1.1 引言

毛細管電泳(capillary electrophoresis, CE)是在 70 年代開始發展的一種分離技術,其主要原理是在充滿緩衝溶液中的毛細管兩端施加高電壓,並利用分析物的淌度(electrophoretic mobility)不同,在毛細管中有著各自的泳動速度而彼此分離。由於其具有應用範圍廣、樣品消耗量少、分離效率高與分析時間短等特點,使得毛細管電泳正迅速成為一有力的分析技術。

此外,由於微機電(Micro-Electro-Mechanical System, MEMS)技術的發展與生物科技的興起,在 1984 年出現了所謂的微小化全分析系統(Micro Total Analysis System, µTAS)[1,2]一詞,將傳統實驗室中的實驗過程如萃取、稀釋、反應、分析、偵測等等,都集中縮小在一個微晶片上進行。而µTAS 又可分為基因晶片(Gene chip)與實驗室微縮晶片(Lab-on-a-chip)兩大類。而在九十年代初期,毛細管電泳開始被應用在微晶片上進行化學分析[1-8],也造就了微晶片電泳(Microchip electrophresis, MCE)一詞的誕生,也為化學分析的領域增添了一名生力軍。到目前為止,微組裝元件已成功地分離了螢光標記的氨基酸[9]、DNA 片段[4,6,10]、PCR 產物及短鏈的寡核苷酸(oligonucleotides)[11]。而毛細管電泳原理以及微晶片的製作、偵測模式將於之後章節簡述之。

1.2 毛細管電泳原理

所謂電泳即是荷電物質於緩衝溶液中受到電場的吸引所造成的運動。 首位將電泳此現象應用於分析化學領域的學者,當屬瑞典科學家 Tiselius。 他於 1937 年成功地在自由溶液中分離三種人體血清中球蛋白[12],也因此 項創舉得到諾貝爾化學獎。為了改善傳統的平板電泳會因為施加高電壓而 產生熱對流以及擴散現象而影響分離效率等缺點,1974 年 Virtamen 與其研 究團隊首度提出以200~500 μm 內徑的玻璃毛細管和聚四氟乙烯毛細管來進 行區帶電泳(capillary zone electrophoresis, CZE)[13],利用玻璃毛細管因高表 面積-體積比(high surface – volume ratio)而散熱速率良好的特性,成功降低 焦耳熱(Joule heat)所產生的不良影響,並自此開啟了毛細管電泳的應用。

電泳的分離是以電場中各種物質的泳動速度差異為基礎。物質在毛細管中的遷移速度可用以下公式表示:

$$v = \mu_e E \tag{1}$$

v =物質遷移速度(migration velocity)

μ_e=電泳淌度(migration mobility)

E =電場強度(electric field strength)

其中電泳淌度為該物質的特徵常數,代表該物質在電場中遷移的速率,電泳淌度由物質受到的電場力與流過分離環境所引起的摩擦力所決定。而電場力(F_E)與摩擦力(F_F)可分別表示為:

$$F_{E} = qE$$

$$F_{F} = -6\pi\eta rv$$
(2)
(3)

q=離子電量(ion charge)

η=溶液黏度(solution viscosity)

r=離子半徑(ion radius)

v=離子速度(ion velocity)

在電泳的過程中,可以藉由以上兩種力量來達到穩定,此時兩者大小相同、方向相反,故:

 $qE = 6\pi \eta rv$

對速度求解,並代入(1)中,可求得

$$\mu_e = q/(6\pi\eta rv) \tag{4}$$

由(4)得知,带電量大或是受到磨擦力較小的物質具有較高的淌度,反之則較低。

荷電物質除了受到電場力的吸引以外,電泳另外一種驅動力為毛細管中的電渗流(electroosmotic flow, EOF)。電渗流形成的原因主要是因為毛細管內壁表面具有過剩的負電荷,負電荷形成原因是由石英玻璃表面的矽羟基(SiOH)解離成 SiO 或是對其他離子物種的吸附。為了保持電荷平衡,溶液中陽離子會在帶負電荷的內壁表面處聚集形成電雙層(double layer),當施加電場時,這些位於電雙層中的擴散層(diffusion layer)陽離子會朝向負極處移動。由於這些陽離子是溶劑化的,所以他們將會拖著毛細管中的整體溶液往負極處移動,此現象即為所謂的電滲流。所以當毛細管或是晶片上的微流道兩端施加高電壓時,帶正電的離子由於受到負極的吸引,故移動速度最快;帶負電的離子則反之,而中性離子則是與電滲流具有相同的移動速度,依照分析物之間的泳動速度差異,便可彼此分離。毛細管電泳分離機制示意如圖 1-1 所示。

