

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

量子點電激發化學發光研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2113-M-029-007-MY3

執行期間：97 年 8 月 1 日至 100 年 7 月 31 日

執行機構及系所：東海大學化學系

計畫主持人：黃承文

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：精簡報告 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- 赴國外出差或研習心得報告
- 赴大陸地區出差或研習心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中 華 民 國 100 年 10 月 28 日

中文摘要

無機半導體奈米晶體，一般通稱量子點 (quantum dots, QDs)，是一種具有特殊光吸收與放射特性的膠體微粒。QDs 的光放射除了可利用光子激發外，也可以藉由電激發化學放光 (electrochemiluminescence, ECL) 方式在 QDs 上產生電子-電洞對而放光。

本研究將儲鐵蛋白抗體 (ferritin antibody) 固定至量子點修飾網版印刷碳電極上，並利用抗原與抗體間的專一特性分析人類血清中的 ferritin。由於抗原抗體經免疫反應所產生的免疫複合體 (immunocomplex) 會增加電極表面的立體障礙，妨礙共反應物 $S_2O_8^{2-}$ 傳輸至電極表面進行反應，因而導致 CdSe QDs ECL 訊號衰減。

藉由 ECL 光訊號會隨 ferritin 濃度增大而降低，本研究發展出人類血清中儲鐵蛋白之新偵測方法。分析稀釋 30 倍血清中儲鐵蛋白的線性範圍濃度為 0.1~20 ng/mL，偵測極限濃度為 0.07 ng/mL，不同電極製作的檢量線斜率之相對標準偏差 (relative standard deviation, RSD) 小於 5%。探討血液中 5 種可能的干擾物，包括：人血清白蛋白、甲型胎兒蛋白、血紅蛋白、輸鐵蛋白、氯化鐵對本方法偵測之影響，結果顯示干擾影響甚微。比較本方法和 ELISA 方法分析 10 個志願者血清中的 ferritin 含量，結果相當一致，顯示本研究發展的 ferritin 感測器具有高靈敏度及準確性，同時具有成本低廉，可拋棄式及可大量製備等優點。

關鍵詞：量子點，電激發化學發光，網版印刷碳電極，儲鐵蛋白，免疫分析

英文摘要

Inorganic semiconductor nanocrystals, or quantum dots (QDs), with excellent luminescent properties have attracted increased attention in recent years. QDs are colloidal particles which have very unique photoluminescence characteristics, such as broad excitation bandwidth, high molar absorptivity, narrow Gaussian emission peak, and tunable emission positions from UV to NIR by changing the colloidal particle size. Luminescence of QDs can be generated not only by photonic excitation, but also by electrochemical methods.

In this research, we intend to immobilize the ferritin antibody onto the QDs-modified screen printed carbon electrode to form an electrochemiluminescence (ECL) biosensor for ferritin. Due to that the immunocomplex formed from the immune reaction between antigen and antibody will increase the steric hindrance at the electrode surface, mass transfer of the co-reactant $S_2O_8^{2-}$ to the electrode will be interfered, which causes decrease of the ECL signal strength of CdSe QDs.

We have successfully developed a new immunoassay method for human ferritin based on the decrease of QDs ECL strength with the concentration of ferritin in serum. The linear range in 30x diluted human serum was 0.1 – 20 ng/mL, and the detection limit was 0.07 ng/mL. The relative standard deviation (RSD%) on the slopes of calibration lines of different electrodes was less than 5%. Interferences from the 5 possible sources, i.e. human serum albumin (HAS), alpha-fetoprotein (AFP), human hemoglobin (HGB), human transferrin (HTF), and ferric chloride, were minimum. Correlation between the results of QDs ECL method and those of ELISA method for 10 volunteers was good. The developed QDs-modified ferritin biosensor has the advantages of high sensitivity, high selectivity, low cost, disposable and easy mass production.

Keywords: quantum dots ; electrochemiluminescence; screen printed carbon electrode; ferritin ; immunoassay.

目錄

摘要.....	2
目錄.....	3
內容	
一、前言.....	4
1.1 量子點 (quantum dots, QDs)	4
1.2 儲鐵蛋白 (Ferritin)	5
1.3 研究動機.....	6
二、研究方法.....	7
2.1 CdSe QDs 的合成.....	7
2.2 CdSe/anti-ferritin QDs 修飾網版印刷碳電極的製作.....	7
2.3 電化學/電激發化學發光偵測裝置.....	7
三、結果與討論.....	8
3.1 CdSe 奈米粒子的吸收與螢光性質.....	8
3.2 HRTEM 高解析穿透式電子顯微鏡測定.....	9
3.3 CdSe QDs/anti-ferritin 修飾金電極之 ECL 行為.....	9
3.4 CdSe QDs/anti-ferritin antibody 修飾金電極應用於 ferritin 抗原之分析.....	10
3.4.1 Ferritin antibody 與 ferritin 反應時間之探討.....	10
3.4.2 檢量線與分析再現性.....	10
3.5 CdSe QDs/anti-ferritin antibody 修飾網版印刷碳電極應用於 ferritin 抗原之分析.....	12
3.5.1 Ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極偵測 ferritin.....	12
3.5.2 稀釋 30 倍抗體修飾電極偵測 ferritin 之檢量線.....	13
3.5.3 Ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極干擾之探討.....	13
3.5.4 真實樣品分析比對.....	15
四、結論.....	16
五、參考文獻.....	16

一、前言

1.1 量子點 (quantum dots, QDs)

量子點(quantum dots; QDs)是準零維(quasi-zero-dimensional)的奈米級材料¹，由少量的原子所構成。量子點三個維度的尺寸都在100奈米(nm)以下，外觀恰似一極小的點狀物而得名，且其內部電子在各方向的運動都受到侷限，所以量子侷限效應(quantum confinement effect)^{1,2}特別顯著。在一般塊材中，電子運動的平均自由徑遠小於塊材尺寸，因此量子侷限效應不顯著。如果將某一個維度的尺寸縮小到奈米尺寸，此時電子運動被侷限在另外兩個維度所構成的二維空間中，這樣的系統我們稱為量子井(quantum well)；若再將另一個維度的尺寸縮到小於一個電子運動的波長，則電子只能在一維方向上運動，我們稱為量子線(quantum wire)；當三個維度的尺寸都縮小到一個電子波長以下時，就成為量子點。由於其體積非常小，量子點又被稱為人造原子(artificial atom)。

量子點 (QDs) 亦是一種良好的無機半導體發光材料，通常由 II-VI 族或 III-V 族元素組成。其發光原理為^{3,4}：當 QDs 吸收一高於其能隙 (band gap) 的能量時，電子被激發至導電帶，價鍵帶空缺生成電洞，形成電子-電洞對，也稱為激子 (exciton)。當導電帶的電子以輻射耦合的方式與價鍵帶電洞再結合 (radiative electron-hole recombination)，就能釋放出光子。相較於傳統有機染料分子⁵，QDs 具有的特殊發光性質包括：寬廣的激發(吸收)頻寬 (bandwidth)、高莫爾吸光係數 (molar absorptivity)、狹窄對稱的螢光放射峰。因 QDs 不同於一般塊材，其物理及化學性質取決於粒子的大小，所以其放射波長可藉控制顆粒大小自紫外光到近紅外光範圍內隨意調整。

QDs 的光放射除了可利用光子激發 (photoluminescence) 外，也可以藉電子撞擊 (cathodo-luminescence)⁶，化學反應 (chemiluminescence)⁷ 或電化學 (electrochemiluminescence; ECL) 方式產生電子-電洞對而放光。相較於其他方法，ECL 具有以下優點：(1) 化學發光反應的進行程度與選擇性可藉由電極電位控制；(2) 光放射現象集中在電極附近，偵測器的空間位置安排較容易；(3) 非活性分析物分子可藉由電化學反應修飾為具有 ECL 活性的物質，擴展應用範圍。

