

壹、緒論

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。

用能階 (能帶理論)的概念可以解釋塊材與小尺寸粒子的性質變化。當無數原子構成固體時，個別原子的能階合併成能帶，由於數目眾多，能帶中能階的間距很小，因此能階可以看成是連續的。對介於原子、分子與大塊固體之間的奈米顆粒而言，大塊材料中連續的能帶將隨著粒子尺寸減小而分裂為獨立的能階。能階間的最高電子佔據分子軌域與最低電子未佔據分子軌域的能階差 (能隙) 會因電子能階密度改變而增大，所以奈米顆粒的物性與一般塊材不同。這種因電子能階呈非連續化及能隙變寬造成光、電、磁等巨觀物理性質發生改變的現象稱為量子尺寸效應。微觀奈米顆粒本身，由於尺寸變小，造成電子能階分散與晶格排列混亂，進而重排表面晶格，使得粒子出現表面效應及交互作用力的改變，產生一系列新奇的性質^[6]。

表面效應^[6]

奈米粒子隨尺寸越小形狀越趨於球形，球形粒子的表面積與直徑的平方成正比，其體積與直徑的立方成正比，故其比表面積 (表面積/體積) 與直徑成反比。隨著顆粒直徑變小，比表面積將會顯著增大，表面原子所占的百分比亦會顯著地增加。表面效應即是因比表面積增大，表面原子數增加，使粒子性質產生變化的現象。由於表面原子數增加使得表面狀態改變，例如：晶格配位數 (coordination number) 不完全、懸空鍵 (dangling bond) 數目增加，使表面晶格混亂容易重

排。總體而言表面效應造成粒子具有較低的表面張力與活化能，較高的表面位能及反應活性，因此隨著粒徑下降，粒子的比表面積及反應活性^[7]亦隨之增加。

量子尺寸效應^[6]

奈米粒子尺寸縮小至一定程度後其物性與一般塊材截然不同，以下分為光、電、磁、力、熱五大物理性質簡單介紹：

a. 光性質：

(1) 當金屬粒子縮小至奈米等級，其對可見光吸收增強且反射率降低，故金屬奈米粒子多數為黑色。(2) 由於奈米粒子比表面積大，導致平均配位數下降、不飽和鍵增多，造成鍵的振動模式多樣化，吸光的頻率大為增加，形成寬廣的吸收峰。(3) 因量子侷限效應，奈米粒子的電子平均自由徑被侷限於很小的範圍，使激子容易結合進而發光。奈米粒子之能隙會隨粒子尺寸而變化，所以粒子的放射波長可任意調整。

b. 電性質：

(1) 奈米金屬中的自由電子平均自由徑會隨粒徑變小而減少，使金屬導電性下降，由導體變成絕緣體。(2) 奈米半導體的介電常數有明顯尺寸效應，在臨界尺寸時有極大值，大於或小於臨界尺寸時，介電常數均會下降。

c. 磁性質：

奈米粒子與塊材之間的磁性行為差異主要有 4 點：(1) 超順磁性的出現：當具有磁性的粒子小於某個尺寸時，因磁各異向力減小而無法抵抗粒子熱能的運動，導致其磁化性質與順磁體相似。(2) 磁性

的變化：當粒子小於某個尺寸時，某些具有反磁性的的粒子會反轉磁性為順磁性，例如 Sb 奈米粒子。(3) 居禮溫度的下降：磁性物質溫度達居禮溫度後會失去磁性，為磁性材料的重要參數。居禮溫度代表磁性元件的工作溫度極限。(4) 磁矯頑力 (coercive force) 的上升：磁性材料大小下降到奈米尺寸會具有高矯頑力，矯頑力是磁性材料經過磁化後再經過退磁使其餘磁性 (剩餘磁化強度) 降低到零的磁場強度，即為消除餘磁所需外加的反向磁場大小。

d. 力性質：

奈米材料的力學性質往往與溫度有關，但一般而言由於高比例表面原子的配位不足及極強的凡德瓦爾力，使得奈米材料之強度、硬度、延展性及韌性大致隨著粒子粒徑減小而大幅提升。

e. 熱性質：

奈米材料之熱學性質變化主要有 (1) 熱傳導係數：當奈米材料製成薄膜時，熱傳導係數隨著薄膜厚度減少而下降；當為奈米流體(流體中加入奈米粒子)，熱傳導係數則顯著提升。(2) 比熱上升。(3) 熔點下降：金屬奈米粒子因表面效應表面活化能較大，熔點一般隨尺寸下降而下降，但對錫而言其熔點反而較塊材上升，是因為其奈米結構與塊材有很大差異。

1.2 量子點 ECL 的機制

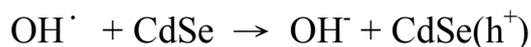
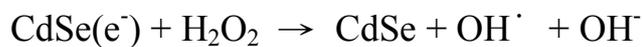
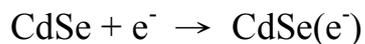
QDs 放光除了可用光子激發(photoluminescence)外，也可藉化學反應(chemiluminescence)或電化學(electrochemiluminescence) 反應產生激子而放光。

早期的 QDs 通常是在有機溶劑中合成為非水溶性粒子^[8, 9]，使用上有諸多限制，特別是在生化領域，因此進行 QDs 的 ECL 實驗十分麻煩。近年來合成水溶性 QDs 的方法發展迅速^[10, 11, 12]，由 QDs 產生之 ECL 研究為近年來一個熱門的主題。由於 QDs 具親水性，在生物感測和生物標示領域^[13, 14, 15]的應用也大幅提高。

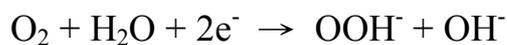
QDs 的陰極 (cathodic) 與陽極 (anodic) ECL 現象^[16]均有文獻報導，水溶液中 QDs 的 ECL 產生往往需要在 O₂、H₂O₂ 或 S₂O₈²⁻ 等共反應物 (coreactant)^[17, 18, 19, 20] 存在下形成電子-電洞對才能發光。

以 Zou 報導^[17] CdSe QDs 在 H₂O₂ 和 O₂ 共存條件下的陰極 ECL 為例，QDs 先在 paraffin-impregnated graphite electrode (PIGE) 電極上還原成 CdSe(e⁻)，CdSe(e⁻)再與 H₂O₂ 反應生成 OH[·] 自由基，OH[·] 自由基會注入一個電洞(h⁺)至 CdSe，形成 CdSe(h⁺)，當 CdSe(e⁻)與 CdSe(h⁺)結合時形成 CdSe^{*} 激發狀態，再以放光形式釋能。此外當水中有溶氧 (O₂) 時，O₂ 在施加負電位的電極表面形成 OOH⁻ 產物，OOH⁻ 亦會與 CdSe 反應產生 CdSe^{*} 而放光，其反應機構如下：

【Scheme 1】



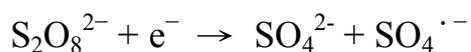
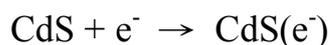
Or





在 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 存在下的 CdS QDs ECL 反應亦曾被報導^[18]，其反應機制如下：

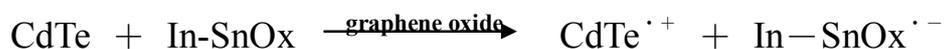
【Scheme 2】

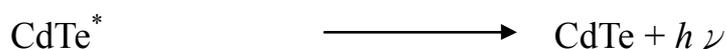
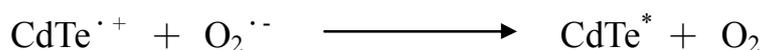
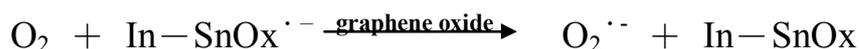


反應機制顯示當電極施加負電壓掃描時，電極上 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 被還原成 SO_4^{2-} 和 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ ，同時 CdS 被還原成 $\text{CdS}(e^-)$ 。 $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 為強氧化劑，可與未還原的 CdS 反應，使 CdS 被注入一個電洞形成 $\text{CdS}(h^+)$ ，當電子-電洞對再結合時，放光釋能產生 ECL 訊號。

上述 QDs ECL 報導均屬陰極 ECL 反應機制，即電極在負電位掃描下可觀察到放光現象。2007 年，Liu 等人^[19]發現在 O_2 共存下，於氧化銦-錫（Indium-Tin Oxide；ITO）薄膜電極表面可產生 CdTe QDs 的陽極 ECL。2009 年，Li 等人^[20]報導使用 graphene oxide (石墨大環氧化物) 可使 CdTe 陽極 ECL 訊號強度大幅增加，其反應機制如下：

【Scheme 3】





反應機制顯示 ITO 電極在陽極 ECL 放光步驟中扮演一個 QDs 與 O_2 間的電子傳遞者，電極表面分別形成 $\text{CdTe}^{\cdot+}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，最後電子-電洞對結合放光。以上的反應機制顯示水溶液系統中 QDs 的 ECL 需要共反應劑存在，形成自由基離子，誘使電子-電洞對產生並進行再結合而放光。同時，不論施加正或負電壓均會產生 ECL，由此可以設計出偵測自由基離子或利用自由基離子間接偵測其他分析物的感測器^[17, 18, 19, 20]。

1.3 網版印刷電極

傳統固態電極在電化學分析應用上容易遭遇到的問題包括：電極價格昂貴、再現性不佳、易受污染而鈍化、電極再生不易等，而網版印刷電極能夠彌補這些缺點。網版印刷電極相較於傳統電極具有低成本、不怕污染、製作簡單以及可拋棄等優點^[21]，因此在化學分析上更具實用意義以及商業價值。網版印刷電極(screen-printed electrode；SPE)是結合電腦製版及現代印刷技術，將設計出的電極利用不同的印刷膠體(碳、金、銀、銅)，印製在適當的材質上(PP 或 PVC 紙板)，圖 1.1 為網版印刷電極之構造簡圖。經過電腦製版及自動網版印刷，現已能夠快速大量地製作各種類型的網版印刷電極，廣泛地應用在各領域。包括：生化感測器、環境檢測、藥物與化妝品管制...等^[22, 23, 24, 25]。網版印刷電極的另一個發展空間則在於與高效液相層析法

(HPLC)^[26]、流動注入系統(FIA)^[27, 28, 29]、或毛細管電泳分離技術(CE)^[30, 31, 32]結合，做為電化學偵測器的工作電極。

1.4 分析物簡介

1.4.1 嘉磷塞 (glyphosate)

嘉磷塞(glyphosate ; Gly)是農業上及日常生活中常見的除草劑，一般市面上各種除草劑如：年年春、日日春、大地春、一路春等主要成分皆為嘉磷塞異丙胺鹽(glyphosate-isopropylamine)。Gly 在水中溶解度高於其在有機溶劑中，但也僅有 1.2%，轉化成鹽類可大幅增加溶解度。Gly 於 1971 年被 Franz 發現具有除草效果，屬於系統性、非選擇性萌後廣效型除草劑，對深根性多年生之雜草效果極佳，為目前除草劑中使用量最大之商品。其結構與基本特性列於表 1.1^[33]。

除草劑必須經過植物吸附 (adsorption)、傳導(translocation)，達到作用目標 (target site) 產生作用，才能造成雜草的死亡。以 Gly 作用機制為例：藥劑經由根葉吸收後，快速傳導至整株植物，藉由抑制植物體內的酵素，例如：shikimate kinase 及 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)^[34]，阻斷植物體內代謝物之形成，造成植株死亡達到除草效果。Gly 所抑制的是植物特有的酵素^[34]，對動物的危害性不高，但其對野生植物的群落生長結構和物種的組成有很大的影響，此影響會進一步造成野生動物生活棲地消失被迫遷移，產生環境的污染與破壞^[35]。

儘管 Gly 對動物毒性影響較低，但長期攝取含有微量殘留農藥的食物仍然會造成慢性危害。為保障消費者的健康，各國均訂定出符合

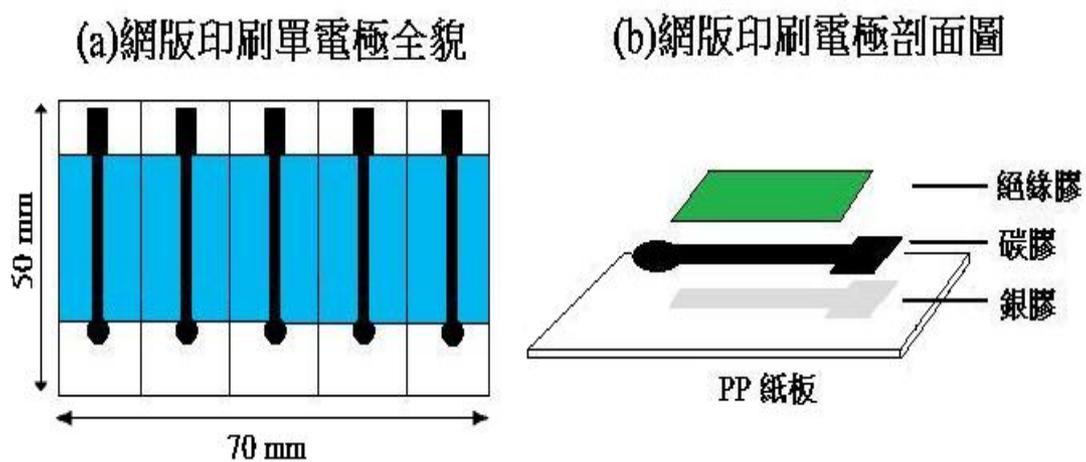
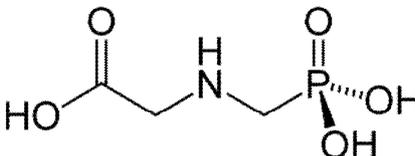


圖 1.1 網版印刷電極之構造簡圖。(A) 網版印刷單電極全貌；(B)

網版印刷電極剖面圖

表 1.1 GLY 的結構式與基本特性^[33]

理化特性	分子結構：
	
	化學名稱：N-(phosphonomethyl)glycine
	分子式：C ₃ H ₈ NO ₅ P
	分子量：169.08
	物理形態：固態、無味
	密度：0.5 g/cm ³
	熔點：200°C
生理特性	蒸氣壓：低
	溶解度：1.2%(於 25°C 水中)，對其它溶劑大多不溶
	吸收性：植物根葉均可快速吸收
	傳導性：可快速運送至各植物地上器官
環境汙染性	代謝性：在植物中代謝較慢，土中較快
	藥性：廣效性接觸型除草劑
	光分解性：低
	揮發性：低
	土壤吸附性：強
生物毒性	土壤淋失性：弱
	微生物分解性：強
	哺乳類及野生動物：低
	蜜蜂：低
	水中生物：低

農藥使用原則下，殘留在食品或農產品中之最大殘留容許量 (maximum residue level ; MRL)，表 1.2 為我國行政院衛生署最新公告對 Gly 在各農產品、放流水及飲用水的 MRL^[36]。

1.4.2 嘉磷塞分析方法

Gly 的分析多以氣相層析(GC)、高效能液相層析(HPLC)和毛細管電泳(CE)為主^[34]。就結構而言，Gly 為 2 級胺類含磷的化合物，不具揮發性且無發色團，進行上述層析及電泳時大多需先經過複雜的衍生化反應，使 Gly 衍生物具有揮發性或發色團以利分離偵測。若進行土壤或水樣中微量 Gly 分析，通常需以固相萃取方式純化或預濃縮，更增加分析步驟的繁雜性。2005 年，Gonzalez-Martinez 等人^[37]發展了捕捉 Gly 免疫複合體 (immunocomplex) 進行液相層析 (LC) - 螢光偵測的方法。作者將一定量的衍生劑、Gly 抗體、標示有 horseradish peroxidase 的 Gly (Gly-HRP) 和分析物混合，同步進行衍生反應和競爭免疫反應。再將混合物注入包含特殊固定相(protein A/G-specific immunoglobulin-binding support)之反應器捕捉 Gly 免疫複合體，最後將產物注入 HPLC 管柱並配合螢光偵測，檢量範圍為 0.05~1.0 μ g/L，偵測極限為 0.021 μ g/L。此方法結合了免疫和衍生反應，具有高度專一性及靈敏度，但仍然無法改變需先進行衍生反應的困擾。

2009 年，Songa 等人^[38, 39]使用電沉積方法於金電極表面聚合 poly-(2,5-dimethoxyaniline) (PDMA) 摻雜 poly-(4-styrene- sulfonic acid) (PSS) 高分子薄膜後，藉由靜電吸引力將 horseradish peroxidase (HRP) 固定於薄膜。HRP 可催化 H₂O₂ 還原，而 Gly 則會抑制 HRP

表 1.2 GLY 的最大殘留容許量^[36]

國家	樣品種類	MRL (ppm)
台灣	放流水	1.0
	飲用水	0.9
	毛豆	0.2
	黃豆	10
	漿果類	0.2
	小麥	5
	玉米	1.0
	甘蔗類	0.1
	米類	0.1
	柑桔類	0.1
	核果類	0.2
	茶類	0.1
	梨果類	0.2

的作用使還原電流下降，因此監測電流變化即可間接定量 Gly，檢量範圍為 0.25~14.0 µg/L，偵測極限為 1.7 µg/L。由於文獻報導以生物感測器分析 Gly^[37, 38, 39] 的研究很少，本研究嘗試利用生化免疫反應的專一性結合 QDs 的 ECL 發展分析 Gly 的新方法。

1.4.3 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^[40, 41]，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 依不同比例組合成一空心球形蛋白質，可以和 4500 個鐵原子結合，其構造顯示於圖 1.2^[42, 43]。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，表 1.3^[44, 45] 為人體血清中 ferritin 的正常值參考範圍。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

