

2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 160023
參展科別 物理與天文學
作品名稱 奈米濃縮晶片運用於人體體液濃縮之研究
得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 簡麗賢、沈弘俊

作者姓名 趙中綺、陳恩庭

關鍵字 預濃縮晶片、微奈米流道、人體體液

作者簡介



我們是恩庭與中綺，非常感謝學校的專研課程，讓我們可以在高中階段參與科學研究，並使用大學端的儀器操作，是個全新又充實的體驗。儘管碰到許多挫折，但克服失敗的喜悅以及研究時發生的大小趣事，都是我們前進的動力。感謝實驗夥伴，也感謝教授、師長、學長，以及父母。這次參與科展的經驗，相信會是很精采的回憶。

摘要

本實驗探討低濃度離子的檢測方法，實驗利用微奈米流道濃縮晶片，將樣本進行濃縮。由於奈米離子選擇性流道對於液體離子導電度，即離子價性有所限制，因此，我們首先測試人體體液的可濃縮性。

我們採用的樣本為血清、尿液、唾液及汗液，研究主軸是將螢光分子加入樣本內，做為濃縮的指示劑，並測試該檢體溶液是否能夠濃縮。藉由濃縮提高待測溶液的濃度，使得在少量檢體、稀薄濃度的狀況下，也可量測樣品內的物質濃度。在檢測方面，我們以具有奈米結構的表面電漿共振技術(Surface Plasmon Resonance, SPR)作為檢測平台。奈米結構表面會因吸附物質的改變，導致表面折射率改變，使得吸收光譜產生位移。因此日後可以依照光譜圖的位移量，推估檢體溶液的離子濃度，期盼此技術能運用於生醫晶片及簡易攜帶型生醫檢測器(Bio-sensor)上。

Abstract

In this research, we demonstrated a new method to detect ultra-low concentration ions. By using the microchannel-based nanofluidic preconcentrator chip and adjusting the concentration of the samples, we conducted our detection experiment. The nano ion selective channel has a limit toward the conductivity of the ions (the valence of the ions), so we tested the feasibility of the body fluid concentration. The test samples we used are serum, urine, saliva and perspiration. In order to validate the preconcentration of body fluid, we first used fluorescent particles as an indicator of the concentration experiment. And then we tested whether the four kinds of body fluid we used can be concentrated and observe the condition and the status of when the concentration achieved. By enriching the concentration of body fluid samples, we can measure the substances in our samples even with a small amount of our bulk solution or when they are in the condition of dilute solution. Experimental results showed that many kind of body fluid can be concentrated in certain condition by using our device. For sensing the ion in the body fluid, the metallic nano-slit based surface plasmon resonance (SPR) technology has been used. By modifying ion-attractive membrane on nano-slit, the resonant wavelength of the nano-slit become sensitive to ion concentration variation. The refractive index of the nanostructure at surface will change because of the different numbers of ions absorption on it so that the resonant spectrum shifted to the red end of it. According to the redshift of the resonant spectrum, we will be able to determine the concentration of our samples. In conclusion, the method can be used to measure the concentration of the heavy metal ions that are commonly seen in human body fluid. This method is potential for further biochip application and integrating into portable device.

壹、前言

一、 研究動機

人體內各類金屬離子，調節與主導人體各項重要機能，並存在一個適當的濃度，濃度過高或過低皆可能導致其所主導的功能失調，嚴重情況下甚至會導致昏迷、呼吸中止等情況。藉由研究人體各種體液的離子濃度，可以有效監控人類的健康情形。

人體各式體液所含的各種離子濃度不一，低離子濃度的體液不容易被現行的離子感測器快速檢測出，因此，透過濃縮機制將體液內的離子濃縮，是一種可能加速檢測流程的方法。

微流道晶片提供一個可以僅用小樣本，且快速反應的腔體環境，先前研究顯示，奈米離子選擇性通道用於濃縮技術，可以將蛋白質和離子溶液濃度提升一萬倍以上甚至於百萬倍，但目前在生醫領域上的應用，還停留於普通緩衝溶液濃縮機制的研究。因此我們想探討這個技術是否真能運用於人體生醫技術方面，亦即使用於人體體液內金屬離子濃縮和相關檢測。

二、 研究目的

為了將人體體液普遍運用於生醫檢測方面，使少量的低離子濃度檢體，可作為簡易分析之樣本。研究中，我們使用兩種螢光標記，分別添加於四種常見人體體液（包含血清、尿液、唾液、汗液），進行預濃縮實驗。

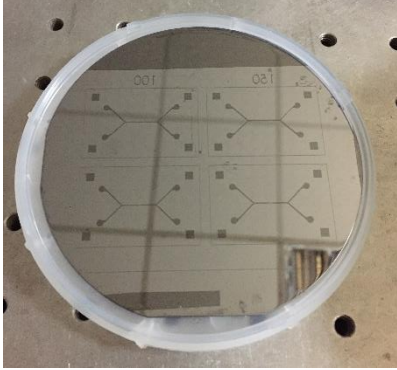

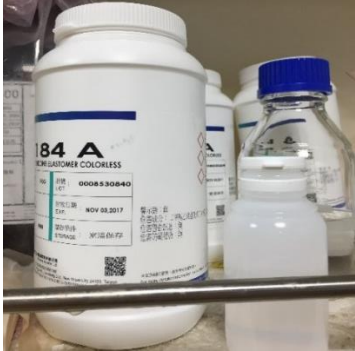

觀察歸納各體液濃縮的可行性與程度後，我們先使用可與微流道整合的奈米結構型穿透式表面電漿共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)量測檢體溶液在不同濃度下的共振光譜。不同的離子濃度溶液會造成金屬結構層表面的折射率改變，導致金屬結構表面電漿共振波長改變。因此可以透過光譜儀量測共振波長的改變，反推離子濃度的改變。

- (一) 觀察四種人體體液在微奈米流道中，受離子選擇性通道濃縮的行為
- (二) 了解人體的不同體液，加入螢光標記時的濃縮狀態及濃縮條件
- (三) 利用表面電漿共振技術，對人體體液進行光譜分析，作為推估所含微量離子濃度的方法

貳、研究方法與過程

一、 研究設備及材料

(一) 微流道晶片製作器材

<p>矽晶圓模板</p> 	<p>奈米孔洞薄膜 (Nafion)</p> 
<p>聚二甲基矽氧烷 (PDMS)</p> 	<p>氧電漿機</p> 

(二) 濃縮及 SPR 檢測器材

<p>磷酸鹽緩衝測試溶液 (PBS + 去離子水, 比例 1:9)</p> 	<p>人體體液 (血清、尿液、唾液及汗液)</p> 
---	--

0.45 μm 及 0.25 μm 濾紙



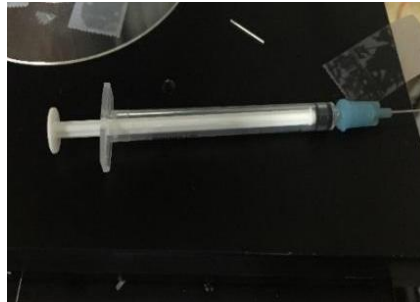
鈣黃綠素(螢光分子)



螢光筆 (一般螢光粒子)



針筒



凱索尼酸(Chitosonic Acid)



移液器



倒立式光學顯微鏡



燈源 (汞燈、日光燈)



電源供應器



注射幫浦



試管震盪器



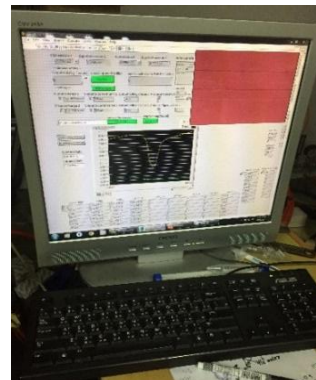
光譜儀



高速數位攝影機 CCD



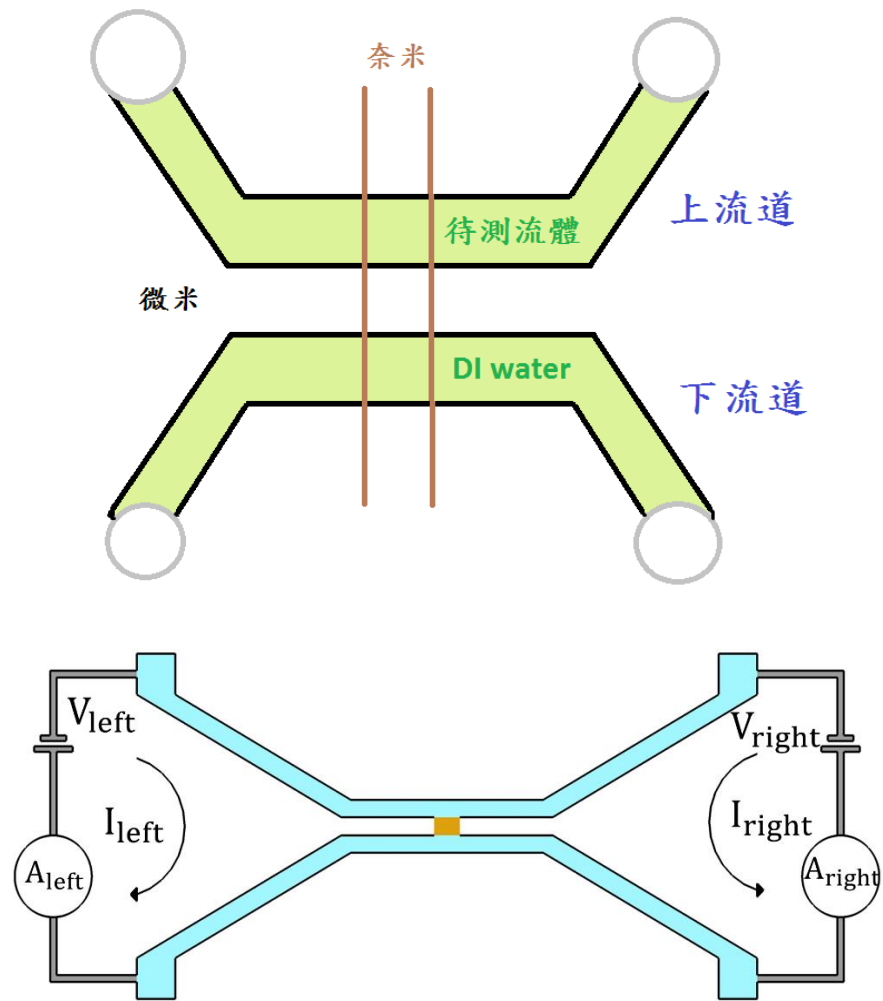
電腦



二、 研究原理

(一) 微流道濃縮

我們使用的微流道晶片，分為上下兩條微米流道，兩條流道間為奈米多孔性材料 Nafion (此處作為離子選擇性薄膜)，上流道通入待濃縮液體，下流道通入去離子水。如圖一所示。