最近幾年，QDs 在水溶液中的 ECL 報導開始出現，例如：穩定高效率的 ECL 可藉施加負電壓於溶在水中的 CdSe QDs 而獲得⁷；H₂O₂ 可增強 CdSe⁸ 及 CdS-碳奈米管複合 QDs⁹ 的 cathodic ECL；S₂O₈²⁻ 存在下 CdO QDs 可在 Pt 電極表面產生 cathodic ECL¹⁰。水溶性 QDs 的 ECL 也曾被應用於生物感測及生物標示 (biolabeling)，例如：以 CdSe QDs 為基礎的 H₂O₂⁸，glucose¹¹，glutathione¹² 感測，以 CdSe/ZnS dendron QDs 為基礎的 *E. coli* pathogens¹³ 感測，以 CdS QDs-Au nanoparticles 為基礎的 LDL (low-density lipoprotein) 感測¹⁴，以 CdTe QDs 當作蛋白質的電化學與螢光標示物的免疫感測 (immunosensor)¹⁵。

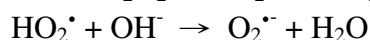
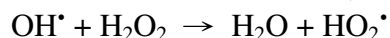
水溶液中 QDs ECL 的產生常需在 H₂O₂ 或 S₂O₈²⁻ coreactant 共存下形成電子-電洞對激發態 (1S_e-1S_h exciton) 而發光。以 Poznyak 所報導 CdSe/CdS core-shell QDs 在 H₂O₂ 存在下的 cathodic ECL 反應為例⁷，H₂O₂ 先在 Pt 或 F-doped SnO₂ 電極上分解出 OH[•] 自由基，如下式，其中 M 代表電極：



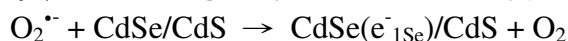
OH[•] 在 CdSe core 的 1S_h 量子侷限軌道 (quantum-confined orbital) 注入一個電洞，如下式：



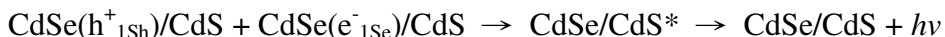
同時，OH[•] 能與 H₂O₂ 反應產生過氧離子，O₂^{•-}，如下式：



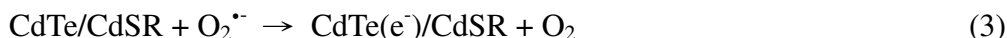
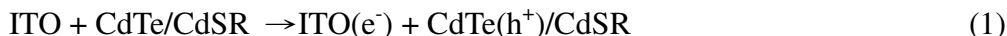
O₂^{•-} 隨即注入一個電子到 CdSe core 的 1S_e 量子侷限軌道，如下式：



當注入的電洞 (h^+) 與電子 (e^-) 再度結合時形成激發態的 QDs ($CdSe/CdS^*$) 而放光，如下式：



多數在 H_2O_2 共存下的 QDs ECL 報導均屬於 cathodic ECL，即是當電極在負電位條件下可觀察到放光現象。最近，第一篇於 O_2 共存下 mercaptopropionic acid (R)-capped CdTe QDs 在 ITO 電極上的 anodic ECL 報導也出現¹⁶，其反應機制如下：



反應步驟 (1) 與 (2) 顯示 ITO 電極在正電位下扮演一個 QDs 與 O_2 間電子轉移的仲介者，形成電洞 (h^+) 和 $O_2^{\cdot-}$ ， $O_2^{\cdot-}$ 隨即注入一個電子至 CdTe 的 $1S_e$ 量子侷限軌道生成負離子自由基， $QD^{\cdot-}$ ；當電洞 (h^+) 與電子 (e^-) 結合產生激發態 QDs 而放光。在此反應中，電極材料是個關鍵，只有使用 ITO 電極才有放光現象，其他電極 (Au, glassy carbon 及 graphite 電極) 均無效果。絕大部分水溶性 QDs 性質的研究都是在水溶液或膠體環境下進行，若要利用 QDs 發展平面顯示裝置或生物感測器，則必須設法將 QDs 固定於電極表面。

1.2 儲鐵蛋白 (Ferritin)

儲鐵蛋白 (ferritin) 為生物體血液中儲藏鐵質有密切關係的重要蛋白質，是一種鐵和蛋白質結合的複合物，它的濃度可以反應生物體組織中鐵的含量。Ferritin 分子是由 light chain (L-chain; 19 kDa) 和 heavy chain (H-chain; 21 kDa) 共 24 個 subunits 依不同比例組成一空心球形蛋白質，可以和 4500 個鐵原子結合¹⁷。H-ferritin 主要存在於肝臟、脾臟及網狀內皮細胞中，其具有 ferroxidase 活性，能將 Fe(II) 氧化成 Fe(III)，並儲存於鐵蛋白外殼中。L-ferritin 通常存在於心肌、紅血球細胞及淋巴球細胞中，它缺乏 ferroxidase center，不具與鐵結合的活性。一般人體血清中的 ferritin 以 L-chain 為主，其 pI 值介於 5.3~5.8 之間，若是 H-chain 含量較高者其 ferritin 的 pI 值則低於 4.8。

Ferritin 為生物體中維持鐵質平衡的重要蛋白質。當人體內游離鐵 (free iron) 過多時，會催化自由基離子的形成而毒害細胞，此時 ferritin 可將過量的鐵儲存於蛋白質外殼中，等待身體需要更多鐵時再釋放出來。人體血清中 ferritin 的含量可以直接反應身體鐵質的儲存狀況。臨床檢測 ferritin 含量具有健康指標意義，由 ferritin 含量可分辨容易混淆的兩類貧血病，缺鐵性貧血患者的 ferritin 經常小於 10 ng/mL，而海洋性貧血 (又稱地中海型貧血，是一種隱性遺傳血液疾病) 患者的 ferritin 經常是正常或偏高的。Ferritin 亦屬於急性反應物質，當人體感染、發炎、溶血、肝病、急性白血病、腎臟病變、血球病變時 ferritin 濃度會顯著升高，也有人將它歸類為癌症 (惡性腫瘤) 指標，在某些癌症 (肺癌、肝癌、胰臟癌) 中它會明顯上升，但這方面的特异性稍嫌不足，僅可搭配其他指標參考。

關於 ferritin 含量的檢測已有許多文獻報導，開發更為簡便靈敏的偵測方法成為主要的研究目標。研究顯示放射免疫分析法 (radioimmunoassay; RIA)、酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)、伏安法 (voltammetry)、石英晶體微天平法 (quartz crystal microbalance; QCM) 及表面電漿共振技術 (surface plasmon resonance; SPR) 等都曾被應用於 ferritin 的分析¹⁸⁻²³。最早應用於分析 ferritin 的 RIA 與 ELISA 仍為現今醫院與檢驗院常用的方法。RIA 利用放射性同位素標記的抗原 (標記抗原) 和非標記抗原 (標準抗原或待測抗原) 同時與有限量的抗體發生抗原-抗體反應。抗體上的有效結合點數量恆定，標記抗原和非標記抗原互相競爭結合點，未與抗體結合的標記抗原隨著待測抗原數量增加而增加 (競爭性結合)，因此測定標記抗原-抗體或標記抗原即可算出待測抗原的數量。此方法具有高度專一性及靈敏度，但由於使用放射