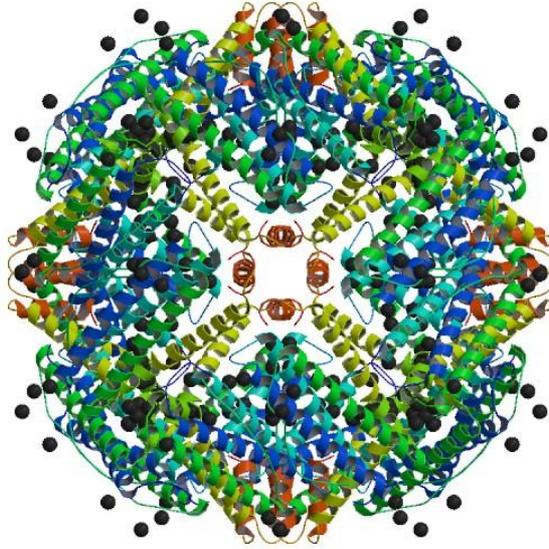
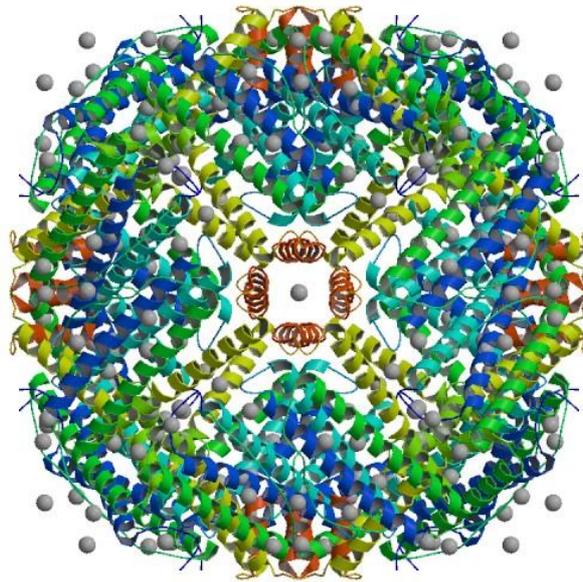


圖 1.2 (A) Structure of Human Ferritin L-Chain ^[42]



(B) Structure of Human Ferritin H-chain ^[43]

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^[41]，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^[44]，但這方面的特異性稍嫌不足，僅可搭配其他指標參考。

1.4.4 Ferritin 分析方法

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)^[46]、酵素連結免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA)^[47, 48]、伏安法(voltammetry)^[49]、石英晶體微天平法(quartz crystal microbalance；QCM)^[50]及表面電漿共振技術(surface plasmon resonance；SPR)^[51]等都曾被應用於 ferritin 的分析。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。Yoshino 等人^[46]於 1980 年發展 RIA 進行 ferritin 分析，偵測極限為 0.625 ng/mL，檢量範圍為 0.625~125 ng/mL。此

表 1.3 人體血清中 Ferritin 的正常值參考範圍^[44, 45]

成年男性	20-250 ng/mL
成年女性	10-120 ng/mL
6 個月至 15 歲之孩童	7-140 ng/mL
嬰兒,2-5 個月	50-200 ng/mL
嬰兒,1 個月	200-600 ng/mL
新生兒	25-200 ng/mL

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。1998 年 Polson 等人^[47]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。1999 年 Zhang 等人^[49]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^[50]於 2002 年利用 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。2004 年 Chou 等人^[51]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^[52, 53, 54]。2007 年，Wang 等人^[52]利用磁性奈米粒子 Fe_3O_4 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，Yang^[53]參考 Wang 的方法，改用 CuO-SiO_2 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^[54]利用類似三明治型 ELISA 的方法分析 ferritin。先以 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 磁性奈米粒子鍵結 glucose oxidase (GOD)，形成 GOD- $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 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。

上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。

1.5 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。

本論文分為兩部分，第一部份為發展 QDs 結合生化免疫修飾電極偵測 Gly，研究進行中 Gly 抗體的製造供貨商突然於 2010 年 4 月停止生產供貨，Gly 的研究被迫中斷。為繼續 QDs ECL 偵檢器之開發，臨時將分析物變更為 ferritin，電極製作流程不變，但更換分析物抗體，後續的研究結果包含於本論文第二部分。

貳、實驗

2.1 儀器設備

1. 電化學/電化學發光實驗裝置：

電化學分析儀：

CH Instruments 公司 (Austin, TX, USE) 產品，Model 635A。

電化學分析槽—20 mL 石英槽。

工作電極：

—直徑 2 mm 黃金盤式電極。

—網版印刷碳電極 NO.SE102-GH (直徑 1.5 mm)：禪譜科技股份有限公司產品。

參考電極—自製 Ag/AgCl/飽和 KCl 電極。

輔助電極—白金絲。

2. 光電倍增管 (Photomultiplier Tube, PMT)：

偵測電化學發光訊號的光電倍增管為 Hamamatsu 公司 (Hamamatsu City, Japan) 產品，Model R928。

3. 雜訊抑制器 (time constant)：

實驗室自行組裝，內含 time constant 1 秒的 RC low-pass filter ($10\text{ k}\Omega \times 100\ \mu\text{F}$)，具有過濾雜訊的功能。

4. 電流放大器：

使用 Keithley Instrument 公司 (Cleveland, Ohio, USA) Model 485 picoammeter 放大 PMT 的電流訊號，將電流轉換成電壓輸出至數

據處理系統。

5. 數據處理：

個人電腦配合訊華 (Taipei,Taiwan) 積分軟體 (Data Station)進行數據處理。

6. 酸鹼度計：

Mettler Toledo 公司 (Columbus,OH,USA) 產品，Type InLab 439。

7. 超音波震盪器：

L & R Ultrasonic 公司 (Kearny,NY,USA) 產品，Model Quantrex AG 90。

8. 天平：

日本電子科學株式會社 (Kyoto,Japan) 產品，Model AJ-100。

9. 烘箱

Kwang Shen (Taipei,Taiwan) 產品，Model KS-21。

10. 磁石攪拌器：

新光精機工業股份有限公司 (Taipei,Taiwan) 產品，Model MS-1。

11. 數位加熱攪拌器：

VWR Scientific (San Francisco,CA,USA) 公司產品，Model 400 HPS。

12. 過濾薄膜：

Titan 公司 (San Diego,CA,USA) 產品，Nylon 材質，孔徑為 0.45 μm 。

13. 注射針：

TERUMO 公司 (Tokyo,Japan) 產品，體積 3 mL，Type

DVR-3414H。

14. 透析膜：

Orange Scientific 公司 (Seguim,Texas,USA) 產品，再生纖維材質，孔徑大小為 3500 MWCO。

2.2 藥品

1. 磷酸氫二鈉 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; disodium hydrogen phosphate) : E.Merck 公司 (Darmstadt,Germany) 產品，純度 99.5%。
2. 硝酸鉀 (KNO_3 ; potassium nitrate) : E.Merck 公司，純度 99%。
3. 氫氧化鈉 (NaOH ; sodium hydroxide) : E.Merck 公司，純度 99%。
4. 磷酸 (H_3PO_4 ; phosphoric acid) : E.Merck 公司，純度 85%。
5. 過硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$; sodium peroxodisulfate) : E.Merck 公司，純度 99%。
6. 硒 (Se ; selenium) : Aldrich 公司 (St.Louis,MO,USA) 產品，純度 99.99%。
7. 硫酸鎘 ($\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$; cadmium sulfate) : J.T.Baker 公司 (Phillipsburg,New Jersey,USA) 產品。
8. 硼氫化鈉 (NaBH_4 ; sodium borohydride) : Sigma 公司，純度 > 98.5%。
9. 單壁奈米碳管 (single-walled carbon nanotube ; CNT,carboxylic acid functionalized) : Aldrich 公司，4-5 nm diam \times 0.5-1.5 μ m length，純度 80~90%。

10. 甲殼素 (Chitosan ; CHIT, MW = 60000) : Aldrich 公司。
11. 氯化鉀 (KCl ; potassium chloride) : E.Merck 公司 (Darmstadt, Germany) 產品，純度 99.5%。
12. 氯化鈉 (NaCl ; sodium chloride) : E.Merck 公司，純度 99.5%。
13. 乙硫醇酸 ($C_2H_3O_2SNa$; Thioglycolic acid ; TGA) : Sigma 公司，純度 96.5%。
14. D,L 二硫蘇醣醇 ($C_4H_{10}O_2S_2$; D,L-Dithiothreitol ; DTT) : Fluka 公司 (Steinheim, India) 產品，純度 99%。
15. (3-Aminopropyl)triethoxysilane ($C_9H_{23}NO_3Si$; APS) : Sigma 公司，純度 98%。
16. N-succinimidyl-4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate ($C_{16}H_{18}N_2O_6$; SMCC) : Fluka 公司，純度 95%。
17. 牛血清蛋白 (Bovine serum albumin ; BSA) : Sigma 公司，純度 98%。
18. 二甲亞砜 (Dimethyl sulfoxide ; $(CH_3)_2SO$; DMSO) : Sigma 公司，純度 > 99%。
19. Rabbit polyclonal anti-glyphosate : abcam 公司 (Cambridge, UK) 產品，濃度 1.0 mg/mL
20. 嘉磷塞 (N-(phosphonomethyl)glycine ; $C_3H_8NO_5P$; glyphosate) : Sigma-Aldrich 公司 (St.Louis, MO, USA) 產品，純度 96%。
21. Mouse monoclonal anti-ferritin : abcam 公司，濃度 4.37 mg/mL。
22. Ferritin antigen from human liver : Sigma 公司產品，濃度 10 μ g/mL。

23. 氯化鐵 (iron(III) chloride hexahydrate ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), E.Merck 公司產品，純度 99%。
24. 人血清蛋白 (human serum albumin ; HSA) : Sigma 公司，純度 99%。
25. 輸鐵蛋白 (human transferrin ; HTF) : Invitrogen 公司 (Carlsbad,CA,USA) 產品，濃度 4 mg/mL。
26. 甲型胎兒蛋白 (alpha-fetoprotein ; AFP) : Cell Sciences 公司 (Canton,MA,USA) 產品，純度 > 95%
27. 血紅蛋白 (human hemoglobin ; Hgb) : Cell Sciences 公司產品，純度 > 96%
28. IllustraTM NAPTM-5 Columns : GE Healthcare 公司 (Buckinghamshire,UK) 產品，pre-packed with SephadexTM G-25 DNA grade resin。
29. Sandwich-type ELISA for ferritin : ALPCO Diagnostics 公司 (Salem,Oregon,USA)產品。
30. 分子篩：先進化工實業有限公司。粒徑 3.6-4.8 mm；孔隙 3-4 Å。

2.3 實驗方法

2.3.1 CdSe QDs 的合成^[55]

(1) NaHSe 水溶液之配製^[56]

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。

(2) 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，期限為 6 個月

(3) 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^[57]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。

2.3.2 甲殼素高分子溶液之配製^[55]

取 0.25 g 甲殼素 (CHIT) 粉末配製於 40 mL 去離子水中。由於 CHIT 於中性環境下不易溶解，須加入 5 mL 0.05 M HCl 並加熱至 80~90°C，使 CHIT 完全溶解。利用 NaOH 調整溶液 pH 值至 3.5~5.0，再的去離子水稀釋至 50 mL 即為 0.5 wt% CHIT 水溶液。最後以 0.45 μ m 孔徑濾膜過濾，保存於 4°C 冰箱中。

2.3.3 儲備溶液之配製

1. 磷酸緩衝溶液：

秤取 1.7799 g Na_2HPO_4 及 1.0111 g KNO_3 以 100 mL 去離子水配製成 0.1 M 磷酸緩衝溶液，並以 NaOH 與 H_3PO_4 調整 pH 值至 7.0。

2. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液：

秤取 1.1905 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ，以 10 mL 去離子水配成 0.5 M 之儲備溶液。

3. 碳奈米管-甲殼素 (CNT-CHIT) 溶液：

秤取 1 mg 碳奈米管，以 0.5 wt% CHIT 溶液 2 mL 配製成 0.5 mg/mL CNT-CHIT 溶液，並以超音波震盪 1 小時後保存於 4°C 冰箱。

4. 平衡管柱溶液 (平衡 illustraTM NAPTM-5 Columns 之溶液)：

秤取 Na_2HPO_4 1.7798 g、NaCl 0.8065 g、KCl 0.02012 g，配製於

100 mL 去離子水中，並以 0.1 M H_3PO_4 調整 pH 值至 7.2，保存於 4°C 冰箱，期限 1 個月。

5. 儲鐵蛋白抗體 (Ferritin antibody ; Ferritin-Ab) 溶液：

取濃度為 4.37 mg/mL ferritin-Ab 溶液 57.2 μL ，並以 0.1 M 磷酸緩衝溶液 稀釋至 250 μL ，配製成 1.0 mg/mL ferritin-Ab 儲備溶液，保存於 4°C 冰箱，期限為一個月。

6. Dithiothreitol (DTT) 溶液：

取 0.0154 g DTT 加入 100 μL 0.1 M 磷酸緩衝溶液配製成 1 M 儲備溶液，置於 4°C 冰箱保存，期限為 3 天。

7. N-succinimidyl-4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate (SMCC) 溶液。

秤取 0.001 g SMCC 以 300 μL 除水 DMSO 配製成 10 mM 儲備溶液，置於 4°C 冰箱保存，期限為 3 天。SMCC 易水解，故 DMSO 須使用分子篩除水後方可使用。

8. (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APS) 溶液：

取 APS 原液 100 μL 加入 4.9 mL 除水乙醇，配製成 2% APS 儲備溶液，置於 4°C 冰箱，保存期限為 3 天。由於 APS 極易水解，乙醇須先以分子篩除水，APS 溶液被電極浸泡後不可重複使用。

9. 牛血清蛋白 (BSA) 溶液：

取 0.04 g BSA 以 2 mL 0.1 M 磷酸緩衝溶液 配製成 2% BSA 儲備溶液，置於 4°C 冰箱保存，期限為 1 個月。

2.3.4 還原抗體(reduced antibody)製備與純化^[58, 59]

本研究中使用兩種抗體，Gly-Ab 和 ferritin-Ab，其還原抗體製作流程相同，以下統稱為 antibody。

取 250 μ L 1 mg/mL antibody 加入 5 μ L 1 M DTT，於室溫下反應 30 分鐘，此步驟目的在切斷抗體間的雙硫鍵，製成 reduced antibody。再利用平衡管柱溶液稀釋至 500 μ L，並倒入 illustraTM NAPTM-5 Columns 管柱中，待管柱溶液排出後，再添加 500~750 μ L 平衡管柱溶液以重力方式將還原抗體洗出並收集 500 μ L 溶液，抗體濃度約為 0.5 mg/mL，最後保存於 4°C 冰箱，期限為一個月。

2.3.5 血清樣品處理

抽取男女共 10 名自願者空腹 10 小時後之靜脈血，置於不含抗凝劑之乾燥採血管中，室溫下靜置 1 小時，以轉速 3000 rpm 離心 15 分鐘後取出上層澄清液即為實驗用之血清。血清樣品於 2—8°C 環境下可保存 7 天，於 -20°C 下避免反復凍融可保存 3 個月。

2.3.6 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極之製作^[55]

1. 將黃金電極以 0.05 μ m Al₂O₃ 粉末研磨使表面平滑，再於電極表面滴上 5 μ L 0.5 mg/mL CNT-CHIT 溶液，室溫下待其乾燥。
2. 將以上電極浸泡在 100 μ L CdSe/TGA 溶液中 10 分鐘後，待其乾燥並以去離子水潤洗，進行 CV 掃描以活化電極。
3. 因 APS 容易水解，須以氮氣將電極表面的水吹乾確保表面乾燥，使接合反應得以進行。將電極浸入 2% APS 溶液反應 30 分鐘。

4. 以氮氣吹乾電極，再滴上 5 μ L 10 mM SMCC 溶液於 4°C 下反應 1 小時。
5. 以除水 DMSO 潤洗電極，再使用氮氣吹乾，滴上 5 μ L 0.5 mg/mL Gly-Ab 溶液，於 4°C 下反應 12 小時。
6. 以 0.1 M 磷酸緩衝溶液潤洗電極後，將電極浸泡在 2% BSA 溶液中，於 37°C 下反應 1 小時，進行 CV 掃描並記錄 ECL 訊號。
7. 將電極浸入樣品溶液中於 37°C 下反應 10 分鐘，取出後以 0.1 M 磷酸緩衝溶液潤洗，進行 CV 掃描並記錄 ECL 訊號即完成一次分析。
8. CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極之製作流程顯示於圖 2.1。

2.3.7 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/antibody 修飾網版印刷碳電極之製作

1. 將網版印刷碳電極以去離子水清洗，置於含有 0.1 M KNO_3 和 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液中，進行 CV 掃描 (0.0~-1.8V) 活化電極，待 CV 圖形穩定即可取出，以去離子水清洗並乾燥備用。
2. 在電極表面滴上 5 μ L 0.5 mg/mL CNT-CHIT 溶液，待其乾燥。再於電極上滴 10 μ L CdSe/TGA 溶液靜置 15 分鐘，放入 60°C 烘箱使電極乾燥。此步驟重覆 2 次。
3. 將電極浸入 2% APS 溶液反應 30 分鐘。因 APS 容易水解，須以氮氣將步驟 2. 電極表面吹乾確保表面乾燥，使反應得以進行。
4. 以氮氣吹乾電極，再滴上 5 μ L SMCC 溶液於 4°C 下反應 1 小時。

