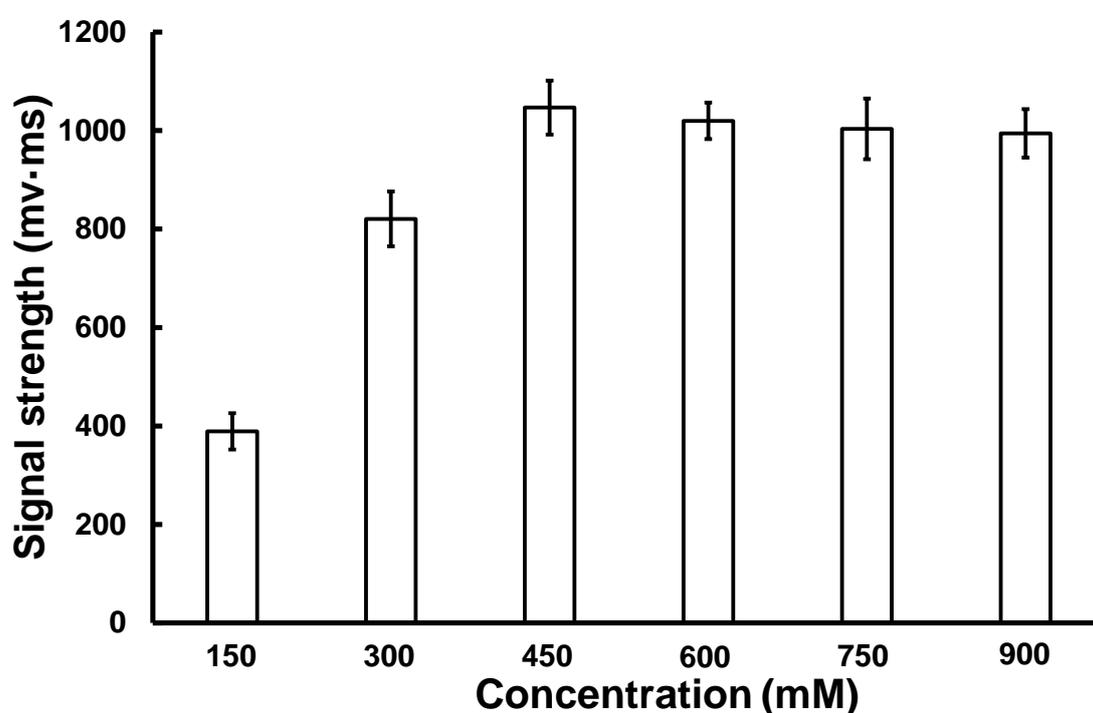


圖 4-7 不同  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度量測。固定 NaOH 與 Luminol 濃度配置  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度分別為 150.0 mM、300.0 mM、450.0 mM、600.0 mM、750.0 mM 以及 900.0 mM 反應溶液。

### 4.3 晶片檢測改善及效能驗證

在改善微流體晶片的設計、光纖的選擇以及收光位置並優化 Luminol 溶液後，接著本節將在晶片檢測的改善後進行晶片的效能驗證，首先會先找出樣本的過濾時間以及晶片進行重複使用時殘留樣本的清潔進行定義，最後測試此系統的金屬離子選擇性、晶片的檢測極限與再現性量測。

### 4.3.1 樣本過濾時間

本研究透過兩種尺寸分別為 15  $\mu\text{m}$  及 100  $\mu\text{m}$  的玻璃珠將紅血球阻擋於過濾流道前，利用此種方式將樣品純化以降低晶片檢測極限，並且可將剩餘不需要被偵測的溶液透過出口端負壓裝置排除，防止樣本中的干擾物影響 Luminol 化學發光的進行，而此小節將針對樣本的過濾時間進行探討。

此實驗量測的樣品皆是高於標準濃度 10 倍的血液與生理食鹽水混合溶液，並且使用優化後之反應溶液，實驗步驟為加入待測溶液後開啟負壓系統中的泵浦進行樣本過濾，等待泵浦過濾 4 秒立即關掉，在加入 Luminol 溶液後重新開啟泵浦使 Luminol 溶液與紅血球反應，透過光纖將收到的藍光傳輸到光檢測器中，並將數值輸出到電腦以便後續的數據處理，待測量結束後加入大量的 DI water 將晶片清洗乾淨，滴入 Luminol 溶液確認系統只有背景值後，即可進行同樣的操作步驟測量 4 秒、6 秒、8 秒以及 10 秒的過濾時間，可得圖 4-8。

結果圖的橫軸為時間座標軸，縱軸為訊號強度之數值，結果顯示，當樣本只過濾 4 秒時，樣本中的紅血球還未完全被阻攔於過濾流道前，因此當 Luminol 與紅血球反應時，呈現的發光亮度較低，導致檢測的結果是最差的，訊號強度為 2609.2。樣本過濾時間為 6 秒時，檢測結果有比 4 秒好一些，其訊號強度為 2816.3，當實驗進行到過濾時間為 8 秒時，其結果已經與過濾時間 10 秒的檢測結果差不多，訊號強度分別為 3992.6 與 3897.2。由此可以判斷，在測量低於 10 倍標準濃度的情況下，每次樣本的過濾時間需至少超過 8 秒，否則會有過濾不全的問題，這將會影響後續檢測的結果，而本研究之後的實驗皆選擇過濾時間 10 秒來進行，以確保樣本中的紅血球被完全過濾。

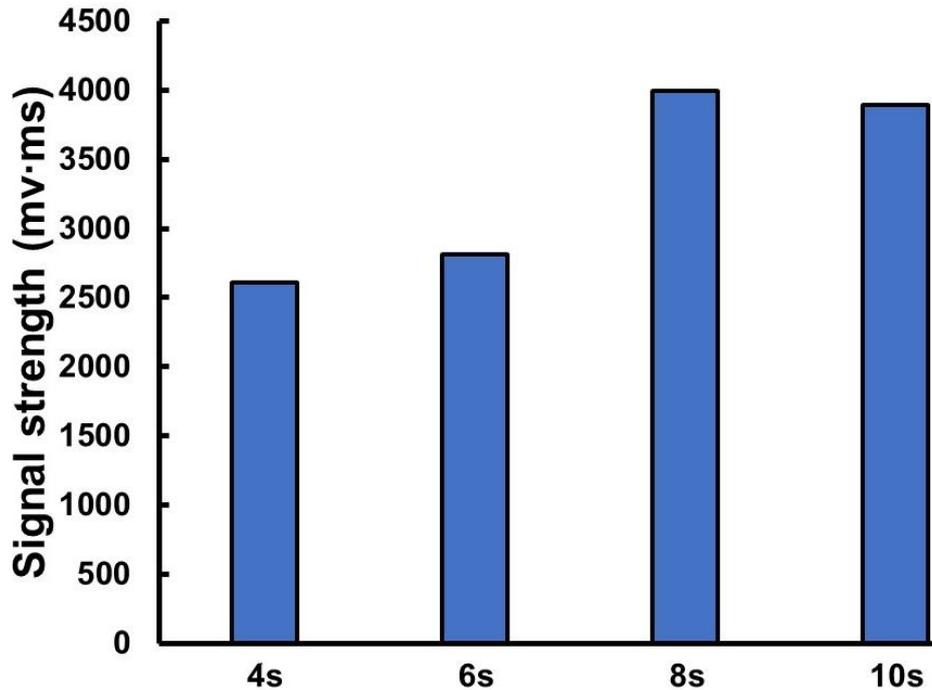


圖 4-8 不同樣本過濾時間的晶片量測。

### 4.3.2 殘留樣本清潔探討

本研究所開發的微流體晶片還有一大優勢為晶片可進行重複性的使用，不須於每次測量結束後將之拋棄，這對於未來將之與馬桶進行整合時是非常有幫助的。但在每次量測結束時，容易會有檢測樣本中的紅血球殘留於晶片內，這會導致接下來的實驗結果失真，並不利於連續性的檢測。而為了解決這個問題，我們透過滲透壓 (Osmotic pressure) 的方式來防止殘留問題發生。若將紅血球細胞放入高濃度的溶液中，高張溶液 (Hypertonic solution) 的滲透壓比紅血球中的細胞質大，因此紅血球內的水透過細胞膜進入高張溶液中，導致細胞脫水變形，這過程稱為「皺縮」(Crenation)。反之將紅血球放在低張溶液 (Hypotonic solution) 中，水從低張溶液中穿透細胞膜進入紅血球，此水量遠比從細胞進入溶液的水量多，紅血球會因此而膨脹破裂，即「紅血球溶解」(Hemolysis) [94]。

