

## 第一章 緒論

### 1.1 過氧化氫之簡介

自由基(free radical) 是指外層軌道上有一個或一個以上未配對電子的分子、原子或離子基團。在生物體內，自由基多來自氧化還原反應的中間產物，產生來源可分為內生性與外源性兩部份，內生性來源包括粒線體電子傳遞鏈、氧化反應、噬菌體細胞和自我氧化反應等。其中於電子傳遞鏈的各步驟中，會漏掉部份的電子，約有 2-5% 的氧會形成含氧自由基，為內生性自由基主要來源。外源性自由基的產生是由於生物體暴露於物理刺激或化學物質中，例如熱、游離輻射、抽煙、環境污染，使生物體內分子失去穩定性而生成自由基。自由基產生後容易與其它的物質進行連鎖反應產生更多新的自由基，當自由基過多時會與生物分子引起超氧化反應，造成蛋白質與核酸的損傷，導致細胞結構與功能性的損害(Breen and Murphy 1995; Cadet et al. 2003; Schreck et al. 1992)。

生物體內之有氧代謝過程中，所形成眾多種類的自由基，最常見的為含氧自由基(oxygen-containing free radicals)，包括超氧陰離子(superoxide anion radical;  $\cdot\text{O}_2^-$ )、過氧化氫(hydrogen peroxide;  $\text{H}_2\text{O}_2$ )、氫氧自由基(hydroxyl radical;  $\cdot\text{OH}$ )、單重態氧(single oxygen;  $^1\text{O}_2$ )等，此類帶有不穩定電子之含氧自由基，又稱為活性氧自由基(Reactive

oxygen species; ROS) (Kong et al. 2000)。根據 Fraga 等人的研究結果顯示，人體的每個細胞中每天遭受到活性氧自由基攻擊所造成的 DNA 氧化損傷的頻率高達  $10^4$  次，若損傷的 DNA 未及時被修復將可能導致細胞老化、癌症、心血管與腦神經方面的疾病(Fraga et al. 1990)。

生物體中存在各種可代謝自由基之抗氧化酵素，包括超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase; SOD)、過氧化氫酶(Catalase; CAT)與穀胱甘過氧化酶(Glutathione Peroxidase; GSHPx)，其通過各自的作用途徑代謝特定種類自由基，維持生物體內自由基產生與清除的動態平衡。

當超氧陰離子自由基生成後，會被生物體內用於消除超氧陰離子自由基之超氧化物歧化酶(SOD)作用而轉化成過氧化氫，為了防止細胞中過氧化氫大量的累積，所產生的過氧化氫會被過氧化氫酶(CAT)與穀胱甘太過氧化酶(GSHP)進一步代謝成水，未及時被代謝的過氧化氫可經由尿液排出生物體，因此藉由尿液中過氧化氫濃度測定，可得知生物體內自由基濃度指標(Farr and Kogoma 1991; Halliwell and Gutteridge 1992; Kasprzak 1991)。人體尿液中過氧化氫的濃度除了會受到生理代謝影響，亦會受到飲食與生活習慣所影響，具有抽煙、喝咖啡與熬夜等習慣皆會造成過氧化氫濃度增加，根據 Long 等人的研究結果指出，當尿液中過氧化氫的濃度高於  $100 \mu\text{M}$  時，會與癌症、

腦神經與心血管疾病產生有直接的關係(Long et al. 1999)。

於臨床生化檢驗項目中，過氧化氫亦為眾多生化物質經由酵素催化反應後之產物，經由過氧化氫濃度的測定，可間接得知生化待測物質的濃度，例如：血糖(Xian et al. 2006; Yabuki and Fujii 2009)、尿素(Cho and Huang 1998; Luo and Do 2004)、尿酸(Arora et al. 2007; Castillo-Ortega et al. 2002)、膽固醇(Arora et al. 2007; Singh et al. 2006)與膽鹼(Rahman et al. 2004)。

過氧化氫的檢測十分重要，其廣泛使用於臨床醫療、食品、工業製程、環境監測等領域上，常見的檢測方法有滴定法(titrimetry) (Kalous et al. 1993)、酵素法(enzymatic) (Demmano et al. 1996)、光譜法(spectrometry) (Sunil and Narayana 2008)與化學發光法(chemiluminescence) (Aizawa et al. 1984; Nakashima et al. 1991)，但這些方法存在容易有干擾、檢測時間長、容易造成環境污染及分析所使用的試劑昂貴等缺點。使用生物感測器感測過氧化氫，具有價格低廉、檢測時間短與靈敏度高等優點(Li et al. 2007; Liu et al. 2008; Razola et al. 2002; Ryan et al. 2006; Sun et al. 2007; Xiao et al. 1999)，為近年來大量被研究與發展的感測方法。根據文獻資料統計，感測過氧化氫之生物感測器文獻數量，佔所有生物感測器文獻數量的比重超過65% (Mogharrab and Ghourchian 2005)。

## 1.2 生物感測器之簡介

### 1.2.1 生物感測器之定義與發展歷史回顧

生物感測器(Biosensor)是由具特異性的生物辨識元件(例如：核酸、蛋白質、抗體與細胞)與可以將生化性訊號轉變成處理及顯示訊號的信號轉換器(Transducer)所組成，用來偵測生物體內或體外的環境化學物質或與之特異性交互作用後產生回應的一種分析儀器(Gerard et al. 2002)，其構成與偵測原理如 Fig. 1-1 所示。

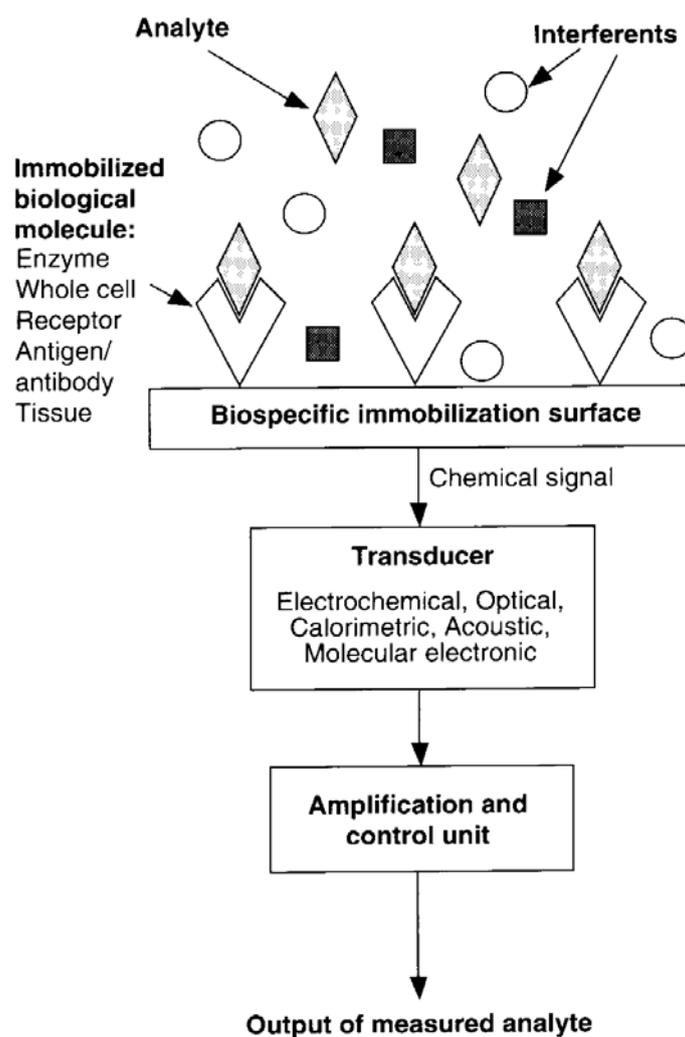


Fig. 1-1 生物感測器組成示意圖 (Scouten et al. 1995)

生物感測器對血糖、尿酸、血脂的檢測，於醫療檢驗上有相當重要的幫助。生物感測器與傳統的定量分析方法比較，具有以下優點：

- I. 因生物分子的辨識功能具有較高的專一性(specificity)與選擇性(selectivity)，可避免雜質的干擾，所以分析樣品不須經過繁雜的前處理。
- II. 生物分子透過固定化後，可重複使用，大幅降低感測的成本。
- III. 量測方便、操作簡單，感測所須時間短。
- IV. 靈敏度高、所須待測樣品量少。
- V. 分析所得的結果可轉換為電子信號適用於自動化量測，亦可使用於連續式追蹤感測。

生物感測器主要包括辨識元件 (recognition element)和信號轉換器(transducer)兩部份所組成。使用生物元件 (biological component)當作辨識元件，其優點是具有相當高的選擇性 (selectivity) 和專一性 (specificity)，而且有相當快的反應速率；其缺點是生物元件的穩定性較差，易受環境因素及不當操作而遭到破壞，造成感測器的使用準確性降低。常用的辨識元件如 Table 1-1 所示：

**Table 1-1 生物辨識元件之組成分**

生物辨識元件 (biological component)	優點 (advantages)	缺點 (disadvantages)	成功例子 (examples)
<b>1. 化學受體(chemoreceptors)</b>	天然構造已具最適偵測條件	脆弱，使用壽命短	
原始構造(intact structures)	靈敏度高	用來儲存及固定化困難	(Yang et al. 2002)
受體蛋白質(receptor proteins)		僅少數種類可以使用	(Sung et al. 2006)
<b>2. 抗體/抗原(antibodies/antigens)</b>			
多株抗體(polyclonal antibodies)	價格較不昂貴	具多種結合常數，且結合常數較低，選擇性較低	(Newcombe et al. 2006)
單株抗體(monoclonal antibodies)	具單一結合常數，且結合常數較高，選擇性較佳	價格昂貴，來源不易	(Sonezaki et al. 2000)
抗體片段(antibody fragments)	較易定向	製備繁瑣，易失活性	(Hudson 1998)
酵素/抗原聯接或標誌之抗體	具信號放大效果	來源不易，製備繁瑣	(Chen et al. 2005)
<b>3. 生物催化劑(biocatalysts)</b>			
酵素(enzyme)	生物選擇性及活性佳	來源不易，穩定性受限制	(Kafi et al. 2008)
酵素序列(sequence enzyme)	反應途徑擴展	易受干擾，操作條件較嚴苛	(Shu and Wu 2001)
微生物細胞	變化大且可以再生	選擇性差，使用壽命短	(Pemberton et al. 2009)
<b>4. 植物/動物組織</b>	活性高，天然形態	易受干擾及污染	(Felix et al. 2006)

生物感測器的發展可分為三個世代，第一代生物感測器發展源起於 1962 年，Clark 以及 Lyons 首先提出酵素電極的概念。於溶氧電極上，使用含葡萄糖氧化酵素的薄膜將葡萄糖轉換成溶氧，經由溶氧的偵測可檢測出葡萄糖的濃度的方法(Clark and Lyons 1962)，其感測機制示意圖如 Fig. 1-2 所示。隨後於 1967 年，Updike 與 Hicks 結合葡萄糖氧化酵素與溶氧電極，成功地製造出監測葡萄糖的生物感測器(Updike and Hicks 1967)。1970 年代 Yellow Spring Instruments (YSI)

公司積極投入商品化開發與生產，第一代生物感測器於 1979 年成功投入醫檢市場，成為第一家血醣檢測商品化的公司。此一商品化的成功帶動了生物感測器的研發熱潮。

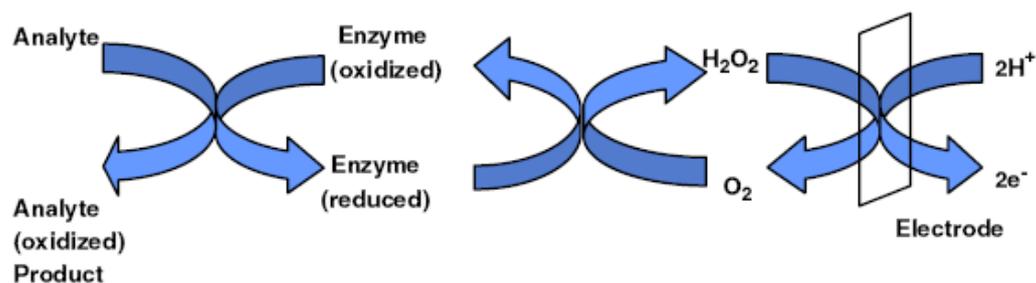


Fig. 1-2 第一代生物感測器之感測機制示意圖(Ahuja et al. 2007)

儘管第一代生物感測器得到廣泛的研究與改進(Dong and Kuwana 1991)，但由於這類型的感測器是通過檢測中間產物過氧化氫的濃度變化或溶氧的消耗量來檢測待測物的濃度，因此普遍存在以下幾點問題：(1) 在較高的操作電壓容易造成感測樣品中易氧化物質的氧化，而產生訊號的干擾；(2) 由於氧的溶解度有限，當溶氧濃度過低時會影響檢測靈敏度與偵測極限；(3) 感測性能受到 pH 值與溫度的影響較大。為了克服這些問題，一些電化學活性良好的電子傳遞介質(electron mediator)被應用於生物感測器的製備，產生所謂的第二代生物感測器。此類型的生物感測器使用電子傳遞介質來取代氧氣成為電子接受者，常被使用的電子傳遞介質有二茂鐵(ferrocene) (Garcia et

al. 1998; Viswanathan and Ho 2007)、對苯二酚(hydroquinone) (Lei et al. 2004)等,其感測機制示意圖如 Fig. 1-3 所示。其產品代表為 Medisense 公司於 1988 年成功開發出利用電子傳遞介質來縮短應答時間與提高靈敏度而聲名大噪,並開發出筆型及名片型等方便攜帶的產品,於 1988 年產品上市後即囊括了 70%以上的生物感測器產品市場,成為生物感測器市場中最知名的品牌。