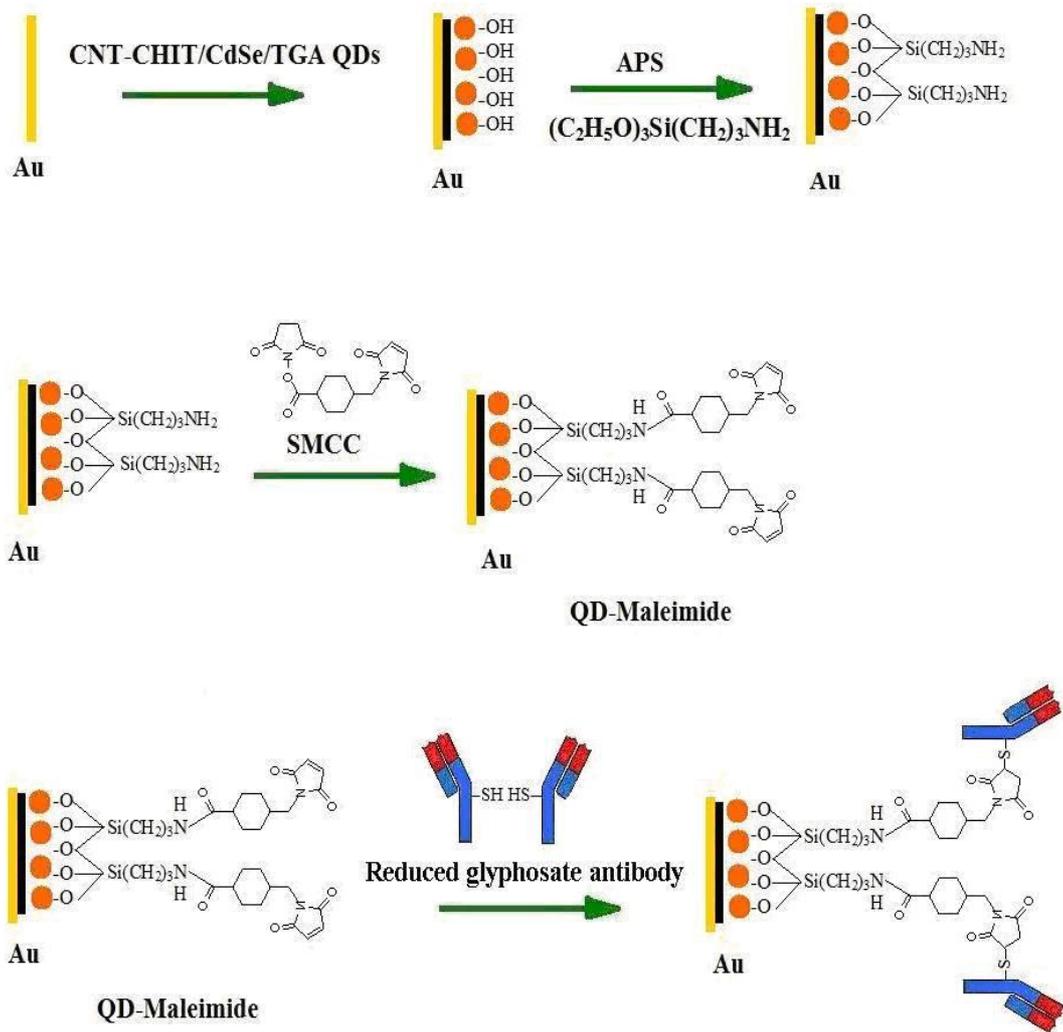


圖 2.1 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極製作流程

5. 以除水 DMSO 潤洗電極，再使用氮氣吹乾，滴上 5 μ L 0.5 mg/mL 之 reduced antibody，於 4°C 下反應 16 小時。
6. 以磷酸緩衝溶液潤洗電極後，將電極浸泡在 2% BSA 溶液中，於 37°C 下反應 1 小時，即可使用。
7. 將電極浸入分析物溶液中於 37°C 下反應 10 分鐘，取出以 0.1 M 磷酸緩衝溶液潤洗，進行 CV 掃描記錄 ECL 訊號。
8. CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/antibody 修飾網版印刷碳電極之製作步驟僅部分不同於金電極，主要流程同圖 2.1。

2.3.8 銀/氯化銀 (Ag / AgCl) 參考電極之製作

將直徑 300 μ m 銀絲浸入 0.1 M 氯化鉀溶液中，將其與 1.5 V 電池的正極相連；電池負極與白金電極相連，通電數秒，直至銀絲表面氧化(表面顏色變暗呈現紫褐色)，再用去離子水清洗後，置於飽和氯化鉀溶液中備用。

2.3.9 電化學/電化學發光偵測裝置

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

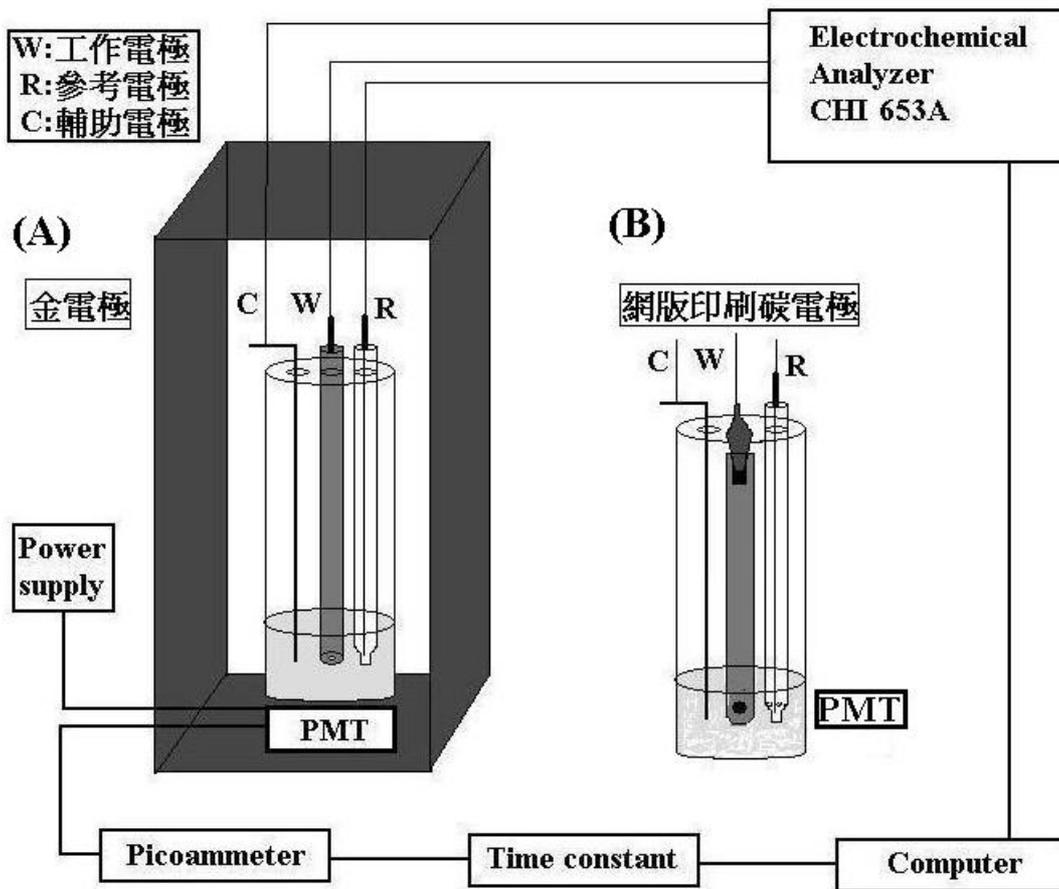


圖 2.2 電化學/電化學放光偵測裝置圖 (A) 盤式金電極 (B) 網版印刷碳電極

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。

2.3.10 黃金電極之清洗

使用 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDS/APS/Gly-Ab 修飾金電極偵測結束後，將其分別浸泡在甲醇和去離子水中，以超音波震盪器各清洗 20 分鐘，再使用 $0.05 \mu\text{m Al}_2\text{O}_3$ 粉末研磨拋光使表面光滑，最後以去離子水清洗，經氮氣吹乾即可進行下次實驗。

參、結果與討論

3.1 CdSe/TGA 奈米粒子光學性質

緒論中曾提到 QDs 具有寬廣的吸收頻寬、高莫爾吸收係數、狹窄且對稱的螢光放射頻寬、及可藉控制顆粒大小調整放射波長等特殊的光學性質，本研究由 UV-visible 及螢光光譜分析來推測合成的 CdSe/TGA QDs 粒徑大小。

3.1.1 UV-visible 吸收光譜

根據文獻報導^[60, 61]，QDs 的粒徑會隨著製備過程中加熱迴流時間增長而變大，且其 UV-visible 最大吸收波長 (λ_{\max}) 會隨 QDs 粒徑增大而產生紅位移。主要原因有兩個：一是 QDs 表面電漿共振之頻率改變造成。當粒子受一入射光照射，粒子表面之電子雲團會以一加速度沿著反入射光電場的方向運動，使得粒子的電子團與原子核產生分離。當電子團與原子核分離時，由於其電性不同會產生庫倫引力，在兩者中間產生回復力使兩者相對震盪。當此震盪頻率與入射光頻率相同時會發生共振現象，此即為表面電漿共振。當粒子的震盪頻率落在可見光範圍內即可藉由 UV-visible 光譜儀觀察其特徵吸收峰。QDs 粒徑變大，表面電漿共振的頻率隨之減少，UV-visible 特徵吸收峰往長波長方向移動產生紅位移，反之粒徑變小則發生藍位移。另一原因是當 QDs 粒子由小變大時，其電子結構能量分佈會由不連續的能階態轉變成接近連續的能階態，使得粒子能帶邊緣的能階密度變大，進而導致價帶與導帶之間的能隙變小，因此 UV-visible 特徵吸收峰往長波長方向移動，反之粒徑變小則往短波長移動。圖 3.1 為本研究

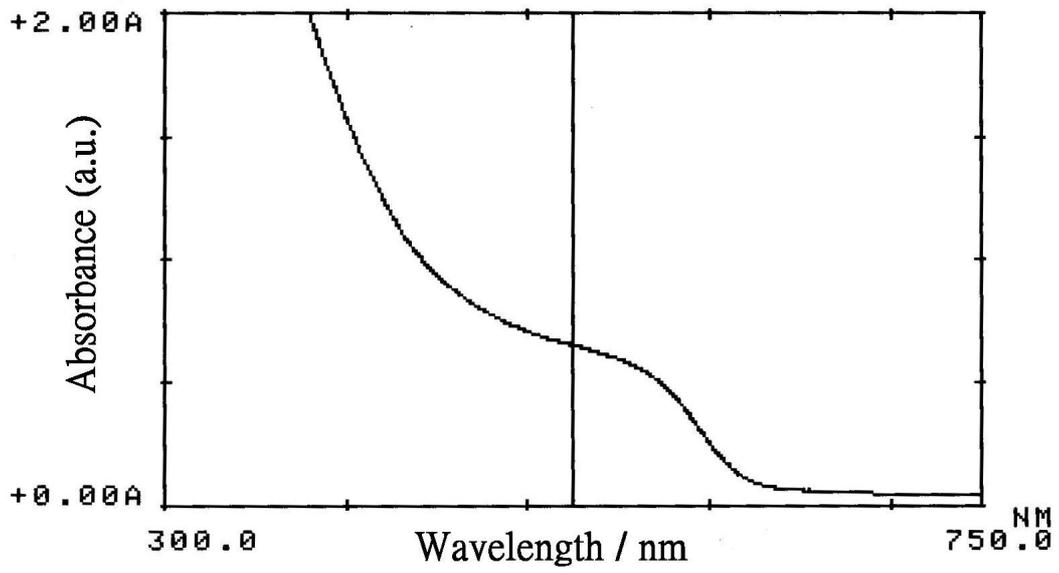


圖 3.1 CdSe QDs 的 UV-visible 吸收光譜

樣品：3 mL CdSe/TGA QDs 溶液

掃描速率：2400 nm/min

吸收波長：530.5 nm

掃描範圍：300~750 nm

迴流時間：24 小時

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^[60]：

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

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:

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

$$A = \varepsilon b c$$

ε ：莫爾吸收係數

D：QDs 粒徑大小 (nm)

A：吸收度

c：濃度 (μ M)

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 μ M。但根據 Kucur 等人報導^[62]利用陽極剝除伏安法 (anodic stripping voltammetry; ASV) 及原子吸收光譜 (atomic absorption spectrometry;

AAS) 結果推算 QDs 濃度，發現與上述公式結果有顯著差異，表示 QDs 粒徑增加不僅與迴流時間有關，也與合成方法和迴流溫度有關，迴流時溫度越高粒徑增大越快，因此上述計算公式僅可供參考。

3.1.2 螢光光譜

圖 3.2 為 CdSe/TGA 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。QDs 粒徑大小分佈不均勻會影響光的純度，可藉增加 QDs 的迴流時間提高粒徑分佈的均勻性。由圖 3.2 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/TGA QDs 顆粒大小一致。

3.2 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極

研究初期先以盤式金電極練習製作 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/ Gly-Ab 修飾電極，製備方法依循實驗室學姐先前之步驟^[63]，主要參考 Jie^[55] 和 Pereira^[58] 的報導，電極製作流程見圖 2.1。因修飾盤式金電極的實驗條件曾經過謹慎探討，故直接套用進行後續研究。

3.2.1 甲殼素修飾薄膜

本研究中製作的修飾電極均以甲殼素^[64, 65] (chitosan; CHIT) 為固定 QDs 的基材。甲殼素又稱幾丁質、甲殼質或多殼醣，為真菌細

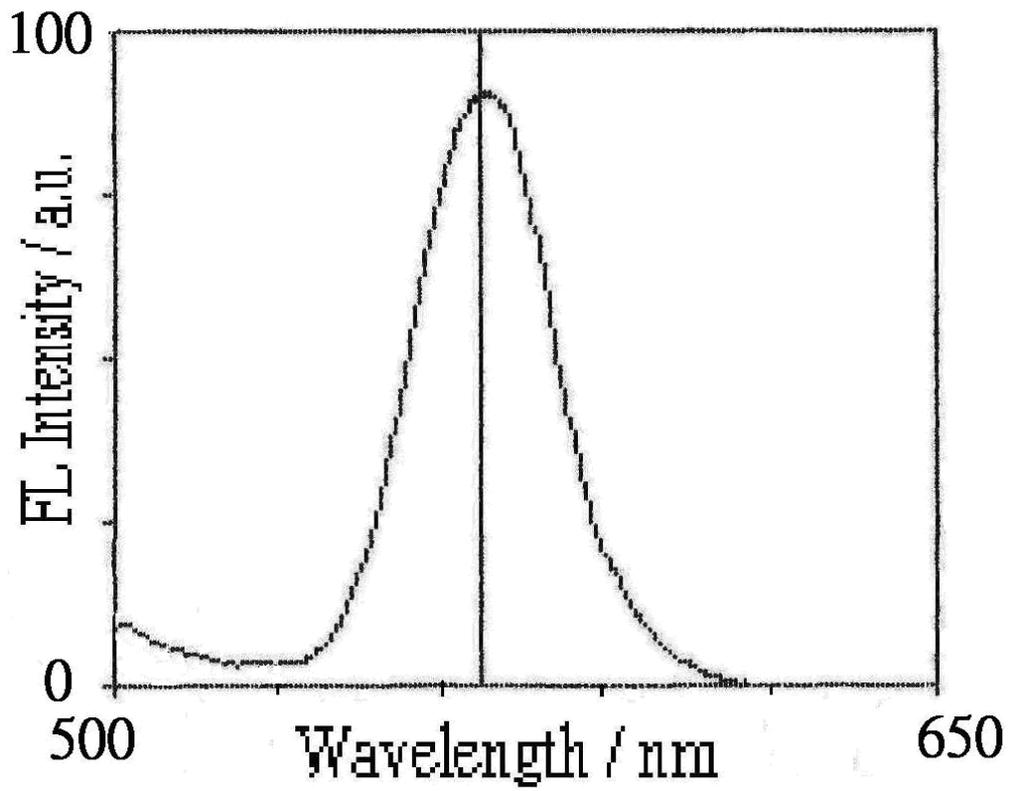


圖 3.2 CdSe/TGA QDs 的螢光放射光譜

樣品：3 mL CdSe/TGA QDs 溶液

激發波長：450 nm

放射波長：566 nm

掃描範圍：500~650 nm

胞壁和節肢動物的外骨骼主要成分，結構顯示於圖 3.3。因為其源於生物體，被鑑定為無毒性且具生物相容性 (biocompatibility)，廣泛使用於生醫領域。甲殼素能溶於酸性溶液形成帶有多個正電荷之陽離子，容易吸附於電極表面形成堅韌不易破損之高分子薄膜。本實驗藉由陰陽離子的電性吸附作用，利用甲殼素當作固定化載體，將表面具負電性的 QDs 修飾於電極上。

3.2.2 量子點結合抗體

QDs 結合抗體之做法參考 Jie^[55] 的方法，首先合成表面保護基為具有羧酸官能基 thioglycolic acid (TGA) 的 CdSe QDs。QDs 表面的羧基 (-COOH) 能與(3-aminopropyl)triethoxysilane (APS) 上的矽烷基以共價鍵結合，利用此方式將 QDs 表面修飾為帶有胺基的粒子 (QDs-NH₂)。之後續以 Pereira^[58] 的方法使用交聯劑 N-succinimidyl-4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate (SMCC) 連接 QDs 與抗體。因為 SMCC 能選擇結合至蛋白質的特定位置 (specific site)，可以避免 QDs 與抗體結合的同時失去抗原-抗體的反應性 (antigenicity)。本研究藉由 SMCC 上的羧基與 QDs-NH₂ 之胺基以共價鍵結合形成 QD-maleimide，QD-maleimide 再與 reduced Gly-Ab 結合而使抗體固定於電極上。最後以 bovine serum albumin (BSA) 覆蓋未與 reduced Gly-Ab 鍵結的 QDs 表面活性位置，避免 QDs 上之反應活性點與 Gly 抗原反應，即完成 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極製作。本研究對電極製作過程中每一步修飾行為進行探討。