1.3 晶片材質種類與製程

在微晶片電泳發展初期,主要的晶片材質是以矽晶圓(silicon wafer)與玻璃為大宗。選用此兩種材料做為實驗室微縮晶片的原因,是因為矽晶圓與玻璃都具有經強鹼洗滌後,能使微流道內壁表面帶負電的特性,故其電泳情形接近傳統的融熔毛細管(fused-silica capillary)。此外,兩種材質的電泳晶片中的微流道是利用目前技術發展成熟的半導體製程所衍生出的微機電系統技術來製作,故能得到品質與精密度相當良好的微流道電泳晶片。

但是以矽晶圓或是玻璃為材質的晶片仍有下述數項缺點:製程複雜且須於無塵室(clean-room)中進行、耗費大量有機溶劑與蝕刻液、無法連續式大量生產、晶片製作成本高昂等缺點。而近年來,亦有多種高分子材料被用來做為晶片基材。以高分子製成的晶片因為成本較為低廉,故具有可拋棄(disposable)、不需重覆清洗使用之優點。製程包括微鑄模(micromolding)、熱壓印(imprinting and hot embossing)、射出成形(injection)等,製程所需時間較矽晶圓或玻璃晶片來得簡短且具有成本低廉等優點。

1.3.1 高分子晶片製程簡介

現今常見於文獻中,用於微晶片製作的高分子材料有聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate, PMMA)[14,15] 、 聚 二 甲 基 矽 氧 烷 (polydimethylsiloxane, PDMS)[16,17] 、 聚 對 苯二甲酸 乙烯酯 (polyethyl-(ethylterphthalate), PET)[18]、聚碳酸酯(polycrbonate, PC)[18]等。其中又以PMMA 與 PDMS 最為常見,前者為一般的塑膠材料,來源取得容易並適用於常見的塑膠加工模式,而後者屬於軟性的彈性體(elastemer)材料,利用複製鑄模(replica molding)的方式可以輕易地製作出品質良好、具有複雜佈局 (pattern)的微晶片。以下分別簡介 PMMA 與 PDMS 此兩種高分子基材的微晶片製程。

1.3.1.1 PMMA 微晶片製程 - 熱壓印法

熱壓印法(imprinting and hot embossing)多用於 PMMA 微晶片的製作, 其原理是將 PMMA 加熱至玻璃轉換溫度(glass transition temperature, Tg), PMMA 即開始由玻璃區態(glassy region)逐漸轉換至玻璃轉移區態(glass transition region),而 PMMA 基材會開始軟化,此時再施加壓力將模具於 PMMA 基材上壓印出微流道。而模具的種類分為細金屬線[19,20]與矽晶圓 模板[21,22],壓製方式如圖 1-2 所示。

將已壓製出微流道的 PMMA 基材,與另一片表面平整的 PMMA 施予外加壓力使其相貼合,並加熱到玻璃轉換溫度使其接觸面軟化相接合,再予以冷卻,及完成晶片密封的程序,最後再以二氯甲烷或是其他黏著劑將晶片四周以及微流道盡頭密封以防止流體滲漏。此項技術的優點是製作模式簡便,但是相對的缺點則是晶片佈局圖案簡單,無法製作出複雜微流道的晶片設計。

熱壓印法的模具除了上述的細金屬線以外,還有利用表面氧化層已經 顯影蝕刻出微流道佈局的矽晶圓凸模進行壓鑄。其製作與密封模式與上述 以細金屬線為模具的作法大致相同。

由於半導體工業中微顯影、蝕刻技術的成熟發展,使得矽晶圓上的微

流道佈局可以有著各式各樣的變化以及尺寸,相較於細金屬線熱壓印法的十字交叉佈局,則顯得更具有廣泛的應用性,而微流道外型的再現性也較細金屬線熱壓印法為高,但因為矽晶圓凸模的剛性不佳,容易在熱壓完畢後,晶片脫模時損壞,導致於模具的成本較金屬線熱壓印法高出許多。