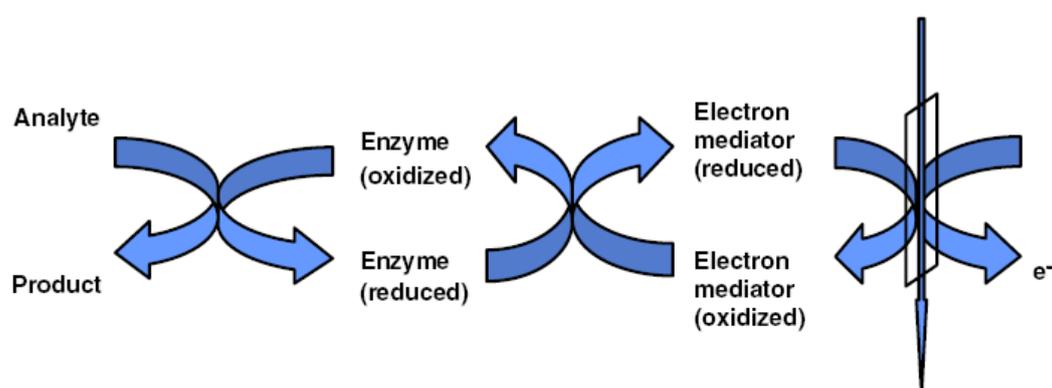


Fig. 1-3 第二代生物感測器之感測機制示意圖(Ahuja et al. 2007)

前兩代的生物感測器都需要媒介物作為電子的受體(或載體)才能完成催化循環程序,因此屬於間接電催化反應。第三代生物感測器則是將酵素與電子傳遞物共同固定於電極表面之氧化還原膜或是導電高分子膜上,酵素與電極之間直接進行電子交換,進行直接電催化反應,提高其電子傳輸效率,其感測機制示意圖如 Fig. 1-4 所示。

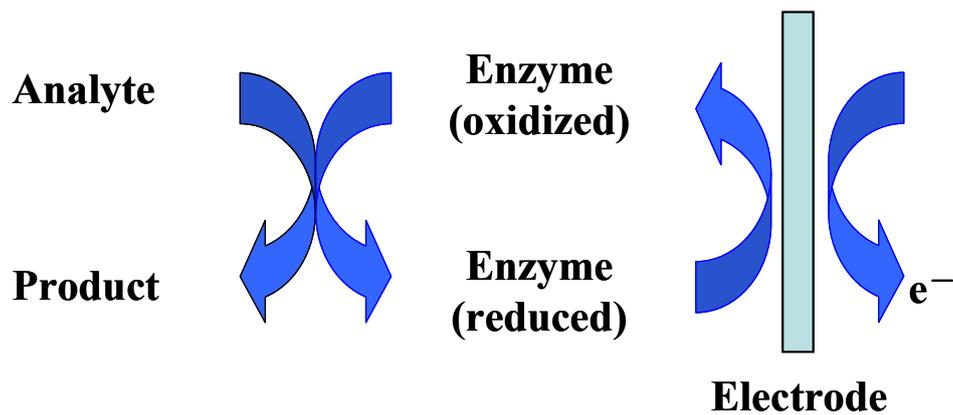


Fig. 1-4 第三代生物感測器之感測機制示意圖

相較於化學感測器所使用的催化觸媒，酵素的分子量較大，分子結構更複雜，其活性中心往往緊密被酵素結構之胺基酸所包圍，使其不易靠近電極表面。因此第三代生物感測器的製備方式，常將酵素直接固定於電極表面所修飾高分子膜，其修飾的高分子膜可分成兩類，一類為導電性高分子膜如聚苯胺(polyaniline; PANI)、聚吡咯(polypyrrole; PPy)等(Cosnier 1999; Guimard et al. 2007; Malinauskas et al. 2004; Saxena and Malhotra 2003)。近年來，導電性高分子因具備優異的導電性，可增加電極的電活性面積以及較小的背景電流等優點，被廣泛的被應用於生物感測電極的製備。另一類高分子膜為具有選擇性薄膜如 Nafion、聚氯乙烯(polyvinylchloride)、醋酸纖維素(cellulose acetate)等，由於此類薄膜具有不同的孔徑、正負電荷與極性，因此可選擇適當種類的薄膜修飾於電極表面可有效隔離干擾物於電極上進行反應。

## 1.2.2 生物感測器的分類

生物感測器分析之特異性，是由其使用之生物辨識元件而定。依生物辨識元件之特性，可將生物感測器區分成兩大類：

### (I) 生物親和型感測器

此類型感測器之生物辨識元件不具催化作用，當生物辨識元件與待測分子因親合力結合時，造成生物分子形狀改變或引起電荷、光、熱或質量等物理性質的變化，此種經由分子結合進行偵測的生物感測器常見於免疫感測器與化學受體感測器等，其待測分子可為抗體、抗原、荷爾蒙、蛋白質等物質，而相對應的生物辨識元件為抗原、抗體、荷爾蒙受體、染劑等。

### (II) 生物催化型感測器

此類型感測器的信號偵測並不只基於分子的結合辨識，而是利用此類生物辨識元件之催化能力與選擇性，與待測分子反應後，將待測分子代謝所產生之變化或代謝產物藉由轉換元件偵測後，將訊號轉換成電子訊號表現出來，第一代生物感測器即是利用此偵測原理所製備。

組成生物感測器的另一個重要的元件為信號轉換器，其作用是將生物反應後所產生的難以判定的電子或化學信號轉換成可被處理、量化顯示與儲存之訊號，例如電訊號、光學、聲波或熱能等訊號(Morgan

et al. 1996)，依據信號轉換器的種類，可將生物感測器分為以下幾種：

### (1) 電化學生物感測器 (Electrochemical Biosensor)

此類型的生物感測器為發展最完備的系統，電化學式生物感測器結合了生物感測層的特異性與電化學感測器之高靈敏度、應答時間短等優點。電化學感測器能將生物所偵測到訊號轉變成電子訊號，此電子訊號強度於部份的分析物中與其濃度成比例關係。依據訊號的特性，電化學生物感測器可分為以下三類：

#### (a) 電位式生物感測器 (Potentiometric biosensor)

依據電化學原理，各物質在電極上均有特定的反應平衡電位，當待測物於感測系統中，會於電極表面累積電荷，藉由偵測電極與待測物在電極界面因電位能差所產生的電壓，可得知待測物的濃度，其感測電位訊號與待測物的濃度成對數關係，此方程式即為 Nernst equation：

$$E = E_0 + RT/nF (\ln \gamma C) \quad (1-1)$$

其中

E：所測量到的電位

$E_0$ ：formal potential

R：理想氣體常數(8.314 J mol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>)

T：絕對溫度 (K)

n：離子帶電荷數

F：法拉第常數(96500 C mol<sup>-1</sup>)

$\gamma$ ：待測物活性

C：電極上待測物之濃度

(b) 電流式生物感測器 (Amperometric biosensor)

電流式生物感測器偵測原理在感測系統中外加一適當的電位，提供電極界面足夠的能量，使得待測物質能夠在電極表面進行氧化還原反應，經由偵測待測物質在電極表面進行的氧化還原所產生的電流大小，而得知待測物質的濃度，其電流(I)與待測物的濃度(C)成正比關係：

$$I = nAFD_s C / \delta \quad (1-2)$$

其中

n：電極上之電荷轉移數

A：電極面積

F：法拉第常數(96500 C mol<sup>-1</sup>)

D<sub>s</sub>：待測物之擴散係數

C：待測物濃度

δ：電極表面之擴散層厚度

(c) 電導式生物感測器 (Conductometric biosensor)

此類型感測器是以量測電導度的改變量來得知待測物濃度。對於導電體而言，電導度與電阻成倒數關係，依據歐姆定律可表示為：

$$G = I/E \quad (1-3)$$

其中 G 為電導度，I 為電流，E 為電位。

由於電流式有較大的感測訊號，其應答電流訊號與待測物濃度呈一次方線性正比關係，於電化學式感測系統中最常被使用。

## (2) 壓電晶體生物感測器 (Piezoelectric quartz crystal biosensor)

壓電晶體生物感測器之感測原理主要是利用塗佈於壓電晶體電極表面之生物元件，例如抗體或抗原等，對待測物具有專一性的結合，使得晶體表面質量變化而使晶體的振動頻率改變，經由其振動頻率的改變來偵測壓電石英晶體表面微量的質量變化，例如抗體與抗原結合後會造成感測器上因質量增加而使共振頻率下降，經由晶體表面質量的變化與其振動頻率變化之線性應答關係，可檢測待測物的濃度。

## (3) 離子選擇性場效電晶體 (Ion Sensitive Field Effect Transistor, ISFET)

此類型之半導體是由金氧半場效電晶體 (Metal-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor, MOSFET) 改良而成，由 Piet Bergveld 於1970 年提出(Bergveld 1970)，使用不易被水分子及離子物質侵入的氮化矽( $\text{SiN}_4$ )膜取代MOSFET的金屬閘極，以使電化學感測元件具備微型化與適合自動化量測之優點，在於氮化矽膜上共價接合一層已固定化生物元件之薄膜當作離子選擇膜，透過其與待測生物元件上的離子反應，將使該離子感應膜上的電位改變而輸出電訊號。目前已有可以感應 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 等離子的離子選擇性場效電晶體。

#### (4) 光纖生物感測器(Fiber-optic biosensor)

光纖具低光損失、低色散、高撓性且無電磁干擾的優點，因此廣被開發作為機械、環控、生物等各類感測器。而光纖感測器亦因調制的機制可以分成兩類：

##### (a) 本質光纖感測器(intrinsic fiber sensor)：

光於光纖纖核中靠全反射條件傳遞，當光穿透感測區並與樣品進行作用，因光學特性改變而影響於光纖纖核中傳遞的光之強度、相位、極化偏振，透過這些變化量的量測而分析待測物的含量。

##### (b) 非本質光纖感測器(extrinsic fiber sensor)：

光於光纖纖核中傳遞，遇到感測區時部份光將進入感測區而後再耦合進入光纖纖核中，當光穿透感測區時並未與樣品進行作用，離開光纖被調節後再進入光纖中的感測器，稱為非本質光纖感測器，例如表面電漿共振(surface Plasmon resonance, SPR)即屬於此類型。

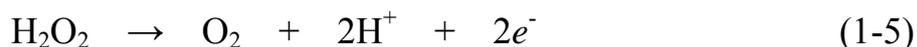
光纖生物感測器可以高靈敏地感測生物樣品及具化學發光之物質，經常被使用於免疫分析檢驗之應用。

### 1.2.3 過氧化氫生物感測器之文獻回顧

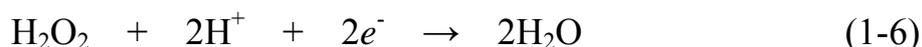
過氧化氫的氧化還原反應如(1-4)式所示，可經由氧化的程序將過氧化氫氧化成氧氣，或經由還原的程序將過氧化氫還原成水。



使用電化學方式感測過氧化氫最常見的方法可分為兩種，分別為經由氧化的路徑，過氧化氫於電極上氧化成氧，在氧化反應的過程中會有兩個電子轉移到電極上，經由偵測氧化電流的大小，可得知感測電流與過氧化氫的濃度，如(1-5)式所示。



另一種感測方法為經由還原的程序，將過氧化氫還原成水，在還原反應的過程中於電極上獲得兩個電子，經由偵測還原電流的大小，可得知感測電流過氧化氫濃度的關係，如(1-6)式所示。



關於生物感測器研究之文獻中，其中直接或間接感測過氧化氫感測之文獻比重佔65%。在電化學生物感測器之電極的製備方面，常被使用的電極基材包括黃金電極(Guo et al. 2009; Liu et al. 2009; Song et al. 2009; Wang et al. 2009; Xiang et al. 2009)、白金電極(Khudaish and Al-Farsi 2008; Miao et al. 2008)、玻璃碳電極(Liu et al. 2009; Wu et al.

2009)、石墨電極(Laurinavicius et al. 2008; Rezaei-Zarchi et al. 2008)等。

例如Kong (Kong et al. 2003)等人，於玻璃碳 (glassy carbon; GC) 電極表面修飾含羧酸基 (carboxylic acid group) 之聚合物 5,2':5',2''-terthiophene-3'- carboxylic acid polymer (TCAP)，再使用交聯劑 1-Ethyl-3-(3- dimethylamino-propyl)carbodiimide (EDC)將HRP酵素經由交聯方式固定於TCAP膜上，製備成HRP/TCAP/GC電極，於-0.2 V (vs. Ag/AgCl)的條件下感測過氧化氫，其感測濃度線性範圍為0.3 ~ 1.5 mM，偵測極限為0.2mM，感測後電極保存於4°C磷酸鹽緩衝溶液 (0.1M, pH7.4)中，於三星期後依然保有90%感測活性。

Xiao (Xiao et al. 2000)等人利用金硫鍵結於黃金電極上修飾半胱胺酸(cysteamine)，隨後將電極浸泡於含奈米黃金顆粒之膠體溶液中，吸附黃金顆粒於電極上，再將HRP酵素以吸附方式固定於奈米黃金顆粒表面，製備成HRP/Au colloid/cysteamine/Au電極，於-0.3 V (vs. Ag/AgCl)的條件下感測過氧化氫，其應答時間為15 sec，感測過氧化氫濃度線性範圍為1.4  $\mu$ M ~ 2.8 mM，偵測極限為0.58  $\mu$ M，感測後電極保存於4°C磷酸鹽緩衝溶液(0.1M, pH7.0)中，於兩星期後依然保有87%感測活性。

為了於電極表面創造更大的電活性面積及營造酵素固定化環境，於電極表面修飾導電性高分子為廣泛被使用的方式之一，導電性

高分子中聚苯胺以其良好穩定性及電化學氧化還原特性，而經常被使用於電極表面之修飾(Castilho et al. 2005; Fernandes et al. 2005; Jin et al. 2001; Mathebe et al. 2004; Yang and Mu 1997)。