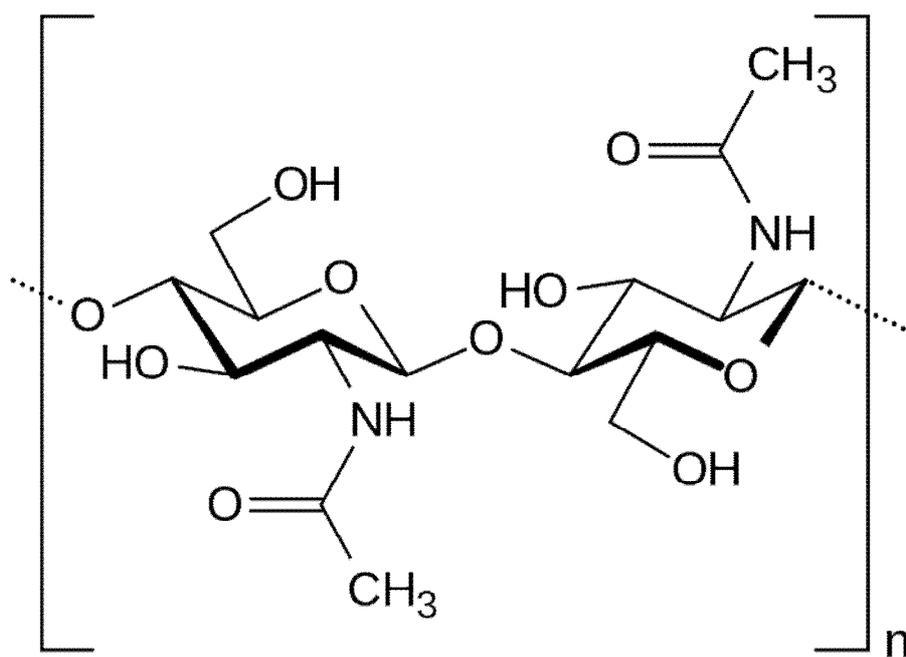


圖 3.3 甲殼素結構^[64]

3.2.2.1 修飾盤式金電極最佳條件

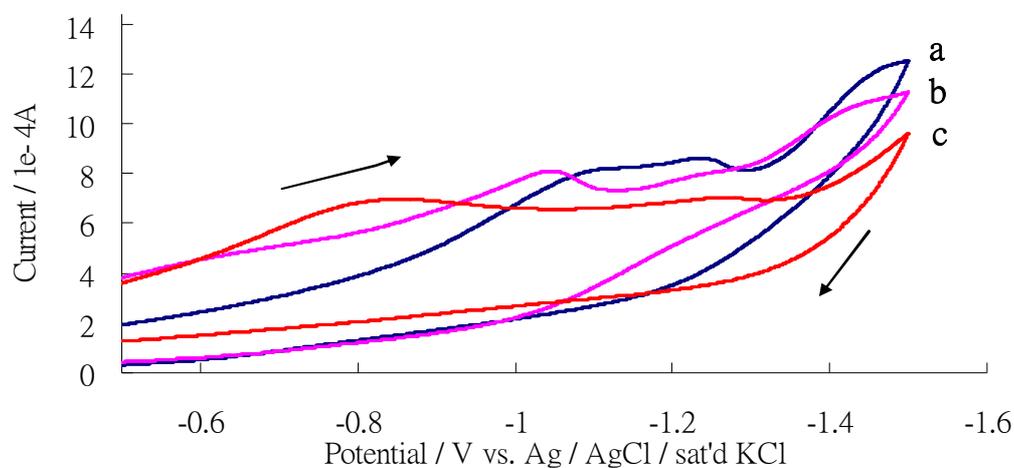
本研究製備 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極方法參考學姊論文^[60]，包含使用 2% APS 溶液浸泡電極 30 分鐘及電極鍵結抗體時間 12 小時。ECL 反應槽中的電解質溶液則為含有 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.0)。

3.2.2.2 Gly-Ab 修飾盤式金電極 CV 及 ECL 表現

為追蹤製作過程中每一步修飾後電極之電化學及 ECL 的變化，將修飾後之電極置於含有 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.0) 中，以 0.1 V/s 速率在 -0.5 ~ -1.5 V 電位範圍進行 CV 掃描並同時記錄 ECL 強度，結果顯示於圖 3.4。圖 3.4 (A) curve a、b、c 分別為 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs、CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS 與 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極之 CV 圖。對應的 ECL 訊號強度圖顯示於圖 3.4 (B)。

圖 3.4 (A) 中 curve a、b 均有三個還原峰訊號，第一個還原峰差距較大，分別在 -1.12 V 與 -1.05 V，第二個還原峰在 -1.24 V，第三個還原峰則在 -1.44 V。Curve a、b 兩者差異不大，但 curve c 只有兩個還原峰，第一個還原峰在 -0.88 V，第二個還原峰則在 -1.26 V。根據文獻報導^[66] 第一個還原峰應為 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 的訊號，第二、三個還原峰則是 CdSe QDs 的還原訊號。有文獻^[17] 指出 QDs 會隨著塗覆在電極表面的密度不同產生兩個不同的還原峰；當 QDs 塗覆的密度較分散的位置則往負電位移動，表示緊密聚集的 QDs 較難被還原，其發光時，還原峰的位置偏向正電位，當塗覆的 QDs 堆疊緊密時，還原峰

(A)



(B)

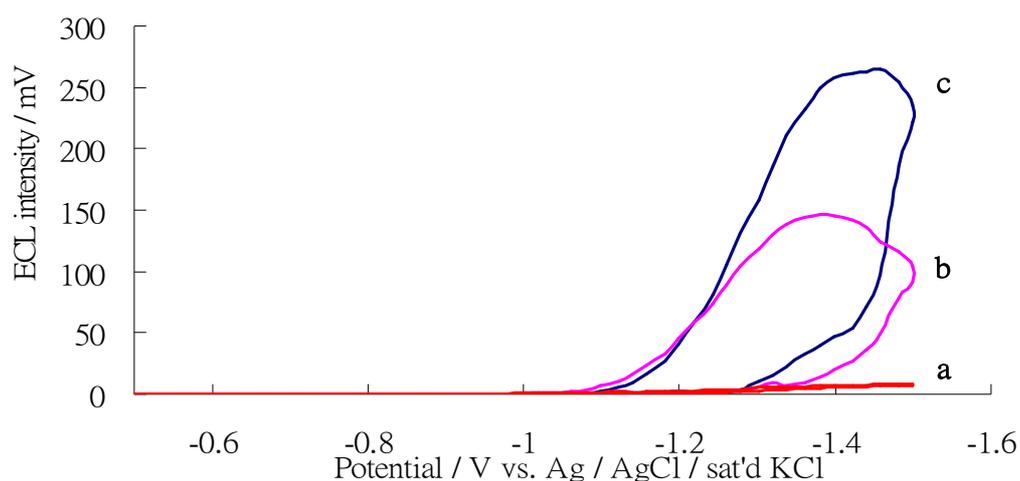


圖 3.4 修飾盤式金電極之 (A) CV 及 (B) ECL 對應掃描電位圖

電解質溶液：含 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.0)

掃描速率：0.1 V/s

掃描範圍：-0.5 ~ -1.5 V

PMT 施加電位：-600 V

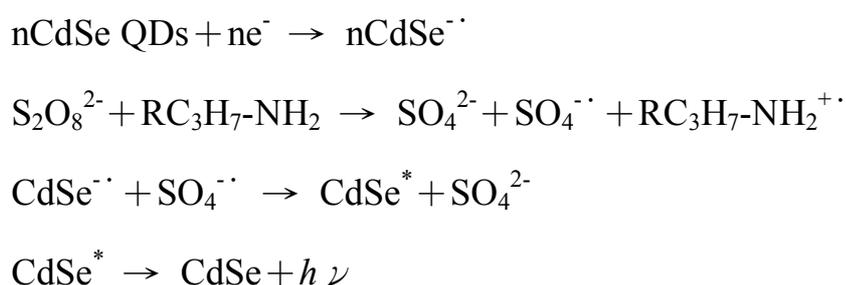
curve (a) CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs 修飾金電極

(b) CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS 修飾金電極

(c) CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極

效率也較差。由圖中發現 curve c 並無第三個還原峰，可能因為抗體的鍵結造成 QDs 在電極表面的塗覆狀態改變，使原本較為聚集的 QDs 分散，加快 QDs 與 $S_2O_8^{2-}$ 的還原效率，ECL 強度增加。 $S_2O_8^{2-}$ 的還原效率增加可藉由比較 curve a、b、c 的第一個還原峰位置得知，當電極依次鍵結上 APS 和抗體時，其還原峰位置均往正電位移動，表示 $S_2O_8^{2-}$ 更容易還原。

比較圖 3.4 (B) 中未鍵結 APS 之 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs 修飾電極 (curve a) 與鍵結有 APS 之修飾電極 (curve b)，curve b 的 ECL 訊號強度增加約 15 倍。因 APS 是以矽烷基與 CdSe/TGA QDs 的羧基鍵結，APS 上自由的胺基可催化 CdSe QDs 與 $S_2O_8^{2-}$ 的反應 [55]，使 ECL 強度增加。文獻 [55] 曾證實若以 mercaptopropyltriethoxysilane (MPS) 取代 APS，即將 $-NH_2$ 替換成 $-SH$ ，則 QDs 的 ECL 強度明顯下降。可能是因為 $-SH$ 較大，增加電極表面的障礙，降低 $S_2O_8^{2-}$ 的還原，因此 APS 之胺基在催化 CdSe QDs 與 $S_2O_8^{2-}$ 的反應相當重要。催化的反應機制如下 [55]：



比較圖 3.4 (B) 中 curve b 與 curve c，當電極表面鍵結抗體後 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極的 ECL 強度再次增加，應是 CdSe/TGA QDs 的羧基與抗體的胺基結合，使 CdSe/TGA

QDs 表面形成新的狀態彌補其晶格缺陷，消除表面非輻射再結合中心 (nonradiative recombination center)，進而提升輻射再結合效率，增加 ECL 強度^[9, 67, 68]。

3.2.2.3 修飾金電極之穩定性

為探討 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極的穩定性，將製備完成的修飾金電極置於電解質溶液中，在電位範圍-0.5 V ~ -1.5 V 以 0.1 V/s 之掃描速率連續掃描 10 次，並同時記錄 ECL 強度，結果顯示於圖 3.5。由圖可觀察到在連續 10 次 CV 掃描下，電極所表現之 ECL 強度差異不大，其 RSD = 3.70% (n = 10)，顯示 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾盤式金電極具有良好的穩定性。

3.2.2.4 抗體-抗原反應時間之探討

本研究利用 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極對抗原 Gly 進行分析。圖 3.6 為 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs /APS/Gly-Ab 修飾金電極於 37°C 環境下與 0.1 ng/mL Gly 抗原反應，反應時間對 ECL 強度之影響。圖中顯示電極的 ECL 強度隨反應時間增加而下降。根據文獻報導^[66, 68]，抗原-抗體經免疫反應所產生的免疫複合體會阻礙 QDs 與 SO_4^{2-} 之間的作用，並減低自由基離子在電極表面的電子交換速度，造成 ECL 訊號下降。圖中顯示當反應時間達 60 分鐘後，免疫反應達到平衡，ECL 強度趨於平緩。此反應時間過於冗長，本研究將尋求其他改善方法。

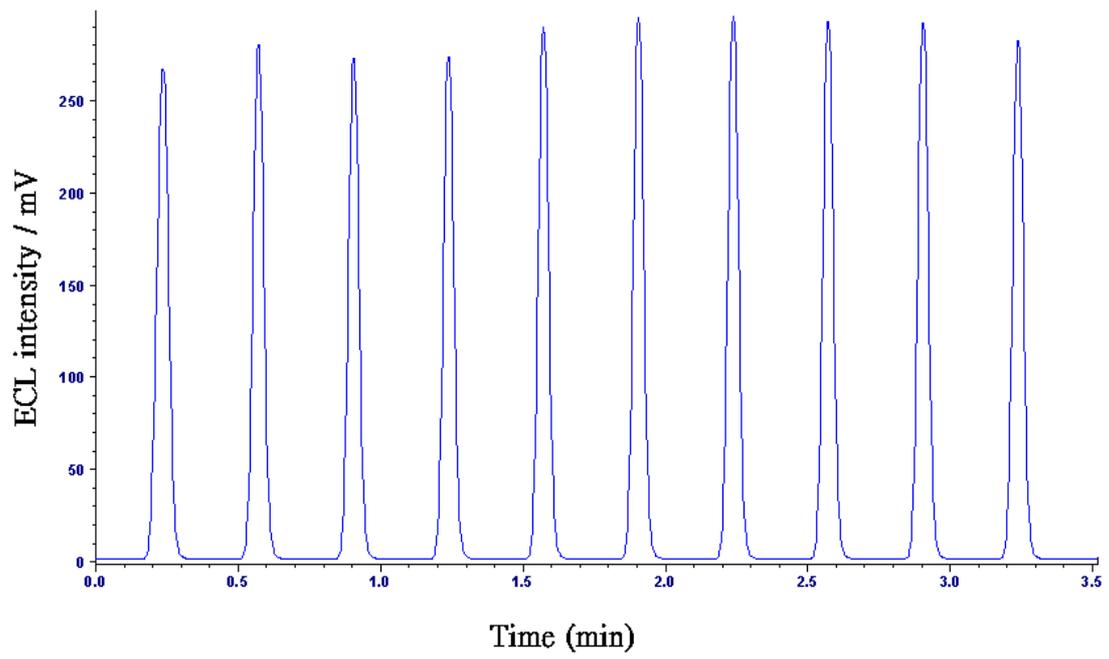


圖 3.5 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾盤式金電極之穩

定性

其他條件同圖 3.4

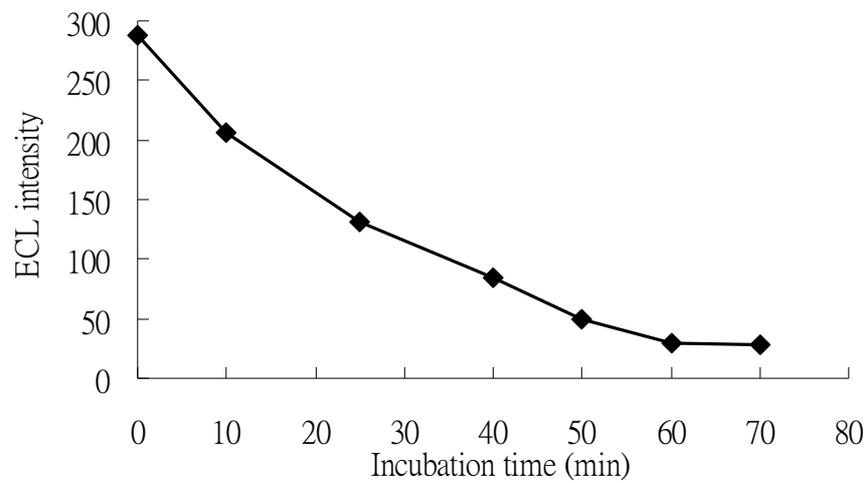


圖 3.6 ECL 強度與抗體-抗原反應時間關係圖

電極：CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極

抗原 (Gly) 濃度：0.1 ng/mL，以 0.1 M 磷酸緩衝溶液配製 (pH = 7.2)

其他條件同圖 3.4

3.2.2.5 攪拌溶液對抗原-抗體結合反應時間之影響

實驗發現偵測越低濃度的抗原，免疫反應所需時間越長，檢量線製作相當費時，因此嘗試利用攪拌來縮短免疫反應時間。圖 3.7 為攪拌速率對免疫反應時間之影響。由於每支電極的絕對 ECL 強度可能不同，使用 ECL 相對值 (I/I_0 ，其中 I 為電極與 Gly 抗原反應後的 ECL 訊號強度； I_0 為電極與 Gly 抗原反應前的 ECL 訊號強度) 當作檢視標準可減少實驗誤差。由圖可看出反應 10 分鐘後未攪拌與攪拌溶液所量測的 I/I_0 值有明顯差異。在 250 rpm 攪拌速率下 10 分鐘後的 I/I_0 值幾近為零，推測可能是攪拌速率過快，造成樣品擾動過於劇烈，使電極修飾薄膜剝落。比較攪拌與未攪拌之曲線，其 I/I_0 值遞減速率有顯著的差異，顯示攪拌溶液可加快免疫反應進行，但對於達完全平衡的時間並未能有效縮短。由圖可知在 50~200 rpm 攪拌條件下反應 25 分鐘後，即可達到近 8 成反應效果。本研究後續將以攪拌速率 100 rpm 下反應時間 25 分鐘進行實驗。

3.2.3 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極檢量線

將一支製作好的修飾金電極依序浸泡在不同抗原濃度的溶液中，溶液攪拌速率 100 rpm 及免疫反應時間 25 分鐘下，每次反應完成後，立刻量測 ECL 訊號變化 (I/I_0)，對應不同抗原濃度取對數後 ($\log(C)$) 製作檢量線，結果顯示於圖 3.8。檢量線性範圍為 0.001~0.1 ng/mL，檢量線方程式為 $y = -0.4893x - 0.5462$ ， $R^2 = 0.9479$ 。以 3 支不同電極分別製作檢量線，表 3.1 (A) 為 3 支不同電極之檢量線方程式 (B) 為檢量線斜率、截距的統計資料。表 3.1 (B) 中由 R^2 值可看出線性

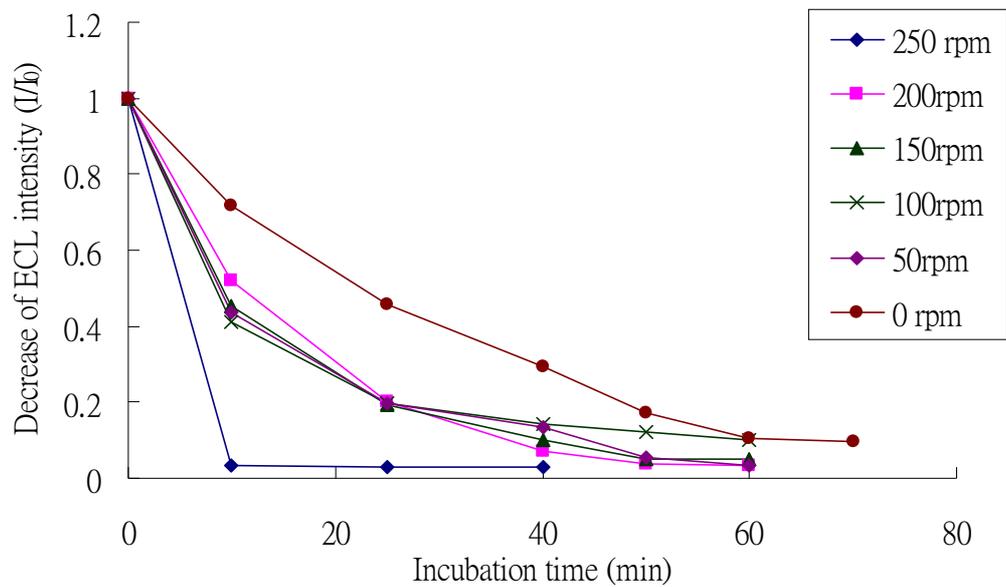


圖 3.7 攪拌速率對抗原-抗體反應時間之影響

攪拌速率：0, 50, 100, 150, 200, 250 rpm

抗原 (Gly) 濃度：0.1 ng/mL，以 0.1 M 磷酸緩衝溶液配製 (pH = 7.2)