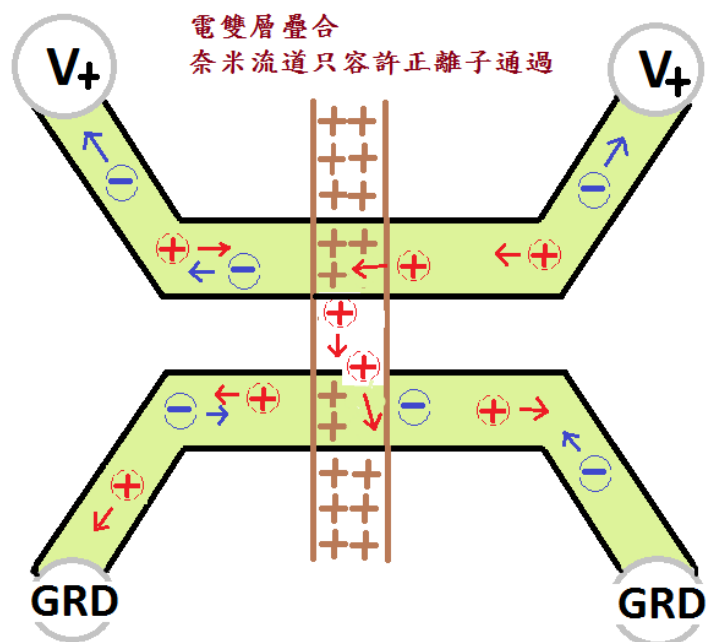
圖一 微奈米流道示意圖。

上流道為待測液體，下流道為去離子水。

在流道內壁帶有電荷的情形下，則會吸附流體內的離子產生電雙層。以玻璃和 PDMS 為例：其材料表面帶有 OH 官能基，因此會吸引液體內的正電荷離子到材料表面。而電雙層厚度與液體導電有關，液體導電度越高，電雙層厚度越薄，電雙層結構越扎實。當上流道的兩側施加電壓，並將下流道液體的電極接地時，形成兩個迴圈電路，在微米尺度的微流道內電雙層受到電流影響，會開始移動並拖曳流體，此時所形成的流體運動稱為電滲透流 (electroosmosis flow)。

當流道直徑縮小至奈米尺寸時，在奈米流道內會產生兩側電雙層重疊的效果，導致奈米流道內只充滿了單一的電性離子。以細胞培養使用的一倍磷酸鹽緩衝溶液為例，其在流道內壁所產生的電雙層厚度約為 5nm。在此實驗我們根

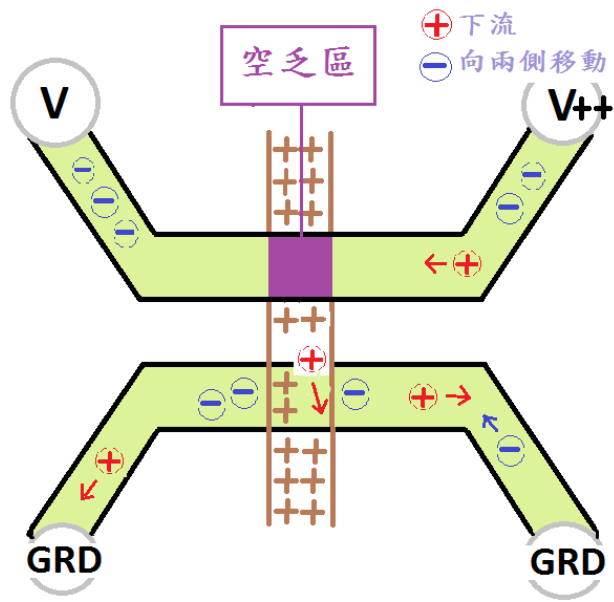
據文獻以奈米孔洞材料 (Nafion) 做為奈米流道，其孔洞佈滿負電荷，因此會吸引正電荷離子形成電雙層，並充滿奈米孔洞材料。在上流道施加電壓，並將下流道接地的時候，電流流動會造成正負離子的移動方向如圖二所示。



圖二 微流道示意圖。

上流道施加電壓，下流道接地，電流流動會影響正負離子的移動方向。

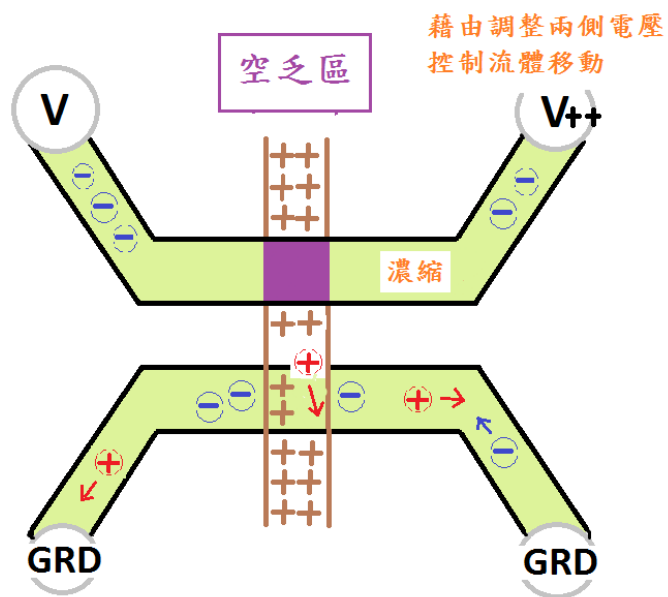
依據流體的連續性，流速與截面積成反比，故離子在微米流道與奈米流道中，會因為流道截面積的不同，而有不同的流速。在奈米流道中，離子會高速通過，且遠大於微米流道中的移動速度。這兩者的速度差，造成上微流道中會產生離子空乏區 (ion depletion region)，如圖三所示。在空乏區中，離子只能以擴散方式到達奈米流道。在離子快速通過奈米流道，進入下微流道並大幅減速的情況下，離子會全部累積在下微流道中。



圖三 微流道示意圖。

微米與奈米流道中流體的速度差，造成上微流道會產生離子空乏區。

除了在空乏區中，正離子會緩慢擴散通過外，負離子和大部分的正離子，及其他尺寸較大的物質，會被電滲透流攜帶至空乏區附近，但無法穿越而累積於空乏區外側，如圖四所示。



圖四 微流道示意圖。

待濃縮物質被電滲透流攜帶至空乏區外側累積。

(二) 奈米結構穿透式 SPR 檢測

在 SPR 檢測實驗中所使用的晶片，分為兩層結構，第一層為塑膠片，其表面利用矽晶圓模板，做出奈米狹縫的結構，也就是光柵；第二層則是在奈米狹縫表面鍍上一層金，做為檢測時的金屬薄膜。

實驗時，使用全波段之光束，照射在置有待測溶液的晶片結構上，因為奈米結構金屬薄膜會在特定波長產生表面電漿共振的關係，該波段會有光強度上的增強。表面電漿共振發生的波長為光柵週期乘上表面的折射率。依照檢體溶液不同的濃度，折射率會有些微的變化，運用光譜儀接收折射率變化的訊號，再將之轉換到電腦裡，分析吸收光譜的位移，作為判斷濃度與濃縮程度的依據。

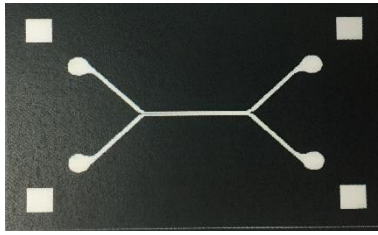
三、 研究步驟

(一) 晶片製作

1. 以 10：1 比例均勻混合 A 液（矽膠本液）和 B 液（固化劑）。
2. 將混合液體倒入微流道晶片模板，並於烘烤凝固後脫模裁切(PDMS)。
3. 在玻片定型奈米孔洞材料(Nafion)，並待溶劑揮發後留下固體 Nafion 薄膜。
4. 利用氧電漿機將 PDMS 與玻片結合。

(二) 濃縮實驗

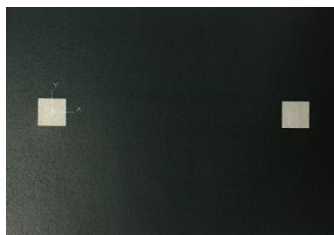
1. (1) 一般螢光粒子：將待測體液依選定濃度，與添加一般螢光粒子之磷酸鹽溶液混合，作為檢體溶液。
(2) 鈣黃綠素：在依比例完成調配的體液中，加入濃度為 10%之鈣黃綠素溶液（體液：濃度為 10%之鈣黃綠素溶液=10：1），作為檢體溶液。
2. 將去離子水通入下流道，檢體溶液通入上流道。
3. 配合電流圖與粒子流向，調整電壓，使奈米流道旁產生空乏區。
4. 濃縮現象發生於空乏區外側。
5. 在使用一般螢光粒子作為標記的實驗中，若檢體溶液可於低濃度達成濃縮現象，則繼續提高濃度進行實驗。



圖五 微流道晶片示意圖。

(三) SPR 檢測

1. 使用凱索尼酸 (Chitosonic Acid) 修飾奈米狹縫結構，靜置 1 小時，文獻表示其可以自動吸附銅二價和銀一價離子。
2. 依不同濃度將體液與磷酸鹽溶液混合，配製檢體溶液。
3. 修飾完成後，以去離子水滴洗結構，再將檢體溶液滴於奈米狹縫結構上，靜置 1 小時。
4. 開啟 SPR 顯微鏡、光譜儀及光譜分析程式 BWSpec4，量測背景值做為光譜儀校正。
5. 將滴有檢體溶液的晶片置於載物台上，並調整晶片使光線通過奈米狹縫結構。
6. 量測各濃度檢體溶液的光譜。
7. 比對不同濃度檢體溶液之光譜，分析其紅移的現象。



