

三、實驗

3.1 實驗目的

由於醣類分子之檢測於各分析領域都相當重要，尤其以食品檢驗與人類生活最為息息相關。故本實驗期望能建立一製程快速、成本低廉之電化學微晶片，經由標準物之測試來卻確認其效能與再現性後，並進一步應用於市售飲料之含糖量檢測。

3.2 儀器設備

(1) 電化學偵測器

本實驗所使用的電化學偵測器為 Model 802B electrochemical workstation(CH Instruments, Austin, TX, USA)，並使用其循環伏安法(cyclic voltammetry)和安培法(amperometry, $i-t$ curve)兩種功能。

(2) 高電壓電源供應器

利政科技公司所生產專為晶片電泳所設計之高電壓供應器，型號為 MP-3500-250P(Major Science, Taiwan, ROC)，共有四組電源輸出，可供應電動注射以及分離時所需電壓，最高供應電壓至 5000 V。

(3) 矽晶圓母模

母模上晶片佈局係由本實驗室利用 AutoCAD 繪圖軟體製出，而製作方面則是委託工研院機械所以濕式蝕刻方式完成，其流道尺寸為 $50 \times 50 \mu\text{m}$ (寬 \times 深)，流道細部照片與微晶片詳細格式由圖 3-1 所示。

(4) 氧電漿清潔機

做為晶片密封用途之氧電漿清洗機，型號為 PDC-32G(HARRICK PLASMA, Inc., Ithaca, NY USA)，共有 Low、Med、Hi 三種功率輸出，並依實驗參數對微晶片與玻璃平板表面進行電漿處理。

3.3 阻斷器與工作電極之材質、規格

本實驗所使用之阻斷器材質為白金，其直徑分別為 250 μm 與 500 μm 兩種規格，而工作電極材質為銅，其直徑為 200 μm 。上述兩金屬線純度均為 99.99 %。

3.4 藥品

(1) 分析物標準品

本實驗所用之標準品為兒茶酚(catechol)、果糖(fructose)由美國 sigma 公司(St. Louis, MO, USA)所生產製造，而多巴胺(dopamine)則是購自美國 Acros 公司(New Jersey, USA)。蔗糖(sucrose)是由交大應化所李耀坤教授實驗室所提供。

(2) 緩衝溶液與添加物藥品

磷酸氫二鈉(disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4)、磷酸二氫鈉(sodium dihydrogen phosphate, NaH_2PO_4)與氫氧化鈉(sodium hydroxide)均購自 Fluka 公司、十二烷基硫酸鈉(Sodium dodecyl sulfate, SDS)與四硼酸二鈉(disodium tetraborate)均由美國 sigma 公司(St. Louis, MO, USA)所生產製造，而硫酸銅(copper sulfate)購自於 Merck 公司(D-6100, Darmstadt, F. R. Germany)。實驗室所用之去離子水係由 Milli-Q 純水系統(Millipore, Bedford, MA, USA)所製造，其電阻值為 18.2 $\text{m}\Omega$ 。

(3)微晶片製程藥品

聚二甲基矽氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)單體以及硬化劑(curing agent)皆由喬越公司(Silmore, Taiwan, ROC)購得，塗佈於矽晶圓母模進行矽烷化反應的三十氟-1,1,2,2-四氫辛基三氯矽烷 (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyltrichloro-silane, TTTS)由 Gelest 公司購得。工業級清洗用異丙醇(isopropanol, IPA)及丙酮(acetone)分別由聯工試藥(Union chemical work, Taiwan, ROC)公司及友和貿易公司(UNI-ONWARD Crop., Taiwan, ROC)購得。

3.5 樣品與緩衝溶液配製

測試晶片效能之標準品多巴胺、兒茶酚二種分析物，以去離子水配製成 10 mM 儲存溶液後，置於 0 °C 冷凍庫中保存，進行實驗時再以磷酸緩衝溶液稀釋至所需濃度。緩衝溶液則是以濃度均為 0.2 M 之磷酸氫二鈉及磷酸二氫鈉溶液，依照配方表的比例混合出所需之 pH，以去離子水稀釋至所需濃度。