性同位素具有輻射危險，後續發展 ELISA 取代 RIA。

ELISA 是目前檢測 ferritin 最簡單普遍的方法，此方法也是利用抗原-抗體免疫反應的專一性，再與酵素結合發生呈色反應，於特定波長下偵測其吸收值以定量。Polson 等人¹⁹ 利用競爭結合型的 ELISA 分析 ferritin，檢量範圍為 2.0 ~755 ng/mL，偵測極限為 2.0 ng/mL。

電化學伏安法亦成功應用於人血清 ferritin 的分析。伏安法可觀察物質在電極表面電子轉移之情形，經過不同設計可直接或間接偵測分析物濃度。Zhang 等人²¹ 將分析物 ferritin（抗原）固定於塗覆有 ferritin 抗體（抗體）的容器，再加入與 HRP 連結的 ferritin 抗體進行反應，並一起固定於容器上，最後將抗原-抗體-HRP 洗下並加入定量的 H₂O₂ 和 m-aminophenol (MAP) 進行伏安分析。HRP 可催化 H₂O₂ 氧化 MAP，反應產生的氧化電流可直接定量 HRP 化合物。藉由定量抗體-HRP 可間接分析人血清 ferritin，其檢量範圍為 0.25 ~320 ng/mL，偵測極限為 0.25 ng/mL。

石英具有反壓電性質，當其處於一外加電場下晶體會產生微小的形變，此形變會來回擺動具有固定之震盪頻率。QCM 利用石英晶體表面吸附物質其振動頻率會隨物質多寡改變的特性，觀察振動頻率變化達到定量的目的。Chou 等人²² 利用 QCM 偵測 ferritin，藉由 cystamine-glutaraldehyde 將 ferritin 抗體固定於石英晶體的金薄膜上，觀察 ferritin 與 ferritin 抗體結合後石英晶體振動頻率的變化以定量。檢量範圍為 0.1 ~100 ng/mL，偵測極限為 0.1 ng/mL。

SPR 對於分析定量 ferritin 亦具有高靈敏度。SPR 利用一道偏極光(雷射光)由玻璃三稜鏡入射至金屬感應片時，會產生全反射。當感應片表面環境沒有改變時，反射角度不變。若金屬感應片塗覆待測物質即會改變反射角度。藉由反射角度之變化即可間接定量分析物。Chou 等人²³ 利用 SPR 技術分析 ferritin，檢量範圍為 0.2 ~200 ng/mL，偵測極限為 0.2 ng/mL。

近年來利用奈米粒子薄膜修飾電極分析 ferritin 的報導陸續出現。2007 年，Wang 等人²⁴ 利用磁性奈米粒子 Fe₃O₄ 修飾玻璃碳電極分析 ferritin，將 ferritin 抗體固定於薄膜電極上，進行 CV 掃描觀測電流變化，進而對 ferritin 定量，檢量範圍為 20~500 ng/mL，偵測極限為 7.0 ng/mL。2009 年，Yang²⁵ 參考 Wang 的方法，改用 CuO-SiO₂ 薄膜修飾金電極分析 ferritin，檢量範圍為 1 ~120 ng/mL，偵測極限為 0.4 ng/mL。2010 年，Ren 等人²⁶ 利用類似三明治型 ELISA 的方法分析 ferritin。先以 Fe₃O₄@SiO₂ 磁性奈米粒子鍵結 glucose oxidase (GOD)，形成 GOD- Fe₃O₄@SiO₂ 奈米粒子，再使網版印刷碳電極與奈米粒子均結合 ferritin 抗體，如此可將樣品溶液中的 ferritin 固定在奈米粒子與電極板中間。進行電化學分析時，電解質水溶液添加固定濃度的 glucose，glucose 會被 Fe₃O₄@SiO₂ 奈米粒子上的 GOD 氧化，此氧化電流會隨分析物濃度增加而上升，觀察電流變化量即可偵測 ferritin 含量，其檢量範圍為 0.1 ~400 ng/mL；偵測極限為 10 pg/mL。

1.3 研究動機

生化感測器是化學研究中新興的領域，其學術價值及經濟效益都非常可觀。一般而言，生化感測器需具備優良的選擇性、高靈敏度及較短的偵測時間，兼具良好的穩定性與可靠性。QDs 特有的光學性質與生物包容性結合網版印刷電極便宜及穩定的特性，應具有非常大的發展潛力。本研究嘗試固定 QDs 於電極上製作薄膜修飾電極並結合分析物抗體，進行抗原-抗體免疫反應。由於抗原-抗體結合會造成 QDs 表面狀態改變，進而影響 ECL 訊號強度。本研究期望利用生物免疫的專一性發展一個便宜、方便、快速且具高靈敏度的 ECL 偵檢器。

前述薄膜修飾電極方法皆利用金屬奈米粒子修飾並追蹤電流變化，達到間接偵測 ferritin 的目的，本研究則嘗試利用無機奈米粒子的 ECL 發光特性，由偵測 ECL 訊號變化進行 ferritin 的直接偵測。

二、研究方法

2.1 CdSe QDs 的合成²⁷

a. NaHSe 水溶液之配製²⁸

取 0.01892 g NaBH₄ 溶於 1 mL 去離子水中，再加入 0.01974 g Se 粉末，即為 0.25 M NaHSe 水溶液。由於此步驟反應劇烈，會產生大量的 H₂，因此需將氣體排出，待 Se 粉末完全溶解，取上層無色澄清液使用。NaHSe 水溶液須於使用前配製，因為其接觸空氣極易氧化，氧化後呈現暗紅色，無法再使用。

b. TGA-capped CdSe QDs (CdSe/TGA QDs)之製備

取 0.02566 g CdSO₄·8/3H₂O，溶於 60 mL 去離子水中，再加入 0.02738 g sodium thioglycolate (TGA) 攪拌至完全溶解。利用 0.1 M NaOH 調整溶液酸鹼值至 pH = 10.0 後，通入氮氣除氧 30 分鐘，再加入 200 μL 0.25 M NaHSe 水溶液，使 Cd²⁺ : HSe⁻ : TGA 之莫爾比為 1 : 0.5 : 2.4^[56]。將上述溶液加熱迴流 24 小時即可合成 CdSe/TGA QDs。最後以去離子水 : CdSe/TGA QDs 溶液體積比 20 : 1 進行 9 小時透析，再以 0.1 M HCl 將 pH 調整至 5.0，避光保存於暗處。

c. CdSe/TGA QDs 溶液之透析

CdSe/TGA QDs 溶液透析的時間越長純化效果越好，其能排除 QDs 合成時過量的反應物，但當透析時間太長則會使溶液 pH 值有較大的變化，造成 QDs 上的保護基 (capping agent) TGA 脫落而產生凝聚現象。另外有研究²⁹報導 QDs 表面的保護基會隨存放時間越長而脫落，因此溶液中含有適量未反應的保護基即可隨時遞補，使 QDs 能穩定分散延長其保存期限。所以透析時間不宜過長，本研究選擇透析時間 9 小時。

2.2 CdSe/anti-ferritin QDs 修飾網版印刷碳電極的製作

製作表面修飾 anti-ferritin 抗體的 CdSe QD 網版印刷碳電極流程顯示於圖 2.1。將上述表面具有負電性 thioglycolic acid (TGA)保護基的 CdSe QDs 藉導電高分子 chitosan 固定於碳電極上，再和 3-aminopropyl triethoxysilane (APS) 反應，使 QDs 表面具有 NH₂ 基。經 N-succinimidyl-4-maleimidomethyl cyclohexanecarboxylate (SMCC)處理，可在 QDs 表面掛上 maleimide，最後即可連接還原後的 anti-ferritin 抗體。