1.3.1.2 PDMS 微晶片製程 - 複製鑄模

複製鑄模(replica molding)是屬於操作彈性體(elastomer)做為各種應用工具之軟微影技術(soft lithography)的一環[23]。此項技術的優點在於不需要昂貴的微影製程設備,如黃光室、無塵室等,於一般的實驗室環境下即可快速進行微流體晶片之製作。一般來說,此製程所製造的微流體晶片線寬大多在 20 μm 至 100 μm 之間[24-26]。

複製鑄模之製作原理是將具有流體性質的高分子單體與硬化劑(curing agent)混合均勻並除氣(degas)之後,將其倒至表面已經具有微流道佈局的母模之上,待高分子單體硬化完畢之後,將高分子晶片由母模上脫模並與另一片玻璃或是高分子薄板密封後,即完成整個晶片的製程。詳細製程如圖1-3 所示。

PDMS 其單體結構如圖 1-4 所示,是此種複製鑄模技術中最廣泛做為做為晶片材質的高分子。除了本身具有價格便宜、彈性可撓曲(flexible)、光穿透性良好(於 visible/UV 波長範圍)等特色以外,相較於矽晶圓或是玻璃晶片,PDMS 晶片的最大優勢在於製程簡單及快速,通常只需要數十分鐘到兩小時左右的時間便可製出一片微晶片。由於在硬化前具有良好的流動性以及容易脫模的特點,使得各式各樣複雜的微流道晶片[27,28]以及微反應器(microreactor)製程都逐漸出現,甚至三維立體的微流道都能以微機電技術配合 PDMS 複製鑄模的模式製出[29,30]。而本研究將以 PDMS 做為晶片基材並進行製程上的改良。

1.3.2 PDMS 微晶片密封模式

除了追求外型平整與尺寸合適的微流道佈局之外,微流道晶片的密封模式也是製作過程中極為重要的一環,而 PDMS 晶片密封模式主要可分為

可逆式(reversible seal)與不可逆式(irreversible seal)兩種類型。

可逆式密封是先以有機溶劑(如丙酮、異丙醇……等)將脫模後的 PDMS 晶片徹底洗淨之後,直接與另一片平滑的 PDMS 或是玻璃薄片直接貼合 (conformal contact),即完成密封的動作。此種利用凡德瓦爾力(van der Waals force)的密封模式優點在於操作方法簡便以及可重複使用晶片[31,32]。在分離的過程中,一旦微流道產生堵塞等問題時,可以輕易的將密封的晶片分開後清洗,將堵塞問題去除之後,可再度重新貼合密封,進行下一次的電泳分離。但此法缺點是晶片的貼合力只能承受到 5 psi 以下的壓力,過大壓力容易導致於液體滲漏的問題產生[48,49]。

而不可逆密封模式則是將已經脫模完畢、有微流道佈局於其上的PDMS 晶片與另一片 PDMS 或是玻璃片置入氧電漿清洗機(oxygen plasma cleaner)中,將欲貼合的兩面以氧電漿氧化後取出後平貼,此時 PDMS 表面之疏水性質的矽烷基(Si-CH₃)將會被破壞,並形成親水性的 Si-OH 官能基。經氧電漿處理過後,於 PDMS 晶片之接觸面,會生成 O-Si-O 的共價鍵結而產生緊密的貼合力[33-35],故能避免液體滲漏的問題發生。

相較於矽晶圓或玻璃晶片的製作必須在造價昂貴的無塵室中進行,而晶片密封過程也必須處於高溫高壓環境之中,上述 PDMS 晶片的製作與密封只需要在一般環境下即可完成,此項優點也明顯的引起諸多學術研究團隊的興趣,近年來諸多的 PDMS 晶片的文獻發表於臨床分析(clinical assays)[36-40]、酵素/免疫分析(enzyme/immunoassays)[41-43]、環境分析(environmental application)[44-47]的期刊之中,也證實了 PDMS 微晶片電泳的廣泛應用性。