本小節會針對晶片殘留樣本的清潔進行探討，本研究使用 DI water 作為低張溶液，目的為將晶片內的殘留紅血球漲破，並透過出口端的負壓系統將含有破裂紅

血球的 DI water 從晶片內排除，達到清洗晶片的效果。為了測試晶片潔淨度，此次實驗步驟為晶片在量測完高於標準濃度 10 倍的血液與生理食鹽水混合溶液後，從進樣入口滴入容量為 0.5 mL 的 DI water 清洗晶片，將 DI water 抽乾後加入 Luminol 溶液進行第二次的發光反應並偵測之，接著加入大量的 DI water 將晶片清洗乾淨後滴入 Luminol 溶液，在確認系統沒偵測到發光反應後即可進行同樣的操作步驟測量 1.0 mL 的 DI water 與 1.5 mL 的 DI water，量測結果如圖 4-9。

結果顯示，在加入 0.5 mL 的 DI water 清洗晶片後，殘餘的紅血球還可以與 Luminol 溶液反應產生光訊號被系統偵測到，當增加到 1.0 mL 的 DI water 後還會有微弱的數值，直到晶片經過 1.5 mL 的 DI water 清潔後，系統才只剩下背景雜訊值。由此次實驗可知，在檢測低於 10 倍標準濃度的情況下，每次實驗結束後，需要至少 1.5 mL 的 DI water 進行晶片的清潔，以防止晶片殘留紅血球的干擾。

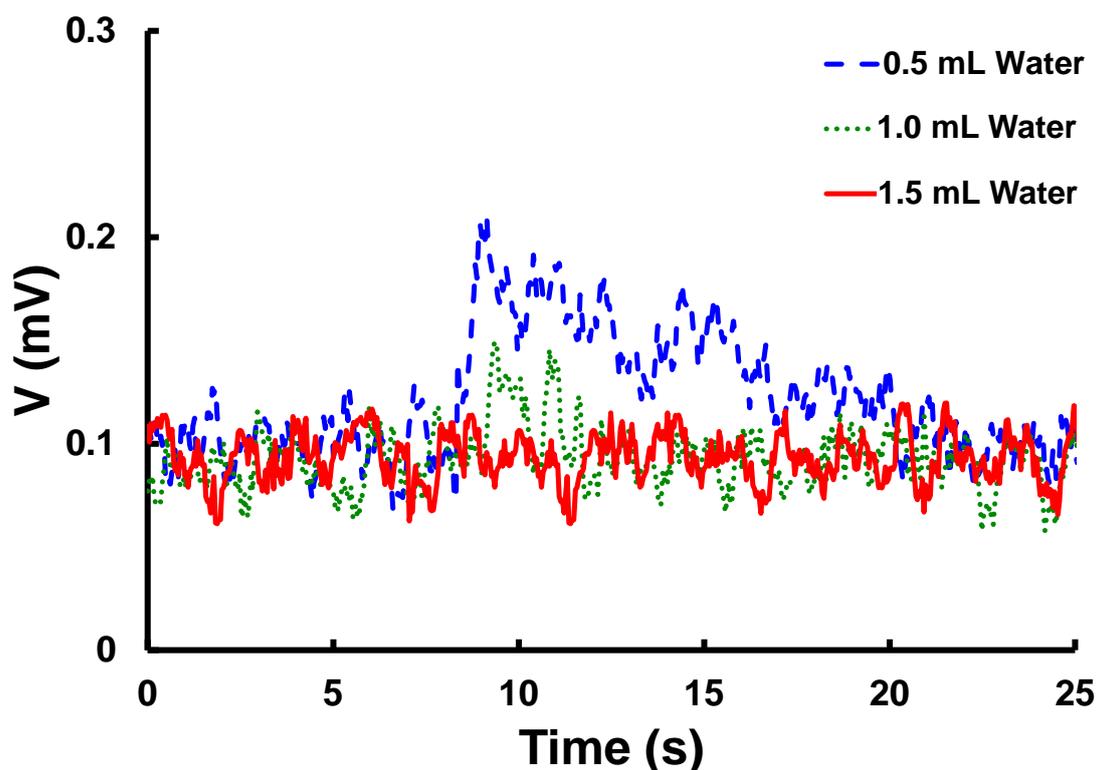


圖 4-9 微流體晶片殘留樣本清潔度檢測。

### 4.3.3 檢測極限

在改善微流體晶片設計、光纖的選擇、收光位置、優化 Luminol 溶液以及定義好量測條件後，本小節要透過量測不同濃度之血液與生理食鹽水混合溶液來進行晶片檢測極限量測。本次實驗使用優化後的 Luminol 溶液進行檢測，Luminol 濃度為 30.0 mM、NaOH 濃度 600.0 mM 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 450.0 mM，各濃度的血液與生理食鹽水混合溶液在量測三次後可得圖 4-10。

結果顯示，本裝置可量測低於標準濃度一半的樣本，於 7.5 k(RBC/c.c.)濃度時，三次量測結果的平均訊號強度為 373.1、標準差為 13.7，標準濃度 15 k(RBC/c.c.)時平均訊號強度為 968.5、標準差為 67.7，高於標準濃度 5 倍 75 k(RBC/c.c.)濃度時平均訊號強度為 2100.9、標準差為 116.5，高於標準濃度 10 倍 150 k(RBC/c.c.)時平均訊號強度為 4122.7、標準差為 145.7。

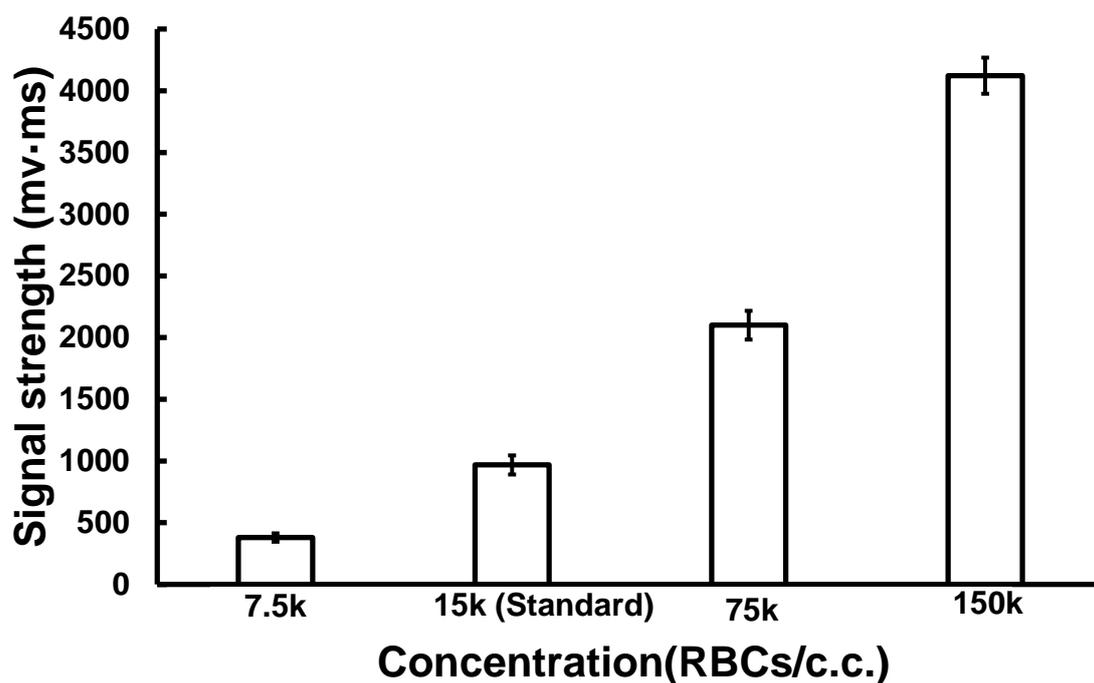


圖 4-10 微流體晶片對於血液與生理食鹽水混合溶液之檢測極限量測。

### 4.3.4 金屬離子選擇性檢測

尿液為混合物溶液，其中有九成以上是水，固體成分大約占了 6%，例如有機物（尿素、尿酸、毒素、色素、蛋白質、葡萄糖等）、電解質（離子）、無機物（固

體)、細菌等，有機物當中又以尿素(Urea)含量為最高，電解質的部分又以氯離子、鈉離子的含量最多[95]。

本節透過配置濃度皆為 0.04 mM 的氯化鈉、氯化鉀、硝酸銀、氯化鎂、硫酸銅、氯化鈣、六水合氯化鎳、氯化亞鐵、九水合硝酸鉻、鐵氰化鉀、硫酸錳、六水合氯化鈷的不同金屬離子溶液，來進行本研究系統的金屬離子選擇性檢測。由於金屬離子無法如紅血球一樣被晶片的過濾流道攔截住，因此本次實驗所使用的架構為比色管量測架構，量測結果如圖 4-11。