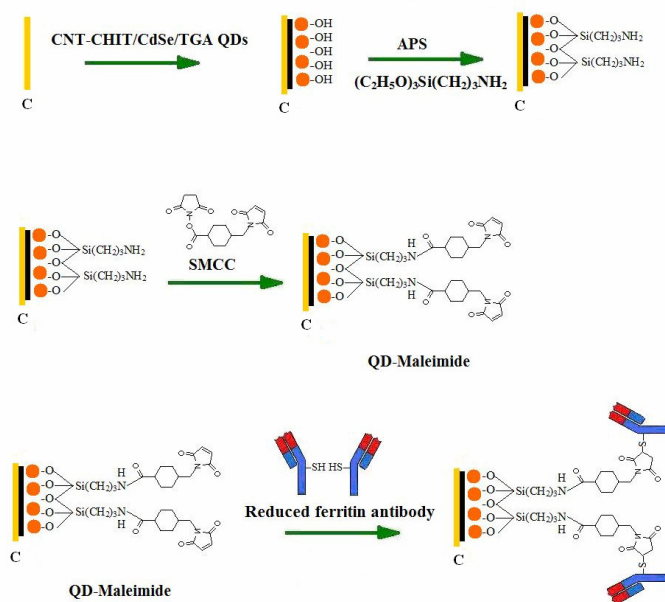


圖 2.1 CdSe QDs 表面修飾 anti-ferritin 網版印刷碳電極製作流程

2.3 電化學/電激發化學放光偵測裝置

電化學/電化學發光偵測裝置顯示於圖 2.2。實驗在約 20 mL 石英燒杯中進行。工作電極為金電極或網版印刷碳電極，參考電極為銀/氯化銀電極，輔助電極為白金電極。三支電極皆由容器上方的蓋子固定，電位掃描由 CHI-635A 電化學分析儀控制。

當進行 ECL 實驗時，由 PMT (施加電壓 -600V) 接收光訊號產生微電流，藉 picoammeter 轉換成電壓，經濾波線路過濾雜訊後，輸出至電腦記錄處理。為隔絕外界光源干擾，ECL 偵測裝置以黑色壓克力暗箱包覆，並於暗箱外再罩上黑布。使用盤式金電極為工作電極時，PMT 置於石英槽正下方，使用網版印刷碳電極時則置於石英槽側邊，使 PMT 正對電極表面以利接收光訊號。

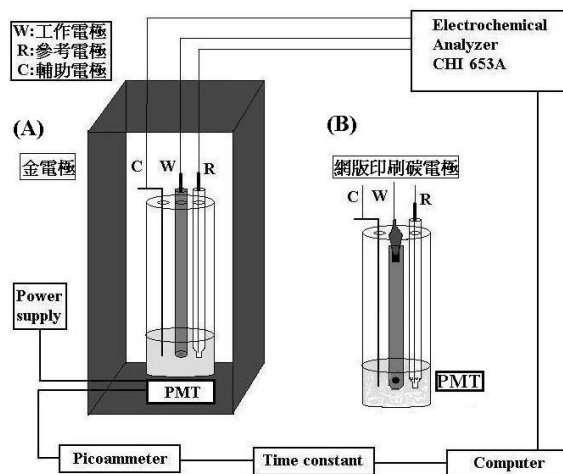


圖 2.2 電化學/電化學放光偵測裝置圖 (A) 盤式金電極 (B) 網版印刷碳電極

三、結果與討論

3.1 CdSe 奈米粒子的吸收與螢光性質

圖 3.1 為本研究所製備之 CdSe QDs UV-visible 吸收光譜，其粒徑大小可依下列公式計算³⁰：

$$D = (1.6122 \times 10^{-9}) \lambda^4 - (2.6575 \times 10^{-6}) \lambda^3 + (1.6242 \times 10^{-3}) \lambda^2 - (0.4277) \lambda + 41.57$$

將計算所得之粒徑代入下列公式，得到 QDs 的莫爾吸收係數與濃度。

CdSe:

$$\varepsilon = 5857 \times (d)^{2.65}$$

$$A = \varepsilon b c$$

其中 ε ：莫爾吸收係數

D：QDs 粒徑大小 (nm)

A：吸收度

c：濃度 (μM)

b：光徑長度 (cm)

由圖 3.1. CdSe QDs 的 UV-visible 吸收光譜可知，本研究所合成之 QDs 最大吸收波長 (λ_{max}) 為 530.5 nm，吸收值為 0.654 (a.u.)，代入上述公式後計算 QDs 粒徑為 2.7 nm、溶液濃度為 8.0 μM 。

圖 3.1 同時顯示 CdSe QDs 螢光放射光譜，激發波長為 450 nm，放射波長為 566 nm。依據文獻報導²，螢光放射光譜波峰的半高寬表示粒子大小的分佈情形，半高寬越窄顯示粒子分佈均勻，反之則分佈不均勻，粒徑均勻分佈的理想半高寬值應小於 30 nm。由圖 3.1 量測本研究螢光放射波峰半高寬約為 30 nm，符合粒徑分佈的理想值，顯示本研究所製備之 CdSe QDs 顆粒大小

一致。

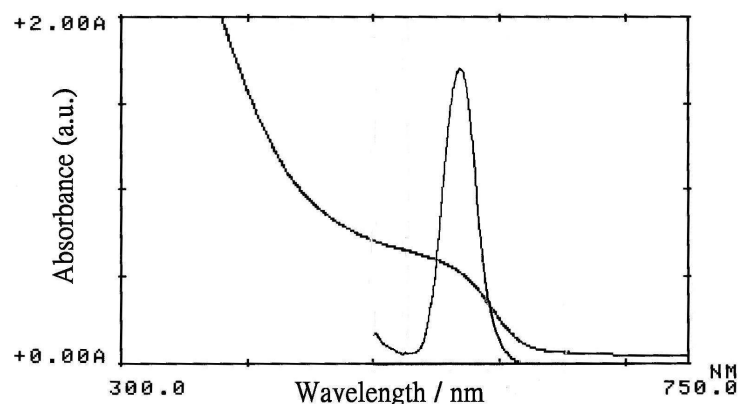


圖 3.1 CdSe QDs 的紫外/可見光吸收與螢光放射光譜

3.2 HRTEM 高解析穿透式電子顯微鏡測定

實驗中除了以 UV-visible 吸收光譜間接推算所合成的 CdSe QDs 粒徑，亦藉由高解析穿透式電子顯微鏡(High Resolution Transmission Electron Microscope ; HRTEM)來觀察實際的顆粒大小。將加熱迴流 24 小時之 CdSe QDs 經透析純化 9 小時後，取 5 μ L 滴至導電的鍍碳銅網上，放置於 50 $^{\circ}$ C 烘箱中乾燥，確保鍍碳銅網上無水分殘留，再藉由東海大學物理系之 HRTEM 觀察 CdSe QDs 的實際粒徑。HRTEM 的電子束加速電壓為 200 kV，放大倍率為 800 k 倍，影像顯示於圖 3.2。經過比例量測，CdSe QDs 之粒徑約為 5 nm。

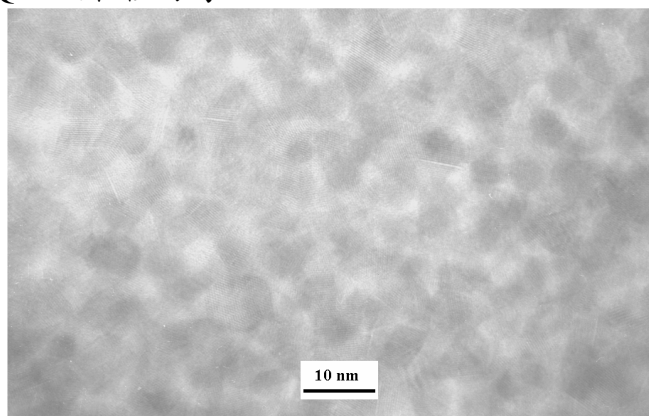
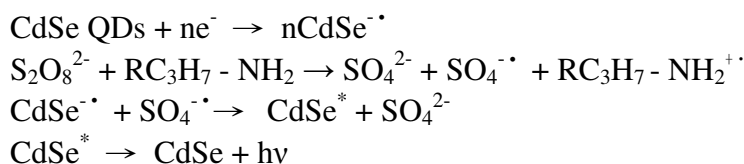