而醣類檢測部分之標準品，蔗糖與果糖二分析物亦以去離子水配製成 10 mM 儲存溶液後，置於 4 °C 冷藏室保存，進行實驗前再以 20 mM 氫氧化鈉電解質溶液稀釋至所需濃度。

SDS、四硼酸二鈉與硫酸銅等添加劑則視所需濃度再添加至緩衝溶液中即可。

3.6 真實樣品之處理

本實驗所選用之真實樣品為市售之利樂盒包裝蘋果汁(統一蘋果多)以 20 mM NaOH 稀釋一百倍後，再以孔徑為 0.2 μm 之 PVDF 針筒過濾器過濾，直接注入微晶片樣品槽中進行電泳分離。

3.7 晶片製作以及前處理

本實驗利用複製灌模方式製作之 PDMS 電泳晶片，其製作程序可分為四個步驟，分別敘述如下。

3.7.1 矽晶圓母模矽烷化反應

首先將矽晶圓母模置於丙酮中，以超音波洗淨器清洗 10 分鐘後，取出以氮氣吹乾母模表面，再將母模置入玻璃培養皿內後，另取 TTTS 20 μl 滴入培養皿中，將培養皿放入設定 60 $^{\circ}\text{C}$ 之烘箱中 10 分鐘，使 TTTS 受熱揮發後沉積於母模表面以進行矽烷化反應(silanization)。行矽烷化反應後，可避免 PDMS 晶片在灌模過程中與母模產生不可逆之共價鍵結[48]，易產生脫模時，PDMS 殘留於母模表面之問題。

3.7.2 電化學微晶片與電極之製作

本實驗所製作之電化學微晶片共有兩代，其主要差異在於阻斷器以及工作電極擺設位置的改進，詳細演進過程由表 3-1 所示，而晶片詳細結構圖與照片如圖 3-2~4 所示。

本實驗微晶片製程分為上下兩層來逐步改進。最早期之 1.1 代微晶片上方之微流道層之製作方式，是秤取重量比 10:1 的 PDMS 單體以及硬化劑，將兩者混合攪拌均勻，置於真空乾燥箱中(desiccator)除氣 3 分鐘後，將其傾倒於微流道寬度為 50 μm 的矽晶圓母模之上，並置於 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中加熱一小時後取出，以刀片裁切成適當之大小，再以打孔器(puncher)於晶片上打出六個直徑為 3 mm 的樣品槽後，以異丙醇以清洗 10 分鐘後，再以氮氣將其表面吹乾備用。

而微晶片下方之電極層亦是採取灌模方式製出，首先先將直徑為 250 μm 之白金線阻斷器與直徑為 200 μm 之銅線工作電極置入一 9 × 4 × 0.3 cm(長 × 寬 × 高)之壓克力容器底部，並使二電極彼此保持 1 mm 的距離，再傾倒 PDMS 單體於其上，至入 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中加熱一小時後取出，脫膜後以刀片裁切成適合於於微流道層之大小。

無論是管柱末或是管柱內之電極擺設方式，工作電極上之催化電流均仍會受到分離電流的影響，故如何降低分離電流流入工作電極之程度，為電化學偵測法重要環節之一，而本實驗採用管柱內之擺設方式，必須降低阻斷器本身之電阻值，使得極大部分之分離電流都先經由阻斷器接地，而減少分離電流溢入工作電極之情形。故 1.2 代製程將 1.1 代之阻斷器由直徑 250 μm 更換為 500 μm 之白金線，以提高阻斷器之絕緣效果。

而最後之 2 代製程的發展原因，是由於 1 代製程的電極層脫模後，原先放置於壓克力容器底部之二電極容易被 PDMS 完全包覆，而無法與微流道中溶液接觸，亦無法產生電滲流驅動分析物。故 1 代製程必須以刀片劃開覆蓋於電極上方之 PDMS，使電極能略為與溶液接觸，但此方式不僅會產生片與片(chip-to-chip)之間的誤差，也容易使流體生成滯留體積(dead volume)而造成訊號的誤判。為改善此缺點，2 代微晶片製程將原先擺置於下層之阻斷器與工作電極移至上層之微流道層，而原先下層之 PDMS 電極層則改換為散熱性更佳、電滲流性質更為穩定的玻璃平板。