### 1.3 酵素之簡介

Enzyme 一字源自希臘文，原意為 “in yeast”，意指在酵母菌中含有某種神奇的催化能力，可以將醴轉變成酒精。人類在確知酵素的  
存在及其作用前，早已利用它來釀酒或製造乳酪。真正的酵素研究始  
於 Buchner 兄弟(1895 年)，他們發現經由砂石破碎的酵母菌細胞，將  
其過濾後，其濾液中雖然不含活細胞，但仍具有將糖發酵生成二氧化  
碳和酒精的能力。Sumner 在 1926 年首先結晶出尿素酶(urease)，並證  
實酵素為一種蛋白質。一般而言，酵素具有下列特性：

1. 酵素具催化生化反應的能力，可增加其反應速率，是一種生  
物觸媒。
2. 酵素的催化能力具有專一性，催化反應具有可調節性，反應  
可受許多因素影響而加快或減緩。

#### 1.3.1 酵素之命名

最初酵素並無法定的命名規則，通常具有 -in 或 -zyme 等字尾，例  
如:chymotrypsin、trypsin、lysozyme 等；後來漸以該酵素催化的反應  
加上 -ase 字尾為名，再冠上此反應的反應物，例如：alcohol

dehydrogenase (反應物 + 反應 - ase)。

隨著酵素種類的逐日倍增，容易造成為數眾多的酵素研究者間，對於相同酵素但彼此間所使用的名稱不同的混淆與困擾。為此，國際生物化學聯盟( International Union of Biochemistry )的酵素委員會 ( Enzyme Commission )，有系統地制定了酵素的分類和命名法，同時對於酵素活性、反應速率常數等表示法也都有正式的規定。

### 1.3.2 酵素的分類

依酵素之催化反應可將酵素分為六大類：

1. 氧化還原酵素 (Oxidoreductase)：催化受質產生氧化還原反應的酵素。
2. 轉移酵素 (Transferase)：催化受質產生官能基轉移的酵素，包括  $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $\text{C}=\text{O}$  等官能基或含有 S、N、P 之原子團。例如：甲基轉移酵素 (Methyltransferase) 即是催化甲基轉移的酵素。
3. 水解酵素 (Hydrolase)：主要催化酯類、醚類、糖苷類 (Glucosides) 及 Peptides 等化合物的水解反應。例如：Carboxylic Ester Hydrolase 即是催化酯類水解的酵素。

4. 裂解酵素 (Lyase) : 催化受質而去除  $-\text{COOH}$  基、醛基等官能基的酵素。
5. 異構酵素 (Isomerase) : 此類酵素包含所有能催化光學異構性、幾何或位置不同之異構物的轉化酵素。例如順反異構酵素 (cis-trans-Isomerase) 中之 Aldoses-Ketones Isomerase, 即是催化醛類轉化成酮類的異構酵素。
6. 聯結酵素 (Ligase) : 利用切斷 ATP 之磷酸鍵結時產生的能量, 共軛結合兩個分子的酵素。

### 1.3.3 酵素的反應特性

一般而言, 酵素反應主要包含下列五個步驟:

1. 受質與酵素活性部位 (active sites) 結合。
2. 受質、酵素或兩者之構形變化 (conformational changes)。
3. 中間物(intermediates) 或過渡狀態(transition state) 之化學鍵的變化。
4. 產物的形成, 酵素與產物構形再變化。
5. 產物的釋放以及酵素回復原狀。

上述各個反應步驟中，除了受質與酵素結合的速率受限於質傳阻力外，其餘各步驟皆受酵素影響。此外，構形變化是非常重要的步驟，倘被其他的外在因素影響，整個反應將受到顯著的抑制，外在因素如受質濃度、緩衝溶液、pH 值、酵素種類、溫度、有機溶劑、金屬離子的存在與否等。

#### 1.3.4 辣根過氧化酵素(HRP)之簡介

過氧化酵素為一中心帶有原血紅素 (Heme) 的氧化還原酵素，廣泛存在於微生物及動植物細胞中。在動植物中許多的生理代謝過程，過氧化酵素皆扮演重要的角色，例如：防禦病原菌及細胞延長 (cell elongation)、植物木質化 (lignification)、促使傷口癒合等(Diazdeleon et al. 1993)。

在眾多種類的過氧化酵素中，辣根過氧化酵素為取自於辣根 (horseradish) 植物根部的過氧化酵素，稱之為辣根過氧化酵素 (horseradish peroxidase, HRP)，由於價格較便宜、取得方便且穩定性高，為最常被使用的過氧化酵素(Chen and Gu 2008; Smith and Veitch 1998; Veitch 2004)。

#### 1.3.4.1 HRP 之結構介紹

HRP 為由 308 個胺基酸所組成之單肽鏈，分子量為 44 kDa，其結構由胺基酸、活性中心之 heme group 與兩個鈣離子所組成，結構示意圖如 Fig. 1-5 所示。在胺基酸部份，分別於 11-91、44-49、97-103 與 177-209 的半胱胺酸 (cysteine) 存在四個雙硫鍵 (disulfide linkage)。Heme group 活性中心為正三價、五配位體之鐵離子，其分別與 porphyrin 形成四個配位之外，與 His170 形成第五個配位，如 Fig. 1-6 所示。結構中之兩個鈣離子並不參與酵素催化反應，但研究顯示這兩個鈣離子對於酵素的結構與活性穩定相當重要(Tsaprailis et al. 1998)。

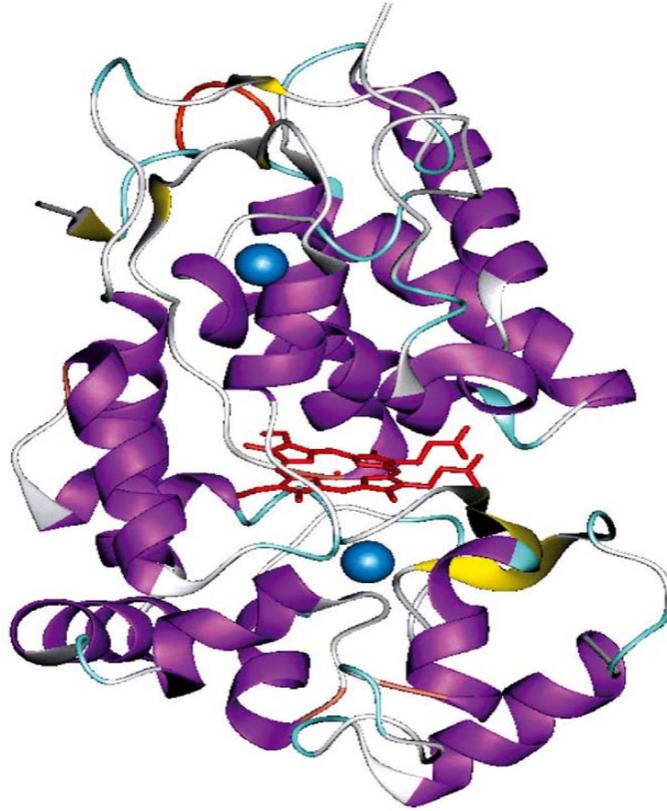


Fig. 1-5 HRP酵素之3-D結構示意圖 (Veitch 2004)

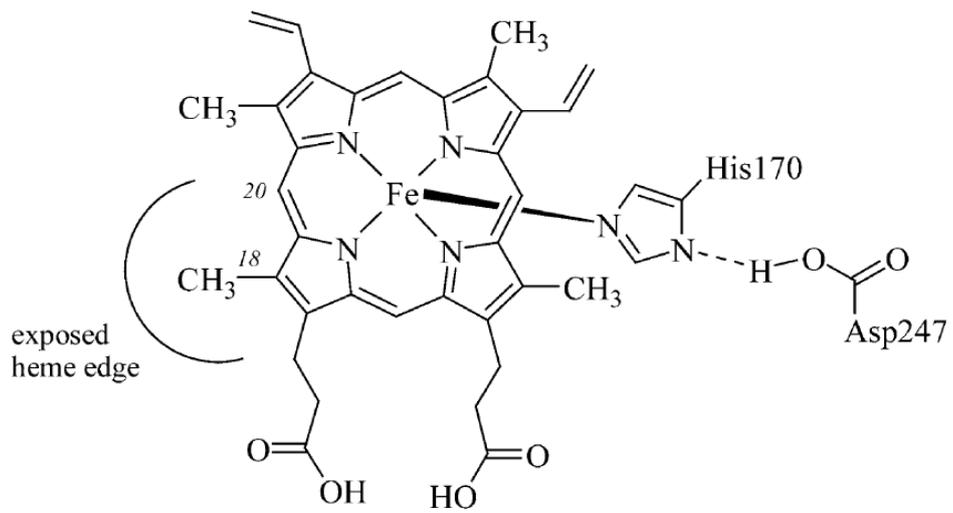
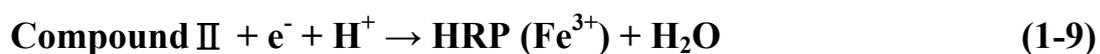
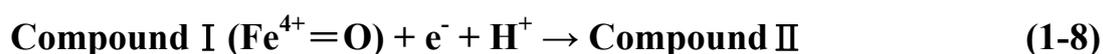


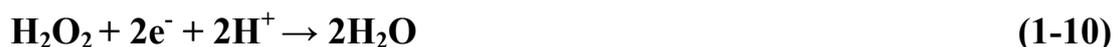
Fig. 1-6 HRP 酵素之活性中心(heme group)示意圖(Veitch 2004)

### 1.3.4.2 HRP 酵素催化過氧化氫反應機制

HRP 酵素催化過氧化氫反應機制如下所示(Ruzgas et al. 1996)：



全反應式：



當 HRP 被  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化後失去電子，形成正 4 價高氧化態之中間體 Compound I，然後再經兩次單一電子轉移，使 HRP 又回到原始正 3 價之狀態。

### 1.3.5 酵素固定化方法

近年來，生物感測器的研究與應用為感測器領域中最受注目的項目之一。在生物感測器的研究中，最關鍵的技術核心在於如何將生物辨識分子有效的固定於信號轉換元件上。其中酵素為最常被使用的生物辨識分子，因此如何保有酵素活性與固定化的穩定性，為生物感測器製備過程中最重要的考量因素。酵素固定化後其結構較穩定，活性

較不易衰退，而且酵素可以重複使用。一個好的固定化方法應滿足下列條件：(1) 快速、簡便；(2) 可固定各種成份分子，不具特異性；(3) 固定化後不易從基材脫落；(4) 被固定的分子可保持原有的結構與活性。

酵素固定化的研究範疇包括基材選擇與表面的修飾、酵素固定化方法的建立與改良。經常被使用的基材包括黃金、白金、玻璃、矽膠、碳材或其他經修飾的材料。酵素固定化方面，目前常被使用的方法有下列幾種：

### **1. 物理吸附法 (Physical adsorption method)**

物理吸附法是藉由生物分子與基材表面之間的凡得瓦爾力、偶極力與靜電力等物理作用力，將生物分子吸附於基材表面。用於吸附的材料種類繁多，包括有機、無機材料。此種方法的優點是操作簡易且對生物觸媒的結構影響較小，但其缺點是因吸附結合力相當弱，所吸附之酵素較易隨操作時間及次數、環境溫度或離子濃度變化而逐漸流失，造成偵測訊號降低。

### **2. 包埋法 (Entrapment method)**

生物分子被包埋在多孔的基材中，方法簡單且適合於各種生物分子，但需適當控制包埋的條件，使用此法固定的生物分子不易脫落。

常用來固定的材料有：明膠(gelatin)、聚丙烯醯胺(polyacrylamide)、醋酸纖維素(cellulose acetate)、矽膠(silicon rubber)、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol)、Nafion、聚氯乙烯(polyvinylchloride)等高分子膜。為了達成包埋酵素之催化反應功能，酵素分子必須有效被包埋於高分子膜中，小分子的待測物必須能通過薄膜進行反應。然而，包埋法經過長時間的使用，酵素分子容易自高分子膜中流失，而降低感測的靈敏度，為此固定方法的缺點。

### **3. 離子結合法 (electrostatic interaction method)**

離子結合法是藉由基材與酵素之間帶相反電荷所形成之靜電吸引力(electrostatic force)而達到固定化的目的。適合的材料主要是聚合醣類(polysaccharides)或合成樹脂(synthetic resins)之商品化離子交換樹脂。此方法簡單且較物理吸附法穩定，但須注意維持正確的離子強度與酸鹼值，以防止脫落。

### **4. 化學鍵結法 (Chemical conjugation method)**

酵素結構上之胺基、羥基、氫硫基、氫氧基、酚基等皆可作為共價鍵結之官能基。通常此法較適用於固定酵素而非細胞，其缺點是在固定化的程序中，容易造成酵素的結構改變而導致活性喪失。交聯法是化學鍵結法中最常被使用的方法之一，其原理是透過具有雙或三官

能基試劑之協助將個別之生物觸媒單元(酵素或細胞)相互結合起來，以形成不溶狀之高分子量凝聚物。交聯作用除了生物觸媒間的結合之外，亦可利用非活性分子間的共交聯(co-cross-linking)來增加固定化後基材的機械強度與酵素活性的維持。

上述酵素固定化方法之優缺點比較如 Table 1-2 (Guimard et al. 2007)所示。

**Table 1-2 Immobilization techniques of biomolecules for biosensing devices (Guimard et al. 2007)**

<b>Immobilization technique</b>	<b>Principles of immobilization</b>	<b>Advantages</b>	<b>Limitations</b>
<b>●Non-covalent techniques</b>			
Adsorption	Electrostatic forces, hydrogen bonding, Van der Waal's forces, etc.	●Simple	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Biomolecule loss (desorption) over time</li> <li>●Limited control over immobilization</li> <li>●Random orientation on surface</li> </ul>
Entrapment	Molecule incorporation during electropolymerization	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Simple</li> <li>●Good proximity between elements</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Potential loss of biomolecule activity</li> <li>●Steric and diffusion constraints</li> <li>●Requires high biomolecule concentration</li> </ul>
Affinity binding	High affinity interactions such as avidin-biotin	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Control over molecule orientation</li> <li>●High accessibility of analytes</li> <li>●Minimal loss of biomolecule activity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Requires pre-immobilization of one of the affinity molecules (e.g., biotin)</li> </ul>
<b>●Covalent techniques</b>			
Chemical conjugation	Surface chemical reaction between functional groups	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Tighter control over immobilization</li> <li>●High accessibility of analytes</li> <li>●Minimal biomolecule loss over time</li> <li>●Control over biomolecule orientation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●Complex</li> <li>●Conditions are not always appropriate for biomolecules</li> <li>●Potential loss of biomolecule activity</li> </ul>