透過結果圖可以看到，尿液中含有的鈉離子並不會與 Luminol 反應，鐵氰化鉀的三價鐵與六水合氯化鈷的二價鈷具有較明顯的反應，三價鐵為紅血球內之金屬離子，而二價鈷在尿液中的含量微乎其微，並不會影響尿潛血的檢測，因此本研究所開發的系統，對於紅血球具有良好的選擇性。

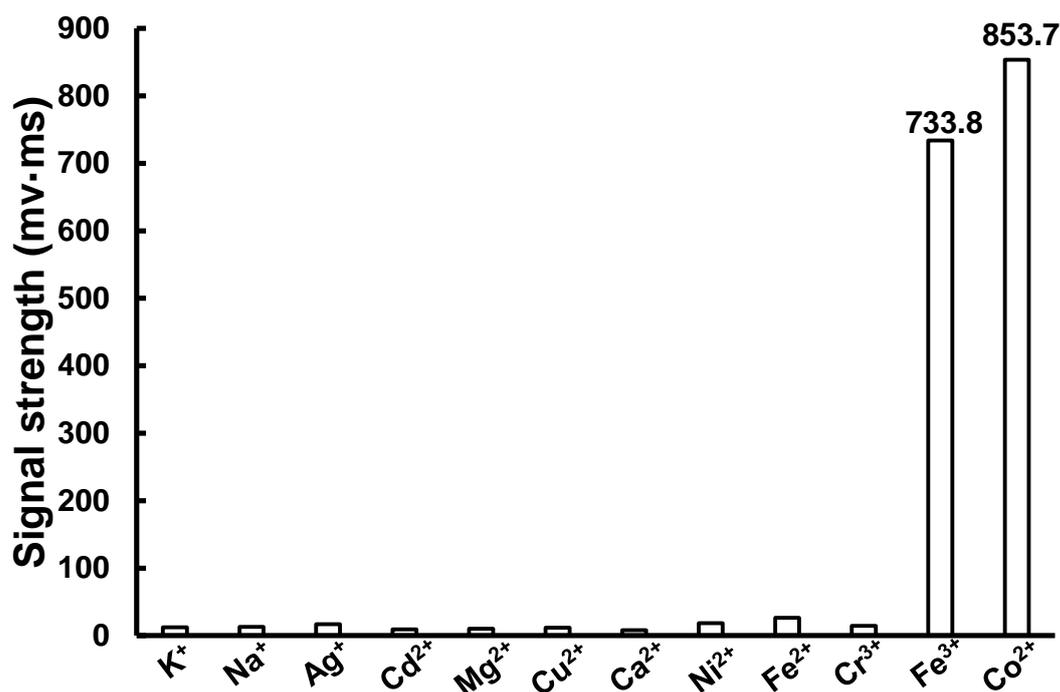


圖 4-11 金屬離子干擾性量測。

#### 4.4 尿液實際量測

本研究最後的實驗也是開發此微流體晶片最終的目的，將開發的系統應用於

尿液的實際量測，分別對晶片的檢測極限、重複性與再現性進行量測，最後還針對尿液顏色是否會對檢測結果造成影響進行探討。

#### 4.4.1 檢測極限

本小節透過量測不同濃度的血液與尿液混合溶液來進行晶片檢測極限量測，一樣使用優化後的 Luminol 溶液進行檢測，Luminol 濃度 30.0 mM、NaOH 濃度 600.0 mM 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 450.0 mM，各濃度的血液與尿液混合溶液在量測三次後可得圖 4-12。

透過結果可以看到，本研究所開發之微流體晶片成功量測到低於標準尿潛血濃度的一半，三次量測結果的平均訊號強度為 303.5、標準差為 49.8，標準濃度 15 k(RBC/c.c.)時平均訊號強度為 863.4、標準差為 76.7，高於標準濃度 5 倍 75 k(RBC/c.c.)濃度時平均訊號強度為 2407.4、標準差為 152.6，高於標準濃度 10 倍 150 k(RBC/c.c.)時平均訊號強度為 3873.7、標準差為 232.4。

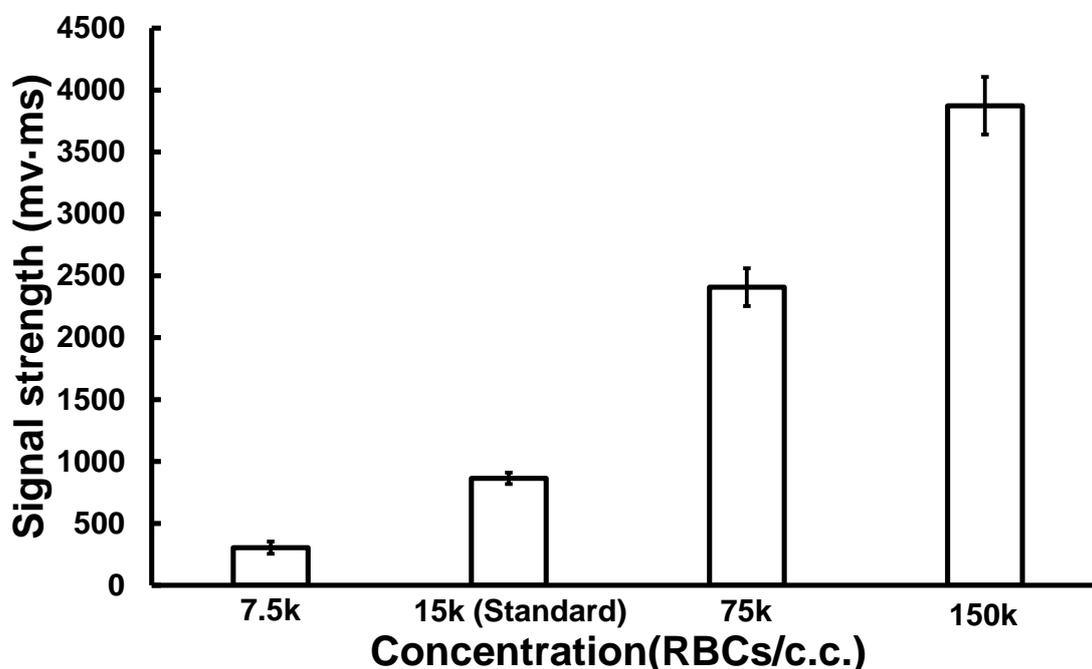


圖 4-12 微流體晶片對於血液與尿液混合溶液之檢測極限量測重複性量測。

#### 4.4.2 重複性量測

本研究針對標準濃度 15 k(RBC/c.c.)的血液與尿液混和樣本進行不間斷測量 5 次的重複性實驗，藉此來評估本研究系統對於相同濃度下微流體晶片偵測紅血球的重複性。測試結果顯示於圖 4-13，結果圖的橫軸為時間座標軸，縱軸為光偵測器將光訊號轉變為電訊號的電壓數值，結果顯示，在這 5 次的不間斷量測實驗當中，訊號強度沒有出現明顯的變化，其平均強度為  $872.4 \pm 47.7 \text{ mv}\cdot\text{ms}$ 。此結果足以顯示本研究所提出的檢測架構在檢測紅血球的方面，具有相當的重複性。