1.4 晶片電泳結合電化學偵測法

由於晶片中的微流道尺寸極小,在偵測器的選擇上必須以高靈敏度且高選擇性的偵測模式為首要考量。此外,由於晶片材質本身的諸多特性,使得常見於毛細管電泳的紫外光/可見光吸收(UV/vis absorbtion)偵測法由於光線的對焦、穿透與吸收光徑較短,而難以應用於晶片電泳之上。常見應用於晶片電泳的偵測法有雷射誘導螢光偵測法(laser-induced fluorescence, LIF)[51,52]、質譜儀偵測法(mass spectroscopy)[53,54]、化學放光偵測法

(chemiluminescence)[55]、電化學法(electrochemical detection)[56,57,59]等方法,早期晶片電泳文獻中的偵測法以雷射誘導螢光偵測法最為常見,但因電化學偵測法儀器體積輕巧、操作模式簡單且無需繁雜耗時的衍生步驟等特點,使得近年來晶片電泳結合電化學偵測法的研究日益蓬勃發展。

1.4.1 三電極系統

目前最常應用於微晶片電泳之電化學系統為三電極系統。三電極系統 (three-electrode system)之電極組成為工作電極(working electrode)、輔助電極 (auxiliary electrode)以及參考電極(reference electrode)。工作電極是分析物發生電化學反應之處,故應依分析物之特性來選擇不同材料做為工作電極。輔助電極則是做為系統之接地端,可與工作電極形成一完整之電流迴路,而材料上的選擇應使用不易發生化學反應的貴金屬或是石墨。由於一般電化學分析之訊號電流極小,故分析時的外加電位必須極為精準以避免誤差過大,而參考電極內部具有銀/氯化銀之氧化還原對(redox couple),可緩衝電位的變化,以提供一穩定的標準電位,做為儀器電位輸出的參考。三電極系統與微晶片的結合方式由圖 1-5 所示。而目前常用於晶片電泳的電化學分析方法說明如下。

1.4.2 循環伏安法

使用循環伏安法(cyclic voltammetry, CV)之目的為得知工作電極於緩衝溶液中是否具有催化分析物的能力,可視為晶片電泳的前置步驟。在進行循環伏安法時,工作電極上的電位會以線性的方式掃描至另一電位後,而再掃描回原電位,故以循環稱之。電壓掃描示意圖由圖 1-6 所示。而當工作電極上電壓以線性方式改變時,若分析物能於電極表面處被催化產生電流,則工作電極會接收到一與背景電流值有所差異的催化電流,若此時電位為正電位,此催化電流稱為氧化電流(andoic current),反之,若是於負電位測得催化電流,稱之為還原電流(cathodic current)。典型的循環伏安法圖譜由圖 1-7 所示。

1.4.3 流體動力伏安法

在進行微晶片電泳時,由於工作電極會受到分離電場的影響,故由循環伏安法所選定的偵測電位可能會產生飄移的現象[56],因而目前大部分電化學晶片電泳的文獻中,大多是以流體動力伏安法(hydrodynamic voltammetry, HDV)做為更準確的前置步驟。其作法是將分析物以重複注射的方式進樣,然後於每一次電泳分離時更換不同偵測電位,而依照不同的偵測電位,分析物會呈現不同的催化電流值,再由催化電流值大小與電極壽命長短來決定最佳的偵測電位。由於工作電極偵測電位是在流體流動的情形下選定,故以流體動力稱之[57]。

一般來說,流體動力伏安法的圖譜會呈現高原型(plateau)的曲線,如圖 1-8 所示,隨著催化電位的上昇,分析物訊號值也會跟著提升,但是訊號值 上升趨勢會於某電位之後趨於平緩,而為了電極壽命的考量,通常我們即 會選擇此電位做為安培法的偵測電位,以避免過大催化電位使得電極表面 生成鈍化的氧化膜,而影響訊號的再現性。

1.4.4 安培法

安培法(amperometry, i-t curve)是目前最廣為應用於晶片電泳的一種電化學偵測法,其原理是施加一固定電位於工作電極之上,此固定電位的選取是利用循環伏安法或是流體動力伏安法來決定。一旦分析物流經電極表面產生催化電流後,便可由偵測器運算軟體轉換成訊號,所得圖譜為一電流與時間的函數圖,亦稱為i-t curve。依照法拉第定律(Faraday's law)可知:

$$i_{t} = \frac{dQ}{dt} = nF\frac{dN}{dt}$$
 (5)

i_t:於時間t下,於電極表面上生成的電流值

Q:於電極表面上形成的電荷量

t:時間

n:每莫耳分析物所能傳送的電子莫耳數

F: 法拉第常數(96485 C/mol)