## 1.4 導電性高分子簡介

### 1.4.1 發展史

將一種或多種不同的小分子單體(monomer)藉由化學鍵結連接起來形成巨大的分子，就是所謂的高分子或聚合物(polymer)，其分子量大約介於  $10^4$  到  $10^6$  之間。高分子的分子量越大其機械強度也越強。一般有機高分子大都為絕緣體 (導電度小於  $10^{-12}$  s/cm)，其原因在於由碳氫化合物所組成的共價單鍵長鏈分子不具備可自由移動的電荷。導電高分子的主鏈是由單雙鍵交替連接的共軛有機高分子所組成，其鍵結除了  $\sigma$ - $\sigma$  單鍵鍵結之外，還有  $p$  軌域重疊的  $\pi$ - $\pi$  鍵結形成雙鍵，交替的單鍵—雙鍵之共軛鍵結 (conjugated bonding) 所組成具有本質 (intrinsic) 導電性，使得電子可沿著分子鏈移動，所以具有導電性，有別於一般摻入金屬粉或碳黑的高分子複合材料。

關於共軛結構的導電性高分子研究發展歷史，可追溯至1960年代，第一個被發現具有導電性的高分子為聚吡咯 (polypyrrole) (Street et al., 1986)。直到1977年，完整的導電性高分子膜研究報告由 Alan MacDiarmid, Hideki Shirakawa, 和 Alan Heeger 這三位研究學者(2000年諾貝爾化學獎得主)所發表，經由碘所摻雜的聚乙炔 (polyacetylene)，由原本柔軟、絕緣的銀色薄膜，轉變成具金屬光澤的金黃色導電薄膜，其導電度增加了  $10^9$  倍以上 (Heeger 2001;

Shirakawa et al. 1977), 開啟了導電性高分子的研究大門。雖然非環狀結構之聚乙炔在高分子的領域中是一個重要研究主題, 但因受限於其加工困難與在空氣中不穩定等缺點, 後續的研究發展並不如 polyphenylenes 等具環狀結構高分子熱門。具有芳香族之環狀結構高分子有較良好的熱穩定性, 因此後來關於導電性高分子的研究與開發以具有環狀結構的高分子為主, 例如: polypyrrole (PPy), polythiophene (PT), polyaniline (PANI), and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) 等 (如 Fig. 1-7 所示)。

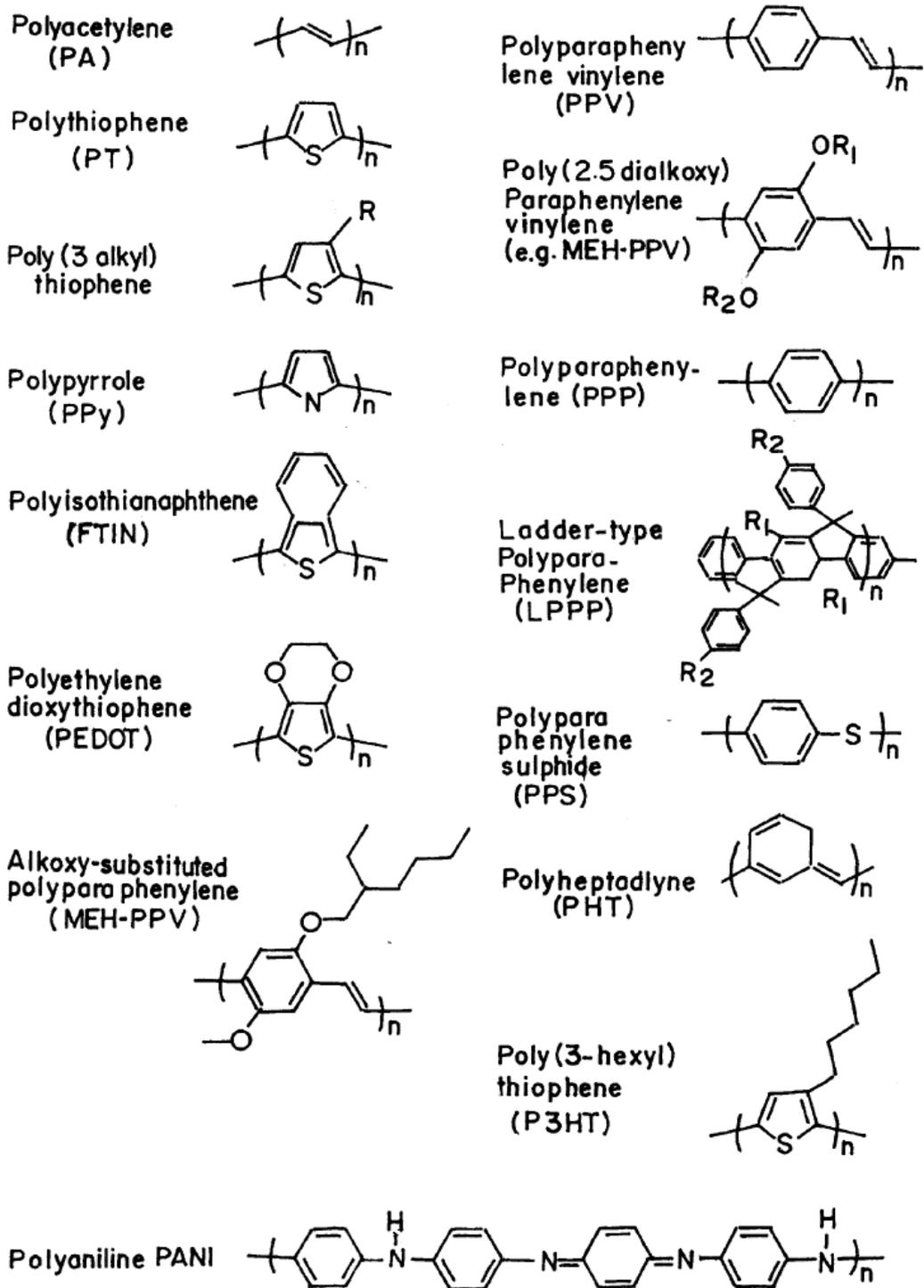


Fig. 1-7 常見的導電性高分子化學結構式 (Saxena and Malhotra 2003)

#### 1.4.2 導電性高分子的摻雜

導電性高分子藉由摻雜 (doping) 處理後，可大幅提升導電度至導體甚至到導體。其導電度 ( $\sigma$ ) 可由未摻雜前的  $10^{-12} \sim 10^{-9}$  S/cm，增加到摻雜後的  $10^3$  S/cm 或更高，相差多達  $10^{12} \sim 10^{15}$  倍之多，而依其摻雜程度的不同，涵蓋了絕緣體 ( $\sigma < 10^{-8}$  S/cm)、半導體 ( $\sigma \sim 10^{-12}$  S/cm) 及導體 ( $\sigma > 10^5$  S/cm) 等材料的導電範圍。導電性高分子在經摻雜後其結構相當不穩定，在空氣中極易損失其導電性。因為高分子鏈上之陰離子、陽離子及未鍵結的電子傾向與空氣中之水氣或氧氣作用而喪失其特性。

#### 1.4.3 導電性高分子之能帶理論與導電原理

物質的導電性取決於其電子結構，可用電子能帶理論 (band theory) 來分析其電子性質。在固體狀態時，由每一個原子的原子軌域重疊組成的分子軌域，其能量狀態為近似連續性的能帶 (energy band)，能帶中的電子數目以及最高電子佔有之分子軌域 (highest occupied molecular orbital ; HOMO) 和最低無電子佔有軌域 (lowest unoccupied molecular orbital ; LUMO) 能帶位置，依起初原子軌域包含的電子數目與軌域的能量有關。價電子所佔有之能帶稱為價帶 (valence band ; VB)，而在基態時無電子佔有之能帶稱為傳導帶

(conduction band ; CB)，價帶之最高電子能量與傳導帶之最低電子能量之間的能量間隔稱為能帶間隙 (band gap ;  $E_g$ )。傳統材料的電子性質由能帶的填充情況而定，當能帶全空或完全被填滿時，無任何電荷傳遞發生。絕緣體、半導體及金屬之能帶間隙如 Fig. 1-8 所示，絕緣體的能帶間隙較窄，則在室溫下，電子可從價帶熱激發至傳導帶，產生導電現象，即傳統半導體之導電行為。當能帶間隙較大時，電子在室溫下未能被激發跨越能帶間隙至傳導帶。金屬的能帶間隙為零，因此電子可自由躍遷至鄰近能階而具有高導電度。

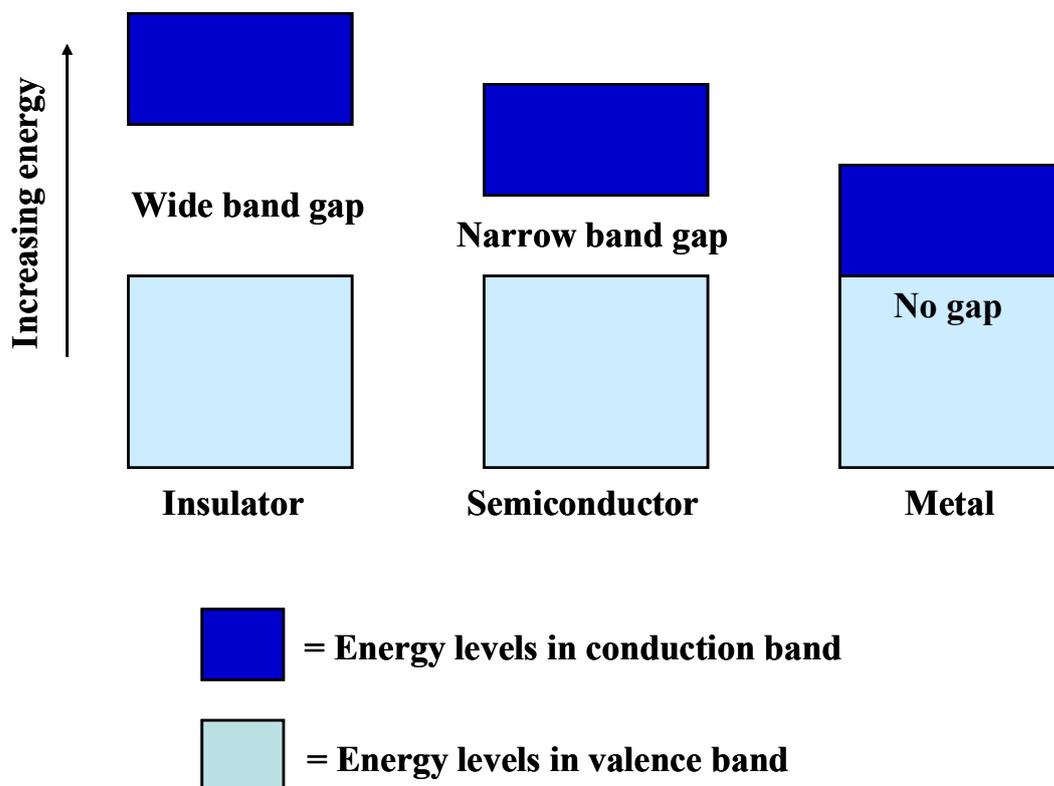


Fig. 1-8 絕緣體、半導體及金屬之能帶間隙 (Shirakawa et al. 1977)

對於導電性高分子而言，在摻雜前的導電度很差( $10^{-12}$  S/cm)，經摻雜後，一個電子由價帶上方被移走，產生一個空缺 (vacancy)稱之為電洞或自由基陽離子 (radical cation)。根據能帶理論來看，此空缺為部份不定域化 (delocalize)，而此部份不定域化將擴展到幾個單體單元，形成不安定的鍵結軌域 (bonding orbital)，所以其能階比價帶能階高。其能量的升高類似於當電子從填滿的分子軌域被移走後，其能階提升一樣。一個自由基陽離子在聚合物鏈中作部份不定域化，在固態物理學上則稱此自由基陽離子或電子-電洞對 (electron-hole pair)為極化子(polaron)。如果另一個電子再從已含極化子的分子鏈被移去時，將有兩種可能情形發生：(1) 電子由聚合物鏈上的其他部位移走，形成另一個極化子；(2) 電子從已形成的極化子上移走，產生新的雙陽離子 (bication)，固態物理學稱之為雙極化子 (bipolaron)。雙極化子的兩個正電荷並非各自獨立，而是成對存在。極化子或雙極化子皆可在電場作用下，藉著共軛系統沿著聚合物鏈移動。在高度摻雜狀態時，會有更多的雙極化子產生，其能帶重疊的情形下，可在能帶間隙產生較窄的雙極化子能帶 (bipolaron bands)，如 Fig. 1-9 所示。由圖中可看出，在摻雜後價帶與傳導帶之間出現了極化子與雙極化子能階，使得電子躍升至高能階的能隙變窄，因而提高了導電度(可達  $10^2$  S/cm 以上)。