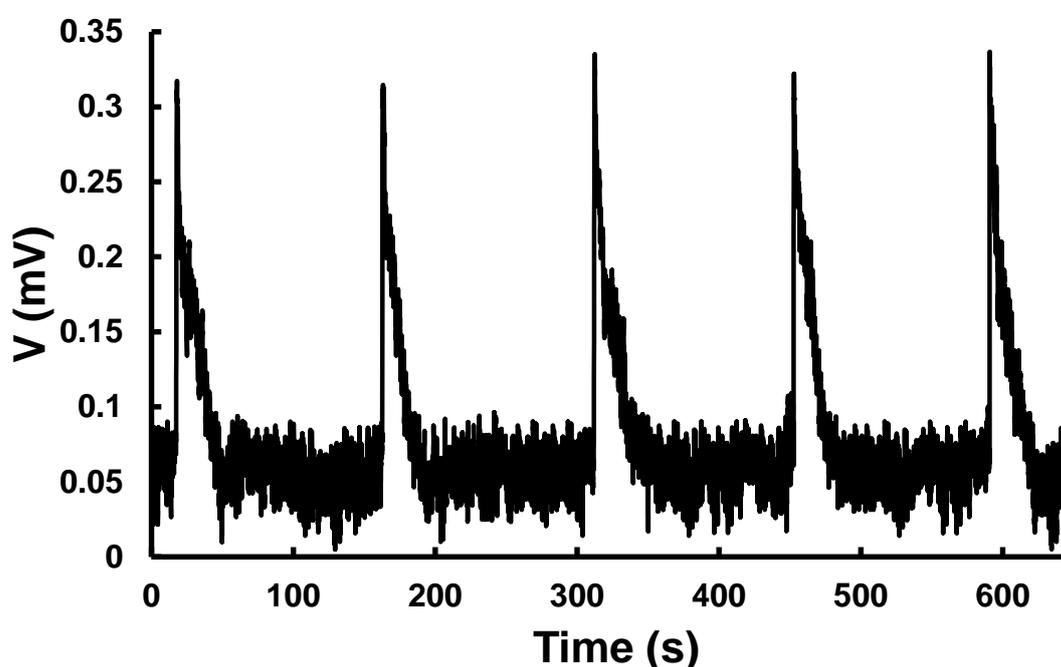


圖 4-13 微流體晶片對於血液與尿液混合溶液重複性之量測。

#### 4.4.3 再現性量測

本研究使用相同製程製做五組不同的微流體晶片進行再現性量測，檢測濃度皆為標準濃度 15 k(RBC/c.c.)的血液與尿液混合溶液來進行晶片再現性的量測，使用優化後的 Luminol 溶液進行檢測，Luminol 濃度為 30.0 mM、NaOH 濃度為 600.0 mM 以及  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度 450.0 mM，將各微流體晶片進行血液與尿液混合溶液量測後可得圖 4-14。從結果圖可以看到，在五組獨立的微流體晶片量測當中，訊號強度沒有出現明顯的變化，最高的訊號強度數值為 947.1，最低量測到的訊號強度數值為

821.8，透過計算可以得知五次訊號強度的平均值為 896.3、標準差為 50.5，整體來看，本研究所開發之微流體晶片在檢測紅血球的方面，具有相當的再現性。

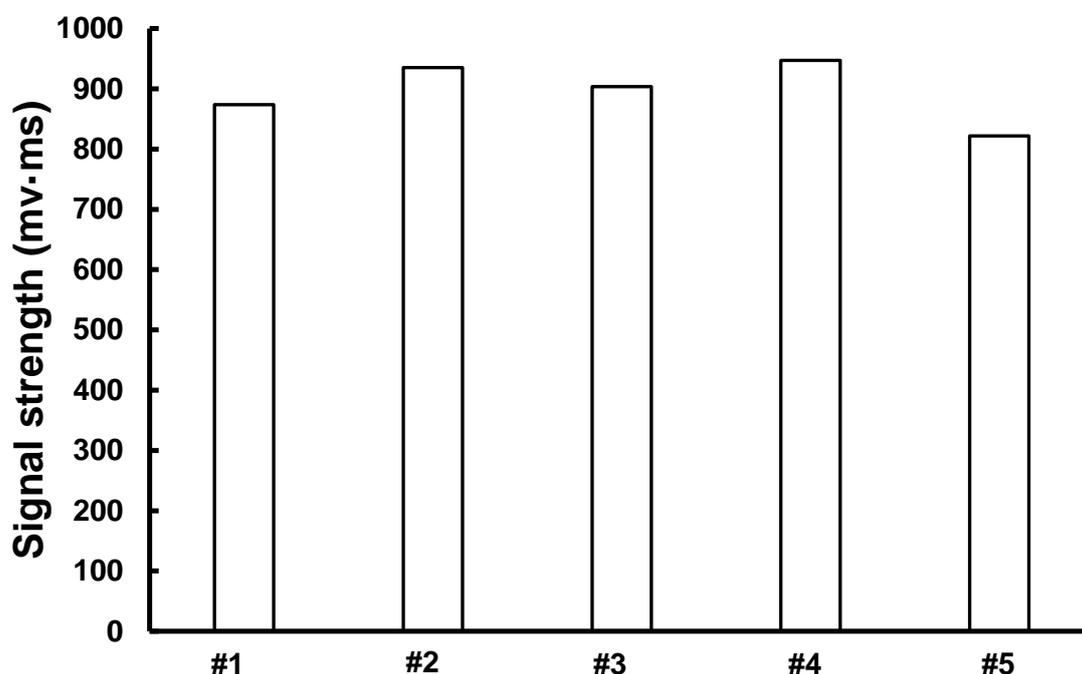


圖 4-14 五組獨立微流體晶片對於血液與尿液混合溶液再現性測試。

## 4.5 尿液顏色對晶片檢測效能影響

尿液的顏色來源為尿色素 (Urochrome)，而人體正常尿液的顏色為淡黃色，會因食用特定食物或藥物而產生不同尿液顏色的改變，例如在食用完甜菜與火龍果這類蔬果後，容易會形成紅色的尿液，而人們常吃的維生素 B 群則會導致尿液呈亮黃綠色，並且在服用一些抗發炎止痛的藥物時，也會讓尿液帶點橙紅色[96]。

本小節要來探討尿液顏色對本研究所開發的尿潛血偵測系統之影響，透過食用色素來模擬尿液顏色的改變，所使用之食用色素如圖 4-15(A)所示。加入 1  $\mu$ L 食用色素分別為紅色、藍色、綠色以及黃色後配置標準濃度 15 k(RBC/c.c.)的血液與尿液混合溶液來進行晶片的量測，如圖 4-15(B)。反應溶液一樣濃度為 Luminol 濃度 30.0 mM、NaOH 濃度 600.0 mM 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度 450.0 mM，將各顏色的血液與尿液混合溶液在量測三次後可得圖 4-16。

透過結果可以看到，由於本研究有一特色為血球過濾的功能，裝置將血球攔截

住並把其他干擾物以及各種顏色的尿液通過後端負壓裝置排除，所以 Luminol 溶液只會與晶片內的紅血球反應，因此各顏色的血液與尿液混合溶液所測得的訊號強度數值並沒有明顯的變化，也證明本研究所開發的尿潛血檢測裝置不會因為檢測者因為吃特定食物造成尿液顏色的改變，進而影響最後的檢測結果。