N:被催化的分析物莫耳數

訊號大小與在電極上被催化的分析物濃度成正比[58]。最早將安培法應用於晶片電泳之上的文獻是 Woolley 與其研究團隊在1998年所發表[59],文獻中以濺鍍(sputtering deposition)的方式製作白金薄膜工作電極於流道出口處,針對三種神經傳導物質進行分離、偵測,並且於100秒之內的時間可以將三種分析物多巴胺(dopamine)、腎上腺素(epinephrine) 以及兒茶酚(catechol)完全分離,偵測極限分別為3.7 μM、6.5 μM以及12 μM。

1.4.5 工作電極擺設方式

晶片電泳結合電化學分析法除了微流道晶片本身的設計即為一大議題以外,如何對工作電極進行絕緣(isolation)的動作也是重要考量之一。在進行電泳分離時,做為電滲流驅動力的分離電場會對工作電極造成干擾,產生基線不穩、雜訊提高等不良影響,甚至於可能出現過大分離電流流入工作電極中而造成偵測器的損傷。

為了降低分離電壓的干擾,主要有兩種作法,分別為:直接降低分離電流,以及阻斷器(decoupler)的使用,故工作電極的擺設方式也因此分為兩大類,一是直接降低分離電流方式的管柱末偵測法(end-column(channel)), 二是使用阻斷器的管柱內偵測法(in-column(channel)),擺設方式如圖 1-9 所示。並針對此二法分別簡述如下。

1.4.5.1 管柱末擺設方式

為了達到理想的分離效果,毛細管電泳的分離電場多在 200 V/cm 以上,而相對應的分離電流值大多在µA 等級,但是工作電極上分析物的催化電流卻只有 pA ~ nA 等級,若不將分離電流降至與催化電流接近的等級,則會對訊號造成嚴重的干擾。此外,工作電極是接到運算放大器的虛擬接地端(virtual ground),若過大的分離電流流經工作電極而接地,便會造成值

測器中定電位器(potentiostat)的損傷[60]。

為了降低分離電流,使用較小內徑的毛細管是最直接的方式。由於溶液在毛細管中的電阻值與管徑平方成反比,所以管柱越細,分離電流就越小。在1991年,Zare 與其研究團隊首度將內徑只有5 µm 的毛細管結合安培法偵測[61],在分離電場達333 V/cm 之下,將分離電流降至1~15 nA,遠低於毛細管電泳常見的分離電流值。在將分離電流的影響降至可接受程度後,便能順利將工作電極放置於毛細管末端處,直接對數種神經傳導物質(neurotransmitter)以及酯類進行安培法及電導度法偵測。

雖然管柱末偵測方式操作方式簡便,無須另外設計阻斷器來將工作電極絕緣,但是如何將工作電極對準或是伸入內徑極為細小的毛細管末端,也是一大難題。1995年,Hung 與其研究團隊提出以壓克力製成的微調器 (micropositioner),能夠利用微調器上的螺紋溝槽來固定白金工作電極的位置與進入毛細管的距離,以提高訊號的再現性[62]。同樣的概念也由 Chen 與其研究團隊提出並應用於晶片電泳之上[63],文獻中是以三維微調器 (3-dimensional adjustor)來調整工作電極於晶片微流道末端的位置,並能精確研究工作電極與流道末端距離對分析效率的影響。此外,也有以濺鍍(sputter disposition)方式在毛細管末端鍍上一層金屬薄膜做為工作電極的作法,以避免電極對準所帶來的問題[64,65]。