2 代晶片之製作程序為；在傾倒 PDMS 分子單體灌製微流道層之前，先將阻斷器以及工作電極平放於矽晶圓母模之佈局上，並使兩電極之間保持 1 mm 之距離，此時再倒入 PDMS 單體加熱一小時硬化，脫膜後，阻斷器與工作電極與流道交會之處會出現一固定面積可與溶液接觸，如圖 3-5 所示。此法不僅可以減少 1 代製程使用刀片劃開 PDMS 所造成之誤差，又因電極與流道交會之處相當平整，能大幅降低流體不規則流動之情形，故在晶片效能測試中，甚至可達到 1×10^5 等級之高理論板數。故本研究採用 2 代晶片製程來進行其後之實驗。

3.7.3 晶片密封

將脫模完畢且清洗過之微流道層與玻璃平板一起置入氧電漿清洗機之中，將欲行電漿處理之面朝上，待電漿機腔體抽真空至 400 mtorr 時，將電漿機之射頻功率調至 Hi 位置，電漿處理 40 秒後，取出微流道層與玻璃薄片並相互平貼之，即完成電化學微晶片製作程序。

3.8 晶片電泳及電化學偵測程序

本實驗進行晶片電泳以及電化學偵測流程可分為晶片前處理、樣品注射、電泳分離以及管柱內電化學偵測等四步驟，分別簡述如下

3.8.1 晶片之前處理

以氧電漿密封之電化學微晶片必須儘快通入極性溶液，以保持流道表面之 OH 基數目[26,94]，故本實驗製作完微晶片後，立刻以水、緩衝溶液之順序，各沖提五分鐘，再施加分離電壓五分鐘做為微晶片使用前之前處理與調態(condition)。

3.8.2 樣品注射

晶片前處理步驟結束後，接下來依照不同注射長度而將樣品溶液置入對應之樣品槽，此時要注意每一樣品槽之液面高低務須一致，以防滲漏情形(leakage)出現，造成基線漂移之現象。置換樣品溶液完畢後，於樣品槽和相對應的樣品廢液槽施加注射電壓 400 V，做為電動注入之驅動力，為避免注射時間過長導致樣品區帶產生擴散現象，本實驗統一以五秒做為注射時間。

3.8.3 電泳分離

在樣品注射結束後，此時高電壓供應器會自動進行施加分離電壓於緩衝溶液槽(buffer reservoir)與緩衝溶液廢液槽(buffer waste reservoir)之間，以進行電泳分離，此時樣品注射電極是處於浮動電壓狀態(floating)。施加分離電壓後，樣品會因電滲流的推動以及本身所受電場的吸引而向工作電極處移動、分離。