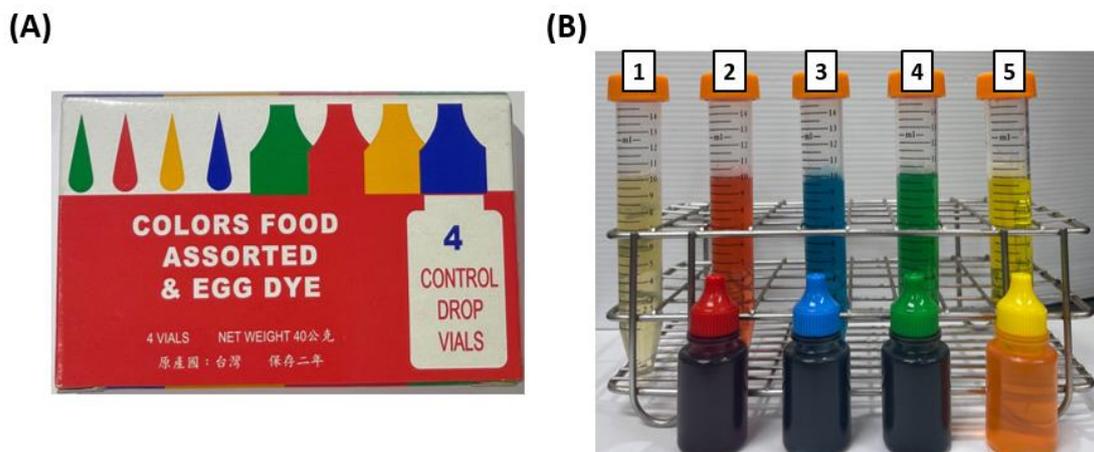


圖 4-15 模擬尿液顏色對晶片檢測之影響(A)本實驗所使用之四種不同顏色食用色素，(B)尿液與食用色素混和後之實體圖。

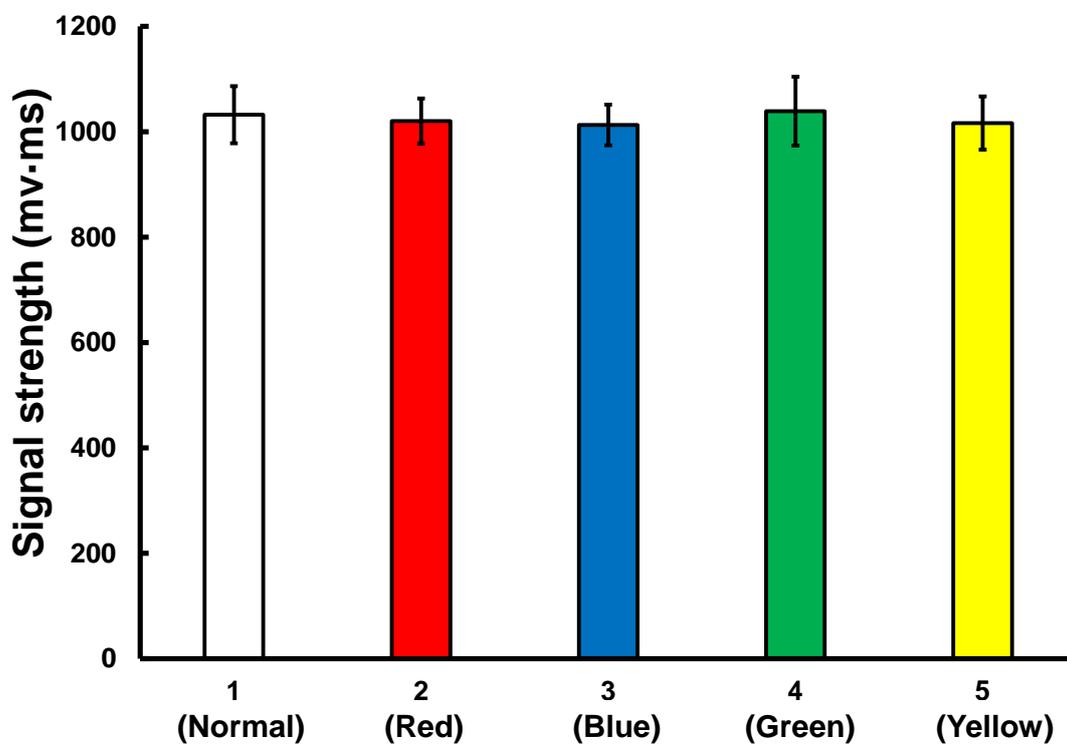


圖 4-16 食用色素模擬尿液顏色的干擾檢測結果。

# 第五章 結論與未來展望

## 5.1 結論

本研究整合了光學偵測系統及微流體晶片，成功開發出一套用於尿潛血檢測的系統，這對於早期慢性腎臟病的檢測是非常有幫助的。晶片透過尺寸分別為 15  $\mu\text{m}$  及 100  $\mu\text{m}$  的玻璃珠將樣本中紅血球阻擋於過濾流道前，在與 Luminol 溶液反應時，可提升訊號強度以降低晶片的檢測極限，並且由於尿液的成分複雜，檢測時容易被干擾物影響而導致結果失真，因此在將紅血球攔截時，透過後端負壓裝置將其他干擾物及尿液排除，可提升微流體晶片檢測尿潛血時的特異性。從實驗結果可以看到，本研究所開發之尿潛血系統能快速辨別檢測者的尿液是否異常。

本研究首先針對晶片製程及設計進行探討，結果表明在第二次的雷射加工離焦參數為 15 mm 時，晶片流道有最佳的平坦化效果，並且在使用型號為 GH-4001-P 塑膠光纖於過濾流道下方來進行微流體晶片收光，可以得到最好的檢測結果。在優化晶片後，本研究為了改善所參考之 Luminol 溶液配方，因此分別針對 NaOH、Luminol 以及  $\text{H}_2\text{O}_2$  進行溶液最佳化的量測，研究結果表明了，當 Luminol 溶液配方為 Luminol 濃度 30.0 mM、NaOH 濃度 600.0 mM 以及  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度 450.0 mM 時有最好的檢測結果，並於後續的血液量測實驗使用此配方。在進入晶片性能驗證前，還對樣本過濾時間以及晶片殘留紅血球的干擾進行探討，根據實驗結果表明，晶片在樣本過濾 10 秒後可達最好的檢測效果，在量測結束時使用至少 1.5 mL 的 DI water 進行晶片的清潔，可確保殘留的紅血球不會影響後續的檢測。

本研究所開發的可重複性使用尿潛血微流體晶片在尿液實際量測的實驗中有良好的表現，結果顯示，檢測極限可達標準尿潛血濃度的一半，並且晶片也有不錯的重複性與再現性，最後還進行尿液顏色的干擾測試，結果表明晶片不會受到尿液顏色的影響。綜合上述，本研究成功透過開發一高穩定度、檢測方便快捷之微流體晶片，具有應用於尿潛血監測的能力，期望在未來與馬桶進行整合，可於平時如廁時進行即時的檢測，對於 POCT 系統的發展，是很有潛力的。

## 5.2 未來展望

慢性腎臟疾病被公認為全球性的健康問題，也是各個國家的重要健康議題，因早期無明顯徵狀，導致最後醫生進行診斷治療時已經為時已晚，由於尿潛血是目前早期發現慢性腎臟病最常見的指標之一，因此在身體檢查時需透過尿液檢查來達到預防的效果，然而在家即可進行檢測的尿潛血試紙是透過比色法方式判讀，容易有誤判的情形發生，所以經常需要借助鏡下顯微鏡檢查予以量化，而目前的施測儀器多存在於醫院，在這疫情嚴峻的時期，容易會有感染的問題。

本研究所開發的微流體晶片有體積小，並且具有偵測快速、易於操作且不受尿液內干擾物影響的優勢，因此易於與 POCT 系統集成，若能將本研究發展的尿潛血微流體晶片實現在馬桶上，一來可免去醫院環境以及外出感染的風險，二來平常在家如廁時即可進行檢測與紀錄，就能及早發現以及預防慢性腎臟疾病，並且檢測數據還能提供醫生進行判讀，使醫生更能夠對症下藥減少療程所帶來的時間與金錢花費，馬桶與微流體晶片結合示意圖如圖 5-1 所示。