圖 3.2 CdSe QDs 的 TEM 圖

3.3 CdSe QDs/anti-ferritin 修飾金電極之 ECL 行為

將 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/ferritin antibody 修飾金電極置於含有 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸 (pH 7.0) 緩衝溶液中，在 -0.5 ~ -1.5 V 電位範圍內以 0.1 V/s 的速率進行循環伏安掃描，並同時記錄 ECL 訊號，結果顯示於圖 3.3。圖 3.3 curves a、b 及 c 分別是以 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs、CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/ APS 與 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/ferritin antibody 修飾於金電極表面置於電解質溶液中所得的 ECL 訊號圖。相較於未添加 APS 之 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs 修飾金電極 (curve a)，添加 APS 使 ECL 訊號增加約 20 倍 (curve b)。於 3.4 節中提到的胺類化合物是以電性作用力吸附至 QDs 表面，而 APS 則以矽烷基和 QDs 的羧基共價鍵結，因此具有活性的胺基能催化 CdSe QDs 與 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 的反應，使得 CdSe QDs ECL 增強。文獻證實³¹，若以 mercaptopropyltriethoxysilane (MPS) 取代 APS，即將

APS 上的 NH₂ 置換成 SH，則 MPS 修飾電極所產生的 ECL 訊號強度明顯下降，主要是因為 SH 會增大電極表面的電阻，阻礙 CdSe QDs 與溶液中 S₂O₈²⁻ 的反應。由此可知，NH₂ 在催化 CdSe QDs 與 S₂O₈²⁻ 反應中扮演了重要的角色。其反應機制如下：



比較圖 3.3 中 curves b 與 c，電極表面連接 ferritin antibody 使 CdSe/TGA QDs ECL 訊號再增加約 30%，推測應是 CdSe QDs 經 TGA 修飾後表面帶有羧基 (COO⁻)，可以與 ferritin antibody 上的胺基以靜電作用力及共價方式結合^{32,33}，使得 CdSe/TGA QDs 表面形成新的型態，不僅能彌補 CdSe/TGA QDs 的表面缺陷，也能消除 CdSe/TGA QDs 表面上的非輻射再結合區 (nonradiative recombination center)，進而提升輻射結合率，增加 ECL 發光效率。

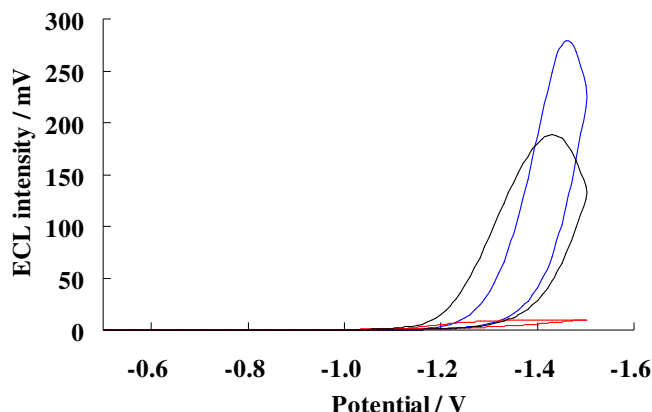


圖 3.3 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/ferritin antibody 修飾金電極之 ECL 訊號圖

- 工作電極： (a) CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs 金電極
 (b) CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS 金電極
 (c) CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/ferritin antibody 金電極

3.4 CdSe QDs/anti-ferritin antibody 修飾金電極應用於 ferritin 抗原之分析

3.4.1 Ferritin antibody 與 ferritin 反應時間之探討

根據文獻報導^{31,34}，抗原抗體經免疫反應所生成的免疫複合體 (immunocomplex) 會影響 QDs 與 S₂O₈²⁻ 間的作用，進而抑制 ECL 訊號。由於免疫複合體增加了電極表面的立體障礙，造成 S₂O₈²⁻ 傳輸至電極表面的困難度增加，且降低了自由基離子在電極表面的電子交換速率，導致 ECL 訊號衰減。圖 3.4 顯示 ferritin 抗原抗體於 37 °C 環境下反應時間對 ECL 訊號之影響。由圖可觀察到 ECL 訊號隨反應時間增加而衰減，當反應時間達到 50 分鐘後，由於免疫反應達到完全，ECL 訊號強度趨於平穩，因此本研究後續工作選擇抗原抗體免疫反應時間 50 分鐘。

3.4.2 檢量線與分析再現性

由於抗原抗體經免疫反應所產生的免疫複合體會影響 QDs 與 S₂O₈²⁻ 間的作用，進而抑制 ECL 訊號強度，因此可藉由 ECL 訊號強度的改變進行抗原的定量分析。本研究將最佳條件下所製作的 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/ferritin antibody 修飾金電極陸續置於含有六種不同濃度之

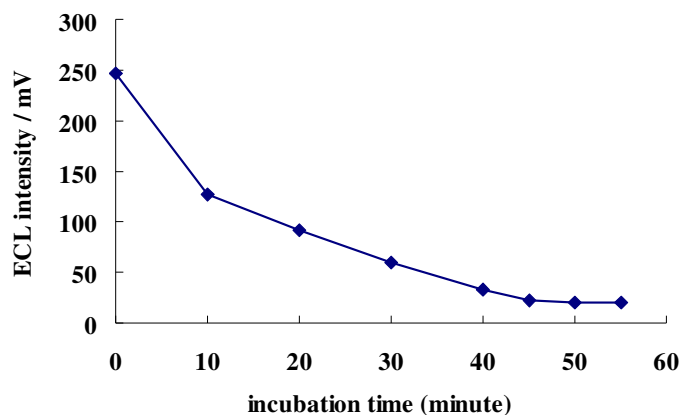


圖 3.4 抗原與抗體反應時間與 ECL 訊號強度之關係圖

ferritin 抗原標準溶液進行抗原抗體免疫反應，最後觀察 ECL 訊號的變化，結果顯示於圖 3.5(A)。

由圖 3.5(A)可觀察到 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/ferritin antibody 修飾金電極之 ECL 訊號強度隨著 ferritin 抗原濃度的增加而減小。當 ferritin 抗原濃度為 0.1 ng/ml 時，由於修飾電極表面沒有多餘的 anti-ferritin 能與 ferritin 抗原反應，因此 ECL 訊號不再衰減。

利用 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/ferritin antibody 修飾金電極偵測 ferritin 抗原濃度製作的檢量線顯示於圖 3.5 (B)。檢量線的 x 軸是將 ferritin 抗原的濃度取對數($\log C_{\text{ferritin}}$)，y 軸是添加 ferritin 抗原後的 ECL 訊號強度 (I) 相對於原始 ECL 訊號強度 (I_0) 之比值 (I/I_0)。由於 ferritin 抗原和 ferritin antibody 進行免疫反應後會消耗修飾電極表面的 anti-ferritin 含量，每當修飾電極與不同抗原濃度反應時，電極表面的抗體殘餘量皆會不同，無法直接利用 ECL 訊號強度來偵測 ferritin 抗原的濃度，本研究利用 I/I_0 對應 $\log C_{\text{ferritin}}$ 之關係來定量 ferritin 抗原的濃度。分析 ferritin 抗原濃度檢量線範圍為：0.001~0.1 ng/ml，線性方程式為： $y = 0.4329x (\pm 0.0584) - 0.3123 (\pm 0.1156)$ ；線性相關係數 (r) 為 0.9953；偵測極限為 0.001 ng/ml。