其他條件同圖 3.6

I：電極與 Gly 抗原反應後的 ECL 訊號強度

I_0 ：電極與 Gly 抗原反應前的 ECL 訊號強度

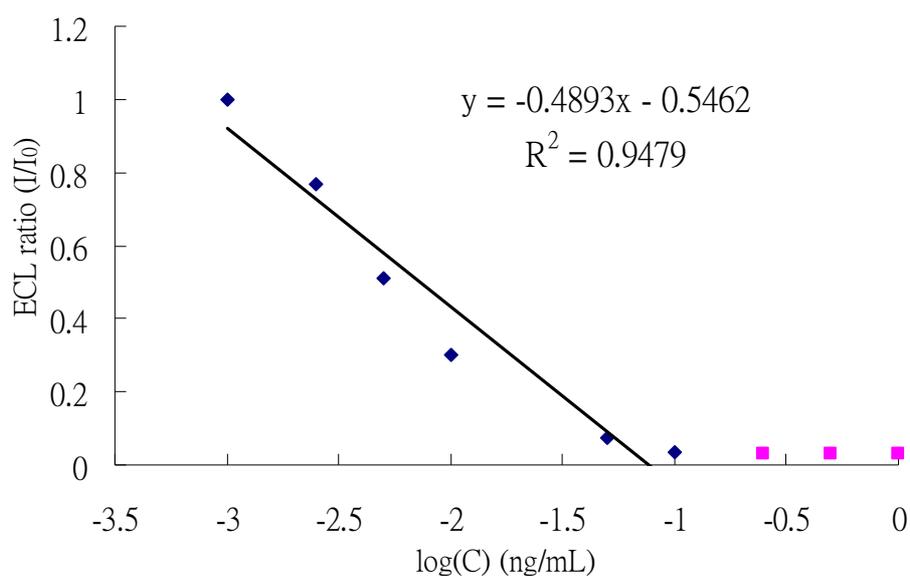


圖 3.8 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極偵測低濃度

Gly 之檢量線

抗原-抗體反應攪拌速率：100 rpm

抗原-抗體反應時間：25 min

抗原濃度：0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 ng/mL

其他條件同圖 3.6

x : $\log(C)$

y : I/I_0

I : 電極與 Gly 抗原反應後的 ECL 訊號強度

I_0 : 電極與 Gly 抗原反應前的 ECL 訊號強度

關係極不理想。由於抗原-抗體結合反應中需攪拌溶液，電極表面薄膜可能受損，加上 25 分鐘反應時間仍舊過長，ECL 量測可能有相當大的誤差。

因抗體-抗原結合其反應時間與系統條件有關，例如：反應溫度、抗原抗體濃度、pH 值…等，改變抗原-抗體結合時間會影響單位時間內結合的抗原濃度，導致檢量範圍變化。本研究嘗試縮短反應時間至 10 分鐘，重新製作檢量線如圖 3.9。圖 3.9 (A) 為觀察到 ECL 強度隨抗原濃度的變化；(B) 為濃度檢量線。由圖 (A) 可以明顯看出隨著抗原濃度增加，ECL 發光強度持續下降，直到分析物濃度增至 50 ng/mL 時其 ECL 不再變化，表示電極表面鍵結之抗體已完全與抗原結合。檢量線性範圍為 0.1~25 ng/mL，檢量線方程式為 $y = -0.4029x + 0.5799$ ， $R^2 = 0.9932$ 。實驗重複七次，表 3.2 (A) (B) 分別為 7 支不同電極之檢量線方程式及檢量線的斜率、截距和線性相關係數的統計資料。表 3.2 (B) 中，不論斜率、截距或線性相關係數的 RSD 均在 5% 以下，顯示不同修飾電極製作之檢量線有良好的再現性。

製作圖 3.9 檢量線時的 I_0 值為電極先浸泡於 0.1 ng/mL 抗原溶液 10 分鐘的 ECL 強度。電極在開始量測前必須先浸泡於 0.1 ng/mL 的 Gly 標準溶液 10 分鐘，才能準確檢量。為何如此原因不明瞭。此舉不僅增加偵測之麻煩，也僅能分析濃度大於 0.1 ng/mL 的樣品，因此本方法仍需改進。

表 3.1 (A) 不同 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極偵

測低濃度 Gly 之檢量線方程式

電極編號	檢量線方程式	相關係數 R^2
1	$y = -0.4893x - 0.5462$	$R^2 = 0.9479$
2	$y = -0.4902x - 0.5319$	$R^2 = 0.9282$
3	$y = -0.4813x - 0.5637$	$R^2 = 0.9398$

x : 抗原 (Gly) 濃度取對數 ($\log(C)$)

y : ECL 訊號變化 (I/I_0)

(B) 不同檢量線之斜率、截距及線性相關係數統計資料

	斜率	截距	R^2
average	-0.4862	-0.5568	0.9385
SD	0.0147	0.0298	0.0099
RSD	3.0%	5.4%	1.1%

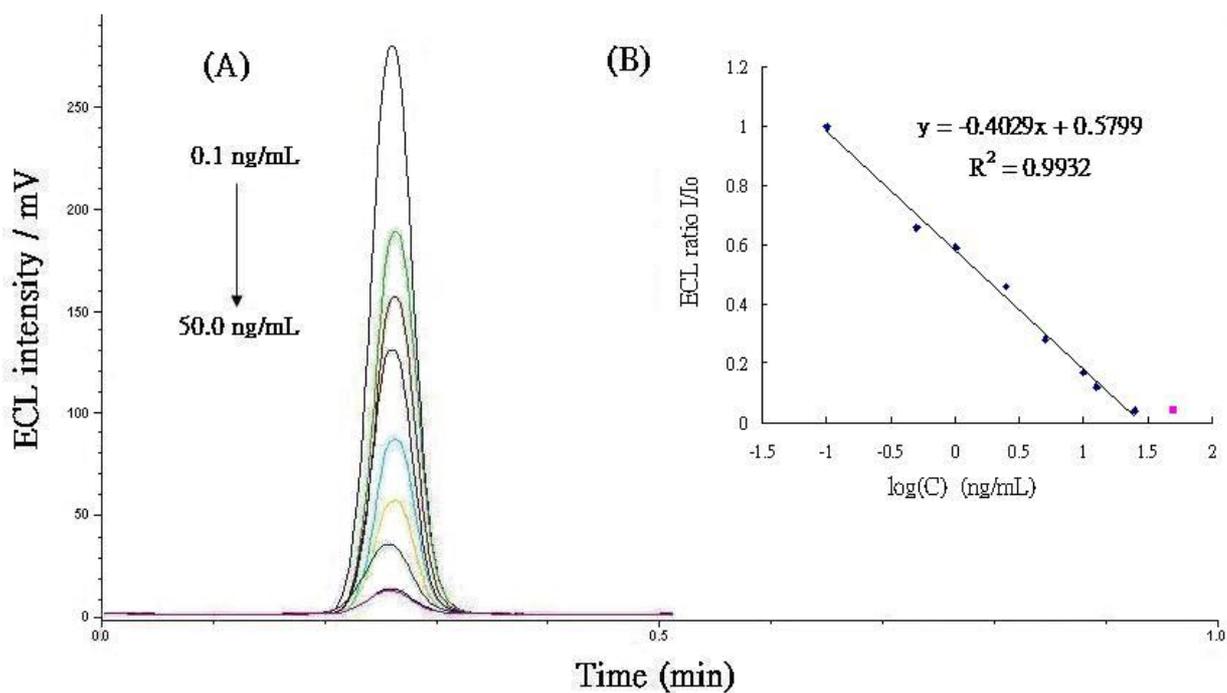


圖 3.9 (A) ECL 訊號強度與 Gly 濃度變化圖；(B)

**CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極偵測高
濃度 Gly 之檢量線**

抗原濃度：0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 12.5, 25.0, 50.0 ng/mL

抗原-抗體反應時間：10 分鐘

其他條件同圖 3.6

圖 (B) x：抗原 (Gly) 濃度取對數 ($\log(C)$)

y：ECL 訊號變化 (I/I_0)

I：電極與 Gly 抗原反應後的 ECL 訊號強度

I₀：電極浸泡 0.1 ng/mL Gly 樣品 10 分鐘的 ECL 訊號強度

表 3.2 (A) 不同 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電

極偵測高濃度 Gly 之檢量線方程式

電極編號	檢量線方程式	相關係數 R^2
1	$y = -0.4029x + 0.5799$	$R^2 = 0.9932$
2	$y = -0.3996x + 0.5305$	$R^2 = 0.9908$
3	$y = -0.4331x + 0.5484$	$R^2 = 0.9919$
4	$y = -0.4137x + 0.5312$	$R^2 = 0.9928$
5	$y = -0.4093x + 0.5924$	$R^2 = 0.9896$
6	$y = -0.4204x + 0.5683$	$R^2 = 0.9917$
7	$y = -0.4059x + 0.5770$	$R^2 = 0.9930$

x : 抗原 (Gly) 濃度取對數 ($\log(C)$)

y : ECL 訊號變化 (I/I_0)

(B) 不同檢量線之斜率、截距及線性相關係數統計資料

	斜率	截距	R^2
average	-0.4121	0.5611	0.9919
SD	0.0115	0.0246	0.0013
RSD	2.8%	4.4%	0.13%

3.3 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾網版印刷碳電極

鑒於 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾盤式金電極有許多缺點，例如：在量測真實樣品前需先浸泡於 0.1 ng/mL Gly 標準溶液 10 分鐘才能準確檢量，不僅增加偵測時之麻煩，亦導致檢量範圍狹窄。另外，最大的問題則是電極在製作完檢量線後表面所有抗體已與抗原結合，無法再利用於樣品偵測，必須換用另一支新電極偵測，造成檢量再現性不佳。後續研究改使用網版印刷碳電極取代盤式金電極，因為市售網版印刷碳電極價格便宜，使用後可拋棄，且可同時大量製作修飾電極，節省反複清洗金電極的時間。

3.3.1 修飾網版印刷碳電極製備條件

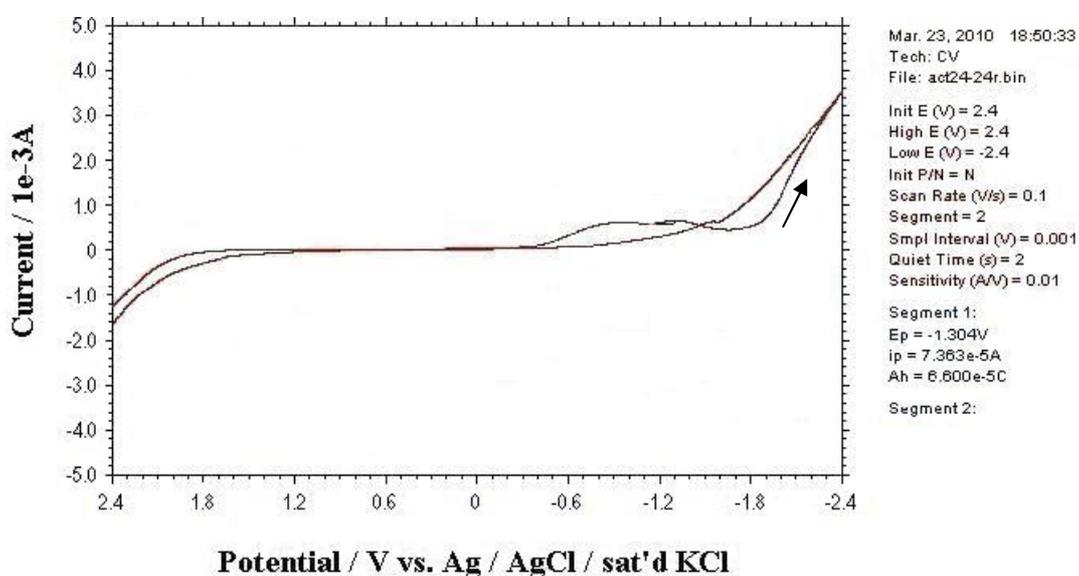
由於電極材質不同，雖然電極修飾程序相同，仍需重新探討製備條件使修飾電極具最佳偵測效果。主要探討參數為：CV 掃描電位範圍、甲殼素薄膜之塗覆、APS 濃度及抗體鍵結反應時間。

3.3.1.1 電位掃描範圍探討

首先探討網版印刷碳電極進行 CV 時適合的電位掃描範圍。本研究將空白未修飾的網版印刷碳電極置於含 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.0)，掃描速率為 0.1 V/s，在 +2.4 ~ -2.4 V 的電位範圍進行 CV，結果顯示於圖 3.10。

圖 3.10 (A) 為空白網版印刷碳電極之 CV 圖，圖 3.10 (B) 為空白網版印刷碳電極於去氧 30 分鐘電解質溶液之 CV 圖。圖 3.10(A) 中顯示當電位超過 +1.8 和 -1.8 V 電流快速上升，碳電極開始極化，因此適當的電位範圍應在 +1.8 ~ -1.8 V 之間。圖 (A) 中有兩還原峰

(A)



(B)

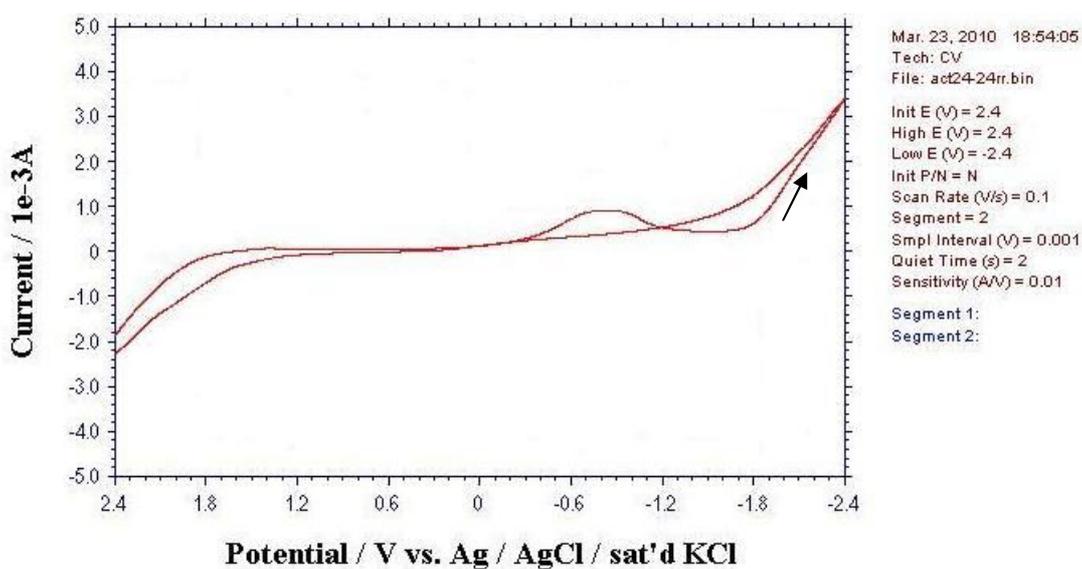


圖 3.10 網版印刷碳電極 CV 圖

(A) 網版印刷碳電極之 CV 圖

(B) 網版印刷碳電極在除氧 30 分鐘的電解質溶液之 CV 圖。

電解質溶液：含 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.0)

掃描範圍：+2.4~-2.4 V

掃描速率：0.1 V/s

出現，電位掃描超過-0.5 V 開始出現第一個還原峰，當電位達-0.8 V 電流最大，第二還原峰出現在-1.3 V 的位置。考慮電解液組成後推測第一還原峰應為 $S_2O_8^{2-}$ 的還原，第二還原峰則為水中溶氧的還原峰。為證實此推論，將電解質溶液通入氮氣除氧 30 分鐘後進行掃描，結果顯示於圖 (B)。由圖中可以看到第二還原峰消失，證實上述推論合理。在 1.2 節曾提到 $S_2O_8^{2-}$ 的還原對 QDs 產生 ECL 有極大的影響，因此本研究將 CV 電位掃描範圍定在-0.5~-1.8 V 進行後續的探討。

換以 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs 修飾網版印刷碳電極置於 0.1 M $Na_2S_2O_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.0) 中，以速率 0.1 V/s 分別在-0.5~-1.5 V，-0.6~-1.6 V，-0.7~-1.7 V，-0.8~-1.8 V 電位範圍掃描，同時記錄 ECL 強度，結果顯示於圖 3.11。圖中明顯看出當電位掃描範圍由-0.5~-1.5 V 至-0.8~-1.8 V，電極產生的 ECL 依序增加。當掃描範圍為-0.8~-1.8 V 時，ECL 強度最大，應是電極表面 QDs 還原所需的電位完整包含於此範圍內。本研究使用-0.8~-1.8V 為後續修飾網版印刷碳電極的 CV 電位掃描範圍。

3.3.1.2 碳奈米管 (CNT) 對修飾網版印刷碳電極 ECL 之影響

CNT 具有增加電子傳導速率及化學穩定性佳等優點^[69, 70]，常被應用於電化學中電極的修飾。本研究先前承續實驗室學姊修飾電極製作方法，使用 CNT-CHIT 修飾盤式金電極。當改用網版印刷碳電極，對於修飾薄膜中添加 CNT 之必要性需重新探討。將網版印刷碳電極分別塗覆 CHIT/CdSe/TGA QDs 和 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs 後，置於含有 0.1 M $Na_2S_2O_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH =