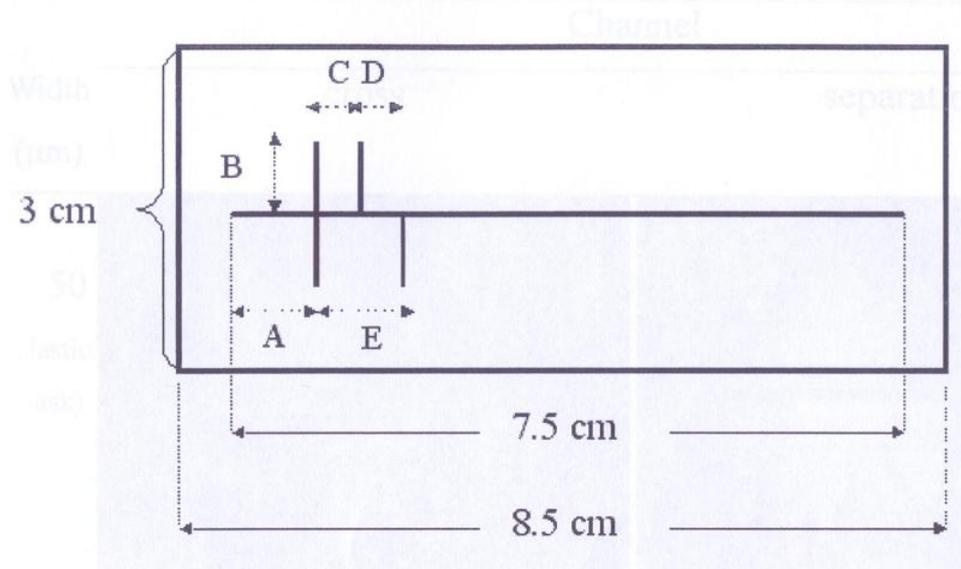
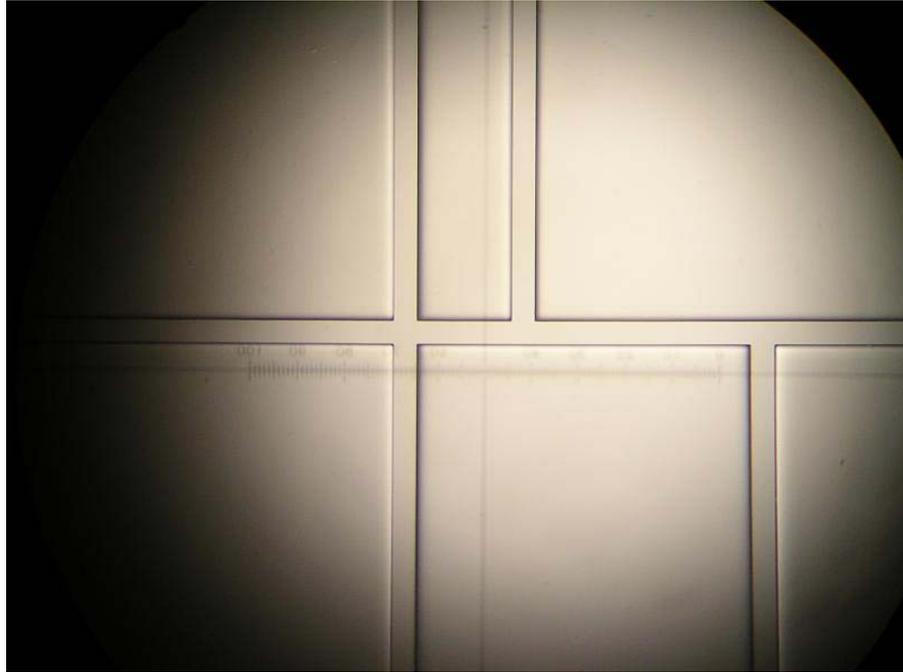
3.8.4 管柱內電化學偵測

當各分析物依序流經阻斷器後，此時已無電滲流推動，但是由於連續流體原則，樣品區帶仍會受到阻斷器前端液體的推擠，而以層流(laminar flow)的方式流經工作電極表面。由於層流方式會造成樣品區帶各點之流速不同，進而造成訊號波型變寬之問題，故阻斷器與工作電極之間距離太遠會造成理論板數降低之負面影響，而本實驗選用 1 mm 做為阻斷器與工作電極之間距，可得到相當對稱且無拖尾之訊號。

3.9 晶片效能測試實驗

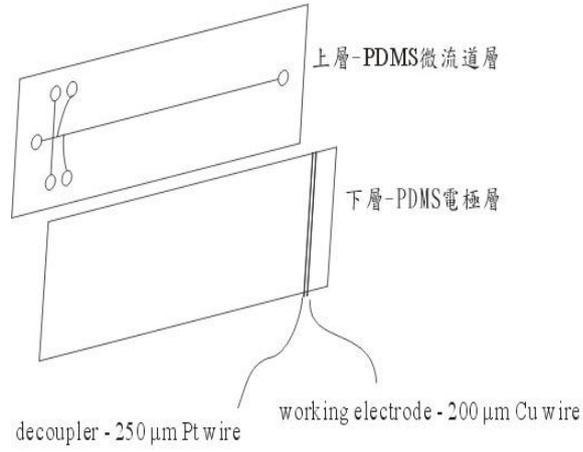
在微晶片製作完畢之後，首先以神經傳導物質進行晶片效能測試實驗。神經傳導物質是由生物之神經元細胞所合成，是神經細胞彼此之間傳遞神經訊息的重要化學物質。因其具有良好電化學活性之特色，故常被選做各種電化學偵測法比較其效能之標準品[60,75]。