圖六 表面電漿共振晶片示意圖。

參、研究結果與討論

一、標準濃縮現象

我們將螢光分子磷酸鹽溶液（PBS：去離子水=1：9）的濃縮情形，定義為標準濃縮現象。濃縮現象的發生，起始於奈米流道兩側空乏區的生成，這種情形通常出現於電流驟降、流體流向忽然改變的時候。首先會觀察到管壁附近產生渦流，逐漸擴大後截斷流體，改變其方向，濃縮區域發生於空乏區外側。

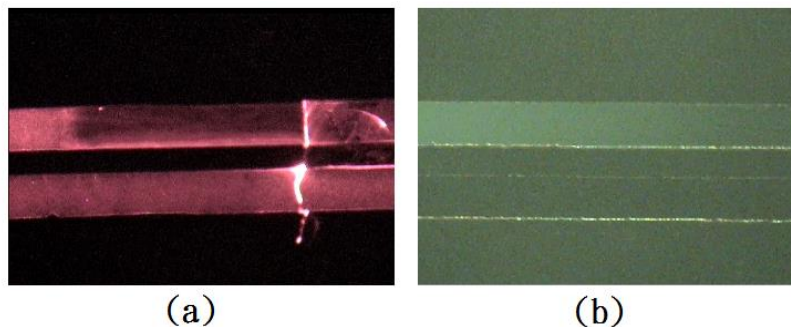
依據實驗所使用的螢光標記，我們將濃縮實驗分為兩個部分：

（一）一般螢光粒子

使用一般螢光粒子時，我們可以清楚觀察到流體中各粒子的移動情形（包含速度及方向），而利用空乏區的產生及流體中粒子的聚集，可作為判斷是否濃縮的依據。另外，這種以一般螢光粒子標記的方式，也利於觀測管壁附近渦流的生成。濃縮情形如圖七-(a)。

（二）鈣黃綠素（螢光分子）

使用鈣黃綠素時，流體中各粒子的運動模式較不明顯，且不易觀察，因此我們是以整體溶液於特定區塊濃度的提升，作為是否濃縮的主要判斷依據。另外，在此部分的實驗中，剛開始通入低電壓時，螢光分子即會有往兩極移動的趨勢產生，我們推測可能原因為：螢光分子較一般螢光粒子容易受電壓影響，初始狀態的電滲流來不及與空乏區的生長抗衡所致。濃縮情形如圖七-(b)。



圖七 標準濃縮情形。

圖(a)為使用一般螢光粒子標記，圖(b)為使用鈣黃綠素標記。

二、 四種體液添加一般螢光粒子時不同濃度之濃縮情形

我們使用的一般螢光粒子，來自於市面上隨手可得的螢光筆，以其螢光水加入檢體溶液中，作為螢光標記，也達成簡易方便的檢測效果。由於此類粒子顆粒較大，因此利於觀察流道內流體的流動與濃縮現象。但是因為其螢光粒子大小差異性大，並不適合做為定量分析，但可做為定性分析工具。

根據實驗，一般螢光粒子在此微奈米濃縮晶片的特色是，當驅動電滲流的電壓過高，奈米粒子與流體被電滲流拖至空乏區附近而遠離電極的時候，疑似因為電滲流的驅動力變弱，導致被推至流道中央的奈米粒子會有回流現象，形成一個類似渦流的循環現象。我們推估，因為流道中間電滲流效應最弱，因此無法抵擋電泳力的吸引而導致粒子回流。

(一) 血清

檢體溶液—血清混入螢光分子磷酸鹽溶液比例分別為 10：1、20：1

血清的黏度較大，空乏區出現所費時間長，且左右兩側電壓差距大，然而濃縮現象並不穩定，高濃度區域在不更改電壓的情況下往復運動，這種現象前所未見，濃縮情形如圖八-(a)。我們推測造成血清這種濃縮現象的可能原因有二，一是黏度，二是其中含有的尺寸較大之蛋白質。

關於黏度的因素，溶液的黏度過大可能會對管壁附近的電滲流產生影響，讓電滲流難以帶動溶液前進，甚至無法生成，因此兩邊電壓需要達到一定的差距才能發生濃縮。我們推想往復運動的發生與黏度造成的阻力有關，所以管壁上發生的電滲流只能在短時間內帶動溶液，當其無法發揮作用時，溶液即流回原本位置。

(二) 尿液

檢體溶液—尿液混入螢光分子磷酸鹽溶液比例分別為 10：1、2：1、1：1、2：3

由於尿液內含許多雜質與大顆粒，是所有樣本中螢光粒子沾黏管壁最嚴重的一組，因此使用前需要過濾，且使用的濾紙為比平常(0.45 μm)更小的 0.25 μm 。

尿液濃縮時，會產生和血清相似的往復運動，因此可以思考是否為兩者相同的成分造成了這樣的結果。

1. 檢體溶液：磷酸鹽緩衝測試溶液 = 10 : 1

未達成成功濃縮，亦無空乏區生成

2. 檢體溶液：磷酸鹽緩衝測試溶液 = 2 : 1

未達成成功濃縮，亦無空乏區生成

3. 檢體溶液：磷酸鹽緩衝測試溶液 = 1 : 1

粒子出現劇烈的渦漩及明顯的空乏區，但液體流向與狀態不穩定，聚集的粒子在形成較大的濃縮區域前便會消散。濃縮情形如圖八-(b)。

4. 檢體溶液：磷酸鹽緩衝測試溶液 = 2 : 3

可以觀察到空乏區在奈米流道邊界生成的情形，產生渦漩時，空乏區外側之粒子會緩慢朝奈米流道方向移動，將粒子壓縮固定於空乏區邊界的區域，達成濃縮的目的。濃縮情形如圖八-(c)。

(三) 唾液

檢體溶液—唾液混入螢光分子磷酸鹽溶液比例分別為 10 : 1、20 : 1、2 : 1

唾液於 10 : 1 時，便出現近似標準濃縮的現象，因此我們嘗試更高濃度的 20 : 1，觀察是否亦能成功濃縮，以追求更接近人體體液原始的樣本狀態。另外我們也進行 2 : 1 的實驗組，與其他檢體比較。

我們原先預期唾液會因黏度過大、雜質過多，影響濃縮結果，但實驗後發現其為典型濃縮。首先，不論成功與否，檢體溶液在電流仍為 10^8 A 時，便會產生明顯的空乏區或渦漩，(大部分的實驗樣本會在 10^6 A 至 10^7 A 的區間產生)，進而發生濃縮。在我們幾次成功濃縮的實驗中，流道內的液體，皆是先產生一至數次

流動方向的改變，以及電流的大幅度變動，之後便出現明顯的濃縮區域，且濃縮情形與去離子水相像，所需電壓也不會太高。

1. 檢體溶液：磷酸鹽緩衝測試溶液 = 10 : 1

濃縮即將發生時，流至奈米流道邊界的液體流速會顯著減慢，可以觀察到空乏區生成並切斷流體的過程。濃縮區域明顯，經由電壓微調可改變其濃縮區塊的形狀與位置。濃縮區域內液體流向分為兩種，靠近管壁的流體背離濃縮中心移動，流道中央則反之。濃縮情形如圖八-(d)。

2. 檢體溶液：磷酸鹽緩衝測試溶液 = 20 : 1

濃縮狀況與 10:1 的實驗組類似，範圍廣。濃縮情形如圖八-(e)。

3. 檢體溶液：磷酸鹽緩衝測試溶液 = 2 : 1

流體多次改變流動方向，造成這個現象的可能原因，可思考施加電壓高低對濃縮現象的影響與關係。濃縮區塊內液體流向也分為兩種，並形成持續性的濃縮區域，空乏區明顯，濃縮區塊大且穩定持久，渦旋的流動方向也較其他檢體及比例有序。濃縮情形如圖八-(f)。

(四) 汗液

檢體溶液—汗液混入螢光分子磷酸鹽溶液比例分別為 10 : 1、4 : 1、3 : 1、2 : 1、1 : 1

汗液本體溶液之粒子與螢光分子結合後，相較其他樣本大得多，因此在實驗前我們會利用 $0.45\ \mu\text{m}$ 的濾紙先行過濾，去除顆粒大的雜質，減少大粒子對實驗的影響。汗液濃縮進行時，兩側的電壓差距較小，而電壓值則較標準濃縮高。在低濃度下，濃縮情況與標準濃縮十分相近，空乏區在奈米流道外側出現，且濃縮區域維持時間較長。

1. 檢體溶液：磷酸鹽緩衝測試溶液 = 10 : 1

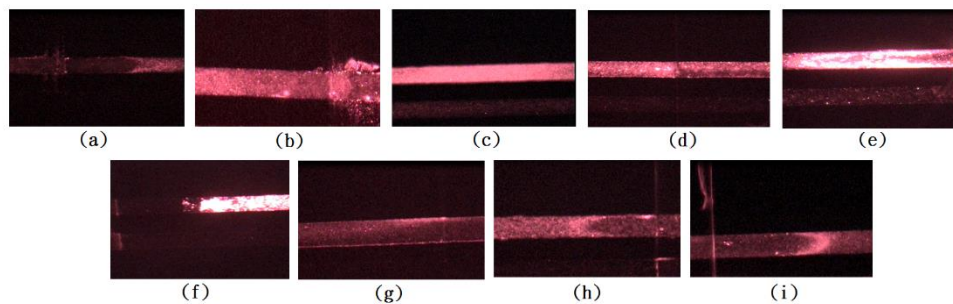
此比例的濃縮現象僅發生於管壁上，為非標準濃縮，兩側的電壓值高但差距不大，此濃縮區域並非穩定，而為容易消散。濃縮情形如圖八-(g)。

2. 檢體溶液：磷酸鹽緩衝測試溶液 = 2 : 1

此比例的濃縮現象，類似標準濃縮，但濃縮電壓的差距較 10 : 1 之實驗組大，可以看見濃縮區域的濃度顯著提升，且濃縮區域形成後不易消散，能夠維持於高濃度狀態。濃縮情形如圖八-(h)。