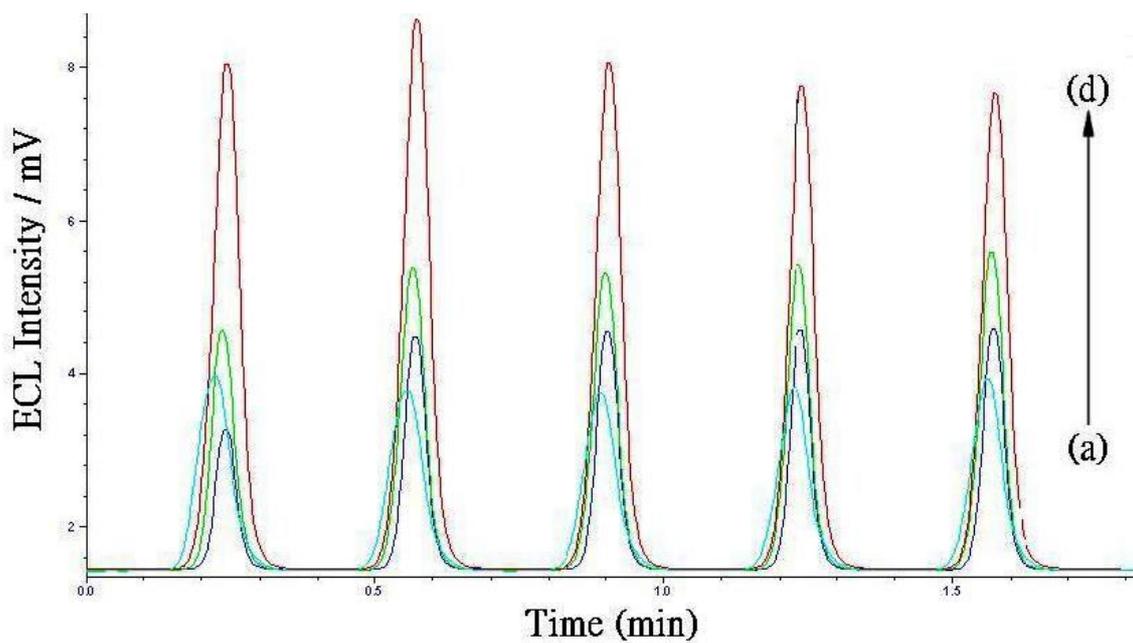


圖 3.11 電位掃描範圍對 ECL 的影響圖

電極：CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs 修飾碳電極

電解質溶液：含 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.0)

掃描速率：0.1 V/s

掃描範圍：(a) -0.5~-1.5 V，(b) -0.6~-1.6 V，(c) -0.7~-1.7 V，(d) -0.8~-1.8 V。

PMT 施加電位：-600V

7.0), 以速率 0.1 V/s 在電位範圍-0.8~-1.8 V 進行掃描, 同時記錄 ECL 強度, 結果顯示於圖 3.12。比較圖中 curve a 與 b, 發現未添加 CNT 的修飾電極約在-1.45 V 開始產生 ECL 訊號, 而 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs 修飾碳電極約在-1.35 V 即產生 ECL 訊號。比較 ECL 發光強度, 添加 CNT 的修飾電極 ECL 訊號亦較未添加 CNT 之電極明顯增大許多。實驗分別重複 3 次, 並記錄 ECL 強度整理於表 3.3。由表中可知添加 CNT 後 ECL 訊號值由 6.8 mV 增大為 14.0 mV, 且其再現性亦佳。CNT 不僅提升了修飾薄膜導電性, 同時也提供更大的孔隙表面積使甲殼素薄膜內部空間更開放, 加速 $S_2O_8^{2-}$ 的擴散, 使其更容易在電極還原成 $SO_4^{\cdot-}$ 與 QDs 作用。本研究後續利用 CNT-CHIT 溶液做為網版印刷碳電極之修飾薄膜。

3.3.1.3 修飾網版印刷碳電極 CV 及 ECL 表現

本實驗將 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾碳電極置於含有 0.1 M $Na_2S_2O_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.0) 中, 以 0.1 V/s 速率在-0.8~-1.8 V 電位範圍進行 CV 掃描並同時記錄 ECL 強度, 結果顯示於圖 3.13。圖 3.13 (A) 中 curve a、b、c 分別為 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs、CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS、與 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾碳電極之 CV 圖。對應的 ECL 訊號強度顯示於圖 (B)。

由圖 3.13 (A) 可看到 curve a、b、c 在-0.8~-1.5 V 的電位範圍有還原峰但數量無法確定。約在-1.6 V 的位置有一個清楚的還原峰, 應為 CdSe QDs 的還原訊號。依據 3.3.1.1 節, $S_2O_8^{2-}$ 還原峰約

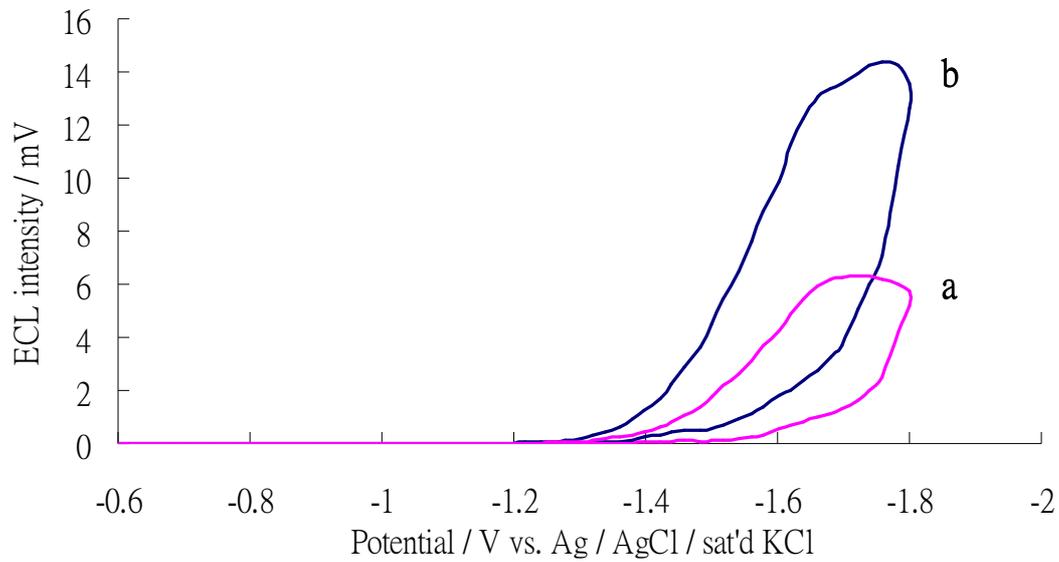


圖 3.12 添加碳奈米管對修飾網版印刷碳電極 ECL 之影響

電解質溶液：0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.0)

掃描速率：0.1 V/s

掃描範圍：-0.8 ~ -1.8 V

PMT 施加電位：-600 V

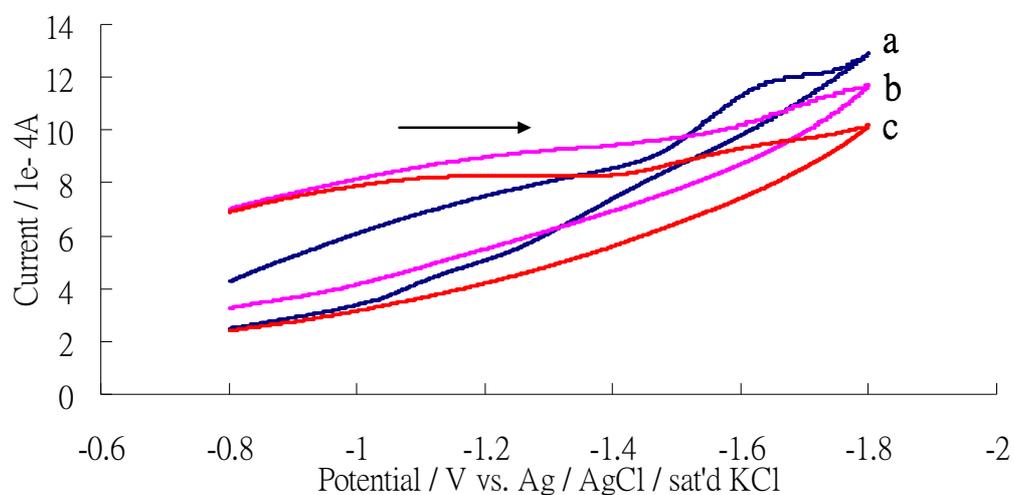
curve a：CHIT/CdSe/TGA QDs 修飾碳電極

curve b：CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs 修飾碳電極

表 3.3 碳奈米管對修飾網版印刷碳電極 ECL 之影響

	ECL 值	平均	SD	RSD
CHIT/CdSe/ TGA QDs	6.65	6.8	0.34	5.0%
	6.58			
	7.20			
CNT-CHIT/CdSe /TGA QDs	13.08	14.0	1.2	8.3%
	15.27			
	13.51			

(A)



(B)

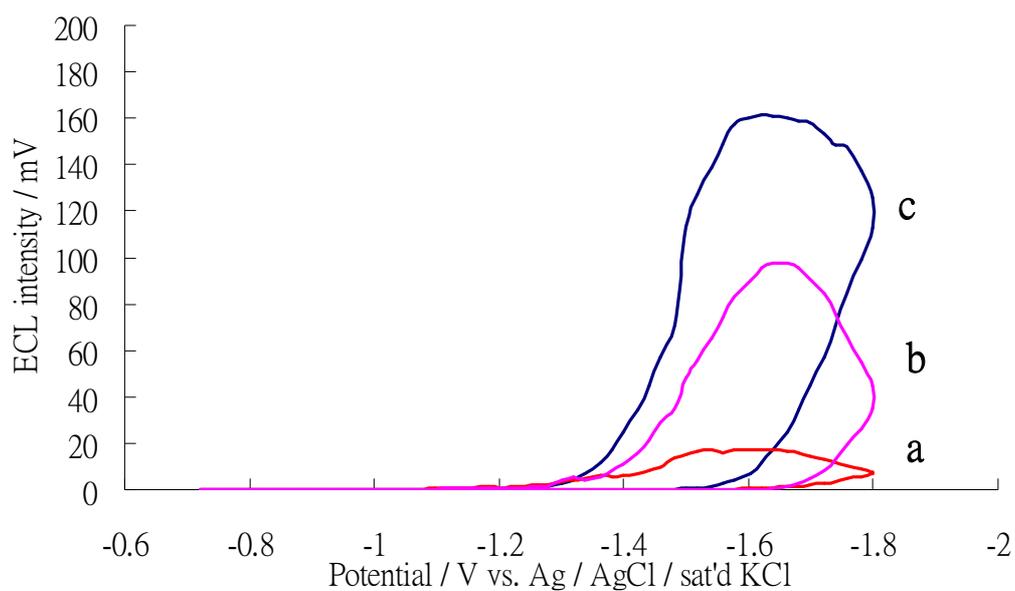


圖 3.13 修飾網版印刷碳電極之 (A) CV 及 (B) ECL 對掃描電位圖

- (A)、(B) curve : (a) CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs 修飾碳電極
(b) CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS 修飾碳電極
(c) CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾碳電極
其他條件同圖 3.12

在-0.4~-1.1 V 範圍，其後為水中溶氧之還原(-1.30 V)，在 3.2.2.2 節也曾提到 QDs 的還原訊號會隨著塗覆在電極表面的不同密度狀態產生不同的還原峰^[17]。對照圖 3.13 (B) ECL 訊號產生出現在溶氧還原 (-1.30 V) 後，推論應有一 CdSe QDs 的還原包含於-0.8~-1.5 V 範圍內。因此在-0.8~-1.5 V 範圍內應有 3 個還原峰，分別為 $S_2O_8^{2-}$ 還原峰、溶氧之還原及 CdSe QDs 的還原訊號。

圖 3.16 (B) 顯示修飾網版印刷碳電極 ECL 強度對應掃描電位的變化，與先前 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極的表現類似，隨著鍵結 APS 和抗體後 ECL 有明顯的增加，原因應與 3.2.2.2 節敘述相同。

3.3.1.4 APS 濃度與 ECL 強度關係

由於電極材質不同，本實驗重新探討 APS 使用濃度對 CdSe QDs ECL 發光訊號之影響。圖 3.14 顯示使用不同濃度 (0.5、1.0、2.0、5.0、10%) 的 APS 修飾電極後置於含有 0.1 M $Na_2S_2O_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.0) 中所產生之 ECL 訊號強度變化。

由圖 3.14 可觀察到 ECL 訊號隨著 APS 濃度增加而變大，當 APS 濃度達 2% 時 ECL 增加趨於平緩。因電極表面塗覆之 QDs 所能提供的表面積固定，當 APS 濃度超過 2% 時，QDs 表面無法再與 APS 結合，因此 ECL 訊號趨於穩定。與修飾金電極比較，其 ECL 放光強度有明顯的下降，應與電極表面積有關。本研究使用之金電極直徑為 2 mm，而網版印刷碳電極直徑則為 1.5 mm，因此 ECL 訊號強度較低。

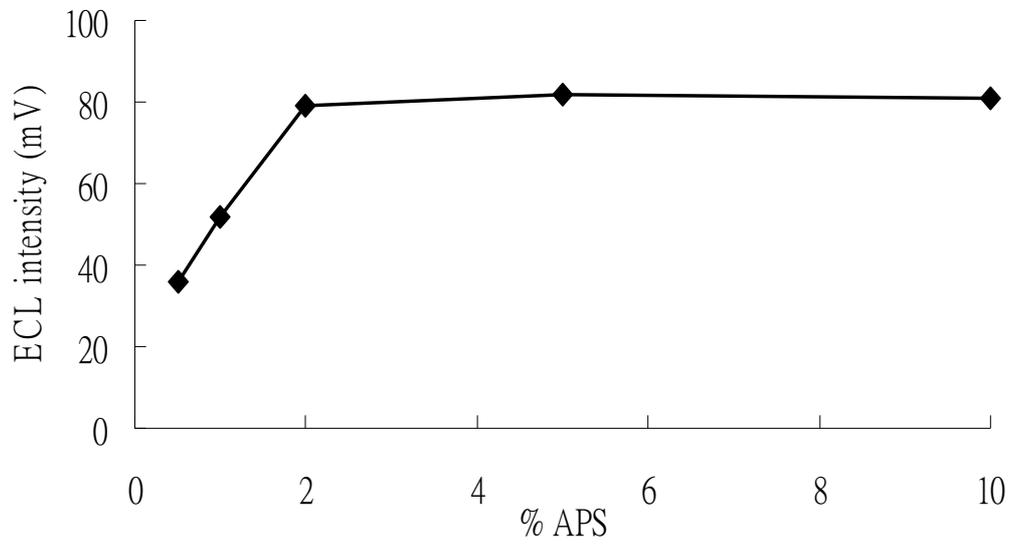


圖 3.14 APS 濃度與 ECL 強度關係

電極：CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS 修飾碳電極

APS 濃度：0.5, 1, 2, 5, 10%

其他條件同圖 3.12

3.3.1.5 電極塗覆抗體反應時間

實驗中發現鍵結抗體後的電極 ECL 放光效果不如預期，且訊號穩定性亦較差，推測可能為浸泡抗體時間太短反應尚未完全。探討抗體和 CdSe/TGA QDs 反應時間分別為 1、8、12、16、20 小時，並觀察反應時間變化對 ECL 強度的影響，結果顯示於圖 3.15。圖中 y 軸為電極鍵結抗體後 ECL 強度增加的比例 (I/I_0 ，其中 I 為抗體與電極不同反應時間的 ECL 訊號強度； I_0 為未鍵結抗體的 ECL 訊號強度)。隨著電極與抗體反應時間增加，ECL 強度亦隨之增加。當反應時間到達 16 小時，ECL 訊號增加達到約 1.4 倍，以後不再增加，表示反應已經完全。本研究後續實驗將電極與抗體之反應時間固定為 16 小時。

3.3.2 Gly-Ab 修飾網版印刷碳電極偵測 Gly 標準樣品之檢量線

以 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾碳電極進行 Gly 標準水樣檢量線的製作。利用上述最佳條件製備完成的一支網版印刷電極依序分別在不同濃度抗原溶液中進行免疫反應 10 分鐘，每次反應完成後立刻將電極置於含 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 及 0.1 M KNO_3 之 0.1 M 磷酸緩衝溶液中在電位範圍 -0.8 V~-1.8 V 以 0.1 V/s 之速率進行掃描，記錄 ECL 發光強度，結果顯示於圖 3.16。圖 3.16 (A) 為電極浸泡不同濃度抗原溶液後的 ECL 強度變化，圖中觀察到 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾碳電極的 ECL 訊號隨 Gly 濃度增大而下降。當抗原 Gly 濃度超過 20.0 ng/mL 時，電極表面可能沒有多餘的抗體可與抗原反應，ECL 訊號衰減趨於平緩。圖 3.16 (B) 為利用修飾電極的 ECL 訊號變化 (I/I_0) 對應抗原濃度取