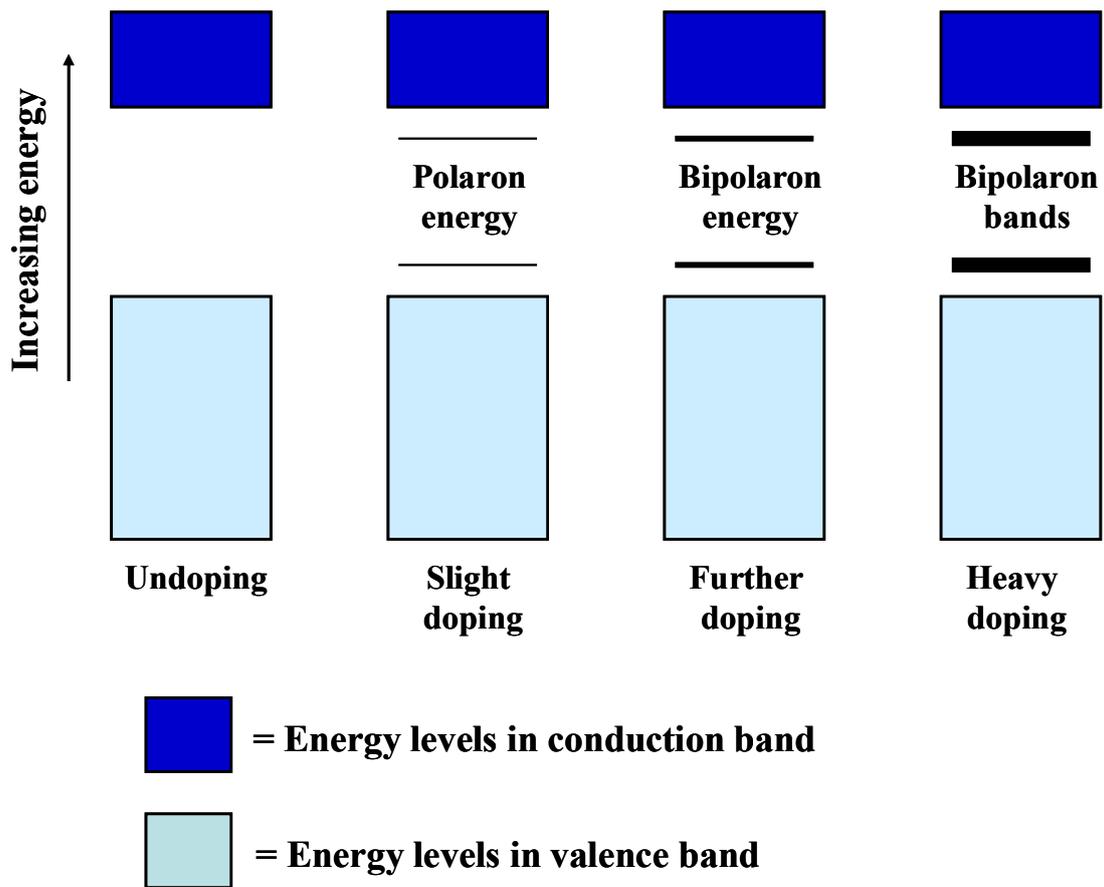


Fig. 1-9 極化子與雙極化子之能階圖 (Shirakawa et al. 1977)

#### 1.4.4 導電性高分子的應用

導電高分子在摻雜前為非導體，經摻雜後其導電度可於導體與半導體之間做調整，故可利用其導電度可改變的特性，應用於靜電防護 (Anti-static)、靜電放電 (Electrostatic discharge ; ESD)及 電磁波遮蔽 (Electro-Magnetic Interference (EMI) shielding)等材料。摻雜與去摻雜的過程中，會伴隨著能量的儲存與釋放，故可應用於電容器 (Capacitor) 與可充電電池 (Rechargeable battery)的電池極板製備。其良好的電化學氧化還原與可摻雜-去摻雜性質，可應用於化學感測器及生物感測器的感測元件。由於不同的摻雜程度與氧化狀態會改變導電性高分子的電子結構，因此其顏色會隨之改變，所以可用於智慧窗戶 (Smart window)與致電變色顯示器(Electrochromic display)的應用。導電性高分子主鏈上的共軛結構可以改變其導電度，而側鏈結構又會影響主鏈上的共軛情形，故可以利用光、電或磁場等方式來改變側鏈結構，以達到改變高分子的導電度，因此可應用於光電開關 (Photoelectricity switch)。近年來，關於導電高分子各方面的研究與應用不斷的被提出，並經實驗印證可行，Table 1-3 為目前導電性高分子之應用領域與項目整理。

**Table 1-3 Important potential application of conducting polymers**

<b>Applications</b>	<b>Contents</b>
<b>Electrical conduction</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Anti-static</li><li>•Electrostatic discharge</li><li>•EMI shielding</li></ul>
<b>Sensor</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Chemical sensor</li><li>•Biosensor</li></ul>
<b>Electrical field protection</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Cable shielding</li><li>•Radar shielding</li></ul>
<b>Electronic devices</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Smart window</li><li>•Solar cell</li><li>•Light emitting diode</li><li>•Electrochromic display</li><li>•Field effect transistor</li></ul>
<b>Chemical potential protection</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Anti-corrosion</li></ul>
<b>Charge storage</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Capacitor</li><li>•Rechargeable battery</li></ul>
<b>Semiconductor</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Lithography</li><li>•Via-hole electroplating</li></ul>
<b>Other (Miscellaneous)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>•Gas separation membrane</li><li>•Plastic welding</li><li>•Conductive adhesive</li><li>•Conductive gasket</li></ul>

## 1.4.5 導電性高分子聚苯胺

### 1.4.5.1 聚苯胺之結構型態與顏色變化

聚苯胺的結構中包含氧化單位與還原單位，以不同的比例存在形成不同的氧化還原態，Fig. 1-10 為聚苯胺的化學結構式，主鏈中存在不同比例的 benzenoid 與 quinoid 結構，其中 x 部份為聚苯胺之還原單位(reduction unit)，y 部份為氧化單位(oxidation unit)。

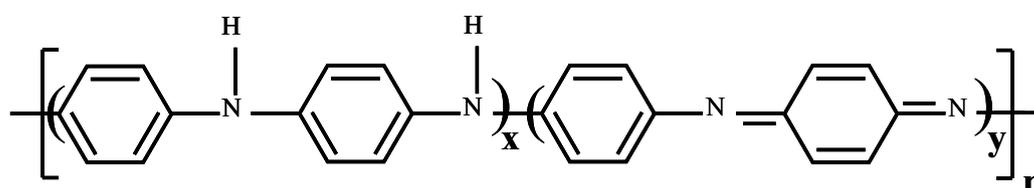
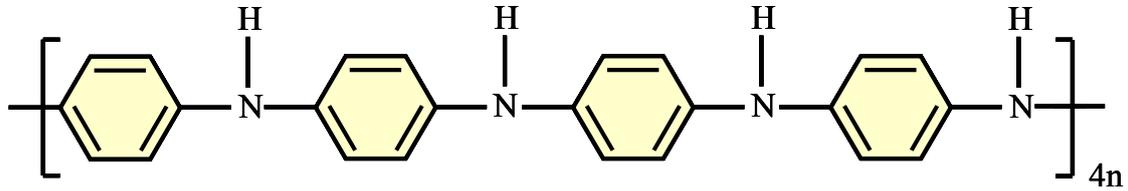


Fig. 1-10 聚苯胺之化學結構式(Yoon et al. 1991)

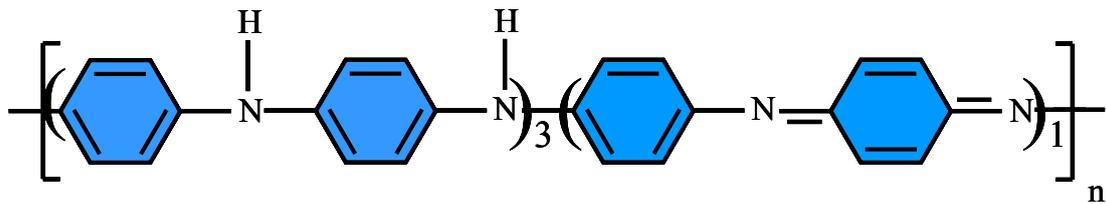
未摻雜狀態下，完全為還原單位的狀態稱為完全還原態 (Leucoemeraldine base, LB)，顏色為淡黃色(lemon yellow)。組成中含 75% 為還原單位的狀態稱為 Protoemeraldine base (PB)，顏色為淡藍色 (sky blue)。氧化與還原單位各佔一半的狀態稱為中間氧化態 (Emeraldine base, EB)，顏色為藍色 (medium blue)。組成中含 75% 為氧化單位的狀態稱為 Nigraniline base (NB)，顏色為深藍色 (dark blue)。完全為氧化單位的狀態稱為完全氧化態 (Pernigraniline, PB)，顏色為紫色 (purple)。不同氧化還原態的聚苯胺於未摻雜 (undoping) 及使用 HCl 摻雜 (doping) 後的狀態下，呈現不同的顏色變化，如 Fig. 1-11 及 Fig.

1-12 所示(Macdiarmid et al. 1985; Yoon et al. 1991)。

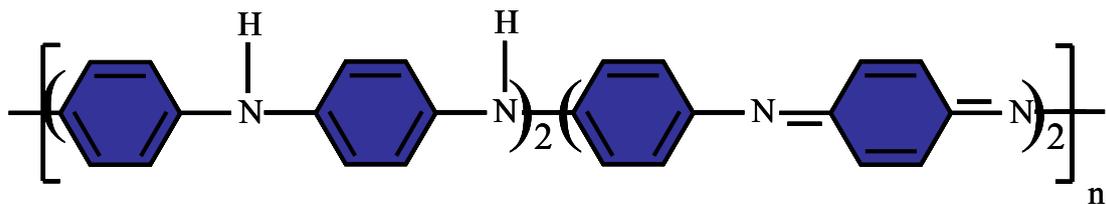
**Leucoemeraldine base (LB), Color : lemon yellow**



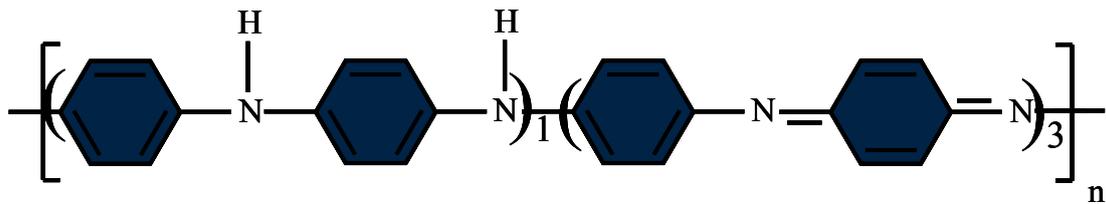
**Protoemeraldine base (PB), Color : sky blue**



**Emeraldine base (EB), Color : medium blue**



**Nigraniline base (NB), Color : dark blue**



**Pernigraniline base (PB), Color : purple**

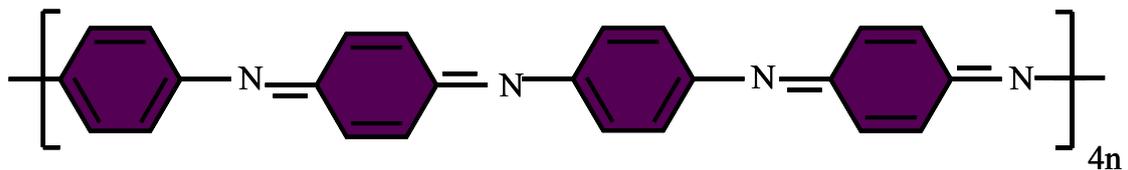
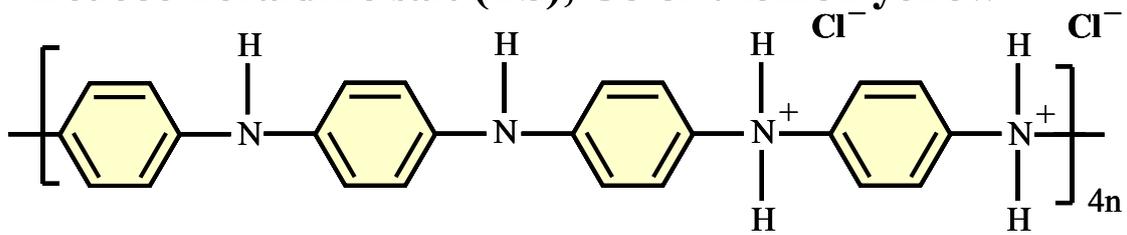
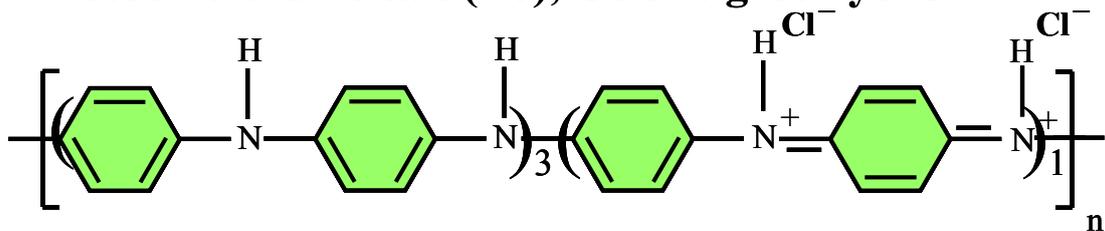


Fig. 1-11 未摻雜之聚苯胺於不同氧化還原狀態下的化學結構式及其相對應顏色 (Macdiarmid et al. 1985)

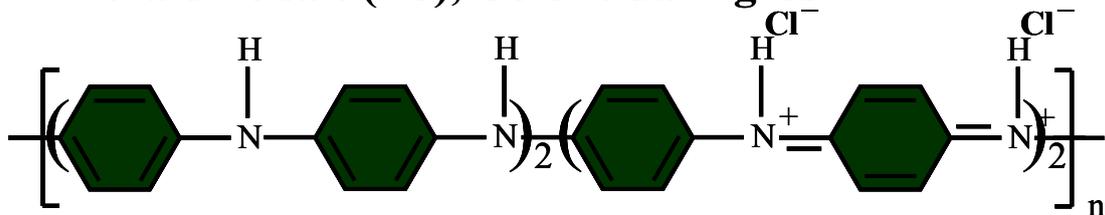
**Leucoemeraldine salt (LS), Color : lemon yellow**