3. 檢體溶液：磷酸鹽緩衝測試溶液 = 1 : 1

此比例之濃縮現象，類似標準濃縮，可觀察到濃縮區域的濃度顯著提升，且濃縮區域不易消散，高濃度區域能夠維持一段時間。濃縮情形如圖八-(i)。



圖八 四種體液添加一般螢光粒子時的濃縮情形。

圖(a)為血清溶液，圖(b)(c)為尿液溶液，

圖(d)(e)(f)為唾液溶液，圖(g)(h)(i)為汗液溶液。

三、 四種體液添加鈣黃綠素時不同濃度之濃縮情形

鈣黃綠素（螢光分子）

鈣黃綠素的螢光標記物較先前實驗使用的一般螢光粒子小，而接近體液中各種離子的大小，因此能夠有效代表檢體溶液中離子的真實運動情形，得知其濃縮狀況。另外，普遍而言，此螢光標記所配製的檢體溶液較一般螢光粒子所配製的檢體溶液之濃縮電壓低。

為了配合下階段的 SPR 檢測，此部分實驗所使用之檢體溶液與磷酸鹽緩衝測試溶液的比列，皆以百分比表示，表示方式為待測體液在整體溶液中之濃度，四種體液在此濃縮實驗及 SPR 檢測之實驗濃度皆為 20%、40%、60%、80%、100%

(一) 血清

加入鈣黃綠素之血清溶液，達成濃縮時，可以發現其濃縮電壓較標準濃縮高出許多，且左右電壓差距較大。然而相較於先前加入一般螢光粒子的濃縮現象，加入鈣黃綠素之血清溶液較易達成濃縮，所需電壓較低，且未出現往復運動情形，因此可以推測鈣黃綠素可作為血清中離子運動行為的代表，進而得知血清中的離子確實可藉由我們的生醫晶片進行預濃縮。

1. 檢體溶液濃度 20%

此比例之濃縮現象與標準濃縮十分相似，在兩側電壓皆低，且左右幾乎無電壓差的情況下，即在奈米流道的兩側產生空乏區，出現濃縮現象，但是其濃縮程度並不明顯，未確實將檢體溶液中的離子集中。濃縮情形如圖九-(a)。

2. 檢體溶液濃度 40%

此比例之濃縮現象所需電壓較標準濃縮高，在左右兩側的電壓差距明顯時，濃縮現象於空乏區外側產生，且濃縮區域十分穩定，但未將檢體溶液中的離子確實集中。濃縮情形如圖九-(b)。

3. 檢體溶液濃度 60%

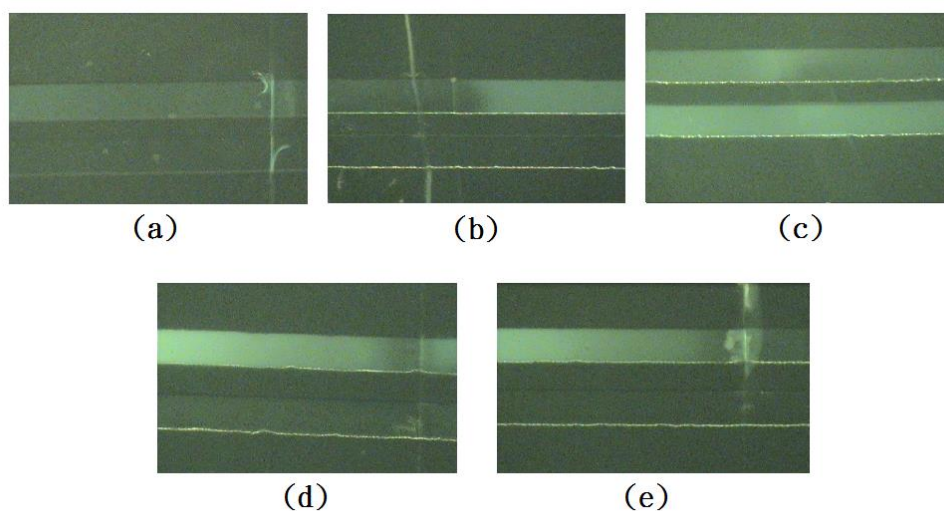
此比例的濃縮現象，發生在兩側電壓高且差距大時，與 40% 實驗組之電壓相近，穩定的濃縮現象發生於空乏區外側，而濃縮區域也未出現高程度的集中，但我們得知檢體溶液中的離子確實能藉由電壓調整而被濃縮。濃縮情形如圖九-(c)。

4. 檢體溶液濃度 80%

此比例的濃縮現象發生於左右兩側電壓高且差距大時，電壓差與 60% 實驗組相似，另外縱使兩側電壓高也未出現往復運動，即空乏區外側的濃縮區域十分穩定。在高比例之血清檢體溶液中，我們並未觀察到先前推測黏度對於濃縮現象造成的影響。濃縮情形如圖九-(d)。

5. 檢體溶液濃度 100%

此比例之濃縮現象所需電壓高，兩側電壓差距大，穩定的濃縮區域在空乏區外側形成，也未出現往復運動，但濃縮程度仍然不高。而此濃度濃縮現象之成功，即代表著血清溶液的可濃縮性。濃縮情形如圖九-(e)。



圖九 血清各濃度的濃縮情形。

圖(a)為 20%，圖(b)為 40%，圖(c)為 60%，圖(d)為 80%，圖(e)為 100%。

(二) 尿液

加入鈣黃綠素之尿液溶液，濃縮成功的機率比添加一般螢光粒子高很多，所需電壓也不用太大，且排除了雜質過多影響實驗的問題，對於觀察接近離子大小之物質的移動較為有利。我們發現，尿液具有可濃縮性，但也有難以藉由調整電壓，限制已濃縮區域位置的特性。

1. 檢體溶液濃度 20%

此比例之濃縮現象所需兩邊電壓差不大，由奈米流道邊界長出明顯空乏區，但濃縮區域不穩定，螢光分子也無持續且顯著的集中情形發生，在不更動電壓的情況下，不久後即消散。濃縮情形如圖十-(a)。

2. 檢體溶液濃度 40%

此比例之濃縮現象所需兩邊電壓差略高於 20% 實驗組，空乏區明顯，過程中不斷增大，有些許來回振動的情形，然而濃縮區域穩定持久，螢光分子亦有效的集中。濃縮情形如圖十-(b)。

3. 檢體溶液濃度 60%

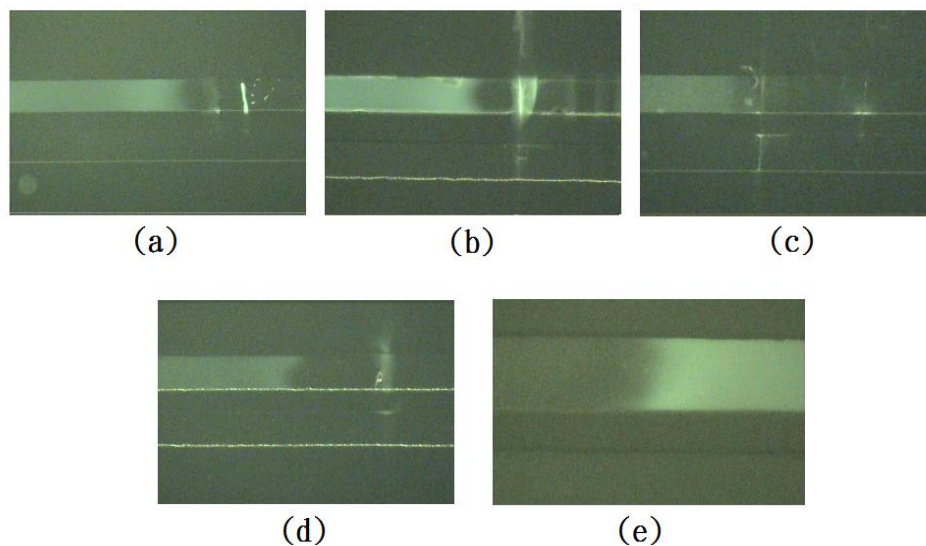
此比例之濃縮現象所需電壓及兩邊電壓差不大，空乏區不太明顯，雖有類似濃縮的形狀出現，但流體持續往兩極移動，沒有集中及濃度變高的情形發生。濃縮情形如圖十-(c)。

4. 檢體溶液濃度 80%

此比例之濃縮現象所需電壓，略高於前面濃度較低的實驗組，空乏區明顯，呈標準濃縮，且端點處濃縮程度大，然而流體不斷往兩極移動，未能精準固定濃縮區域。濃縮情形如圖十-(d)。

5. 檢體溶液濃度 100%

此比例之濃縮現象所需電壓又比前述四個實驗組高，空乏區長出便不斷擴大，流體濃度有顯著提升，且不太容易消散，但濃縮區域不斷往兩側移動，難以限制其範圍。濃縮情形如圖十-(e)。



圖十 尿液各濃度的濃縮情形。

圖(a)為 20%，圖(b)為 40%，圖(c)為 60%，(d)為 80%，圖(e)為 100%。

(三) 唾液

加入鈣黃綠素之唾液溶液，與添加一般螢光粒子一樣，為最接近標準濃縮現象的實驗組，其濃縮所需電壓普遍偏低，且隨濃度的增高只有微幅的上升，濃縮區域產生後，亦十分穩定而不易消散。

1. 檢體溶液濃度 20%

此比例之濃縮現象所需電壓低，兩邊電壓差小，與標準濃縮接近，空乏區的產生雖沒有明顯的界限，但仍可觀察出其推動流體的情形。濃縮情形如圖十一-(a)。

2. 檢體溶液濃度 40%

此比例之濃縮現象所需電壓及兩邊電壓差，皆略高於 20% 實驗組，通電後，奈米流道兩旁形成很長的空乏區，而在到達特定電壓時，粒子逐漸向中間凝聚，濃縮區域穩定，且濃縮程度高。濃縮情形如圖十一-(b)。