神經傳導物質可分為胺基酸類、胜肽類與兒茶酚胺類(catecholamine)，其中兒茶酚胺類神經傳導物質(如：多巴胺、腎上腺素、正腎上腺素.....等)具有容易進行電化學氧化還原之特性，相當適合使用電化學方式偵測。在標準品的偵測上，甚至可達到個位數 nM 的偵測極限[75]。故本研究在微晶片設計製作完成之後，先對晶片效能做一確認之後，再進行醣類之檢測。

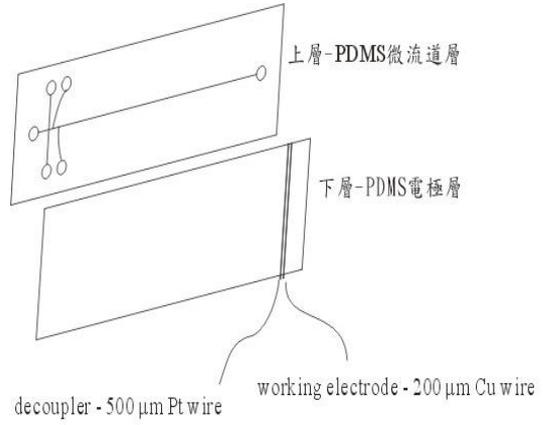


B

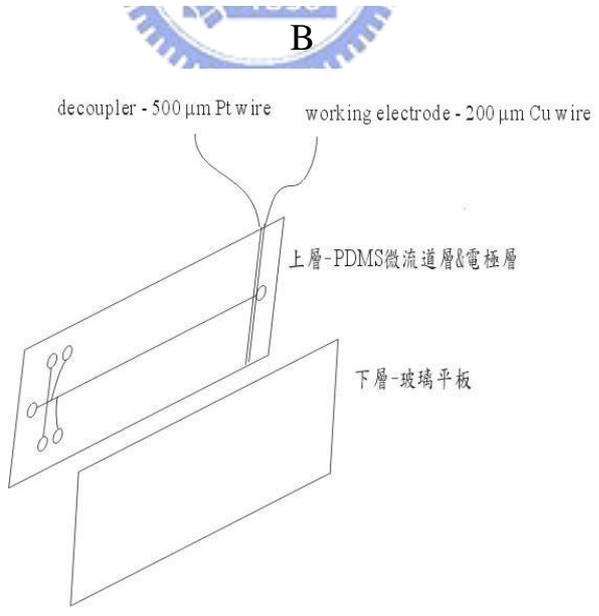
圖 3-1、矽晶圓母模照片與微晶片詳細規格。(A)矽晶圓母模雙 T 注射處；
 (B)微晶片詳細規格圖：A、B 段長度為 0.5 mm；C 段長度 300 μm ；D 段長度 550 μm ；E 段長度 800 μm (各區段未按照實際比例繪製)



A



B

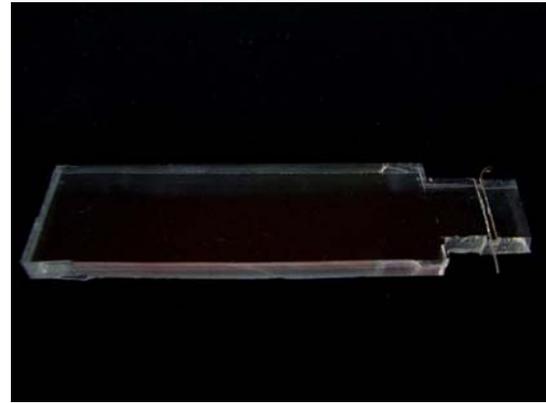


C

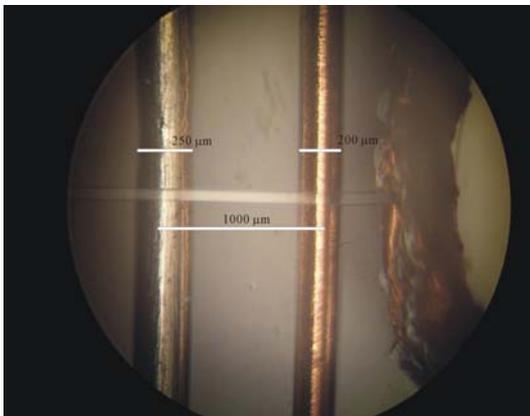
圖 3-2、二代微晶片之結構示意圖。(A)1.1 代微晶片；(B)1.2 代微晶片：1.1 代與 1.2 代差異處僅在於阻斷器直徑不同；(C)2 代微晶片。