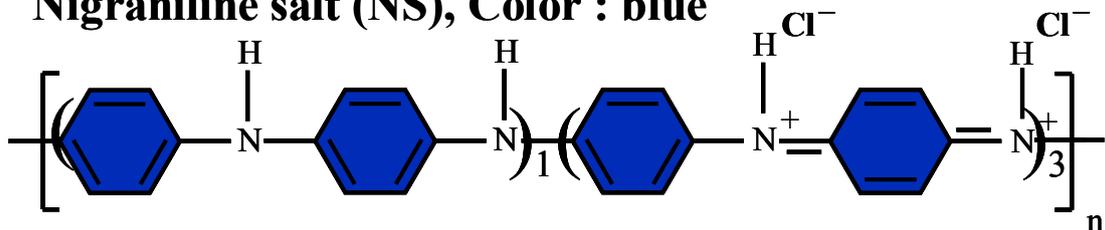
**Protoemeraldine salt (PS), Color : green yellow**



**Emeraldine salt (ES), Color : dark green**



**Nigraniline salt (NS), Color : blue**



**Pernigraniline salt (PS), Color : purple**

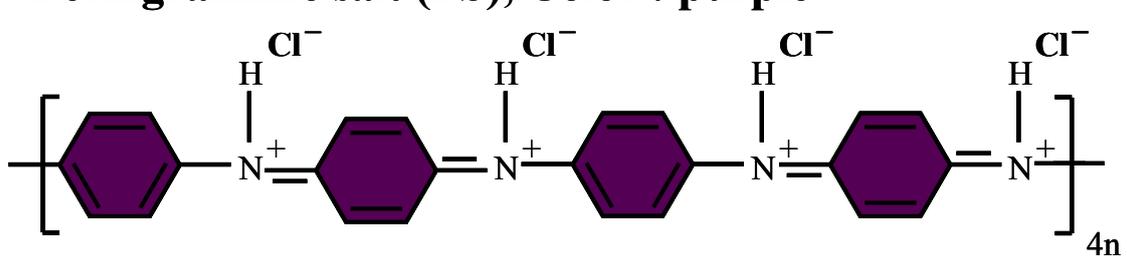


Fig. 1-12 摻雜氯離子之聚苯胺於不同氧化還原狀態下的化學結構式及其相對應顏色 (Macdiarmid et al. 1985)

於上述五種氧化還原狀態之聚苯胺中，最重受到重視形態為以深綠色(dark green)呈現之鹽式中間氧化態(Emeraldine salt)，因為它具有良好的導電性質。聚苯胺可藉由酸和鹼進行摻雜(doping)和去摻雜(undoping)的可逆過程來增加導電度，所以經由摻雜程序增加聚苯胺導電性是必要的程序。聚苯胺的導電度可由摻雜前的  $10^{-10} \sim 10^{-9}$  S/cm 提升至摻雜後的  $0.1 \sim 10$  S/cm。如 Fig. 1-13 所示，鹼式中間氧化態由原本不導電的狀態經由酸摻雜為可導電的鹽式中間氧化態，其原理與不導電的矽經由摻雜硼或砷後可行成 P 型或 N 型半導體類似。

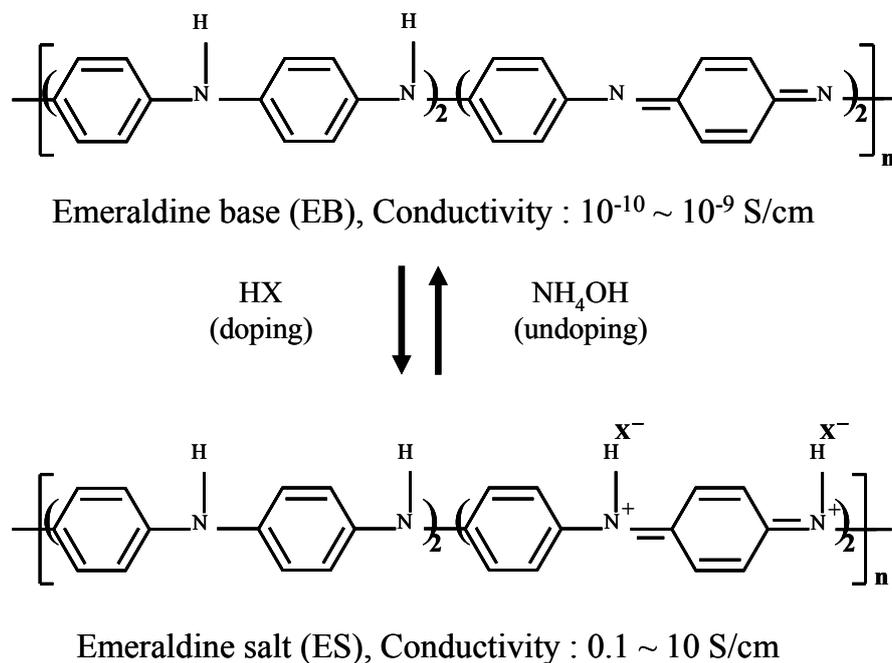


Fig. 1-13 聚苯胺摻雜與去摻雜示意圖 (Macdiarmid et al. 1985)

### 1.4.5.2 聚苯胺之合成

聚苯胺常用的合成方法有化學合成法與電化學合成法兩種，以下是這兩種方法的介紹：

#### A. 化學合成法

一般化學聚合法是先將苯胺單體溶於酸性溶液中，再加入氧化劑進行氧化聚合成聚苯胺。常用的氧化劑有：過硫酸銨 (ammomium peroxodisulfate,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ )、過硫酸鉀 (potassium peroxodisulfate,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ )及過氧化氫 (hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 等。

#### B. 電化學合成法

聚苯胺電化學合成的反應是利用陽極氧化的方式在電極上將苯胺單體進行氧化聚合成聚苯胺，其中以定電流(Galvanostatic)方式所產生的聚苯胺有較低的背景電流，其結構形態為顆粒或短纖維狀；使用定電位(Potentiostatic)方式所產生的聚苯胺為鬆散粉末狀，若電極表面沒有一層可緊密固定在電極上的物質幫助固定時，聚苯胺容易表面脫落(Diaz and Logan 1980)。經由循環伏安法(Cyclic voltammetry, CV)聚合成的聚苯胺具有容易製備，在室溫下可以聚合成均勻的薄膜，而且在空氣中具有良好的安定性且膜的厚度可透過聚合的圈數加以控制等優點。

### 1.4.5.3 聚苯胺之紅外線光譜分析

Table 1-4 為鹼式中間氧化態聚苯胺 (Emeraldine base) 的紅外線主要的吸收光譜。聚苯胺的紅外線光譜中吸收波長位於 $1510\text{ cm}^{-1}$ 與 $1587\text{ cm}^{-1}$ 附近處會有很強的波峰產生，分別代表苯環與昆環結構的拉伸模式(stretching mode)。隨著還原程度的增加，此兩個吸收峰的強度比( $A_{1587\text{ cm}^{-1}} / A_{1510\text{ cm}^{-1}}$ )會逐漸下降，且吸收峰位置會往高波數偏移。另外，鹽式中間氧化態 (Emeraldine salt) 的聚苯胺其N=Q=N 及 N-B-N 吸收峰比起鹼式中間氧化態的聚苯胺要向低波數偏移，其吸收強度大致相同，而同時N=Q=N 的吸收峰也自 $1140\text{ cm}^{-1}$  附近移至 $1120\text{ cm}^{-1}$  附近(Tang et al. 1988; Trchova et al. 2005; Trchova et al. 2004)。

**Table 1-4 聚苯胺的紅外光吸收光譜 (Tang et al. 1988)**

吸收波長 (cm <sup>-1</sup> )	振動模式
3460	NH <sub>2</sub> asymmetric stretching
3380	NH <sub>2</sub> asymmetric stretching, NH stretching stretching
3310	H-bonded NH stretching
3170	=NH stretching
1587	stretching of C=N in N=Q=N
1510	stretching of C=C in N=B=N
1450	stretching of benzene ring
1380	C-N stretching in QBtQ
1315	C-N stretching in QBcQ, QBB, BBQ
1240	C-N stretching in BBB
1140	a mode of N=Q=N
1105	C-H in-plane bending on 1,4-ring
1060	C-H in-plane bending on 1,2,4-ring
895	C-H out-of-plane bending on 1,2,4-ring
800 ~ 850	aromatic, para-disubstituted, C-H out-of-plane bending
740	C-H out-of-plane bending on 1,2-ring
530	aromatic ring deformation

Q : quinonoid unit , B : benzenoid unit , B<sub>t</sub> : trans-benzenoid unit  
B<sub>c</sub> : cis-benzenoid unit

## 1.5 中孔矽材料簡介

### 1.5.1 中孔矽材料之分類與發展歷史回顧

分子篩 (molecular sieve) 這個名詞的由來則是在 1932 年，McBain 發現一種名為 chabazite 的天然礦物對直徑小於 0.5 nm 的分子具有選擇性吸附。他提出分子篩必須能藉由分子的大小與形狀的不同去分離混合物。早期所使用的沸石大多屬於微孔徑沸石，其大部分的用途為應用在石油的異構化、加氫、脫氫、裂解與小分子的催化等方面，但因其常常受限於它的孔徑太小，所以應用性受到限制。因此，為了增加分子篩的應用性，由微孔洞分子篩邁入中孔洞分子篩的研究便成為近年來重要的目標。

根據國際純粹和應用化學聯合會(IUPAC)的分類，多孔材料 (porous material)可依照其孔徑的大小分成三類：孔徑小於 2 nm 為微孔 (microporous)；孔徑介於 2 ~ 50 nm 為中孔 (mesoporous)；孔徑大於 50 nm 為巨孔 (macroporous)，其分類與實例如 Table 1-5 所示。

**Table 1-5 多孔性材料孔洞大小分類**

材料種類	孔徑範圍 (nm)	實例
微孔材料	$d < 2$	ZSM-5 沸石、活性碳
中孔材料	$2 \leq d \leq 50$	MCM-41、SBA-15
巨孔材料	$d > 50$	離子交換樹脂

1992 年，Mobil oil 公司在 Nature 雜誌上發表利用帶正電性的四級銨鹽界面活性劑作為模板與帶負電荷矽酸鹽的結合，成功地合成出可調整孔洞大小 (1.5 ~ 10 nm)、擁有高表面積 (~ 1000 m<sup>2</sup>/g)、高穩定性等優點的新型中孔徑二氧化矽(SiO<sub>2</sub>)分子篩 MCM-41 (Mobile Composite of Matter 41) (Beck et al. 1992; Kresge et al. 1992)。此類中孔洞分子篩可應用於大分子的催化反應(Corma 1997)、奈米導線製作之模板、光電材料等多方面的發展。在製備 MCM-41 的過程中加入少量的金屬，不但不會影響孔道的主要結構且可使不具催化活性的 MCM-41 有較佳的催化能力，因此興起許多科學家的興趣與重視。而中孔洞分子篩 SBA-15 則是在 1998 年(Zhao et al. 1998)，由 Stucky 等人以三區塊共聚物(EO<sub>20</sub>PO<sub>70</sub>EO<sub>20</sub>) 的兩性界面活性劑做為合成 SBA-15 的模板，利用此共聚物中的 PEO、PPO 鏈之相對親水及疏水的特性，在 pH < 1 的環境下，以自身堆聚的方式，

在水溶液中形成六角柱狀的堆疊 (p6mm)，再與無機矽化物 (ex : TEOS) 藉由靜電作用力以及氫鍵作用力形成有機-無機中孔徑結構的物質，之後再藉由鍛燒的方式或有機溶劑萃取將有機模板除去，即可得到以二氧化矽為骨架結構的中孔徑分子篩 SBA-15。六角柱型的中孔徑分子篩 SBA-15，不論孔徑大小 (4.6 ~30 nm)、孔壁厚度 (3.1 ~ 6.4 nm) 以及孔洞體積 ( $>0.85 \text{ cm}^3/\text{g}$ )，均較 1992 年由 Mobil Oil 公司開發出的六角柱型中孔徑分子篩 -M41S 為佳，因此不論熱穩定性以及水熱穩定性皆有較佳的表現。

由於中孔徑二氧化矽材料具有良好的機械強度、水及化學穩定性與大表面積等優點，廣泛地被使用於酵素固定化載體(Aburto et al. 2005; Bai et al. 2007; Han et al. 2002; Lee et al. 2005; Takahashi et al. 2001; Vamvakaki and Chaniotakis 2007; Yiu et al. 2001b; Yu et al. 2007)，並有研究證實酵素固定於中孔材料中相對於未固定狀態下，可增進其催化活性與穩定性(Aburto et al. 2005; Kim et al. 2006; Vamvakaki and Chaniotakis 2007)。

## 1.5.2 非離子界面活性劑介紹

界面活性劑的種類相當多種，但它們有一個相同的共同點即其尾部通常具有 OH 基，依照其親水基團的特性大致上可分為四大類：(1) 陽離子界面活性劑、(2) 陰離子界面活性劑、(3) 兩性離子型界面活性劑與(4) 非離子界面活性劑。在本研究中合成 SBA-15 所使用的界面活性劑為非離子界面活性劑。

SBA-15 合成時使用非離子三區塊共聚物(triblocks copolymer)來當作模板，在眾多的三區塊共聚物中最常被使用的是  $(\text{PEO})_n-(\text{PPO})_m-(\text{PEO})_n$  [(poly(ethylene oxide)<sub>n</sub>-poly(propylene oxide)<sub>m</sub>-poly(ethylene oxide)<sub>n</sub>]，一般縮寫為  $(\text{EO})_n(\text{PO})_m(\text{EO})_n$ ，其中 EO 區塊屬於親水性高分子，PO 區塊屬於疏水性高分子，在熔融或水溶液狀態下可自我組合成微胞結構。由於非離子三區塊共聚物本身並沒有靜電力的作用，因此彼此間可以堆疊的相當緊密，可以藉由調整  $m/n$  的比值來改變其親水性與疏水性，並且可以形成許多種類的液晶相，例如可以用  $\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$  合成出六角排列(hexagonal)的中孔徑分子篩 SBA-15。