3. 檢體溶液濃度 60%

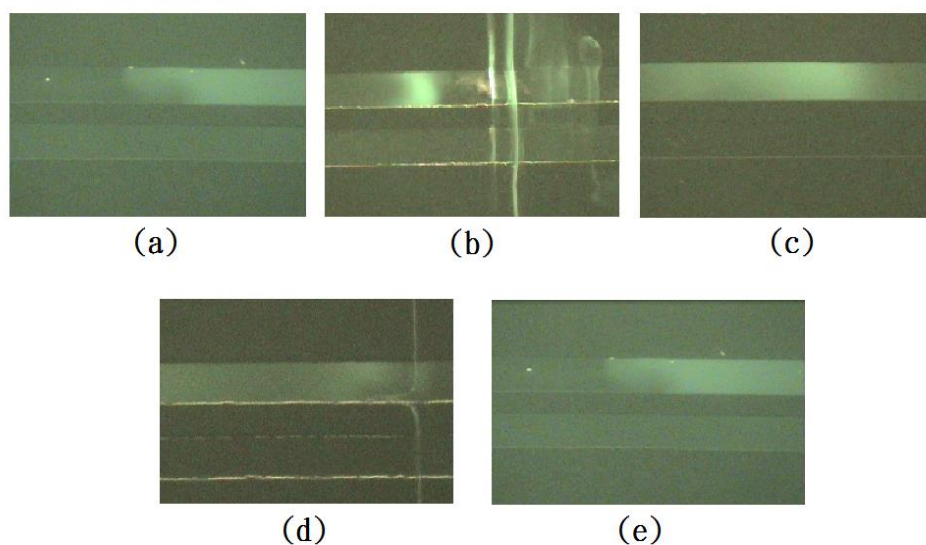
此比例之濃縮現象所需電壓也不高，與前面的實驗組類似，濃縮區域大而穩定，空乏區的生成與形狀亦十分明顯。濃縮情形如圖十一-(c)。

4. 檢體溶液濃度 80%

此比例之濃縮現象所需電壓又比前者略高一些，剛通入電，粒子緩慢向兩極移動時，便有些微粒子集中於空乏區側的現象，濃縮區域大，但較不穩定，一段時間後便消散。濃縮情形如圖十一-(d)。

5. 檢體溶液濃度 100%

此比例之濃縮現象所需電壓與 80%之實驗組相近，濃縮範圍大且穩定，但粒子集中程度沒有先前的實驗組高。濃縮情形如圖十一-(e)。



圖十一 唾液各濃度的濃縮情形。

圖(a)為 20%，圖(b)為 40%，圖(c)為 60%，圖(d)為 80%，圖(e)為 100%。

(四) 汗液

加入鈣黃綠素之汗液溶液，五種濃度的濃縮現象，濃縮電壓皆在一定的區間內，未隨濃度增加有明確規律，且濃縮區域不穩定，難以藉由調整電壓控制其停

留於空乏區外側。

1. 檢體溶液濃度 20%

此比例之濃縮現象接近標準濃縮，與單純使用磷酸鹽緩衝溶液的實驗組，幾乎沒有差別。空乏區的形成十分標準，濃縮區域顯著，兩側差距不大，所需電壓值偏低，螢光分子集中程度高且穩定。濃縮情形如圖十二-(a)。

2. 檢體溶液濃度 40%

此比例之濃縮現象，所需電壓較標準濃縮高一些，電壓差較大，空乏區形成時間較久，而濃縮區域集中且穩定，不易消散。濃縮情形如圖十二-(b)。

3. 檢體溶液濃度 60%

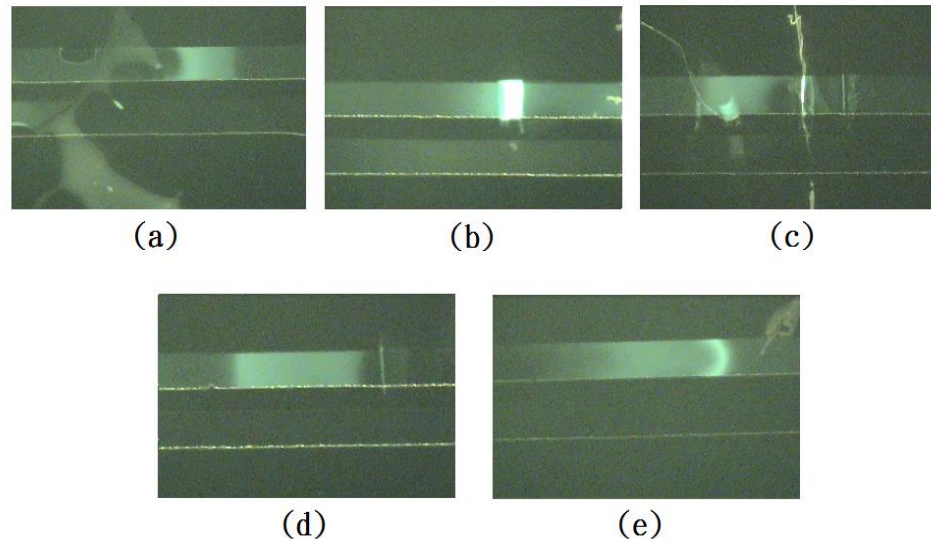
此比例之濃縮現象，濃縮電壓較標準濃縮高出不少，兩側電壓差距較 40% 實驗組大，空乏區的形成十分標準，然而濃縮區域狹小，濃縮程度不高，且不穩定、不易控制。濃縮情形如圖十二-(c)。

4. 檢體溶液濃度 80%

此比例之濃縮現象，所需電壓較標準濃縮高，兩側電壓差距接近於 60% 之濃縮現象，濃縮區域較標準濃縮小，但較 60% 實驗組大。濃縮情形如圖十二-(d)。

5. 檢體溶液濃度 100%

此比例之濃縮現象，所需電壓及兩側電壓差與 80% 實驗組相差不大，形成的濃縮區域濃度高，卻極不穩定，在空乏區出現後，濃縮區域即往流道端點移動，直至消散，且難以藉電壓調整改變其流向。濃縮情形如圖十二-(e)。



圖十二 汗液各濃度的濃縮情形。

圖(a)為 20%，圖(b)為 40%，圖(c)為 60%，圖(d)為 80%，圖(e)為 100%。

四、 使用一般螢光粒子與鈣黃綠素濃縮兩者之比較

	一般螢光粒子		鈣黃綠素	
	電壓值 (V)	電壓差 (V)	電壓值 (V)	電壓差 (V)
血清	30~60	10~30	50~70	10~30
尿液	55~85	10~30	40~60	25~45
唾液	40~70	40~60	30~50	10~30
汗液	60~90	40~60	30~50	20~40

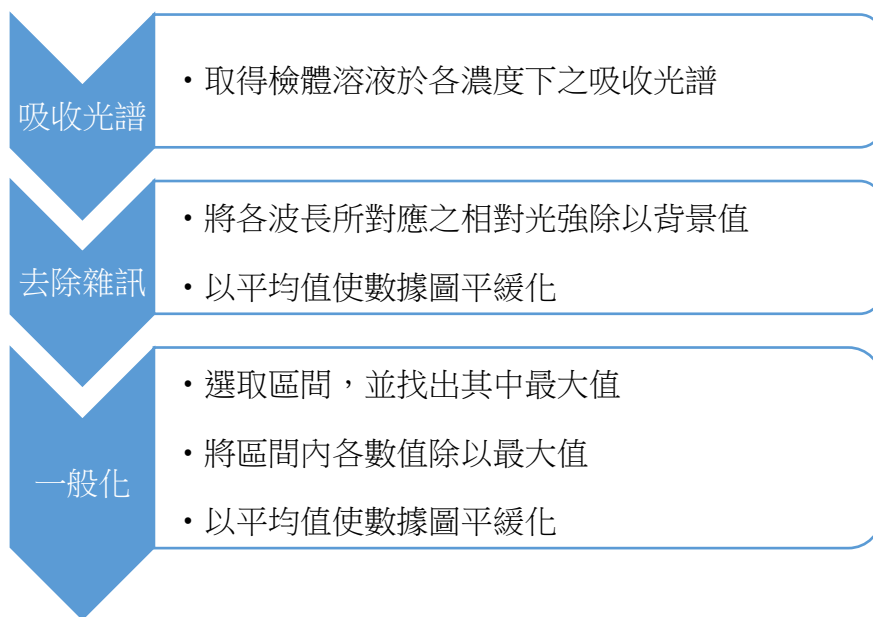
經由實驗我們得知，使用鈣黃綠素進行濃縮時，所需的電壓值大多在一特定區間內，且在數次實驗中相差不大；使用螢光粒子時，濃縮發生的電壓值較無固定。我們推測可能原因為，使用一般螢光粒子作為螢光標記時，流體的流動較容易受到內部大分子物質黏著、結塊等影響，且採用不同樣本之影響更為顯著的情形所致。而使用鈣黃綠素時，其分子較小，不易形成塊狀物，因此濃縮電壓普遍較螢光粒子低，且兩側電壓較使用一般螢光粒子的實驗組小。

	濃縮情形	
	一般螢光粒子	鈣黃綠素
血清	往復運動	未出現往復運動
尿液	往復運動	未出現往復運動，難以藉由調整電壓，限制已濃縮區域的位置
唾液	最易濃縮之體液樣本，任意濃度下皆近似標準濃縮	最易濃縮之體液樣本
汗液	低濃度下與標準濃縮相似	濃縮區域不穩定

藉由比對分別使用兩種螢光標記的實驗組，我們得知鈣黃綠素相較於一般螢光粒子，更容易達成濃縮，且在血清和尿液的實驗組中，皆未觀察到往復運動的現象，我們推測可能原因為，一般螢光粒子與鈣黃綠素在檢體溶液中代表的物質並不相同，因此我們觀察的結果恰好為體液中兩種不同物質的運動行為，前者為分子層級之物質，後者則為離子層級。另外我們觀察到，唾液在兩種螢光標記中皆為最易濃縮之樣本，因此其為日後可發展性高的樣本。