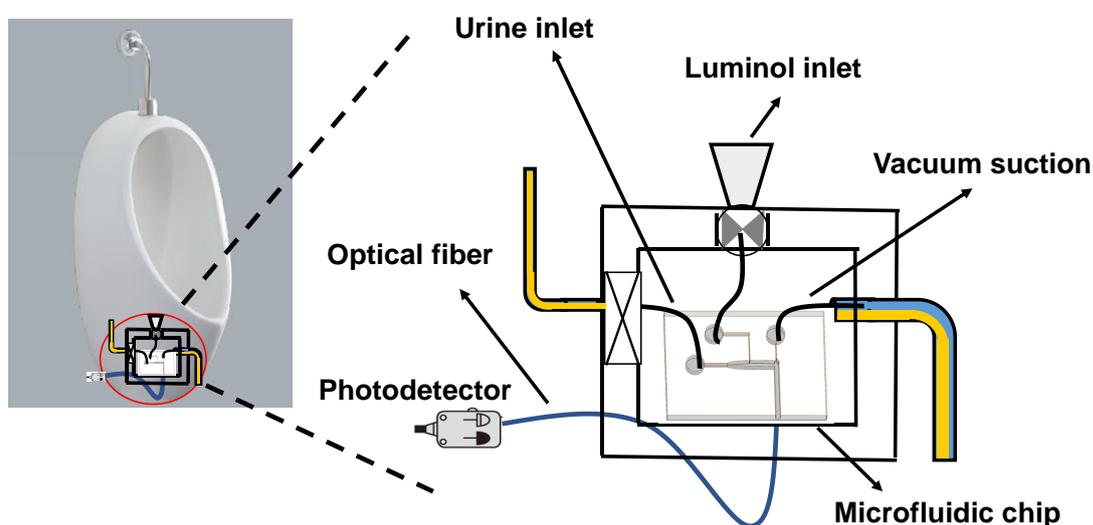


圖 5-1 馬桶與微流體晶片結合示意圖。

## 參考文獻

- [1] K. Kalantar. Zadeh and L. W. Moore, "Does kidney longevity mean healthy vegan food and less meat or is any low-protein diet good enough?," *Journal of Renal Nutrition*, vol. 29, no. 2, pp. 79-81, 2019.
- [2] L. A. Inker, B. C. Astor, C. H. Fox, T. Isakova, J. P. Lash, C. A. Peralta, M. Kurella Tamura, and H. I. Feldman, "KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 63, no. 5, pp. 713-735, 2014.
- [3] M. G. Shlipak, S. L. Tummalaipalli, L. E. Boulware, M. E. Grams, A. P. Kengne, M. Madero, B. Mihaylova, N. Tangri, M. Cheung, M. Jadoul, W. C. Winkelmayer, S. Zoungas, and P. Conference, "The case for early identification and intervention of chronic kidney disease: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference," *Kidney International*, vol. 99, no. 1, pp. 34-47, 2021.
- [4] B. Bikbov, C. Purcell, A. S. Levey, M. Smith, A. Abdoli, and M. Abebe, "Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017," *The Lancet*, vol. 395, no. 10225, pp. 709-733, 2020.
- [5] A. C. Webster, E. V. Nagler, R. L. Morton, and P. Masson, "Chronic kidney disease," *The lancet*, vol. 389, no. 10075, pp. 1238-1252, 2017.
- [6] E. J. Williamson, A. J. Walker, K. Bhaskaran, S. Bacon, C. Bates, C. E. Morton, H. J. Curtis, A. Mehrkar, D. Evans, and P. Inglesby, "Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY," *Nature*, vol. 584, no. 7821, pp. 430-436, 2020.
- [7] E. Akalin, Y. Azzi, R. Bartash, H. Seethamraju, M. Parides, V. Hemmige, M. Ross, S. Forest, Y. D. Goldstein, M. Ajaimy, L. Liriano-Ward, C. Pynadath, P. Loarte-Campos, P. B. Nandigam, J. Graham, M. Le, J. Rocca, and M. Kinkhabwala, "Covid-19 and Kidney Transplantation," *New England Journal of Medicine*, vol. 382, no. 25, pp. 2475-2477, 2020.
- [8] 衛生福利部統計處, "2020 年死因統計結果分析," 2020.
- [9] P. F. Orlandi, N. Fujii, J. Roy, H. Y. Chen, L. Lee Hamm, J. H. Sondheimer, J. He, M. J. Fischer, H. Rincon-Choles, G. Krishnan, R. Townsend, T. Shafi, C. Y. Hsu, J. W. Kusek, J. T. Daugirdas, H. I. Feldman, and C. S. Investigators, "Hematuria as a risk factor for progression of chronic kidney disease and death: findings from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study," *BMC Nephrol*, vol. 19, no. 1, p. 150, 2018.

- [10] N. Yoshida, K. Hanai, H. Murata, Y. Uchigata, and T. Babazono, "Cross-sectional and longitudinal associations between dipstick hematuria and chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 172, p. 108519, 2021.
- [11] J. R. Ingelfinger, "Hematuria in adults," *New England Journal of Medicine*, vol. 385, no. 2, pp. 153-163, 2021.
- [12] A. A. Syed, M. F. Silwadi, and B. A. Khatoon, "Detection and diagnosis of blood in feces and urine: an overview," *Clinica Chimica Acta*, vol. 318, no. 1-2, pp. 1-17, 2002.
- [13] P. Romagnani, G. Remuzzi, R. Glassock, A. Levin, K. J. Jager, M. Tonelli, Z. Massy, C. Wanner, and H. J. Anders, "Chronic kidney disease," *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 3, no. 1, p. 17088, 2017.
- [14] C. f. D. Control and Prevention, "Chronic kidney disease in the United States, 2019," *Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention*, vol. 3, 2019.
- [15] H. M. Free, A. H. Free, and A. S. Giordano, "Studies with a simple test for the detection of occult blood in urine," *The Journal of Urology*, vol. 75, no. 4, pp. 743-752, 1956.
- [16] G. D. Grossfeld, M. S. Litwin, J. S. Wolf, H. Hricak, C. L. Shuler, D. C. Agerter, and P. R. Carroll, "Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy—part I: definition, detection, prevalence, and etiology<sup>1</sup>," *Urology*, vol. 57, no. 4, pp. 599-603, 2001.
- [17] M. L. O'Toole, W. D. Hiller, M. S. Roalstad, and P. S. Douglas, "Hemolysis during triathlon races: its relation to race distance," *Medicine and Science in Sports and Exercise*, vol. 20, no. 3, pp. 272-275, 1988.
- [18] S. Keah and K. Chng, "Exercise-Induced Rhabdomyolysis with Acute Renal Failure After Strenuous Push-UPS," *Malays Fam Physician*, vol. 4, no. 1, pp. 37-39, 2009.
- [19] A. J. Mariani, M. C. Mariani, C. Macchioni, U. K. Stams, A. Hariharan, and A. Moriera, "The significance of adult hematuria: 1,000 hematuria evaluations including a risk-benefit and cost-effectiveness analysis," *The Journal of Urology*, vol. 141, no. 2, pp. 350-355, 1989.
- [20] D. S. Kaufman, W. U. Shipley, and A. S. Feldman, "Bladder cancer," *The Lancet*, vol. 374, no. 9685, pp. 239-249, 2009.
- [21] E. M. Messing and A. Vaillancourt, "Hematuria screening for bladder cancer," *Journal of Occupational Medicine*, vol. 32, no. 9, pp. 838-845, 1990.
- [22] J. Penders, T. Fiers, and J. R. Delanghe, "Quantitative evaluation of urinalysis test strips," *Clinical Chemistry*, vol. 48, no. 12, pp. 2236-2241, 2002.

- [23] D. Enko, I. Stelzer, M. Bockl, B. Derler, W. J. Schnedl, P. Anderssohn, A. Meinitzer, and M. Herrmann, "Comparison of the diagnostic performance of two automated urine sediment analyzers with manual phase-contrast microscopy," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 58, no. 2, pp. 268-273, 2020.
- [24] 台灣醫事檢驗學會, "尿沉渣鏡檢指引 TSLM-GP-U01(1) " 2018.
- [25] E. J. van Kampen and W. G. Zijlstra, "Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives," *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 23, pp. 199-257, 1983.
- [26] E. Dervieux, Q. Bodinier, W. Uhring, and M. Theron, "Measuring hemoglobin spectra: searching for carbamino-hemoglobin," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 25, no. 10, p. 105001, 2020.
- [27] H. J. Chung, J. W. Chung, J. Yi, M. Hur, T. H. Lee, S. H. Hwang, Y. K. Song, and D. H. Lee, "Automation of Harboe method for the measurement of plasma free hemoglobin," *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 34, no. 6, p. e23242, 2020.
- [28] N. Naeem, K. S. Drese, L. Paterson, and M. Kersaudy-Kerhoas, "Current and emerging microfluidic-based integrated solutions for free hemoglobin and hemolysis detection and measurement," *Analytical Chemistry*, vol. 94, no. 1, pp. 75-85, 2022.
- [29] Y. H. Wu, Y. Z. Chen, Y. W. Li, J. Huang, H. Yu, and Z. Wang, "Accelerating peroxidase-like activity of gold nanozymes using purine derivatives and its application for monitoring of occult blood in urine," *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 270, pp. 443-451, 2018.
- [30] N. Pourreza and H. Golmohammadi, "Hemoglobin detection using curcumin nanoparticles as a colorimetric chemosensor," *Rsc Advances*, vol. 5, no. 3, pp. 1712-1717, 2015.
- [31] G. C. Han, X. R. Su, J. T. Hou, A. Ferranco, X. Z. Feng, R. S. Zeng, Z. C. Chen, and H. B. Kraatz, "Disposable electrochemical sensors for hemoglobin detection based on ferrocenoyl cysteine conjugates modified electrode," *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 282, pp. 130-136, 2019.
- [32] R. E. Hirsch, R. S. Zukin, and R. L. Nagel, "Intrinsic fluorescence emission of intact oxy hemoglobins," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 93, no. 2, pp. 432-439, 1980.
- [33] A. Barati, M. Shamsipur, and H. Abdollahi, "Hemoglobin detection using carbon dots as a fluorescence probe," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 71, pp. 470-475, 2015.
- [34] G. Kalaiyarasan and J. Joseph, "Cholesterol derived carbon quantum dots as fluorescence probe for the specific detection of hemoglobin in diluted human