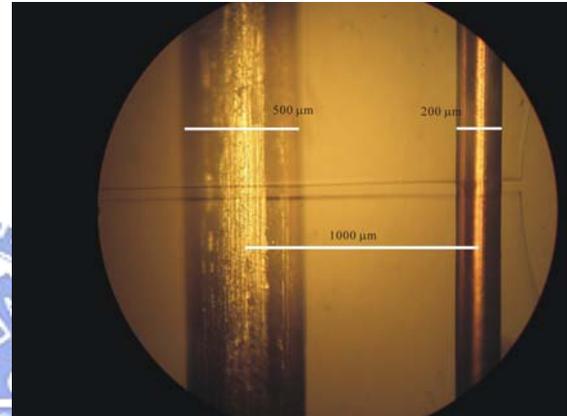
(A)



(B)

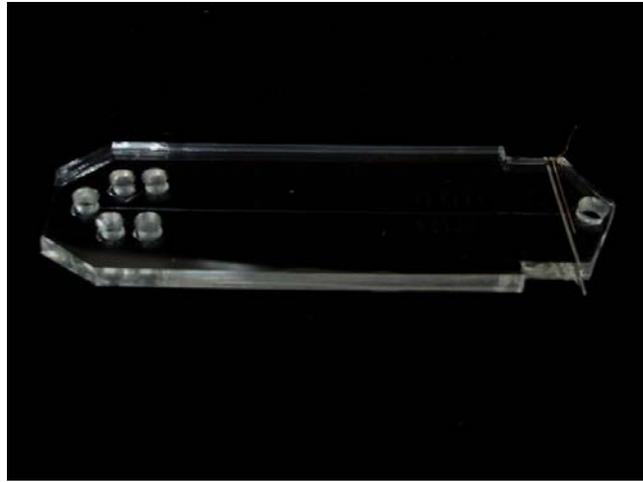


(C)

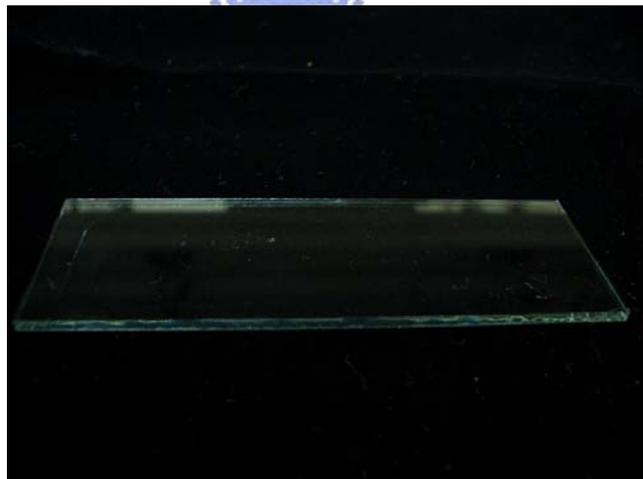


(D)

圖 3-3、1 代微晶片結構示意照片。(A)1.1 & 1.2 代微晶片相同之 PDMS 微流道層；(B)1.1 & 1.2 代微晶片之 PDMS 電極層，1.1 代與 1.2 代差異處僅在於阻斷器直徑不同；(C)1.1 代微晶片阻斷器與工作電極細部放大；(D) 1.2 代微晶片阻斷器與工作電極細部放大。