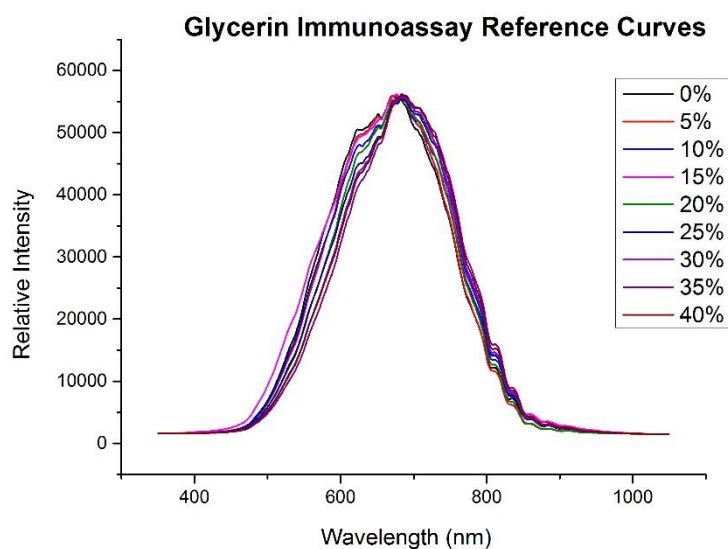
五、 SPR 檢測

數據處理（使用 Origin9 分析程式）：



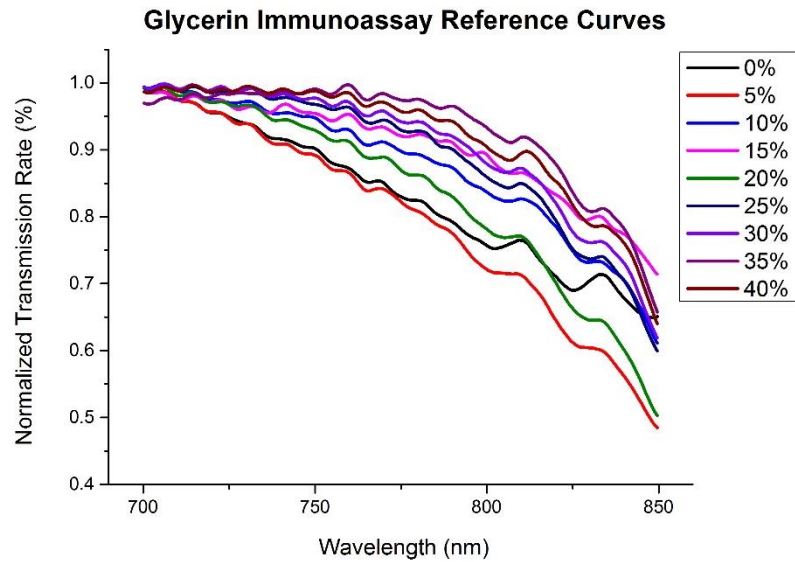
(一) 甘油水測試

為了確認晶片結構的精準度，我們進行了不同濃度甘油水的測試，實驗結果如圖十三所示。甘油水濃度越高，吸收光譜的紅移量越明顯，即是由於濃度越高，折射率增大越多，而造成的影響。



圖十三 甘油水各濃度之吸收光譜。

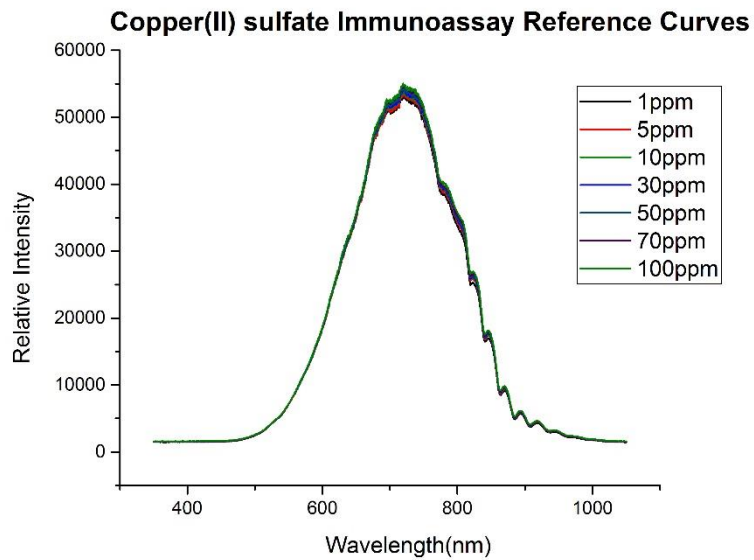
經過數據處理後，我們能更清楚的判斷吸收光譜的紅移量。如圖十四。



圖十四 甘油水吸收光譜之一般化。

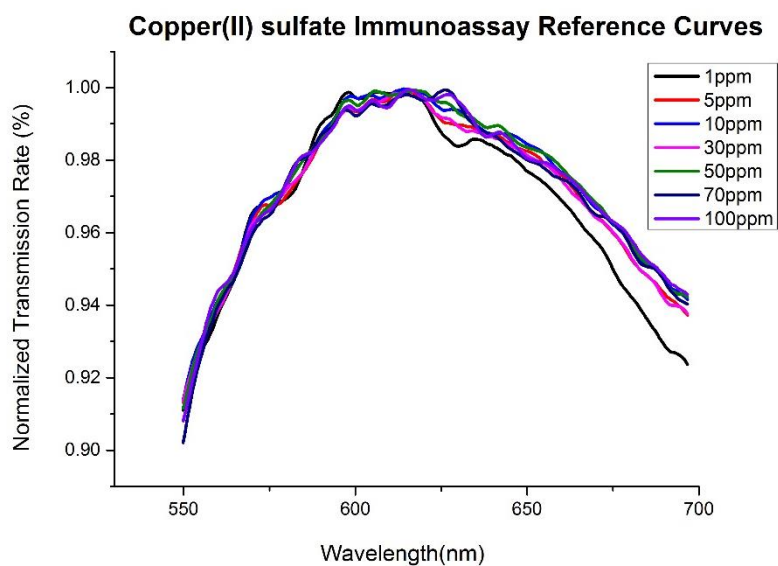
(二) 硫酸銅檢測

我們分別使用 1ppm、30ppm、50ppm、70ppm、100ppm 之硫酸銅溶液進行檢測，銅離子濃度上升會造成吸收光譜的右移，所以此圖表可作為日後體液濃度之對照。實驗結果如圖十五所示。

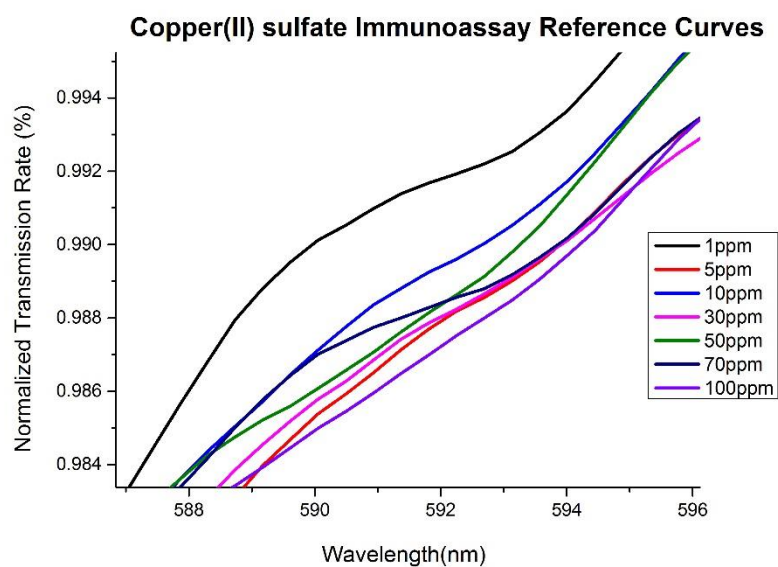


圖十五 硫酸銅溶液各濃度之吸收光譜。

數據處理後，較易觀察吸收光譜的紅移量。如圖十六。



圖十六 硫酸銅溶液吸收光譜之一般化。



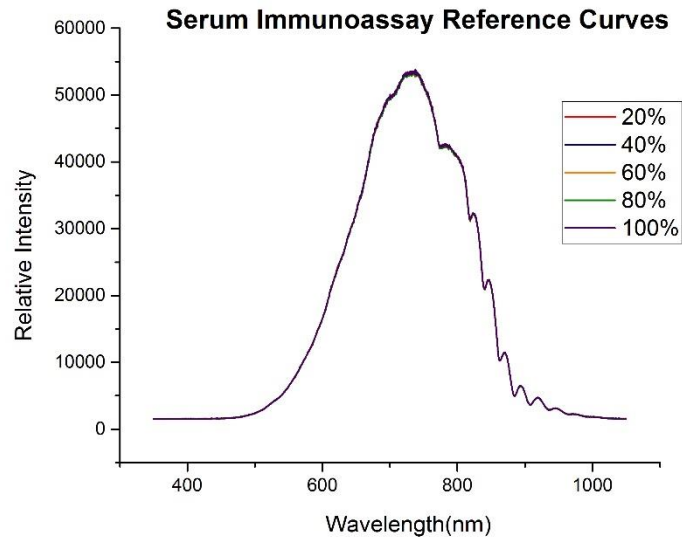
圖十七 硫酸銅溶液吸收光譜一般化之放大比較。

(三) 體液檢測

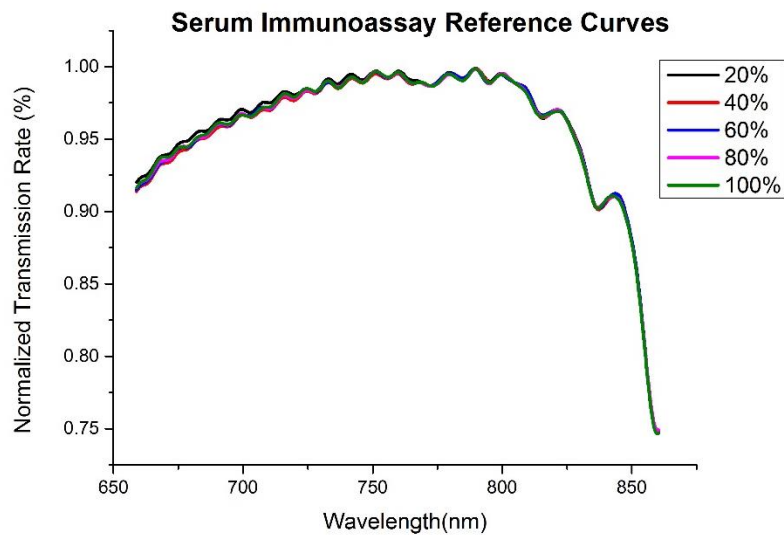
為了得知體液是否可在 SPR 結構上造成吸收光譜的紅移，我們使用與前面相同的步驟，直接將不同濃度之體液放置於結構表面，觀察其吸收光譜的位移量，同時由其紅移量(redshift)了解何種體液需要經由濃縮程序才能清楚觀察金屬離子的濃度變化量。