- blood samples," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 94, pp. 580-586, 2019.
- [35] X.-C. Shen, X.-Y. Liou, L.-P. Ye, H. Liang, and Z.-Y. Wang, "Spectroscopic studies on the interaction between human hemoglobin and CdS quantum dots," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 311, no. 2, pp. 400-406, 2007.
- [36] D. Yang, H. Meng, Y. Tu, and J. Yan, "A nanocluster-based fluorescent sensor for sensitive hemoglobin detection," *Talanta*, vol. 170, pp. 233-237, 2017.
- [37] Q. Li, K. Peng, Y. Yu, X. Ruan, and Y. Wei, "One-pot synthesis of highly fluorescent silicon nanoparticles for sensitive and selective detection of hemoglobin," *Electrophoresis*, vol. 40, no. 16-17, pp. 2129-2134, 2019.
- [38] H. O. Albrecht, "Über die chemiluminescenz des aminophthalsäurehydrazids," *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, vol. 136, no. 1, pp. 321-330, 1928.
- [39] K. S. Ahn, J. Lee, J. M. Park, H. N. Choi, and W. Y. Lee, "Luminol chemiluminescence biosensor for glycated hemoglobin (HbA1c) in human blood samples," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 75, pp. 82-87, 2016.
- [40] F. Barni, S. W. Lewis, A. Berti, G. M. Miskelly, and G. Lago, "Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection," *Talanta*, vol. 72, no. 3, pp. 896-913, 2007.
- [41] S. Hayashi, E. Kakizaki, A. Sonoda, N. Shinkawa, T. Shiragami, and N. Yukawa, "Acceleration effect of the forensic luminol reaction induced by visible light irradiation of whole human blood aqueous solutions," *Forensic Science International*, vol. 299, pp. 208-214, 2019.
- [42] T. H. Fereja, S. A. Kitte, W. Gao, F. Yuan, D. Snizhko, L. Qi, A. Nsabimana, Z. Liu, and G. Xu, "Artesunate-luminol chemiluminescence system for the detection of hemin," *Talanta*, vol. 204, pp. 379-385, 2019.
- [43] J. El-Ali, P. K. Sorger, and K. F. Jensen, "Cells on chips," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 403-411, 2006.
- [44] A. J. DeMello, "Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 394-402, 2006.
- [45] P. S. Dittrich and A. Manz, "Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 5, no. 3, pp. 210-218, 2006.
- [46] S. O. Catarino, R. O. Rodrigues, D. Pinho, J. M. Miranda, G. Minas, and R. Lima, "Blood Cells Separation and Sorting Techniques of Passive Microfluidic Devices: From Fabrication to Applications," *Micromachines (Basel)*, vol. 10, no. 9, p. 593, 2019.
- [47] B. George. Gay and K. Parker, "Understanding the complete blood count with differential," *Journal of Perianesthesia Nursing*, vol. 18, no. 2, pp. 96-114; quiz 115-7, 2003.

- [48] S. Chien, "Red cell deformability and its relevance to blood flow," *Annual Review of Physiology*, vol. 49, pp. 177-192, 1987.
- [49] 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, no. 7101, pp. 412-418, 2006.
- [50] I. K. Dimov, L. Basabe. Desmonts, J. L. Garcia. Cordero, B. M. Ross, Y. Park, A. J. Ricco, and L. P. Lee, "Stand-alone self-powered integrated microfluidic blood analysis system (SIMBAS)," *Lab on a Chip*, vol. 11, no. 5, pp. 845-850, 2011.
- [51] L. Yu, S. R. Ng, Y. Xu, H. Dong, Y. J. Wang, and C. M. Li, "Advances of lab-on-a-chip in isolation, detection and post-processing of circulating tumour cells," *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 16, pp. 3163-3182, 2013.
- [52] M. Toner and D. Irimia, "Blood-on-a-chip," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 7, pp. 77-103, 2005.
- [53] H. J. Lee, J. H. Oh, J. M. Oh, J. M. Park, J. G. Lee, M. S. Kim, Y. J. Kim, H. J. Kang, J. Jeong, and S. I. Kim, "Efficient isolation and accurate in situ analysis of circulating tumor cells using detachable beads and a high-pore-density filter," *Angewandte Chemie*, vol. 125, no. 32, pp. 8495-8498, 2013.
- [54] H. M. Ji, V. Samper, Y. Chen, C. K. Heng, T. M. Lim, and L. Yobas, "Silicon-based microfilters for whole blood cell separation," *Biomedical Microdevices*, vol. 10, no. 2, pp. 251-257, 2008.
- [55] S. Chang and Y. H. Cho, "Continuous blood cell separation using a dielectrophoretic virtual pillar array," *International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*, 2008: IEEE, pp. 974-977
- [56] S. M. McFaul, B. K. Lin, and H. Ma, "Cell separation based on size and deformability using microfluidic funnel ratchets," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 13, pp. 2369-2376, 2012.
- [57] C. C. Wu, L. Z. Hong, and C. T. Ou, "Blood cell-free plasma separated from blood samples with a cascading weir-type microfilter using dead-end filtration," *Journal of Medical and Biological Engineering*, vol. 32, no. 3, pp. 163-168, 2012.
- [58] T. Gerhardt, S. Woo, and H. Ma, "Chromatographic behaviour of single cells in a microchannel with dynamic geometry," *Lab on a Chip*, vol. 11, no. 16, pp. 2731-2737, 2011.
- [59] C. Jin, S. M. McFaul, S. P. Duffy, X. Deng, P. Tavassoli, P. C. Black, and H. Ma, "Technologies for label-free separation of circulating tumor cells: from historical foundations to recent developments," *Lab on a Chip*, vol. 14, no. 1, pp. 32-44, 2014.
- [60] L. R. Huang, E. C. Cox, R. H. Austin, and J. C. Sturm, "Continuous particle separation through deterministic lateral displacement," *Science*, vol. 304, no. 5673,

- pp. 987-990, 2004.
- [61] A. Hochstetter, R. Vernekar, R. H. Austin, H. Becker, J. P. Beech, D. A. Fedosov, G. Gompper, S. C. Kim, J. T. Smith, G. Stolovitzky, J. O. Tegenfeldt, B. H. Wunsch, K. K. Zeming, T. Kruger, and D. W. Inglis, "Deterministic Lateral Displacement: Challenges and Perspectives," *ACS Nano*, vol. 14, no. 9, pp. 10784-10795, 2020.
- [62] D. W. Inglis, "Efficient microfluidic particle separation arrays," *Applied Physics Letters*, vol. 94, no. 1, p. 013510, 2009.
- [63] J. A. Davis, D. W. Inglis, K. J. Morton, D. A. Lawrence, L. R. Huang, S. Y. Chou, J. C. Sturm, and R. H. Austin, "Deterministic hydrodynamics: taking blood apart," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 40, pp. 14779-14784, 2006.
- [64] J. S. Shim, A. W. Browne, and C. H. Ahn, "An on-chip whole blood/plasma separator with bead-packed microchannel on COC polymer," *Biomedical Microdevices*, vol. 12, no. 5, pp. 949-957, 2010.
- [65] J. S. Shim and C. H. Ahn, "An on-chip whole blood/plasma separator using hetero-packed beads at the inlet of a microchannel," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 5, pp. 863-866, 2012.
- [66] C. Meng. Di, Y. Yan. Ting, D. Zhi. Yang, X. Hong. Yan, D. Ji. Nan, Y. Zhong, H. Ning, and Y. Jun, "Microchannel with stacked microbeads for separation of plasma from whole blood," *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 47, no. 5, pp. 661-668, 2019.
- [67] X. Chen, S. Zhang, Y. Gan, R. Liu, R. Q. Wang, and K. Du, "Understanding microbeads stacking in deformable Nano-Sieve for Efficient plasma separation and blood cell retrieval," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 606, no. Pt 2, pp. 1609-1616, 2022.
- [68] H. Gai, Y. Li, and E. S. Yeung, "Optical detection systems on microfluidic chips," *Microfluidics*, vol. 304, pp. 171-201, 2011.
- [69] S. K. Hsiung, C. H. Lin, and G. B. Lee, "A microfabricated capillary electrophoresis chip with multiple buried optical fibers and microfocusing lens for multiwavelength detection," *Electrophoresis*, vol. 26, no. 6, pp. 1122-1129, 2005.
- [70] L. F. Greer III and A. A. Szalay, "Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review," *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*, vol. 17, no. 1, pp. 43-74, 2002.
- [71] M. C. Goldberg and E. R. Weiner, "The science of luminescence," ACS Publications, 1989.
- [72] X. Y. Huang and J. C. Ren, "Chemiluminescence detection for capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis," *Trac-Trends in*