1.4.5.2 管柱內擺設方式

管柱末擺設方式容易使分析物在離開毛細管後產生擴散現象而造成訊號波峰拖尾的情形,為了避免此缺點,也有研究團隊使用阻斷器將分離電流導出毛細管而降低對工作電極的干擾,並將工作電極位置由流道末端移入流道之中,以避免擴散現象產生[66-69]。首度成功將阻斷器與毛細管電泳結合的文獻於 1987 年,由 Ewing 與其研究團隊所提出[70]。文獻中將毛細管分為兩個區段,第一區段為分離用毛細管,而第二區段則是電化學偵測區段,整體結構如圖 1-10 所示。第一區段與第二區段中間是浸泡在緩衝溶液中的孔洞性玻璃接縫(porous glass joint),也就是所謂的阻斷器。阻斷器的微小孔隙只允許電解質離子的進出,而較大的分析物分子只能於毛細管中流動,無法通過阻斷器進入到緩衝溶液池(buffer reservoir)中。當施加分離

電壓後,分離電流會經由此阻斷器流出第一區段的毛細管而進入緩衝溶液 池中接地,而使得第二區段的毛細管中處於絕緣狀態。此外,第一區段毛 細管中的溶液與分析物流經阻斷器後,雖無電滲流的推動,但因連續流體 的原則,仍會以拋物線流方式流經第二區段的電化學偵測區,而被配置於 流道內的工作電極所偵測。

雖然阻斷器的使用能有效降低分離電流的干擾,但是以孔洞性玻璃接 縫做為阻斷器仍是件製程繁複的工作,而近年來,逐漸出現利用蒸鍍 (evaporation)技術與微影蝕刻(photolithography)技術製出的薄膜型阻斷器 (thin-film decoupler)[71,72],其製程不僅精確,應用性也更為廣泛,相較於 孔洞性玻璃接縫較難與晶片電泳結合的情形,薄膜型阻斷器更適合於晶片 電泳的絕緣用途。薄膜型阻斷器與晶片電泳結合示意圖如圖 1-11 所示。

此外,目前亦有少數以直徑在數百微米範圍之細金屬線做為阻斷器之 文獻發表[73-75]。此種阻斷器之成本較蒸鍍或是微影蝕刻便宜許多,若能 準確控制阻斷器與流道接觸之面積,此法可節省許多阻斷器之製作時間, 並能達到與薄膜型阻斷器一樣良好之絕緣效果。

綜合上述優點,本實驗亦採用管柱內之電極擺設方式,並採用直徑為500 µm之白金線做為簡易式阻斷器。此一結合簡易式阻斷器之電化學微晶片不僅製程更為簡便,於晶片效能測試中也有相當良好之表現,並能進一步應用於市售飲料之成分檢測。

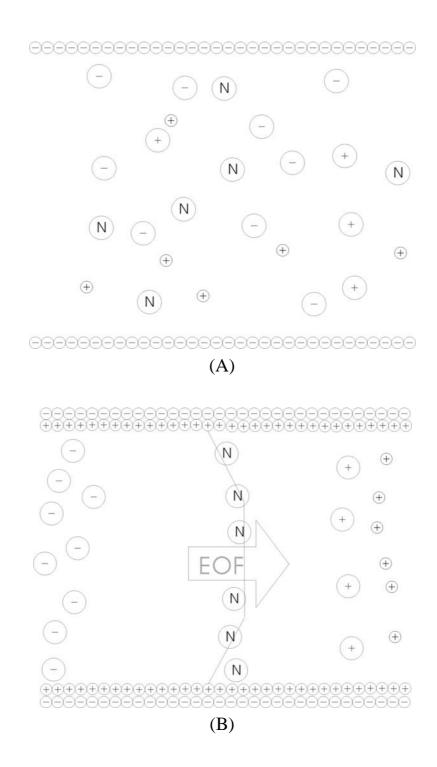


圖 1-1、毛細管電泳分離機制示意圖:(A)毛細管兩端未施加電場時,離子呈現混合分佈之情形;(B)施加電場之後,形成電滲流影響離子分佈情形。

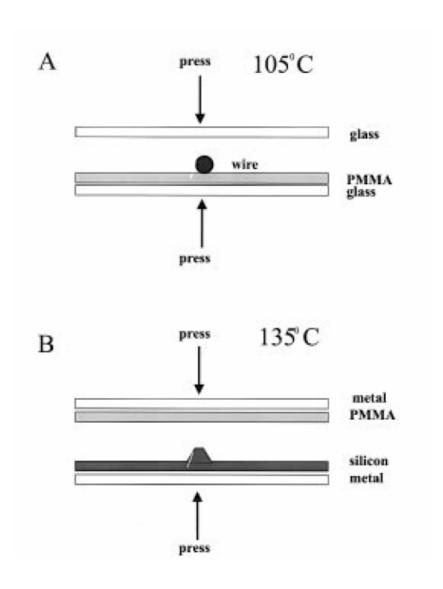


圖 1-2、熱壓印法之示意圖。(A)細金屬線為模具;(B)矽晶圓模版為模具。 [119]