1. 血清

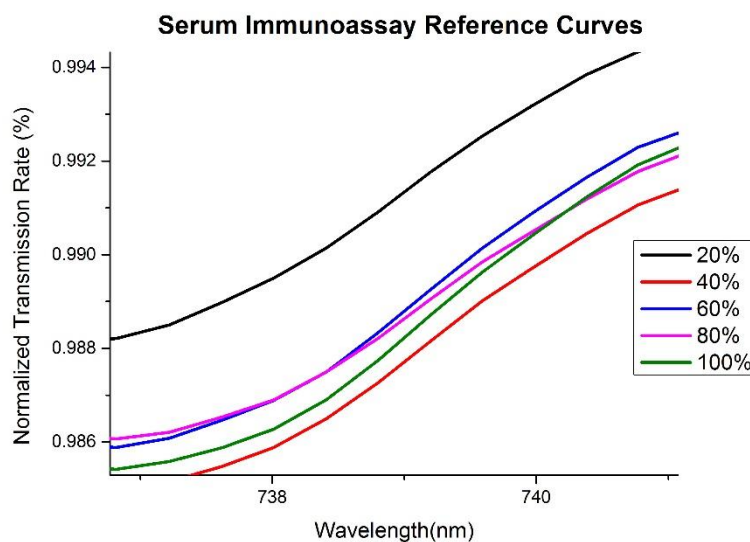
透過不同比例血清的 SPR 檢測，我們成功測得吸收光譜的紅移。然而若藉由此圖表對照濃度，則誤差較大，會因為結構的精確性影響所得結果，因此血清溶液須經由濃縮步驟，始能進行 SPR 檢測，進而推估其中的金屬離子濃度。



圖十八 血清溶液各濃度之吸收光譜。



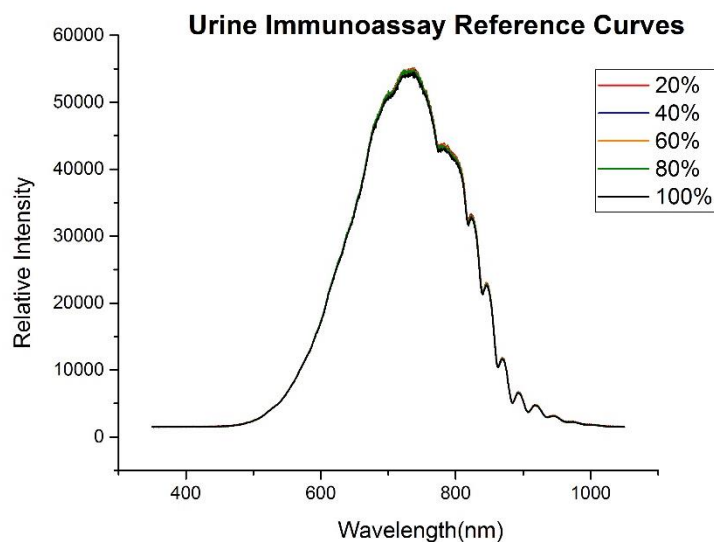
圖十九 血清溶液吸收光譜之一般化。



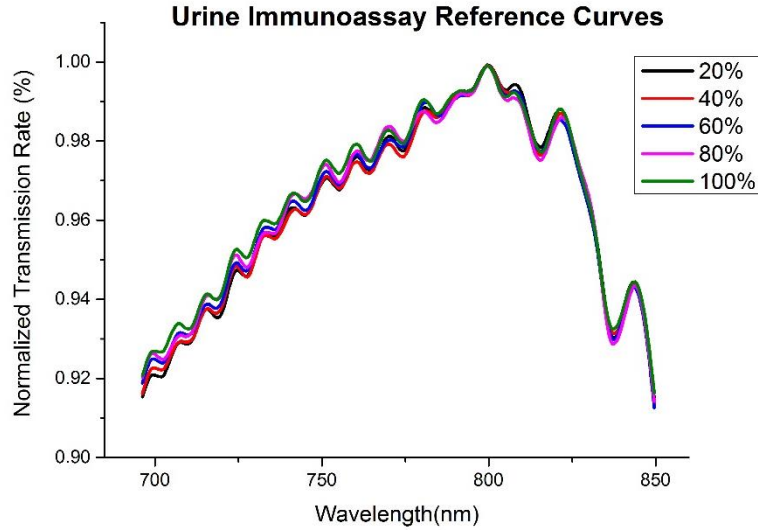
圖二十 血清溶液吸收光譜一般化之放大比較。

2. 尿液

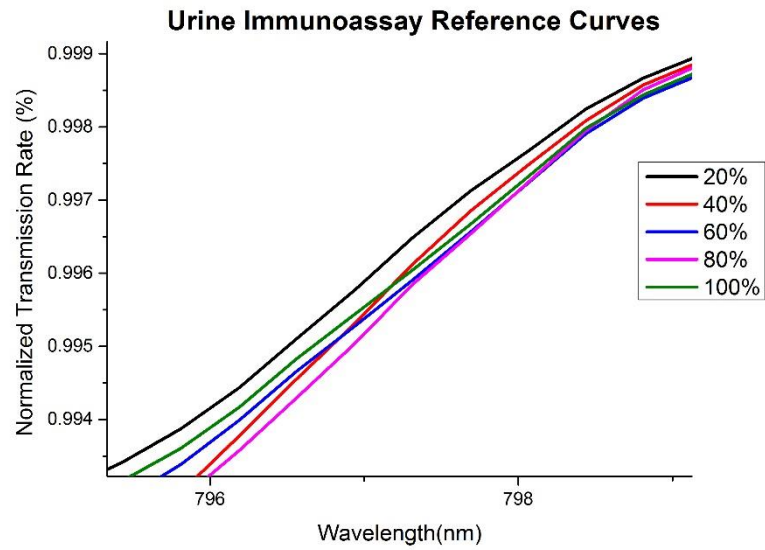
透過不同比例尿液的 SPR 檢測，我們發現其吸收光譜隨濃度提升，會有向右位移的情形，然而並不明顯足以作為內部物質含量的判斷依據，因此需要更精確的檢測，且若藉由濃縮步驟，可較有效的推得金屬離子的濃度。



圖二十一 尿液溶液各濃度之吸收光譜。



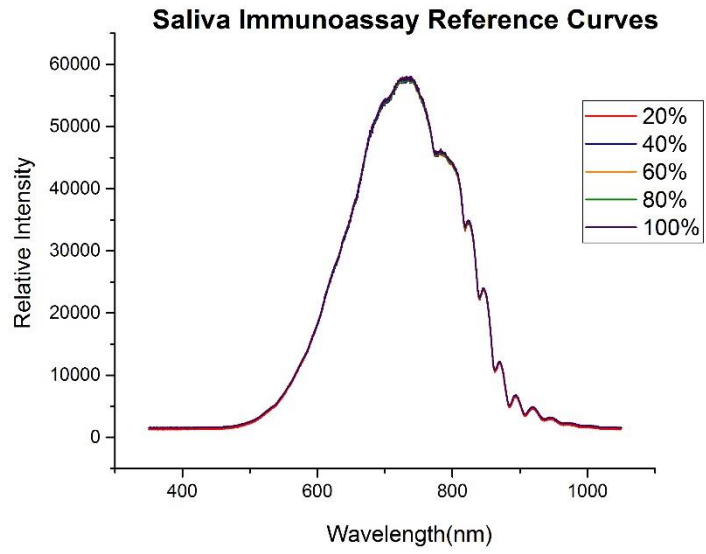
圖二十二 尿液溶液吸收光譜之一般化。



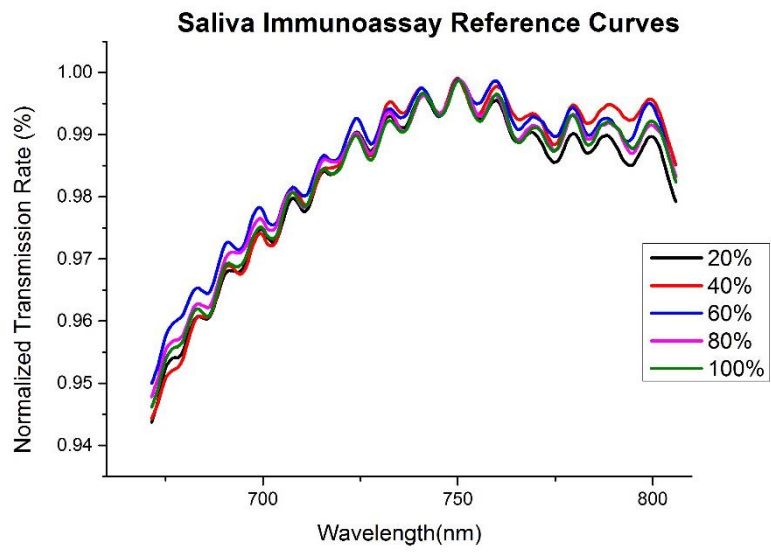
圖二十三 尿液溶液吸收光譜一般化之放大比較。

3. 唾液

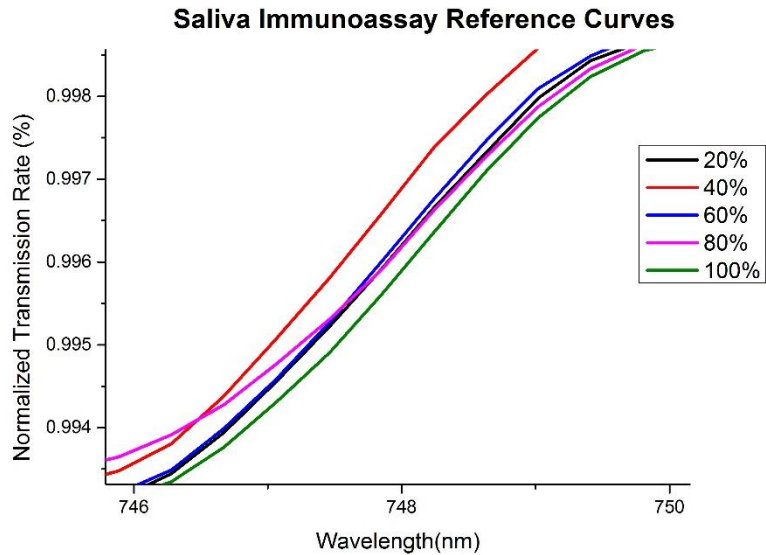
透過不同比例唾液的 SPR 檢測，我們發現濃度的提升會造成吸收光譜些許的紅移，且紅移量較尿液明顯，因此能藉由準確操作與濃縮技術的搭配，量測內部金屬離子的含量。