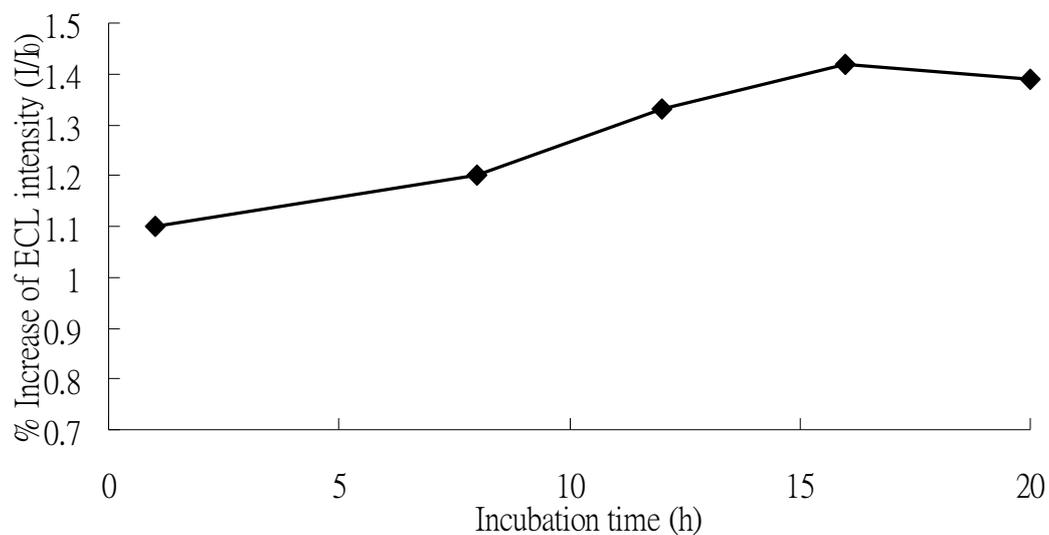


圖 3.15 抗體與電極反應時間關係圖

電極為：CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾碳電極

反應時間：1、8、12、16、20 hour

其他條件同圖 3.12

I：抗體與電極不同反應時間的 ECL 訊號強度

I_0 ：電極未鍵結抗體的 ECL 訊號強度

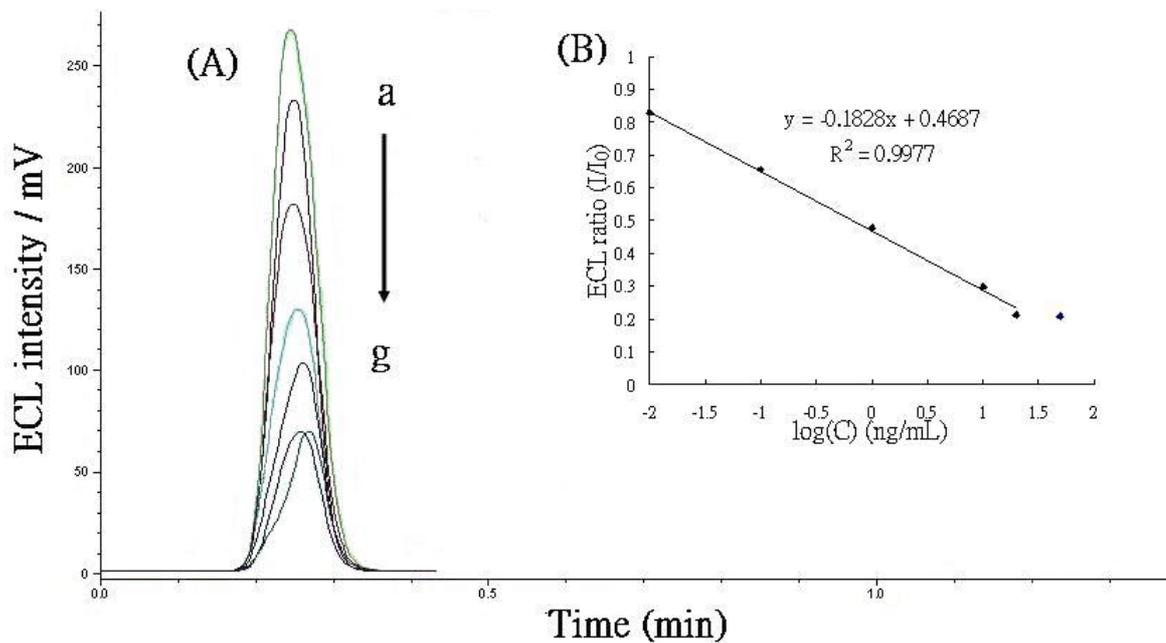


圖 3.16 (A) ECL 訊號強度與 Gly 濃度變化圖；(B) CNT-CHIT/
CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾碳電極偵測 Gly 檢量線

Gly 濃度：(a) 0.0, (b) 0.01, (c) 0.1, (d) 1.0, (e) 10.0, (f) 20.0,
(g) 50.0 ng/mL 配製於 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.2)

圖 (B)：x：抗原 (Gly) 濃度取對數 (log(C))

y：ECL 訊號變化 (I/I₀)

I：電極與 Gly 抗原反應後的 ECL 訊號強度

I₀：電極與 Gly 抗原反應前的 ECL 訊號強度

其他條件同圖 3.12

對數 ($\log(C)$) 製作的檢量線，檢量範圍為 0.01~20.0 ng/mL，檢量方程式為 $y = -0.1828x + 0.4687$ 線性相關係數(R^2)為 0.9977。CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾網版印刷碳電極與圖 3.9 (B) 中 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾金電極製作之檢量線最大的不同為，圖 3.16 (B) 中的 I_0 是修飾電極與 Gly 抗原反應前進行空白溶液掃描所測得之 ECL 訊號，修飾碳電極製作完成後不需事先浸泡低濃度抗原即可直接偵測，減少實驗麻煩。

為檢驗不同 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 修飾碳電極之間的再現性，利用 9 支電極於抗原濃度 0.01~20.0 ng/mL 範圍內分別製作檢量線，結果列於表 3.4。表 3.4 (A) 為 9 支電極的檢量線方程式，表 3.4 (B) 為 9 支電極斜率、截距的統計資料。表中可看出 9 支不同電極的檢量線不論是斜率或截距的 RSD 值均不大，可知不同電極間具有不錯的再現性。

本研究進行接近尾聲時，Gly-Ab 製造供貨商突然於 2010 年 4 月宣布停止生產販售此抗體，後續有關干擾探討與真實樣品檢測的工作被迫中止，改以 ferritin 做為目標分析物，重新製作 ferritin-Ab 修飾電極繼續 ECL 感測器的開發研究。

表 3.4 (A) 不同修飾碳電極偵測 Gly 之檢量線

電極編號	檢量線方程式	相關系數 R^2
1	$y = -0.1828x + 0.4687$	$R^2 = 0.9977$
2	$y = -0.1984x + 0.4734$	$R^2 = 0.9889$
3	$y = -0.1952x + 0.4012$	$R^2 = 0.9892$
4	$y = -0.1782x + 0.4712$	$R^2 = 0.9897$
5	$y = -0.1752x + 0.4616$	$R^2 = 0.9895$
6	$y = -0.1737x + 0.4485$	$R^2 = 0.9897$
7	$y = -0.1979x + 0.4142$	$R^2 = 0.9907$
8	$y = -0.1742x + 0.4719$	$R^2 = 0.9896$
9	$y = -0.1803x + 0.4738$	$R^2 = 0.9902$

x : 抗原 (Gly) 濃度取對數 ($\log(C)$)

y : ECL 訊號變化 (I/I_0)

(B) 修飾碳電極之再現性

	斜率	截距	R^2
average	-0.1840	0.4483	0.9906
SD	0.0103	0.0306	0.0027
RSD	5.6%	6.8%	0.27%

3.4 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極

3.4.1 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 3.17。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 $R^2 = 0.9915$ 。研究後續進行真實樣品分析。

3.4.2 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，使用之血清樣品前處理已於 2.3.5 節詳述。將修飾碳電極浸泡於 200 μ L 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，

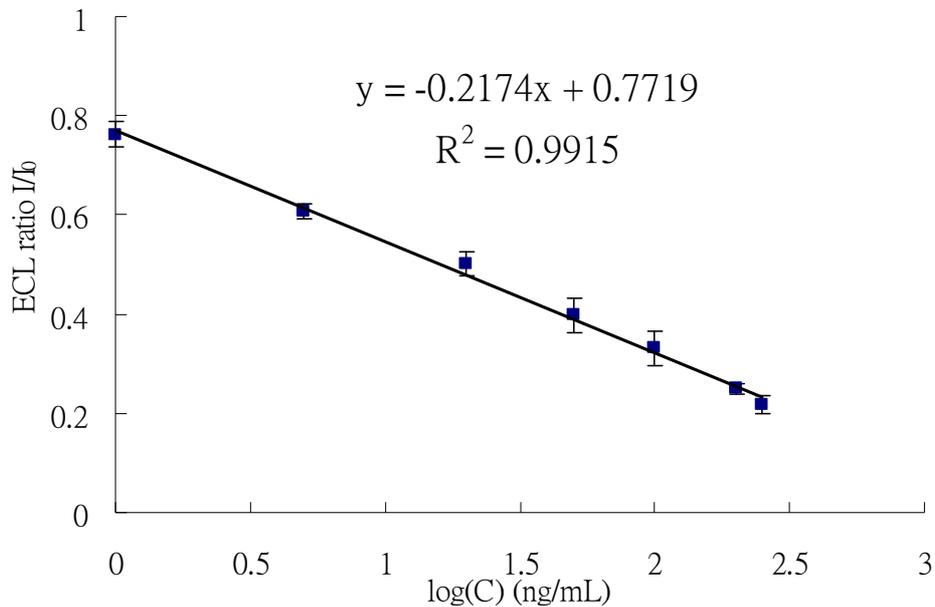


圖 3.17 Ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極偵測 ferritin 之檢量線

電極：CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Ferritin-Ab 修飾碳電極

抗原 (ferritin) 濃度：1.0, 5.0, 20.0, 50.0, 100.0, 200.0, 250.0 ng/mL，配製於 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.2)

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/I₀，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

I₀：電極與 ferritin 抗原反應前的 ECL 訊號強度

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 $5 \mu\text{L}$ 抗體濃度 $16.7 \mu\text{g/mL}$ (稀釋 30 倍後) 的溶液 16 小時，圖 3.18 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 3.17 修飾網版印刷碳電極偵測 ferritin 之檢量線 x 軸不同。圖 3.18 中 x 軸為 ferritin 濃度 (C)，而圖 3.17 中 x 軸為 ferritin 濃度取對數 ($\log(C)$)。若在圖 3.17 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 3.18 檢量範圍為 $0.1 \sim 20.0 \text{ ng/mL}$ ，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。

3.4.3 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 3.19 為一男性自願者之血清中分別添加 $0 \sim 15.0 \text{ ng/mL}$ ferritin 標準溶液，以 0.1 M 磷酸緩衝溶液 ($\text{pH} = 7.2$) 稀釋 50 倍，在上述最佳條件下進行 ECL 偵測定量。與圖 3.18 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。表 3.5 為圖 3.19 偵測數據之整理，由分析結果之誤差大多在 5% 以下，說明基質干擾不顯著。

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

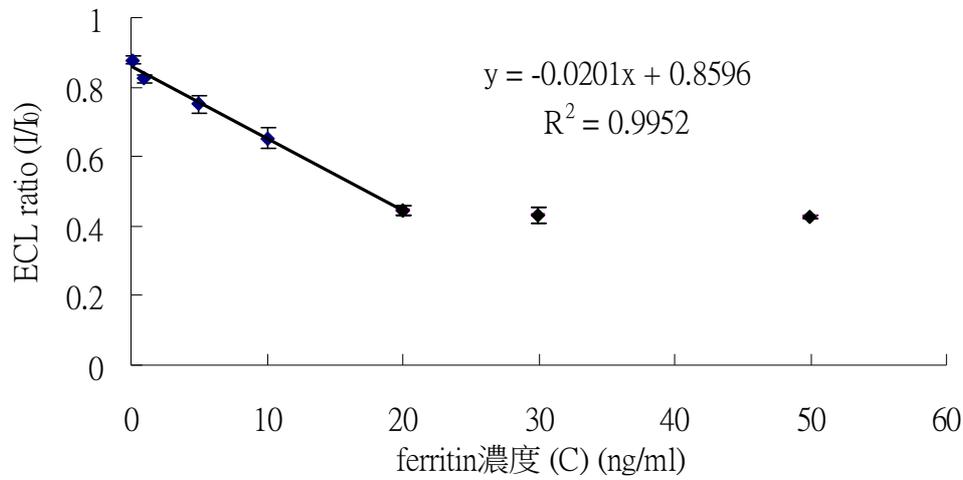


圖 3.18 低濃度抗體修飾電極偵測 ferritin 之檢量線

電極為：CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Ferritin-Ab 修飾碳電極
(Ferritin-Ab 以 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 7.2) 稀釋 30 倍)

抗原(ferritin)濃度：0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 50.0 ng/mL

抗原-抗體反應 10 分鐘

其他條件同圖 3.17

x：ferritin 濃度 (C)

y：I/I₀，每一數據點為 3 支電極偵測平均值

I：電極與抗原 ferritin 反應後的 ECL 訊號強度

I₀：電極與 ferritin 抗原反應前的 ECL 訊號強度

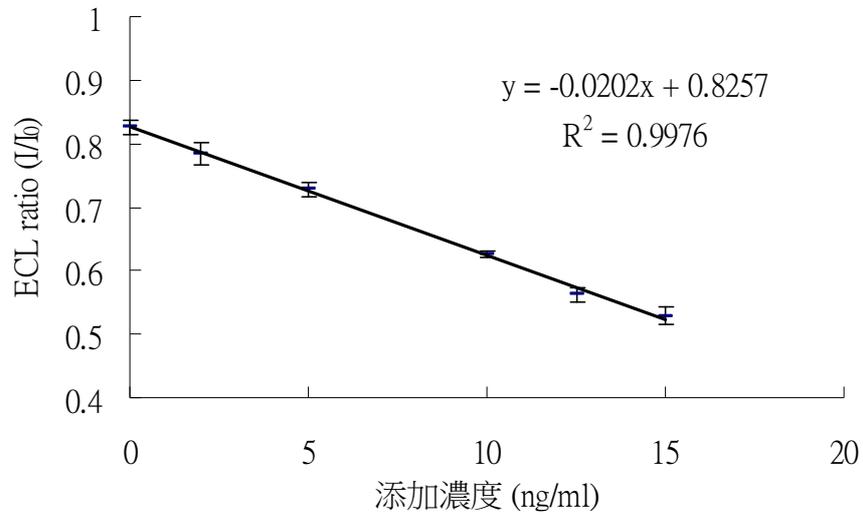


圖 3.19 網版印刷碳電極偵測人血清中 ferritin 之標準添加檢量線

電極為：CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Ferritin-Ab 修飾碳電極

樣品：稀釋 50 倍血清添加抗原 (ferritin) 濃度：0, 2.0, 5.0, 10.0, 12.5, 15.0 ng/mL

其他條件同圖 3.17

x：添加抗原 ferritin 濃度 (C)

y：I/I₀，每一數據點為 3 支電極偵測平均值

I：電極與樣品反應後的 ECL 訊號強度

I₀：電極與樣品反應前的 ECL 訊號強度

表 3.5 網版印刷碳電極偵測人血清中 ferritin 之標準添加

添加濃度(ng/mL)	偵測濃度(ng/mL)	誤差%
0	1.7	
2.0	3.8	4.9%
5.0	6.6	-2.2%
10.0	11.7	0.0%
12.5	14.8	5.1%
15.0	16.4	-1.5%

Albumin; HSA)^[72, 73], HSA 為血清中含量最多的蛋白質(約占一半左右), 主要由肝臟製造, 具有維持滲透壓、調控體內 pH 值及運輸體內藥物、代謝物、毒素及激素等功能; (2) 甲型胎兒蛋白(Alpha-Fetoprotein; AFP)^[74], AFP 是胚胎時期胎兒血清的重要成分, 每毫升血清含量高達 1 mg 以上。成人血清中含量則甚微, 平均在 20 ng/mL 以下。但成年人患原發性肝癌或惡性腫瘤後, 血清中 AFP 的含量會再度升高, 因此 AFP 可算是一種肝癌症指標。AFP 與 HSA 也是一對互補的蛋白, 它們的理化性質、運輸激素的特性, 甚至蛋白質的一級結構都具有相似性。胚胎發育過程中 AFP 是胎兒血清內第一個出現的球蛋白, 是維持正常妊娠所必需的蛋白, 具有保護胎兒不受母體排斥的重要作用; (3) 血紅蛋白(Human Hemoglobin; Hgb)^[75], Hgb 存在於紅血球細胞內, 主要的功用為運輸氧和二氧化碳。Hgb (血紅素) 分子為球狀蛋白質, 由四個次體 (subunits) 構成, 每個次體包含一個血基質(heme) 以及一個和血基質連接的 polypeptide。每個血基質當中有一個鐵原子, 人體約 50% 的鐵質均保存於此。血基質中的鐵原子可以和一個氧分子結合, 因此一個血紅素可以和四個氧分子結合。與 ferritin 相同的是其對鐵質均有強大的親和力, 為維持人體中鐵質平衡的一大環節; (4) 輸鐵蛋白(Human Transferrin; HTF)^[76], HTF 亦為維持人體中鐵質含量平衡的重要物質, 不同於 ferritin 和 Hgb 具有儲存鐵質的能力, HTF 主要的功用為在人體中鐵質的傳遞; (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。表 3.6 為上述 5 種可能干擾物在人體中正常濃度範圍。

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 3.7。由表 3.7 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 3.6 5 種可能干擾 ferritin 偵測的物質在人體中正常濃度範圍【72, 74, 75, 76】

人血清白蛋白 (HSA)	35~50 mg/mL
甲型胎兒蛋白 (AFP)	成人：20 ng/mL 以下 新生兒：1 mg/mL
血紅蛋白 (Hgb)	男：135~180 mg/mL 女：120~160 mg/mL 新生兒：170 mg/mL 以上
輸鐵蛋白 (HTF)	男：1.725~2.74 μ g/mL 女：2.02~2.87 μ g/mL
氯化鐵 (游離鐵)	0.6~1.7 μ g/mL

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%

樣品：干擾物 + 抗原 5.0 ng/mL

其他條件同圖 3.17 (n = 3)

3.4.4 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 3.8。

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 3.8。表 3.6 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 3.20。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，

表 3.8 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)