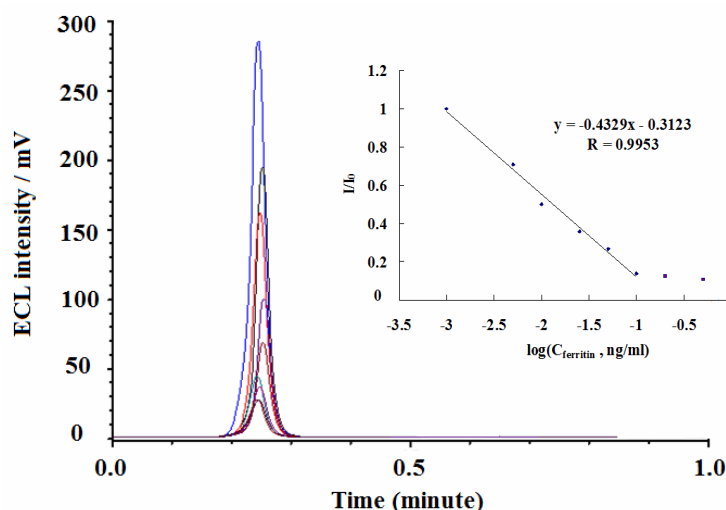


圖 3.5 (A) ECL 訊號強度與 ferritin 濃度之變化圖；(B) Ferritin 之分析檢量線

x : $\log C_{\text{ferritin}}$

y : I/I_0

I : 添加 ferritin 抗原後的 ECL 訊號強度

I_0 : 原始 ECL 訊號強度

為檢驗所製作的 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/ferritin antibody 修飾金電極間之再現性，利用七支不同電極於 ferritin 抗原濃度為 0.001~0.1 ng/ml 範圍內分別製作七條檢量線，比較七條檢量線之斜率差異，結果顯示於表 3.1，七支電極斜率的 RSD 為 5.9%，具有很好的再現性。再比較不同電極間之一致性，利用三支不同電極測量濃度為 0.025 ng/ml 之 ferritin 抗原，結果的 RSD 為 4.3%，證實不同電極之間 (electrode - to - electrode) 差異不顯著，具有很好的再現性。

表 3.1 CdSe QDs/anti-ferritin antibody 修飾金電極之再現性

電極編號	檢量線	相關係數 (r)
1	$y = 0.4349x - 0.3173$	0.9977
2	$y = 0.4379x - 0.3339$	0.9913
3	$y = 0.3951x - 0.1996$	0.9977
4	$y = 0.4147x - 0.2830$	0.9946
5	$y = 0.4766x - 0.4406$	0.9873
6	$y = 0.4231x - 0.2790$	0.9931
7	$y = 0.4456x - 0.3329$	0.9896

3.5 CdSe QDs/anti-ferritin antibody 修飾網版印刷碳電極應用於 ferritin 抗原之分析

3.5.1 Ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極偵測 ferritin

研究發現，由單一電極分別浸泡不同濃度標準溶液製作的檢量線與不同濃度標準溶液分別由多支電極浸泡製作的檢量線，當抗原濃度越大時，兩種偵測方法所測得的 I/I_0 值有明顯不同。比較利用兩種檢量線分析已知濃度標準溶液 (ferritin 濃度 20.0 ng/mL) 結果，使用多支電極製作之檢量線提供較好的準確度，因此更改檢量線製作方式為每一濃度標準溶液使用三支修飾電極偵測並計算 I/I_0 平均值。為確認前述 QDs 結合網版印刷碳電極可發展出具有優勢之 biosensor，僅將修飾碳電極最後所鍵結之抗體更改為 ferritin-Ab，其餘條件並未更動，直接進行 ferritin 標準樣品檢量線的製作，結果顯示於圖 3.6。修飾碳電極對 ferritin 的檢量範圍為 1.0~250.0 ng/mL，線性相關係數 $R^2 = 0.9915$ 。

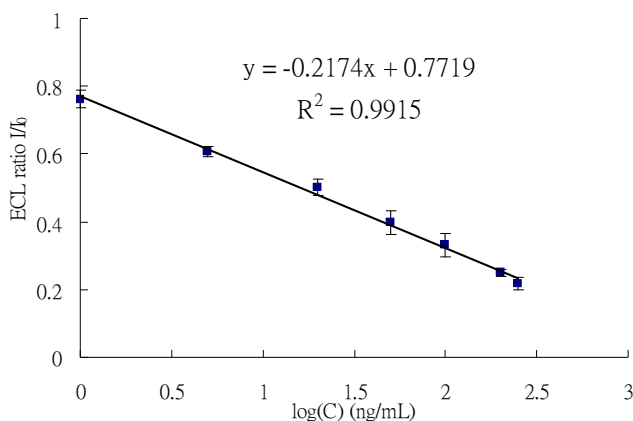


圖 3.6 Ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極偵測 ferritin 之檢量線

抗原-抗體反應 10 分鐘；掃描速率：0.1 V/s；掃描範圍：-0.8~-1.8 V；PMT 施加電位：-600 V
 x ：ferritin 濃度取對數 ($\log(C)$)； y ： I/I_0 ，每一數據點為 3 支電極偵測平均值

I ：電極與 ferritin 抗原反應後的 ECL 訊號強度； I_0 ：電極與 ferritin 抗原反應前的 ECL 訊號強度

3.5.2 稀釋 30 倍抗體修飾電極偵測 ferritin 之檢量線

本研究對人類血清樣品直接進行分析。將修飾碳電極浸泡於 200 μL 血清，在 37°C 反應 10 分鐘後進行 ECL 偵測。理論上修飾碳電極經免疫反應後，其 ECL 值應隨分析物濃度增加而下降，但實驗發現電極浸泡過血清後 ECL 值反而增加，推測原因可能為血清基質中有干擾物存在。嘗試在血清中添加已知濃度 ferritin 標準溶液，並改變抗體及血清稀釋倍率，以 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.2) 稀釋，觀察是否可以改善偵測。經多次實驗，發現將 reduced ferritin-Ab 溶液濃度 0.5 ng/mL 稀釋 30 倍後，偵測稀釋 50 倍的血清樣品，其 ECL 可如預期下降。因此更改電極製作條件為滴覆 5 μL 抗體濃度 16.7 $\mu\text{g/mL}$ (稀釋 30 倍後) 的溶液 16 小時，圖 3.7 為以低濃度抗體修飾電極偵測 ferritin 之檢量線。此檢量線為 ECL 訊號變化 (I/I_0) 對應抗原濃度作圖，其 x 軸與圖 3.6 修飾網版印刷碳電極偵測 ferritin 之檢量線 x 軸不同。圖 3.7 中 x 軸為 ferritin 濃度 (C)，而圖 3.6 中 x 軸為 ferritin 濃度取對數 ($\log(C)$)。若在圖 3.6 中直接以 ferritin 濃度作圖，會呈現指數下降趨勢。推測因為電極表面鍵結抗體濃度下降，結合抗原產生免疫複合體的速率可能變慢，造成 ECL 下降比例 (I/I_0 值) 對應 ferritin 濃度的減小。圖 3.7 檢量範圍為 0.1~20.0 ng/mL，偵測極限為 0.07 ng/mL。本研究後續將以此檢量線為偵測人體血清樣品之依據。