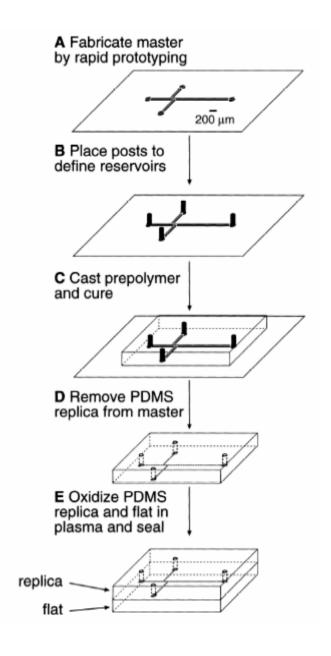


圖1-3、PDMS微晶片複製鑄模製程示意圖。[25]

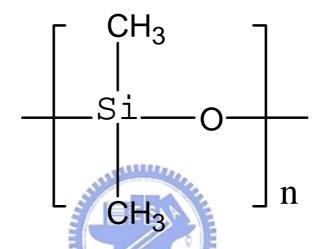


圖 1-4、聚二甲基矽氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)之單體分子結構。

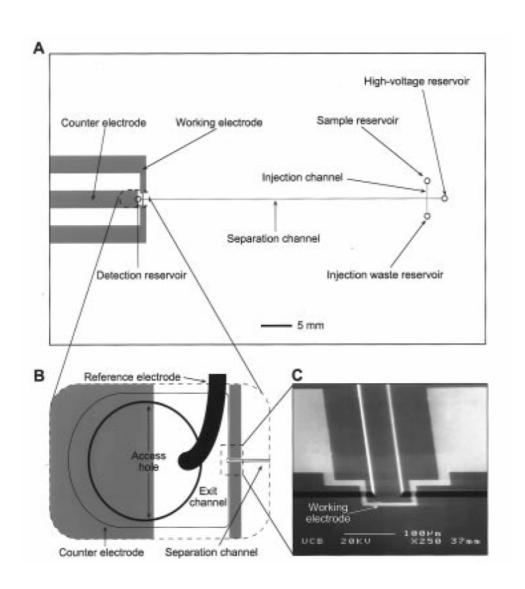


圖 1-5、三電極系統與微晶片結合之示意圖。(A)電化學微晶片全區域圖;(B) 電化學偵測區域圖;(C)流道出口之工作電極位置之電子顯微鏡圖[59]。

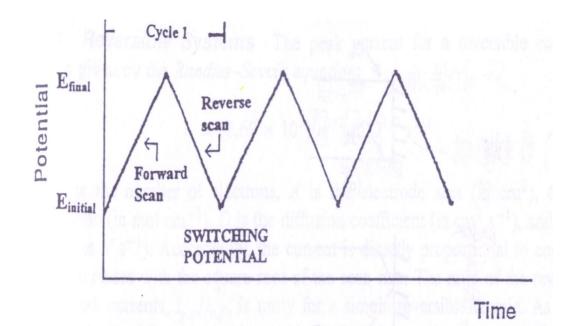


圖 1-6、循環伏安法之電壓線性掃描方式示意圖。[76]

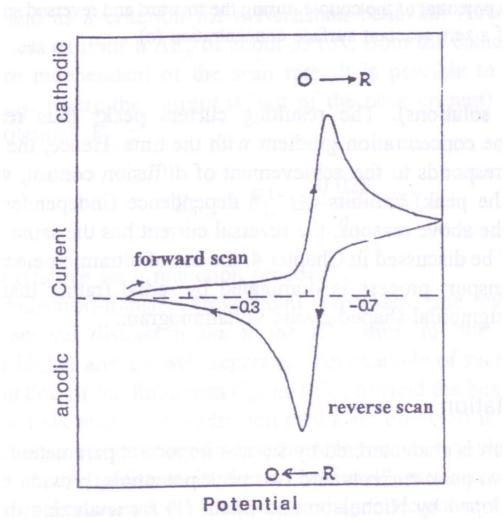


圖 1-7、典型可逆氧化還原反應之循環伏安法示意圖。[76]