A



B

圖 3-4、2 代微晶片結構示意照片。(A)PDMS 微流道與電極層，2 代微晶片之阻斷器與工作電極直徑均同於 1.2 代晶片；(B)玻璃平板。

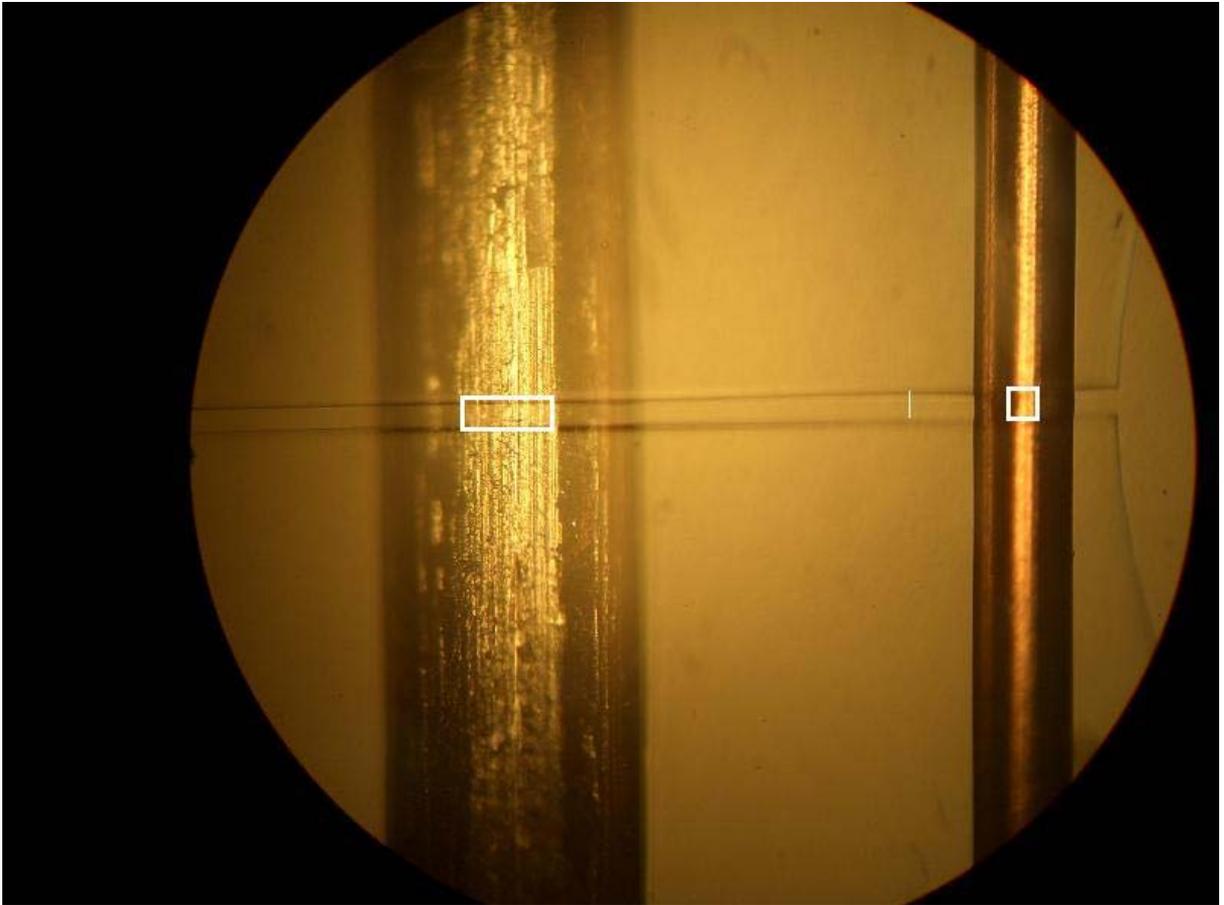


圖 3-5、2 代製程中電極與流道交會之示意圖。圖中白色方框為兩電極與流道接觸之面積。

表 3-1、歷代電化學微晶片之詳細規格

	上層之材質與功能	下層之材質與功能	阻斷器直徑與材質	工作電極直徑與材質
1.1 代微晶片	PDMS, 微流道層	PDMS 電極層	250 μm 白金線	200 μm 銅線
1.2 代微晶片	PDMS, 微流道層	PDMS 電極層	500 μm 白金線	200 μm 銅線
2 代微晶片	PDMS, 微流道&電極層	玻璃平板	500 μm 白金線	200 μm 銅線