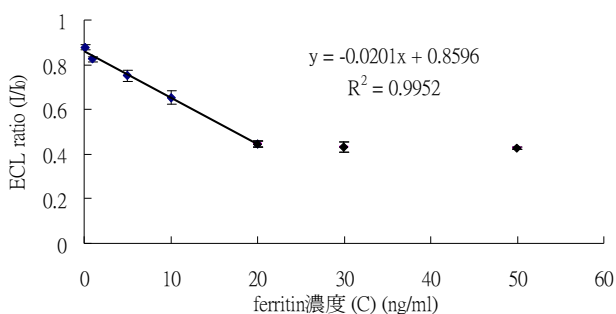


圖 3.7 低濃度抗體修飾電極偵測 ferritin 之檢量線

3.5.3 Ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極干擾之探討

為探討 ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極在分析人體血清樣本時可能遭遇之干擾，本研究進行標準添加的實驗。圖 3.8 為一男性自願者之血清中分別添加 0~15.0 ng/mL ferritin 標準溶液，以 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.2) 稀釋 50 倍，在上述最佳條件下進行 ECL 偵測定量。與圖 3.7 比較可發現兩條檢量線斜率幾乎一樣，表示基質干擾甚微，證明樣品稀釋 50 倍後可以避免基質干擾。

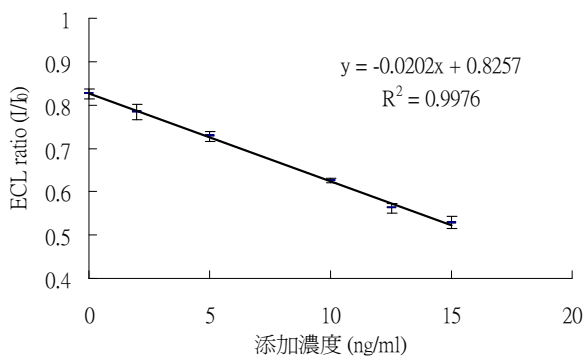


圖 3.8 網版印刷碳電極偵測人血清中 ferritin 之標準添加檢量線

本研究亦進行了其它干擾物的影響測試。在人體血液中可能干擾偵測 ferritin 的 5 種物質包括：(1)

人血清白蛋白(Human Serum Albumin ; HSA)^[72, 73]; (2) 甲型胎兒蛋白(Alpha-Fetoprotein ; AFP)^[74]; (3) 血紅蛋白(Human Hemoglobin ; Hgb)^[75]; (4) 輸鐵蛋白(Human Transferrin ; HTF)^[76]; (5) 氯化鐵(Ferric Chloride ; FeCl₃)，為模擬當血清中含有大量游離鐵時對修飾網版印刷碳電極偵測 ferritin 之影響所添加的鐵質來源。

將 5 種可能干擾的物質依其在人體的濃度分為低、中、高三等級分別添加在 ferritin 標準水溶液中，稀釋 50 倍，ferritin 標準水溶液稀釋後濃度為 5.0 ng/mL，進行 ECL 偵測（每一干擾濃度皆測量 3 次），觀察對分析 ferritin 的影響，結果列於表 3.2。由表 3.2 可知，5 種可能干擾物中除了 HSA 和 Hgb 在高濃度時有些微影響，其餘 3 種可能干擾物於低、中、高濃度均無任何影響。根據文獻報導^[73]，HSA 結合 CdTe/TGA QDs 會使 PL (photoluminescent)發光強度隨著 HSA 濃度增加而增大，因此推論當血清樣品中 HSA 濃度若過高，會造成本方法結果產生負偏差。但由標準添加實驗可知，一般人體正常含量 HSA 經 50 倍稀釋後，對本分析方法影響甚微，不具干擾。AFP 與 HSA 在結構上十分類似，有可能造成干擾，但結果顯示干擾不嚴重。在成人血清中，AFP 含量本來就少，因此分析正常成人血清樣品不會出現干擾。需注意的是，當應用本分析方法於嬰幼兒血清分析時，血清的稀釋倍率應適當增加。Hgb 濃度於 100 μ g/mL 時，本方法分析結果有明顯的正偏差，可能是因為 Hgb 與 ferritin 結構類似，均為球狀蛋白，且中心都有鐵氧化還原中心，導致抗原-抗體免疫反應辨識錯誤。由於 Hgb 存在於紅血球內，在一般情形下血清樣品不可能有高濃度的 Hgb 存在，因此不會對本方法有嚴重干擾，唯需注意血清樣品中不可有溶血情形發生。當血清中含有高濃度的游離鐵時，亦不會對本偵測方法有顯著影響，且人體血清中游離鐵含量很少，因此不會干擾修飾電極的偵測。

表 3.7 可能干擾物對分析 5.0 ng/mL ferritin 的影響

	干擾物濃度	Ferritin 偵測濃度 (ng/mL)	誤差%
Human Serum Albumin	0.5 mg/mL	4.97	-0.7%
	1.0 mg/mL	5.12	2.4%
	2.0 mg/mL	4.44	-11.3%
Alpha-Fetoprotein	20.0 ng/mL	4.90	-2.1%
	80.0 ng/mL	5.18	3.6%
	160.0 ng/mL	5.09	1.8%
Human Hemoglobin	25.0 μ g/mL	5.11	2.3%
	50.0 μ g/mL	5.24	4.7%
	100.0 μ g/mL	5.52	10.3%
Human Transferrin	0.2 μ g/mL	5.14	2.9%
	2.0 μ g/mL	4.89	-2.2%
	20.0 μ g/mL	5.18	3.7%
Ferric Chloride	0.2 μ g/mL	5.11	2.2%
	2.0 μ g/mL	5.15	3.1%
	20.0 μ g/mL	4.86	-2.7%

3.5.4 真實樣品分析比對

為評估 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極進行人體血清分析的準確性，使用商品化 Ferritin ELISA kit (三明治型, ALPCO 公司產品) 分析相同樣品以做比較。將製備好的修飾碳電極浸置於 200 μ L 稀釋 50 倍血清中，於 37°C 反應 10 分鐘。本研究進行 10 個人體血清樣品的分析，每個樣品分別利用 3 支不同電極重複測量 3 次，實驗結果顯示於表 3.3。

表 3.3 以 QDs ECL biosensor 與 ELISA 分析人體血清中 ferritin 含量

樣本編號	QDs ECL Biosensor		ELISA		誤差
	ferritin 濃度	S.D.	ferritin 濃度	S.D.	
1	10.48	5.26	11.51	0.63	-8.9%
2	11.84	4.33	13.42	1.06	-11.8%
3	38.09	7.41	34.30	2.31	11.0%
4	47.48	1.24	43.51	2.72	9.2%
5	66.03	7.14	62.23	0.88	6.1%
6	70.27	5.24	63.64	0.78	10.4%
7	64.35	5.25	70.92	5.25	-9.3%
8	81.50	8.79	89.28	8.76	-8.7%
9	140.25	10.62	130.57	4.21	7.4%
10	165.99	11.28	177.13	2.90	-6.3%

濃度單位：ng/mL；每一血清樣品分別以兩種方法分析，重複 3 次 (n = 3)

ELISA 分析則使用未經稀釋的血清樣品。商品化 ELISA kit 是利用兔子的多株抗體(一級抗體)當作固定相，分析時加入血清樣品，ferritin 會與一級抗體結合。再加入與酵素結合的二級抗體(老鼠產生的單株抗體)，此兩抗體會將 ferritin 夾在中間(故稱為三明治式 ELISA)，最後加入酵素受質反應後呈黃色，在 450 nm 波長下測其吸收值，進而求出 ferritin 濃度^[71]，結果亦列於表 3.3。表 3.3 中樣品編號 1~5 為女性，6~10 為男性，均為健康的成年男女。兩種方法的分析結果皆落在正常範圍值(男：20-250 ng/mL；女：10-120 ng/mL)內，且兩方法偵測值亦十分相近。若以 ELISA 分析結果為標準值，QDs ECL biosensor 分析結果之誤差大多在 10% 以內，顯示本方法分析結果應為可靠。