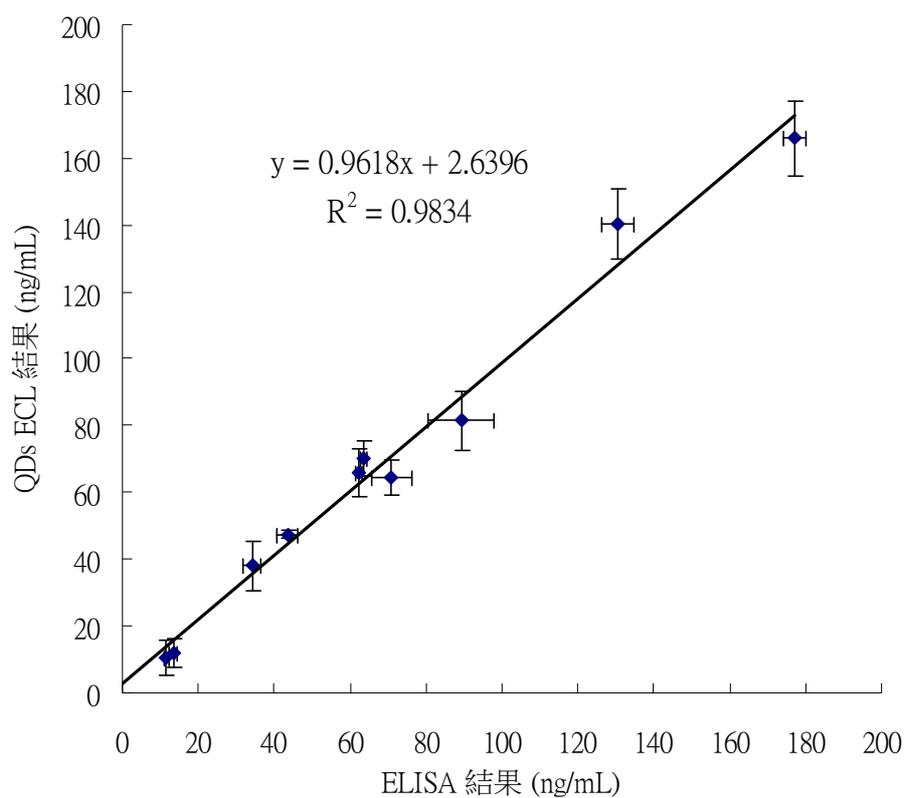


圖 3.20 兩種方法分析 10 個人體血清中 ferritin 結果之相關性

QDs ECL 分析條件同圖 3.18

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。

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 3.6 與圖 3.20 顯示本方法有不錯的準確性。

肆、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 Gly 除草劑抗體，製作出 CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Gly-Ab 薄膜修飾電極。利用抗原-抗體的專一特性，可以定量分析 Gly，發展 QDs ECL 生物感測器。由於研究進行中 Gly 抗體來源中斷，實驗被迫中止。本研究對 Gly 之分析停留於測試標準水樣階段，Gly 偵測範圍為 0.01~20 ng/mL ($R^2 = 0.9977$)。

更改電極修飾抗體為人血清儲鐵蛋白 ferritin 抗體，繼續發展針對 ferritin 的 QDs ECL 感測器。CNT-CHIT/CdSe/TGA QDs/APS/Ferritin-Ab 修飾網版印刷碳電極對 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。

伍、參考資料

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. 盧永坤，奈米科技概論(初版)，滄海書局，**2005**
7. A.L. Rogach, T. Franzl, T.A. Klar, J. Feldmann, N. Gaponik, V. Lesnyak, A. Shavel, A. Eychmuller, Y.P. Rakovich, J. F. Donegan, Aqueous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals : State-of-the-Art, *J. Phys. Chem. C*, **2007**, 111, 14628~14637
8. C.B. Murray, D.J. Norris, M.G. Bawendi, Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 8706~8715
9. R.E. Galian, M.d.l. Guardia, The Use of Quantum Dots in Organic Chemistry, *Trends in Anal. Chem.*, **2009**, 28, 279~291
10. L.J. Hua, H.Y. Han, X.J. Zhang, Size-dependent Electrochemi-luminescence Behavior of Water-soluble CdTe Quantum Dots and Selective Sensing of L-cysteine, *Talanta*, **2009**, 77, 1654~1659
11. J.J. Zhu, S. X, H. Wang, J.M. Zhu, H.Y. Chen, Sonochemical Synthesis of Hollow Spherical Assemblies Via an In-Situ Template Route, *Adv. Mater.*, **2003**, 15, 156~159
12. W.H. Yang, W.W. Li, H.J. Dou, K. Sun, Hydrothermal Synthesis for High-quality CdTe Quantum Dots Capped by Cysteamine, *Mater. Lett.*, **2008**, 62, 2564~2566
13. M.B. Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos, Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels,

- Science*, **1998**, *281*, 2013~2015
14. G.F. Jie, L.L. Li, C. Chen, J. Xuan, J.J. Zhu , Enhanced Electrochemiluminescence of CdSe Quantum Dots Compositied with CNTs and PDDA for Sensitive Immunoassay , *Biosen. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 3352~3358
 15. G.F.Jie, P. Liu, S.S. Zhang , Highly Enhanced Electrochemi-luminescence of Novel gold/silica/CdSe-CdS Nanostructures for Ultrasensitive Immunoassay of Protein Tumor Marker , *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 1323~1325
 16. N. Myung, Z. Ding, A.J. Bard , Electrogenerated Chemiluminescence of CdSe Nanocrystals , *Nano Lett.*, **2002**, *2*, 1315~1319
 17. G.Z. Zou, H.X. Ju , Electrogenerated Chemiluminescence from a CdSe Nanocrystal Film and Its Sensing Application in Aqueous Solution , *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 6871~6876
 18. G.F. Jie, B. Liu, J.J. Miao, J.J. Zhu , Electrogenerated Chemiluminescence from CdS Nanotubes and Its Sensing Application in Aqueous Solution , *Talanta*, **2007**, *71*, 1476~1480
 19. X. Liu, H. Jiang, J.P. Lei, H.X. Ju , Anodic Electrochemiluminescence of CdTe Quantum Dots and Its Energy Transfer for Detection of Catechol Derivatives , *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 8055~8060
 20. Y. Wang, J. Lu, L.h. Tang, H.X. Chang, J.H. Li , Graphene Oxide Amplified Electrogenerated Chemiluminescence of Quantum Dots and Its Selective Sensing for Glutathione from Thiol-Containing Compounds , *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 9710~9715
 21. 石佩榕 , 以鍍銅網版印刷電極結合毛細管電泳在醣類分析之研究 , 國立中興大學碩士論文 , **2004**
 22. A.H. Wu, J.J. Sun, Y.M. Fang, R.J. Zheng, G.N. Chen , Hot Electron Induced Cathodic Electrochemiluminescence at Disposable Screen Printed Carbon Electrodes , *Electroanal.*, **2010**, *22*, 2702~2707
 23. B. Qi, Y. Du, X.R. Yang , Determination of Benzhexol and Procyclidine Using an Electrochemiluminescence-based Sensor Constructed by a Screen-print Technique , *Microchim. Acta.*, **2008**, *162*, 211~217
 24. G.Y. Zhao, X.J. Zhan, W.C. Dou , A Disposable Immunosensor for

- Shigella Flexneri Based on Multiwalled Carbon Nanotube/Sodium Alginate Composite Electrode , *Anal. Biochem.*, **2011**, *408*, 53~58
25. A. Mandil, L.L. Idrissi , A.Z. Amine , Stripping Voltammetric Determination of Mercury(II) and Lead(II) Using Screen-printed Electrodes Modified with Gold Films, and Metal Ion Preconcentration with Thiol-modified Magnetic Particles , *Microchim. Acta*, **2010**, *170*, 299~305
 26. A. Romani, M. Minunni, N. Mulinacci, P. Pinelli, F. F. Vincieri , Comparison among Differential Pulse Voltammetry, Amperometric Biosensor, and HPLC/DAD Analysis for Polyphenol Determination , *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 1197~1203
 27. M.H. Chiu, H. Wu, J.C. Chen, G. Muthuraman, J.M. Zen , Disposable Screen-Printed Carbon Electrodes for Dual Electrochemi-luminescence/Amperometric Detection: Sequential Injection Analysis of Oxalate , *Electroanal.*, **2007**, *19*, 2301~2306
 28. P. Masawat, J. M. Slater , The Determination of Tetracycline Residues in Food Using a Disposable Screen-printed Gold Electrode (SPGE) , *Sens. Actuators B*, **2007**, *124*, 127~132
 29. Y. Li, Y. Umasankar, S.M. Chen , Polyaniline and Poly(flavin adenine dinucleotide) Doped Multi-walled Carbon Nanotubes for p-Acetamidophenol Sensor , *Talanta*, **2009**, *79*, 486~492
 30. M. J. A. Shiddiky, D.S. Park, Y.B. Shim , Detection of Polymerase Chain Reaction Fragments Using a Conducting Polymer Modified Screen-printed Electrode in a Microfluidic Device , *Electrophoresis*, **2005**, *26*, 4656~4663
 31. D.M. Tsai, H.W. Tai, P.R. Shih, R.L. Chang, H. Wu, E. D. Conte, J.M. Zen , Incorporation of Disposable Screen-Printed Electrodes for Use in Capillary Electrophoresis End-Column Amperometric Detection System , *Electroanal.*, **2005**, *17*, 1991~1994
 32. A. G. Crevillén¹, M. Pumera, M. C. González¹, A. Escarpa , Carbon Nanotube Disposable Detectors in Microchip Capillary Electrophoresis for Water-soluble Vitamin Determination: Analytical Possibilities in Pharmaceutical Quality Control , *Electrophoresis*, **2008**, *29*, 2997~3004

33. 羅致述，除草劑嘉磷塞之製劑研究，行政院農委會藥物毒物試驗所技術專刊，**1992**, 24, 1~8
34. 許嘉甄，Fe₃O₄@Al₂O₃ 磁性奈米粒子/固相萃取結合毛細管電泳/電化學放光偵測法應用於 Glyphosate 與 Aminomethylphosphonic acid 的分析，東海大學碩士論文，**2009**
35. 張雅婷，嘉磷塞在土地處理系統中降解之研究，國立雲林科技大學碩士論文，**2004**
36. 行政院衛生署殘留農藥安全容許量標準，衛署食字第 0970407974 號令，**2008**
37. M. A. Gonzalez-Martinez, E. M. Brun, R. Puchades, A. Maquieira, K. Ramsey, F. Rubio, Glyphosate Immunosensor. Application for Water and Soil Analysis, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 4219~4227
38. E. A. Songa, O. A. Arotiba, J. H.O. Owino, N. Jahed, P. G.L. Baker, E. I. Iwuoha, Electrochemical Detection of Glyphosate Herbicide Using Horseradish Peroxidase Immobilized on Sulfonated Polymer Matrix, *Bioelectrochem.*, **2009**, 75, 117~123
39. E. A. Songa, T. Waryo, N. Jahed, P. G. L. Baker, B. V. Kgarebe, E. I. Iwuoha, Electrochemical Nanobiosensor for Glyphosate Herbicide and Its Metabolite, *Electroanal.*, **2009**, 21, 671~674
40. S.Z. Ahmed, M.B.B.CH, The Level of Ferritin in Diabetic and Non Diabetic Patients with Non Ischaemic Cardiomyopathy, *Faculty of Medicine Ain-Shams University*, dissertation of Master Degree of Cardiology,**2007**
41. 阮燕華，南美白蝦鐵蛋白分子特性、表現及其參與生理及免疫調控之研究，國立台灣海洋大學碩士論文，**2007**
42. Z. Wang, C. Li, M. Ellenburg, E. Soistman, J. Ruble, B. Wright, J. X. Ho, D. C. Carter, Structure of Human Ferritin L-chain, *Acta Crystallogr. Sect. D : Biol. Crystallogr.*, **2006**, 62, 800~806
43. T. Masuda, F. Goto, T. Yoshihara, B. Mikami, The Universal Mechanism for Iron Translocation to the Ferroxidase Site in Ferritin, Which is Mediated by the Well Conserved Transit Site, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **2010**, 400, 94~99
44. L. S. Valberg, Plasma Ferritin Concentrations: Their Clinical Significance and Relevance to Patient Care, *Can. Med. Assoc. j.*,

- 1980**, *122*, 1240~1248.
45. J. C. Mareschal, B. Dublet, C. Wustefeld, G. Charlier, R. R. Crichton , Immunological Characteristics of Human Ferritins; Consequences for Human Serum Ferritin Determination , *Clin. Chim. Acta*, **1981**, *111*, 99~103
 46. Y. Yoshino, Y. Hirai, T. Aoki, T. Morita, Y. Eguchi, T. Yajima, Y. Kagawa , Serum Ferritin Concentration and Isoferritin Patterns Detected by Immunoradiometric Assay , *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **1980**, *26*, 87~97
 47. R. J. Poison, J. G. Kenna, I. P. Shears, A. Bomford, R. Williams , Measurement of Ferritin in Serum by an Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbant Assay , *Clin. Chem.*, **1998**, *34*, 661~664
 48. D.G. Spillane, J.O.Mullane , Development of an Affinity-column Mediated Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Ferritin , *Clin. Chim. Acta*, **1998**, *273*, 81~87
 49. S.S. Zhang, K. Jiao, H.Y. Chen, M.X. Wang , Detection of Ferritin in Human Serum with a MAP-H₂O₂-HRP Voltammetric Enzyme-linked Immunoassay System , *Talanta*, **1999**, *50*, 95~101
 50. S.F. Chou, W.L. Hsu, J.M. Hwang, C.Y. Chen , Development of an Immunosensor for Human Ferritin, a Nonspecific Tumor Marker, Based on a Quartz Crystal Microbalance , *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *453*, 181~189
 51. S.F. Chou, W.L. Hsu, J.M. Hwang, C.Y. Chen , Development of an Immunosensor for Human Ferritin, a Nonspecific Tumor Marker, Based on Surface Plasmon Resonance , *Biosen. Bioelectron.*, **2004**, *19*, 999~1005
 52. S.F. Wang, Y.M. Tan , A Novel Amperometric Immunosensor Based on Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles/Chitosan Composite Film for Determination of Ferritin , *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, *387*, 703~708
 53. X. Yang, R. Yuan, Y.Q. Chai, Y. Zhuo, C.L. Hong, Z.Y. Liu, H.L. Su , Porous Redox-active Cu₂O-SiO₂ Nanostructured Film: Preparation, Characterization and Application for a Label-free

- Amperometric Ferritin Immunosensor, *Talanta*, **2009**, 78, 596~601
54. J.J. Ren, D.P. Tang, B.L. Su, J. Tang, G.N. Chen, Glucose Oxidase-doped Magnetic Silica Nanostructures as Labels for Localized Signal Amplification of Electrochemical Immunosensors, *Nanoscale*, **2010**, 2, 1244~1249
55. G.F. Jie, J.J. Zhang, D.C. Wang, C. Cheng, H.Y. Chen, J.J. Zhu, Electrochemiluminescence Immunosensor Based on CdSe nanocomposites, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 4033~4039
56. D.L. Klayman, T.S. Griffin, Reaction of Selenium with Sodium Borohydride in Protic Solvents. A Facile Method for the Introduction of Selenium into Organic Molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 10, 197~199
57. 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**
58. M. Pereira, E. P.C. Lai, Capillary electrophoresis for the Characterization of Quantum Dots after Non-selective or Selective Bioconjugation with Antibodies for Immunoassay, *J. of Nanobio.*, **2008**, 6, 1~15
59. Qdot® Antibody Conjugation Kits User's manual, invitrogen company, Revised: **2008**
60. W.W. Yu, L.H. Qu, W.Z. Guo, X.G. Peng, Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals, *Chem. Mater.*, **2003**, 15, 2854~2860
61. H. Jiang, H.X. Ju, Electrochemiluminescence Sensors for Scavengers of Hydroxyl Radical Based on Its Annihilation in CdSe Quantum Dots Film/Peroxide System, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 6690~6696
62. E. Kucur, F.M. Boldt, S.C. Jaricot, J. Ziegler, T. Nann, Quantitative Analysis of Cadmium Selenide Nanocrystal Concentration by Comparative Techniques, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 8987~8993
63. 林念容, 硒化鎘量子點電化學發光應用於人類血清儲鐵蛋白免疫分析, 東海大學碩士論文, **2009**
64. 王嘉薇, 丁醯化幾丁聚醣之研究, 國立成功大學碩士論文, **2002**
65. 吳仲韋, 不同分子量之幾丁聚醣與纖維摻合於薄膜製程及物性之研究, 國立中央大學碩士論文, **2002**

66. G.F. Jie, B. Liu, H.C. Pan, J.J. Zhu, H.Y. Chen , CdS Nanocrystal-Based Electrochemiluminescence Biosensor for the Detection of Low-Density Lipoprotein by Increasing Sensitivity with Gold Nanoparticle Amplification , *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 5574~5581
67. S. N. Sharma, Z. S. Pillai, P. V. Kamat , Photoinduced Charge Transfer between CdSe Quantum Dots and p-Phenylenediamine , *J. Phys. Chem. B*, **2003**, *107*, 10088~10093
68. G.F Jie, P. Liu, L. Wang, S.S. Zhang , Electrochemiluminescence Immunosensor Based on Nanocomposite Film of CdS Quantum Dots Carbon Nanotubes Combined with Gold Nanoparticles-Chitosan , *Electrochem. Commun.*, **2010**, *12*, 22~26
69. L.J. Hua, H.Y. Han, H.b. Chen , Enhanced Electrochemiluminescence of CdTe Quantum Dots with Carbon Nanotube Film and Its Sensing of Methimazole , *Electrochim. Acta*, **2009**, *54*, 1389~1394
70. J.A. Ho, Y.C. Lin, L.S. Wang, K.C. Hwang, P.T. Chou , Carbon Nanoparticle-Enhanced Immunochemical Detection for Protein Tumor Marker with Cadmium Sulfide Biotracers , *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 1340~1346
71. Ferritin ELISA Kits User's manual, Catalog Number : 25-FERHU-E01, ALPCO Company, Version:102709–ALPCO, **2010**
72. 羅月婉，人血清白蛋白在陽離子/質體 DNA 復合物之 DNA 遞送效能研究，國防醫學院碩士論文，**2009**
73. C.G. Huang, N. Na, L.Y. Huang, D.C. He, J. Ouyang , TEMED Enhanced Photoluminescent Imaging Detection of Proteins in Human Serum Using Quantum Dots after PAGE , *J. Proteome Res.*, **2010**, *9*, 5574~5581
74. 林義傑，壓電晶體免疫感測器應用於甲型胎兒蛋白之檢測，中國文化大學碩士論文，**2003**
75. 張文祥，新型聚合血紅素做為人工替代血液之研究，國立清華大學博士論文，**2002**
76. 曾錦鴻，利用輸鐵蛋白促進基因遞送之研究，國立臺灣大學碩士論文，**2001**