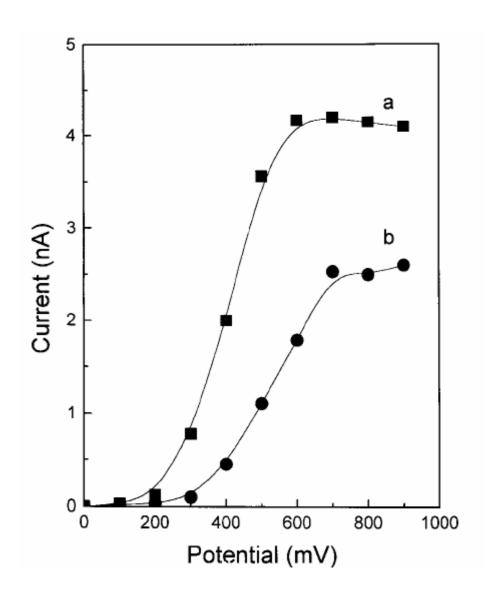


圖 1-8、典型流體動力伏安法圖譜。(a)多巴胺(b)兒茶酚濃度各為 50 μM [57]。

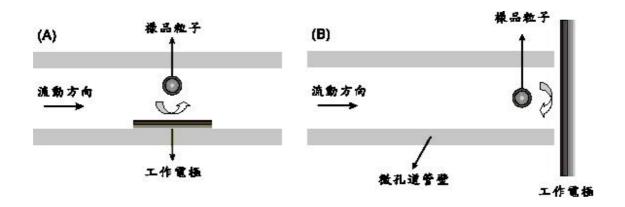


圖 1-9、兩種工作電極之擺設方式。(A)管柱內(B)管柱末[50]

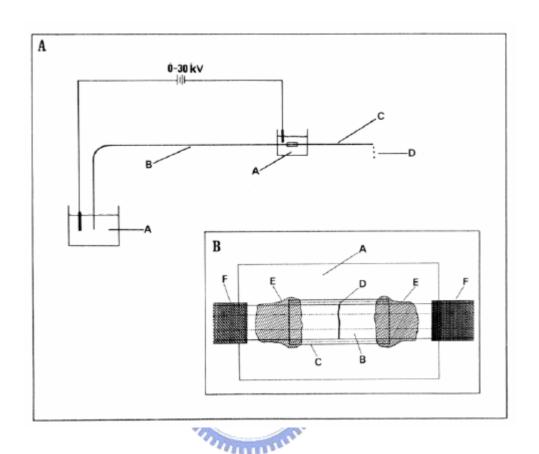


圖 1-10、孔洞性玻璃接縫阻斷器示意圖。(A)毛細管電泳裝置整體示意圖。A:緩衝溶液池;B:第一區段之分離用毛細管;C:第二區段之偵測用毛細管;D工作電極偵測區域。(B)阻斷器區域放大圖。A:載玻片;B:除去聚丙醯胺塗覆之毛細管:C:孔洞性毛細管;D:接縫;E:環氧樹脂;F:塗覆有聚丙醯胺塗覆之毛細管[70]。

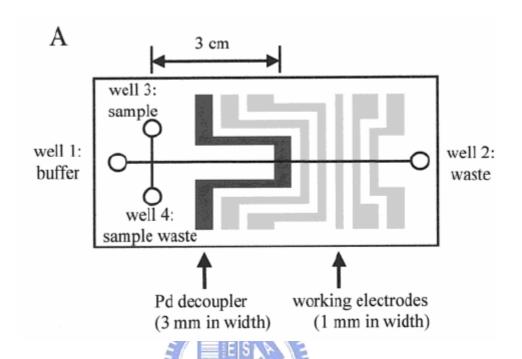


圖 1-11、薄膜型阻斷器微晶片之示意圖。[69]