將 QDs ECL 結果置於 y 軸，ELISA 結果置於 x 軸，可顯示 QDs ECL 結果對 ELISA 結果相關性，如圖 3.9。圖中迴歸線方程式為 $y = 0.9618x + 2.6396$ ($R^2 = 0.9834$)。經過計算，斜率與截距在 95% 信心程度下的信心範圍(confidence interval)分別為斜率：0.8608~1.0628，此範圍包含 1；截距：-5.9743~11.2535，此範圍包含 0，顯示本方法無系統誤差，且由線性相關係數趨近於 1，可知 QDs ECL 分析方法與 ELISA 方法兩者對偵測相同樣品之結果有相當高的一致性。由表 3.3 與圖 3.9 顯示本方法有不錯的準確性。

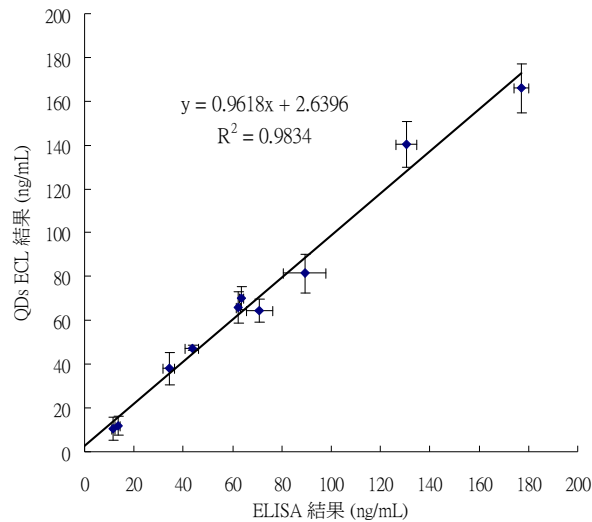


圖 3.9 兩種方法分析 10 個人體血清中 ferritin 結果之相關性測試
 每一數據點為分別以兩種方法分析 3 次取平均值 (n = 3)。
 Error bar 為 3 次分析結果之標準偏差。

四、結論

本研究使用 CNT-CHIT 溶液塗覆於金電極與網版印刷碳電極表面，形成具正電性高分子膜，藉電性吸附將負電性 CdSe/TGA QDs 修飾於電極表面，再利用 APS 及 SMCC 當作交聯劑結合 ferritin 抗體，製作出 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/ferritin-Ab 薄膜修飾電極。利用抗原-抗體的專一特性，可以定量分析 ferritin，發展 QDs ECL 生物感測器。CdSe QDs/ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極對稀釋 30 倍人類血清中 ferritin 的檢量範圍為 0.1~20.0 ng/mL ($R^2 = 0.9952$)，偵測極限 0.07 ng/mL，適用於人體血清中 ferritin 正常含量範圍。研究亦利用標準添加法觀察 5 種可能的干擾物對 QDs ECL 感測器方法分析 ferritin 之影響，結果顯示干擾甚微。比較 QDs ECL 感測器方法和 ELISA 方法分析 10 個志願者血清中的 ferritin 含量，在 95% 信心程度下，分析結果有相當高的一致性，誤差亦在合理範圍。本研究成功發展 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極為基礎的 QDs ECL 感測器，其具有高靈敏度，高準確性，低干擾，且成本低廉，可大量製備等優點。

五、參考文獻

1. 丁志明等編著，奈米科技-基礎、應用與實作-(初版)，高立圖書有限公司，2005
2. 周靜怡，II-VI 族半導體奈米晶粒(量子點)之合成與光學性質分析，國立交通大學碩士論文，2003
3. 謝嘉民、賴一帆、林永昌、枋志堯，光激發螢光量測的原理、架構及應用，國家奈米元件實驗室奈米通訊，2005, 12, 28~39
4. 張銘宏，半導體量子點光學特性研究，國立東華大學碩士論文，2005
5. 楊智惠、黃耿祥、王英基、林裕城，量子點彩紅標籤，科學發展，2008, 422, 46~49
6. J. Rodriguez-Viejo, K.F. Jensen, H. Mattoussi, J. Michel, B. Dabbousi, M.G. Bawendi, *Appl. Phys. Lett.* 1997, 70, 2132.
7. S.K. Poznyak, D.V. Talapin, E.V. Shevchenko, H. Weller, *Nano Lett.* 2004, 4, 693.
8. G.Z. Zou, H.X. Ju, *Anal. Chem.* 2004, 76, 6871.
9. S.N. Ding, J.J. Xu, H.Y. Chen, *Chem. Commun.* 2006, 3631.

10. J.Z. Kang, H. Wei, W.W. Guo, E.K. Wang, *Electrochem. Commun.* 2007, 9, 465.
11. H. Jiang, H.X. Ju, *Chem. Commun.* 2007, 404.
12. H. Jiang, H.X. Ju, *Anal. Chem.* 2007, 79, 6690.
13. Y.C. Liu, R. Brandon, M. Cate, X.G. Peng, R. Stony, M. Johnson, *Anal. Chem.* 2007, 79, 8796.
14. G.F. Jie, B. Liu, H.C. Pan, J.J. Zhu, H.Y. Chen, *Anal. Chem.* 79, 5574.
15. R.J. Cui, H.C. Pan, J.J. Zhu, H.Y. Chen, *Anal. Chem.* 2007, 79, 8494.
16. X. Liu, H. Jiang, J.P. Lei, H.X. Ju, *Anal. Chem.* 2007, 79, 8055.
17. T. Masuda, F. Goto, T. Yoshihara, B. Mikami, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 400, 94.
18. Y. Yoshino, Y. Hirai, T. Aoki, T. Morita, Y. Eguchi, T. Yajima, Y. Kagawa, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1980, 26, 87.
19. R. J. Poison, J. G. Kenna, I. P. Shears, A. Bomford, R. Williams, *Clin. Chem.*, 1998, 34, 661.
20. D.G. Spillane, J.O. Mullane, *Clin. Chim. Acta*, 1998, 273, 81.
21. S.S. Zhang, K. Jiao, H.Y. Chen, M.X. Wang, *Talanta*, 1999, 50, 95.
22. S.F. Chou, W.L. Hsu, J.M. Hwang, C.Y. Chen, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 453, 181.
23. S.F. Chou, W.L. Hsu, J.M. Hwang, C.Y. Chen, *Biosen. Bioelectron.*, 2004, 19, 999.
24. S.F. Wang, Y.M. Tan, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387, 703.
25. X. Yang, R. Yuan, Y.Q. Chai, Y. Zhuo, C.L. Hong, Z.Y. Liu, H.L. Su, *Talanta*, 2009, 78, 596.
26. J.J. Ren, D.P. Tang, B.L. Su, J. Tang, G.N. Chen, *Nanoscale*, 2010, 2, 1244.
27. G.F. Jie, J.J. Zhang, D.C. Wang, C. Cheng, H.Y. Chen, J.J. Zhu, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 4033.
28. D.L. Klayman, T.S. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, 10, 197.
29. 劉又榕，量子點表面改質與生物分子的鍵結，*中原大學碩士論文*，2005
30. W.W. Yu, L.H. Qu, W.Z. Guo, X.G. Peng, *Chem. Mater.*, 2003, 15, 2854.
31. N. Myung, Z. Ding, A.J. Bard, *Nano Lett.*, 2002, 2, 1315.
32. G.F. Jie, B. Liu, H.C. Pan, J.J. Zhu, H.Y. Chen, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 5574.
33. S. N. Sharma, Z. S. Pillai, P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 10088.
34. G.F. Jie, P. Liu, S.S. Zhang, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 1323.