圖二十四 唾液溶液各濃度之吸收光譜。



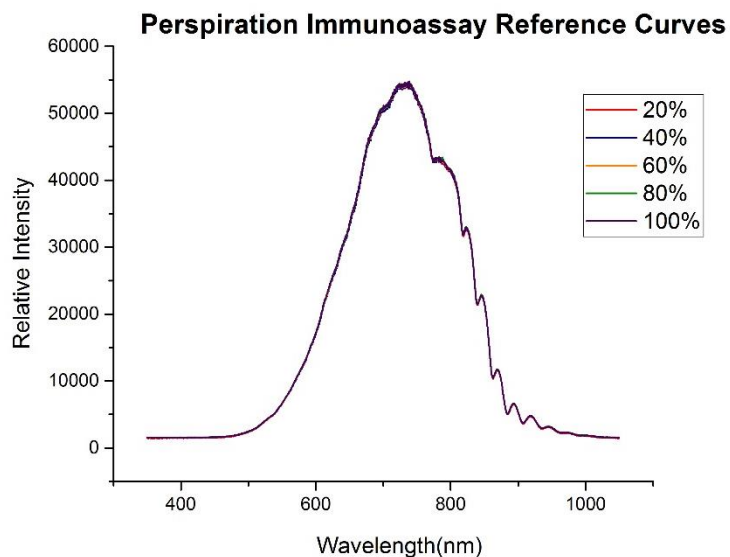
圖二十五 唾液溶液吸收光譜之一般化。



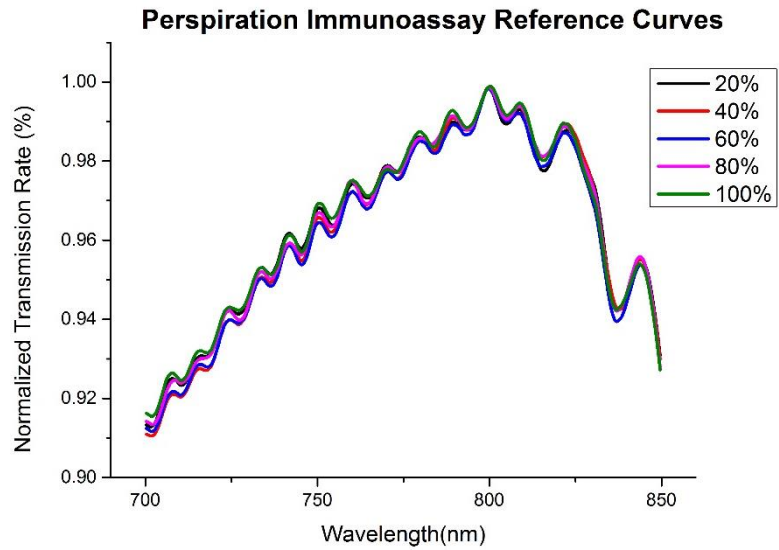
圖二十六 唾液溶液吸收光譜一般化之放大比較。

4. 汗液

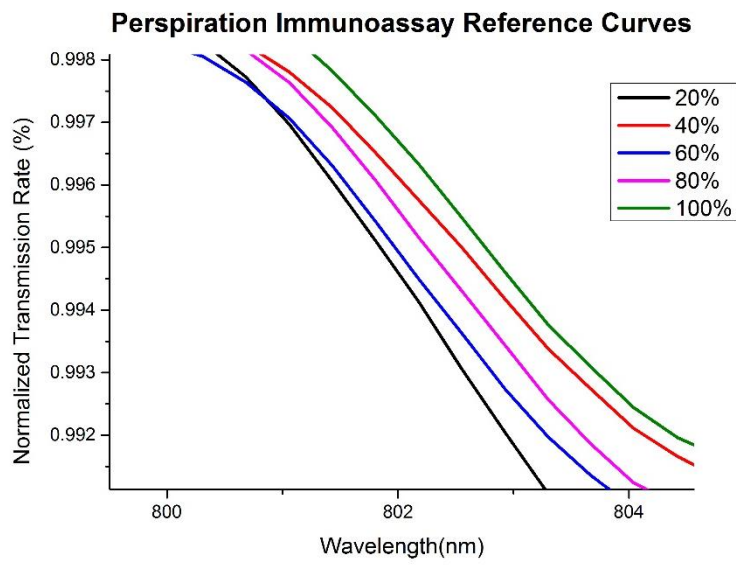
透過不同比例汗液的 SPR 檢測，我們發現吸收光譜隨濃度升高，整體有向右位移的趨勢，紅移量較血清及尿液樣本明顯，但其紅移量仍不足以作為濃度判斷的標準，因此濃縮步驟與量測準確度的提高，可以幫助進行更精確的分析。



圖二十七 汗液溶液各濃度之吸收光譜。



圖二十八 汗液溶液吸收光譜之一般化。



圖二十九 汗液溶液吸收光譜一般化之放大比較。

肆、結論與應用

一、人體體液之濃縮

在嘗試四種人體體液（血清、尿液、唾液、汗液）之後，我們歸納出可達成濃縮之體液比例。

(一) 一般螢光粒子的螢光標記

在使用螢光粒子的實驗組中，尿液相較於其他樣本，需以較低的比例和磷酸鹽緩衝測試溶液混合，才能達到濃縮；血清與尿液濃縮時，皆發生無固定頻率的往復運動；汗液在低濃度的條件下，濃縮區域持續時間長；唾液較不受溶液混合比例影響，可以達到追求體液原始狀態的目的，其濃縮情形接近標準濃縮現象，亦最穩定持久，是未來有發展性的濃縮樣本。由於一般螢光粒子作為標記的顆粒較大，所以能夠用以觀察溶液中大分子的移動情形。

(二) 鈣黃綠素的螢光標記

使用鈣黃綠素標記的檢體溶液，相較於一般螢光粒子，所需的濃縮電壓較低。唾液五種濃度之濃縮電壓，普遍較其他樣本低，易達成標準濃縮現象；血清、尿液、汗液的濃縮，則多發生於奈米流道一側的特定區間。由於鈣黃綠素為小分子的螢光標記，因此能代表檢體溶液內離子的運動行為，且達成濃縮的成功率高。

二、SPR 檢測

依照甘油水的測試結果，我們確認結構的精準性，並得知吸收光譜的紅移量，可用以推測檢體溶液的濃度。接著我們使用硫酸銅溶液，進行重金屬離子的檢測，期待以其吸收光譜，作為體液濃度之對照標準。

我們測試了四種體液樣本是否可藉由濃度調整，於 SPR 檢測中測得光譜位移，並且發現在未進行濃縮的情況下，血清、尿液、唾液、汗液四種檢體溶液的吸收光

譜，皆可觀察到隨濃度提升而產生的些微紅移現象，其中唾液、汗液的紅移量較其餘兩種體液明顯，但要作為離子濃度的判斷依據尚有一定的困難，若直接與硫酸銅溶液的光譜進行比對，所得結果會誤差過大。因此，與濃縮技術結合，會是一項很有幫助的解決方案。

三、 應用與未來展望

使用鈣黃綠素螢光標記，可成功達成四種體液的濃縮，且體液經由 SPR 檢測所得的吸收光譜，亦成功出現微小的紅移現象。然而，由於紅移量過小，以致分析內部離子濃度時誤差較大，因此日後我們將於濃縮完成後，針對濃縮區域再進行 SPR 檢測。未來將結合兩項技術，推估檢體溶液的離子濃度，作為生醫晶片的基礎。期待日後能發展於簡易攜帶型之生醫晶片檢測器上，並更廣泛應用在人體即時健康檢測的方面。

伍、 參考文獻

- 一、 Amay J. Bandodkar, Wenzhao Jia, and Joseph Wang (2015). Tattoo-Based Wearable Electrochemical Devices: A Review. *Electroanalysis*, 27, 562-572
- 二、 Jihye Choi, Keon Huh, Dustin Jaesuk Moon, Hyomin Lee, Seok Young Son, Kihong Kim, Hee Chan Kim, Jong-Hee Chae, Gun Yong Sung, Ho-Young Kim, Jong Wook Hong and Sung Jae Kim (2015). Selective preconcentration and online collection of charged molecules using ion concentration polarization. *RSC Advances*, 5, 66178-66184.
- 三、 Pei-Shan Chung, Yu-Jui Fan, Horn-Jiunn Sheen, Wei-Cheng Tian (2015). Real-time dual-loop electric current measurement for label-free nanofluidic preconcentration chip. *Lab on a Chip*, 15, 319-330.
- 四、 Yap Wing Fen, Wan Mahmood Mat Yunus, Nor Azah Yusof (2011). Detection of Mercury and Copper Ions Using Surface Plasmon Resonance Optical Sensor. *Sensors and Materials*, 23(6), 325-334.
- 五、 Y.-C. Wang, A.L. Stevens, and J. Han(2005). Million-fold preconcentration of proteins and peptides by nanofluidic filter. *Analytical chemistry*, 77(14), 4293-4299.

【評語】 160023

這個實驗直接嘗試用人體體液放到奈米濃縮晶片當中去測試，銅離子濃度，有相當的新穎性，初期結果也當不錯，如能再深入一些探討得到的濃縮液內之濃度種類及與聲音的關連性，將有很大的作用潛力。