根據文獻指出(Zhao et al. 1998)，可以利用 EO/PO 的比值來推測所合成出來的中孔材料結構，其大致趨勢如下：

EO/PO < 0.07

在高分子的濃度低時(0.5 ~ 1 wt%)，較傾向形成六角排列(hexagonal)的結構；在高分子濃度高時 (2 ~ 5 wt%)，則較傾向形成層狀排列(lamellar)的結構，例如：EO<sub>5</sub>PO<sub>70</sub>EO<sub>5</sub> (L 121)。

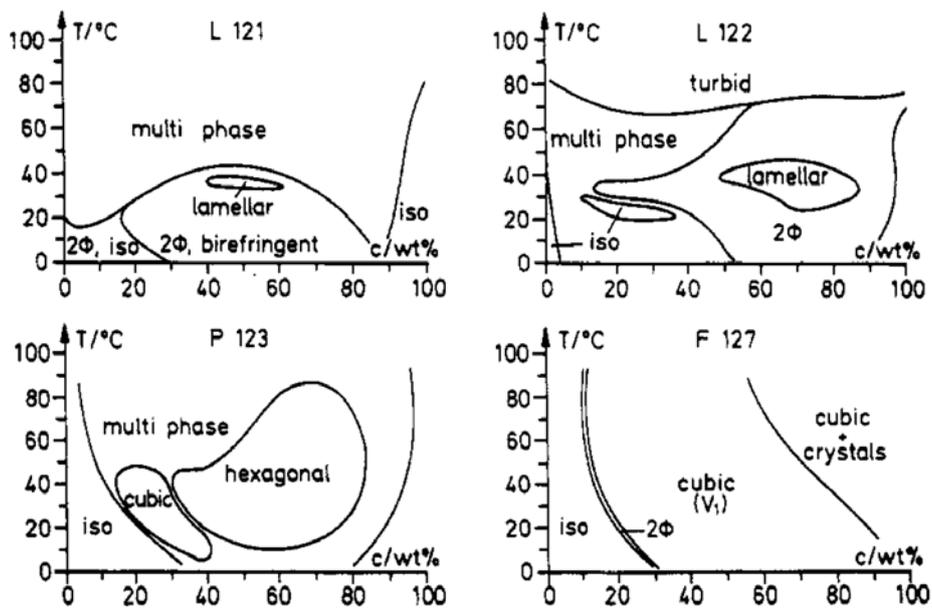
EO/PO = 0.07 ~ 1.5

傾向形成六角排列(hexagonal)的結構，例如：EO<sub>20</sub>PO<sub>70</sub>EO<sub>20</sub> (P 123)。

EO/PO > 1.5

傾向形成立方排列(cubic)的結構，例如：EO<sub>106</sub>PO<sub>70</sub>EO<sub>106</sub> (F 127)。

不同 EO/PO 比值之三區塊共聚物於不同溫度下所形成的微胞型態相圖如 Fig. 1-14 所示。



**Fig. 1-14** Phase diagrams of the systems of (EO)<sub>n</sub>-(PO)<sub>m</sub>-(EO)<sub>n</sub> block copolymers with m = 70 and n increasing from 5 to 106 (Wanka et al. 1994).

### 1.5.3 SBA-15 之孔洞性質分析

中孔材料之孔洞性質分析可透過等溫吸/脫附儀來進行，於適當的條件下，使氣體分子於分析材料上達到分子完全吸附之吸附量，再根據吸附的條件、吸附分子的大小與吸附量來計算比表面積、孔洞體積及孔徑大小。

中孔材料的等溫吸/脫附曲線會隨著分析材料的孔洞性質不同而有所變化，Fig. 1-15 為不同孔徑之中孔材料 MCM-41 以 Ar 氣體進行等溫吸脫附分析的吸附曲線圖，由圖中可看出於吸附曲線的部份，孔徑越大的中孔材料達完全吸附狀態，需於較大分壓方能完成。當壓力上升時，進行吸附的氣體分子開始在孔洞內凝結而產生毛細現象 (capillary condensation)，造成吸附量急遽增加，而孔徑越大需於較大的壓力下方能產生毛細現象。在脫附曲線的部份，中孔材料的脫附曲線常具有遲滯現象(hysteresis)產生，此遲滯程度會隨著所吸附材料的孔徑大小成正比關係，如 Fig. 1-15 中之脫附曲線所示，隨著孔徑增加，其脫附曲線越偏離吸附曲線，代表其遲滯現象越明顯。

另一方面，由吸/脫附曲線意亦可看出中孔材料的孔徑大小關係，Fig. 1-16(a)為 MCM-41 與 SBA-15 於氮氣分子下進行之等溫吸/脫附曲線圖，圖中可明顯看出孔徑較大的 SBA-15 比 MCM-41 有較明顯的遲滯現象產生，且 SBA-15 之脫附曲線呈現兩段斜率，代表所分析之

SBA-15 中孔材料同時存在兩種不同孔徑，如 Fig. 1-16(b)所示，其孔洞呈現壺形之外徑小、內徑大之型態。

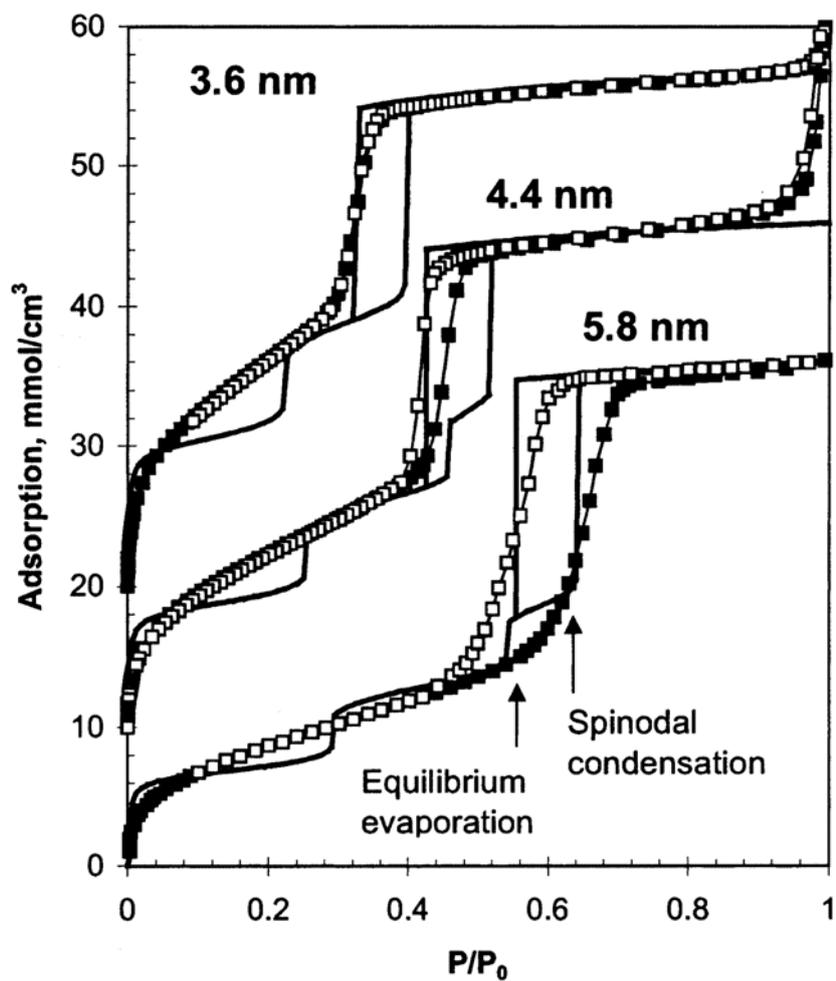
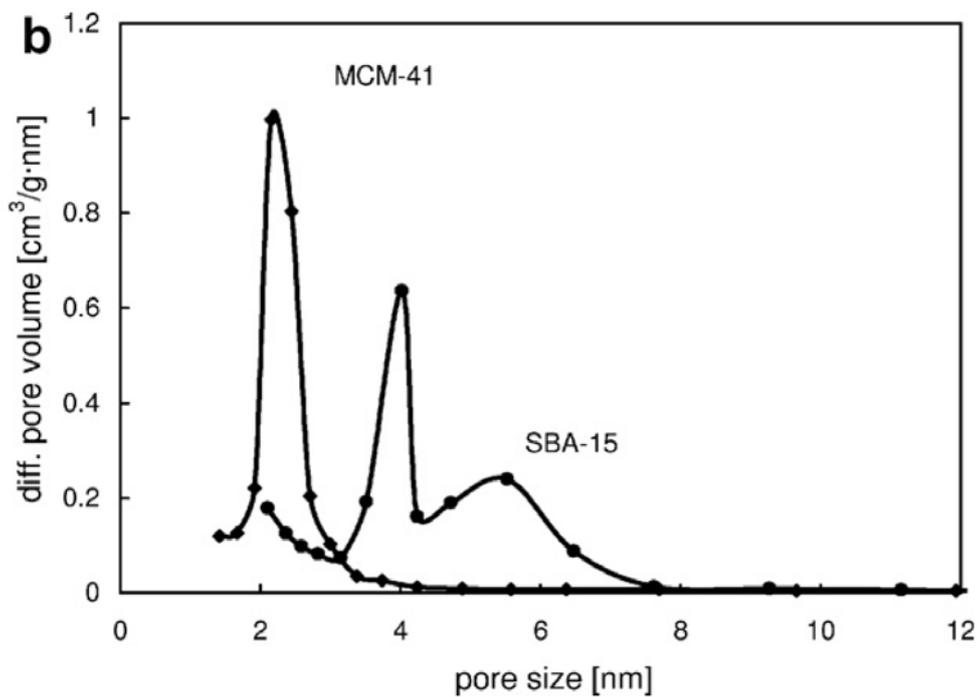
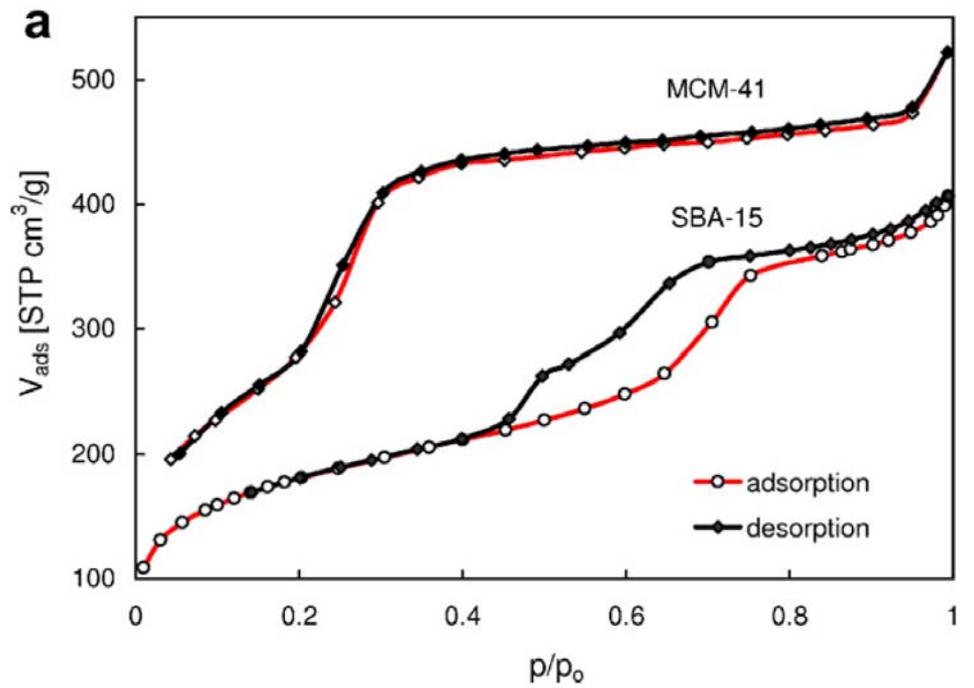
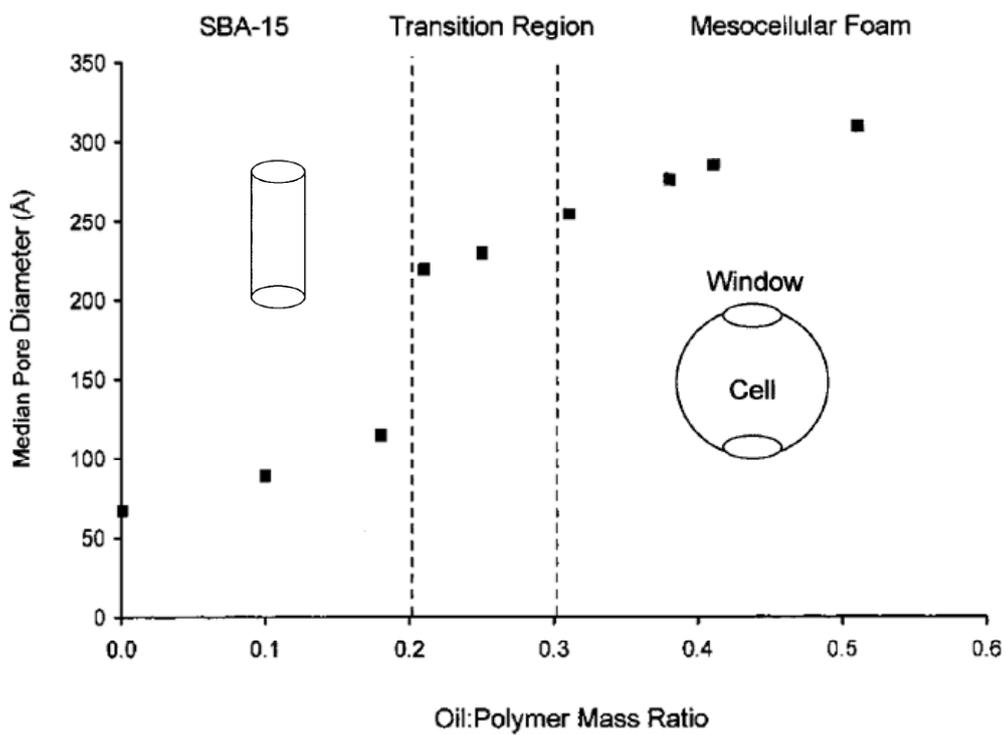


Fig. 1-15 Ar adsorption (black squares) and desorption (open squares) isotherms of MCM-41 (Ravikovitch and Neimark 2001).