- Analytical Chemistry*, vol. 25, no. 2, pp. 155-166, 2006.
- [73] G. Perez. Garcia, J. Camas. Anzueto, and G. Anzueto. Sanchez, "Demonstration of improving the sensitivity of a fiber optic temperature sensor using the wavelength of maximum absorption of the lophine," *Measurement*, vol. 187, p. 110378, 2022.
- [74] M. Grodsky, K. Wright, and P. L. Kirk, "Simplified preliminary blood testing--An improved technique and a comparative study of methods," *The Journal of Criminal Law & Criminology Criminology & Police Science.*, vol. 42, p. 95, 1951.
- [75] L. P. Palilis and A. C. Calokerinos, "Analytical applications of chemiluminogenic reactions," *Analytica Chimica Acta*, vol. 413, no. 1-2, pp. 175-186, 2000.
- [76] J. Y. Yoon and B. Kim, "Lab-on-a-chip pathogen sensors for food safety," *Sensors (Basel)*, vol. 12, no. 8, pp. 10713-10741, 2012.
- [77] C. L. Lin, W. H. Chang, C. H. Wang, C. H. Lee, T. Y. Chen, F. J. Jan, and G. B. Lee, "A microfluidic system integrated with buried optical fibers for detection of Phalaenopsis orchid pathogens," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 63, pp. 572-579, 2015.
- [78] I. Bernacka. Wojcik, H. Aguas, F. F. Carlos, P. Lopes, P. J. Wojcik, M. N. Costa, B. Veigas, R. Igreja, E. Fortunato, and P. V. Baptista, "Single nucleotide polymorphism detection using gold nanoprobe and bio-microfluidic platform with embedded microlenses," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 112, no. 6, pp. 1210-1219, 2015.
- [79] F. B. Myers and L. P. Lee, "Innovations in optical microfluidic technologies for point-of-care diagnostics," *Lab on a Chip*, vol. 8, no. 12, pp. 2015-2031, 2008.
- [80] Y. Zhao, X. G. Hu, S. Hu, and Y. Peng, "Applications of fiber-optic biochemical sensor in microfluidic chips: A review," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 166, p. 112447, 2020.
- [81] J.-Y. Yoon, "Latex immunoagglutination assay in lab-on-a-chip," *Biological Engineering Transactions*, vol. 1, no. 1, pp. 79-94, 2007.
- [82] J. H. Han, B. C. Heinze, and J. Y. Yoon, "Single cell level detection of Escherichia coli in microfluidic device," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, no. 8, pp. 1303-1306, 2008.
- [83] Q. Xiang, X. C. Xuan, B. Xu, and D. Q. Li, "Multi-functional particle detection with embedded optical fibers in a poly(dimethylsiloxane) chip," *Instrumentation Science & Technology*, vol. 33, no. 5, pp. 597-607, 2005.
- [84] F. C. Huang, C. S. Liao, and G. B. Lee, "An integrated microfluidic chip for DNA/RNA amplification, electrophoresis separation and on-line optical detection," *Electrophoresis*, vol. 27, no. 16, pp. 3297-3305, 2006.
- [85] Y. C. Tung, M. Zhang, C. T. Lin, K. Kurabayashi, and S. J. Skerlos, "PDMS-based

- opto-fluidic micro flow cytometer with two-color, multi-angle fluorescence detection capability using PIN photodiodes," *Sensors and Actuators B-Chemical*, vol. 98, no. 2-3, pp. 356-367, 2004.
- [86] R. M. Vazquez, R. Osellame, D. Nolli, C. Dongre, H. van den Vlekkert, R. Ramponi, M. Pollnau, and G. Cerullo, "Integration of femtosecond laser written optical waveguides in a lab-on-chip," *Lab on a Chip*, vol. 9, no. 1, pp. 91-96, 2009.
- [87] Z. Mao, F. Guo, Y. Xie, Y. Zhao, M. I. Lapsley, L. Wang, J. D. Mai, F. Costanzo, and T. J. Huang, "Label-free measurements of reaction kinetics using a droplet-based optofluidic device," *Journal of Laboratory Automation*, vol. 20, no. 1, pp. 17-24, 2015.
- [88] T. Yang, S. Stavrakis, and A. deMello, "A High-Sensitivity, Integrated Absorbance and Fluorescence Detection Scheme for Probing Picoliter-Volume Droplets in Segmented Flows," *Analytical Chemistry*, vol. 89, no. 23, pp. 12880-12887, 2017.
- [89] S. U. Hassan, A. M. Nightingale, and X. Niu, "Continuous measurement of enzymatic kinetics in droplet flow for point-of-care monitoring," *Analyst*, vol. 141, no. 11, pp. 3266-3273, 2016.
- [90] S. Hengoju, S. Wohlfeil, A. S. Munser, S. Boehme, E. Beckert, O. Shvydkiv, M. Tovar, M. Roth, and M. A. Rosenbaum, "Optofluidic detection setup for multi-parametric analysis of microbiological samples in droplets," *Biomicrofluidics*, vol. 14, no. 2, p. 24109, 2020.
- [91] M. Frankowski, N. Bock, A. Kummrow, S. Schadel-Ebner, M. Schmidt, A. Tuchscheerer, and J. Neukammer, "A microflow cytometer exploited for the immunological differentiation of leukocytes," *Cytometry A*, vol. 79, no. 8, pp. 613-624, 2011.
- [92] Y. Zhao, Q. Li, X. Hu, and Y. Lo, "Microfluidic cytometers with integrated on-chip optical systems for red blood cell and platelet counting," *Biomicrofluidics*, vol. 10, no. 6, p. 64119, 2016.
- [93] N. H. Mahmood and M. A. Mansor, "Red blood cells estimation using Hough transform technique," *Signal & Image Processing*, vol. 3, no. 2, p. 53, 2012.
- [94] J. Kim, H. Lee, and S. Shin, "Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review," *Journal of Cellular Biotechnology*, vol. 1, no. 1, pp. 63-79, 2015.
- [95] C. Rose, A. Parker, B. Jefferson, and E. Cartmell, "The characterization of feces and urine: A review of the literature to inform advanced treatment technology," *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, vol. 45, no. 17, pp. 1827-1879, 2015.
- [96] P. J. McIntire, I. Kilic, E. M. Wojcik, G. A. Barkan, and S. E. Pambuccian, "The color of urine: then and now—a comprehensive review of the literature with

emphasis on intracytoplasmic pigments encountered in urinary cytology," *Journal of the American Society of Cytopathology*, vol. 9, no. 1, pp. 9-19, 2020.

# 論文抄襲比對

微流體細胞過篩晶片結合發光胺化學冷光於尿潛血之檢測

## ORIGINALITY REPORT

4%

SIMILARITY INDEX

3%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1	<a href="http://www.labmed.org.tw">www.labmed.org.tw</a> Internet Source	1%
2	Submitted to National Sun Yat-sen University Student Paper	<1%
3	<a href="http://proj3.sinica.edu.tw">proj3.sinica.edu.tw</a> Internet Source	<1%
4	<a href="http://etd.lib.nsysu.edu.tw">etd.lib.nsysu.edu.tw</a> Internet Source	<1%
5	<a href="http://www.lgm.kh.edu.tw">www.lgm.kh.edu.tw</a> Internet Source	<1%
6	Submitted to The Open University of Hong Kong Student Paper	<1%
7	<a href="http://www.uscnk.cn">www.uscnk.cn</a> Internet Source	<1%
8	Huang, X.. "Chemiluminescence detection for capillary electrophoresis and microchip	<1%

# 自述

姓名: 邱宗徽 (Zong-Hui, Qiu)

出生日期: 1995/11/03

性別: 男

出生地: 台中市

電子信箱: eric51005@gmail.com

學歷:

國立中山大學 機械與機電工程研究所 碩士 2019/07~2022/07

國立聯合大學 機械工程學系 學士 2014/09~2018/06



產學計畫:

日月光集團第八屆封裝產學技術研究合作發表”微機電感測器的防水透氣膜黏著性改善”

研討會

1. **Zong-Hui Qiu**, Che-Hsin Lin, “Integrated Microfluidic Chip for Chemiluminescence Detection of Urine Occult Blood” *26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2022)*, China, Hangzhou, October, 2022