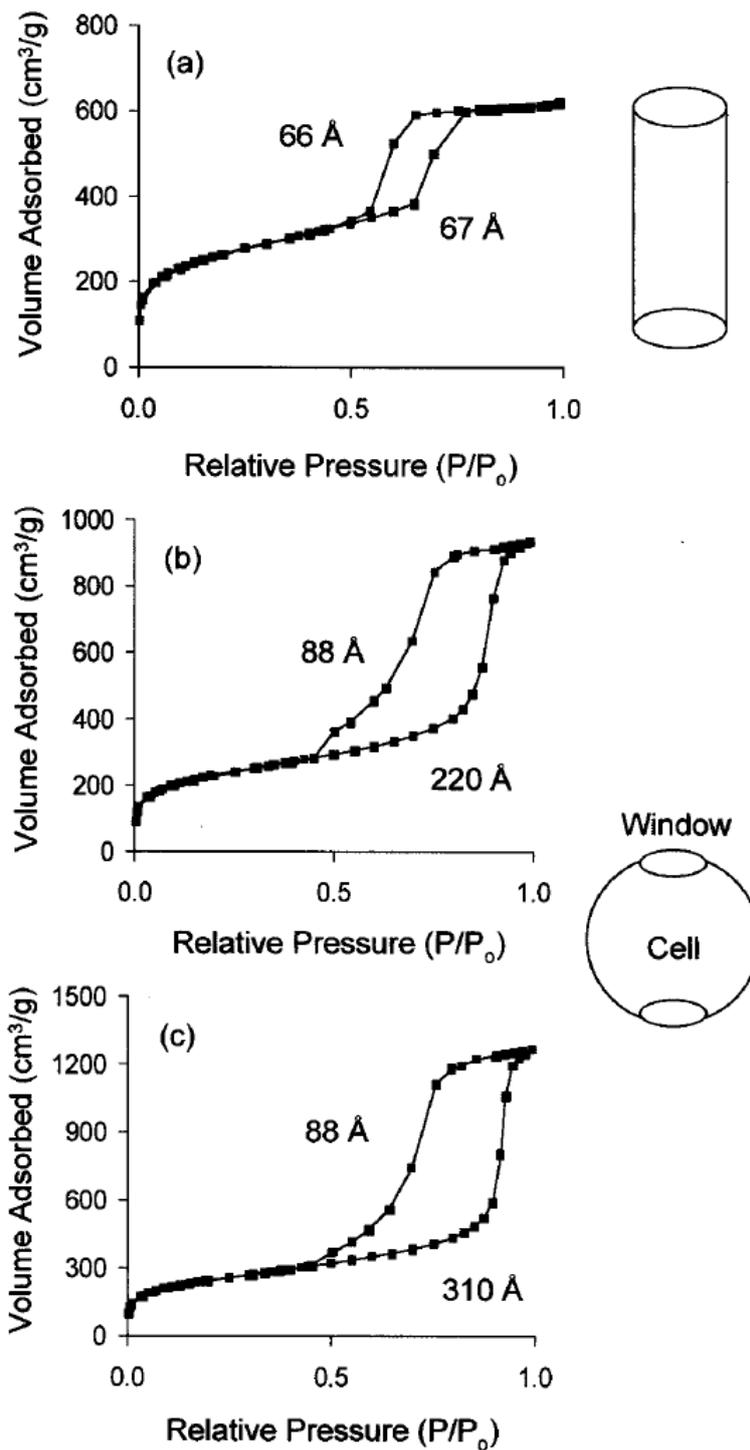


**Fig. 1-16** Isotherms of  $\text{N}_2$  adsorption and desorption on MCM-41 and SBA-15 (a) and mesoporous size distributions calculated from the  $\text{N}_2$  desorption isotherms according to the BJH model (b) (Makowski and Kustrowski 2007).

SBA-15 之孔徑大小與孔洞結構型態，可經由合成過程中添加擴孔劑來調整。根據文獻中，Lettow 等人(Lettow et al. 2000)的研究指出，使用三甲基苯為擴孔劑添加於合成溶液中，其孔徑大小會隨三甲基苯添加量呈正比關係，如 Fig. 1-17 所示，圖中孔徑大小與擴孔劑添加量呈現兩段線性正比關係，第一段為擴孔劑添加量介於 0 ~ 20 wt%，於此添加量區間所合成之 SBA-15 孔洞結構為直孔洞，孔徑大小介於 6 ~ 12 nm，其 BET 等溫吸脫附曲線分析結果如 Fig. 1-18(a)所示。當擴孔劑添加量介於 0.3 ~ 0.5 wt%，孔洞結構為球型之型態，孔徑大小介於 22 ~ 42 nm，其 BET 等溫吸脫附曲線型態如 Fig. 1-18(c)所示，由於此類型之孔洞型態有別於添加量介於 0 ~ 20 wt%之直孔洞，故將這類之中孔矽材料另命名為 MCF (Mesocellular foam)系列。擴孔劑添加量介於 20 ~ 30 wt%區間屬於過渡區域，孔洞結構型態會介於兩者之間。



**Fig 1-17** Variation in the median pore diameter of mesoporous silicas synthesized at different oil-polymer ratios (Lettow et al. 2000).



**Fig 1-18**  $N_2$  adsorption-desorption isotherms of mesoporous silicas synthesized at oil-polymer mass ratios of (a) 0.00, (b) 0.21, and (c) 0.50 (Lettow et al. 2000).

除了等溫吸/脫附儀之外，X光繞射儀亦是分析中孔材料必備的工具，以下將說明如何使用BET與XRD的實驗結果對於孔洞結構進行分析。

當使用 X 光繞射分析儀於小角度下分析 SBA-15 孔洞結構，由 XRD 的分析圖譜中可得知散射波峰的角度位置比值，可用來判斷所分析之材料是否為有秩序性排列之孔洞材料，Table 1-6 為不同微觀結構與其 X 光散射波峰角度位置比值的關係，分析結果中若前三個繞射波峰角度位置比符合  $1 : \sqrt{3} : 2$  關係，則其孔洞結構屬於六角排列 (Hexagonally packed cylinders, HCP) 型態，如 Fig. 1-19 所示。

當孔洞結構為六角排列 (Hexagonally packed cylinders, HCP) 時，可將由布拉格定律 (Bragg's law)，可求得  $d_{100}$  值代入相對應平面之位置 (h,k,l) 可求得 a 值，關係式如下：

**Hexagonal :**

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left( \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (1-11)$$

其中 h, k, l 分別為晶面指數分別以 (1, 0, 0) 代入 (1-11) 式，可求得單位晶格參數 (lattice parameter)  $a_0$  與  $d_{100}$  之關係式，如 (1-12) 式所示：

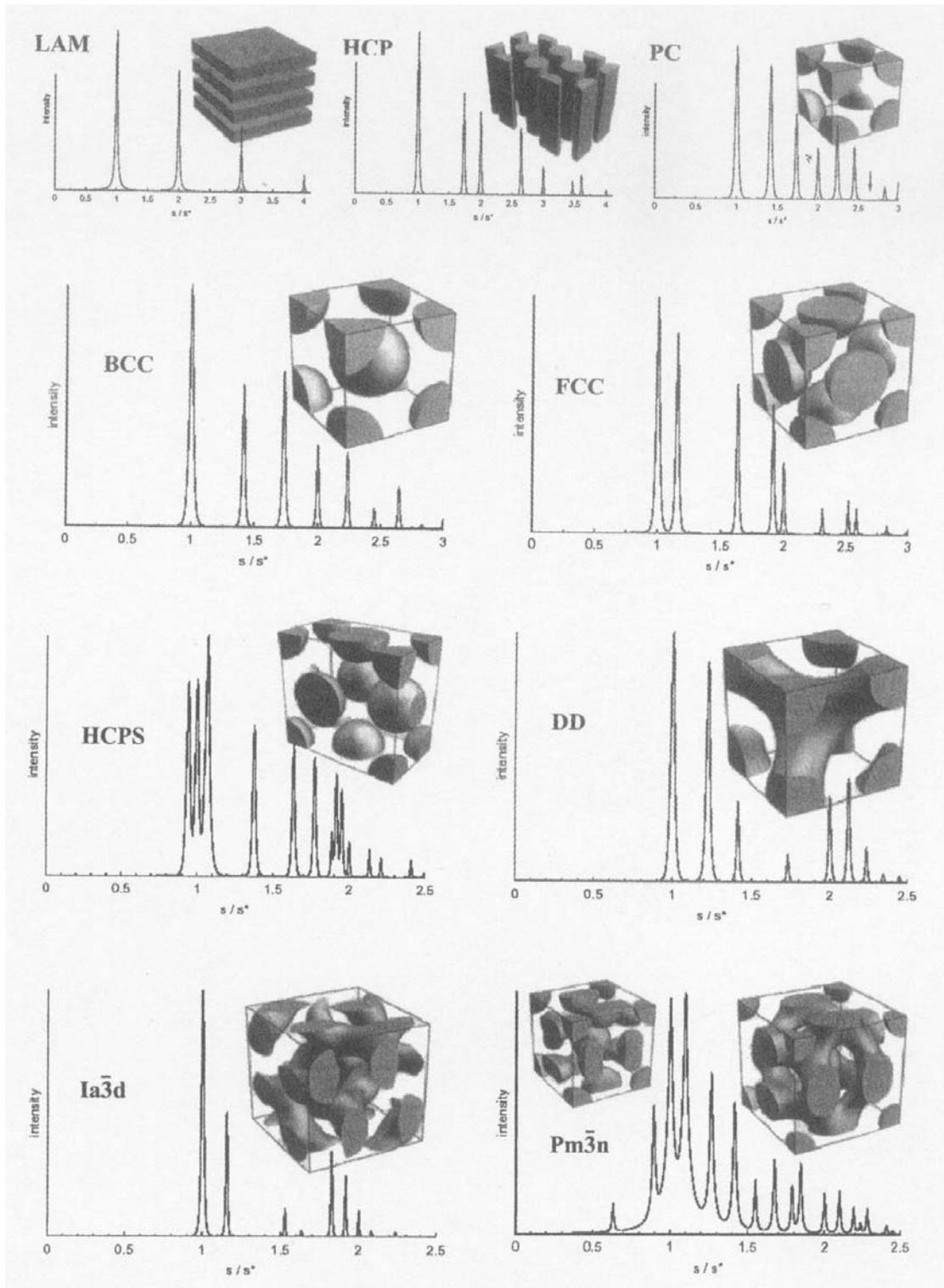
$$a_0 = 2/\sqrt{3} d_{100} \quad (1-12)$$

其中  $a_0$  所代表的物理意義為兩個孔洞中心的距離，其值為孔洞直徑 (D)

加上孔壁厚度(W)。由以上的計算關係式，可經由 XRD 分析結果求得  $a_0$  值，再搭配 BET 分析結果可得知孔洞直徑(D)值，再經由兩值相減可求得孔壁厚度(W)值，如 Fig. 1-20 所示。

**Table 1-6 The relationship of the typical nanostructures and the scattering peak position ratios. (Nikos et al. 2003)**

Typical nanostructures	Scattering peak position ratios
層狀 (lamellar, LAM)	1 : 2 : 3 : 4 : 5 : 6 : 7
六角堆積圓柱狀 (hexagonally packed cylinders, HCP)	1 : $\sqrt{3}$ : 2 : $\sqrt{7}$ : 3 : $\sqrt{12}$ : $\sqrt{13}$ : 4
簡單立方 (primitive or simple cubic, PC)	1 : $\sqrt{2}$ : $\sqrt{3}$ : $\sqrt{4}$ : $\sqrt{5}$ : $\sqrt{6}$ : $\sqrt{8}$ : $\sqrt{9}$
體心球狀 (body-centered cubic, BCC)	1 : $\sqrt{2}$ : $\sqrt{3}$ : $\sqrt{4}$ : $\sqrt{5}$ : $\sqrt{6}$ : $\sqrt{7}$ : $\sqrt{8}$
面心球狀 (face-centered cubic, FCC)	$\sqrt{3}$ : 2 : $\sqrt{8}$ : $\sqrt{11}$ : $\sqrt{12}$ : $\sqrt{16}$ : $\sqrt{19}$
六角緊密堆積球狀 (hexagonally close packed spheres, HCPS)	$\sqrt{32}$ : $\sqrt{36}$ : $\sqrt{41}$ : $\sqrt{68}$ : $\sqrt{96}$ : $\sqrt{137}$
雙菱形 (double diamond, DD)	$\sqrt{2}$ : $\sqrt{3}$ : $\sqrt{4}$ : $\sqrt{6}$ : $\sqrt{8}$ : $\sqrt{9}$ : $\sqrt{10}$ : $\sqrt{11}$
I $\alpha$ 3n	$\sqrt{3}$ : $\sqrt{4}$ : $\sqrt{7}$ : $\sqrt{8}$ : $\sqrt{10}$ : $\sqrt{11}$ : $\sqrt{12}$
Pm3n	$\sqrt{2}$ : 2 : $\sqrt{5}$ : $\sqrt{6}$ : $\sqrt{8}$ : $\sqrt{10}$ : $\sqrt{12}$



**Fig. 1-19** The same nine structure models together with the scattering curves. (Nikos et al. 2003)

The x-axis is reduced as  $s/s^*$ , where  $s^*$  is the primary peak position.

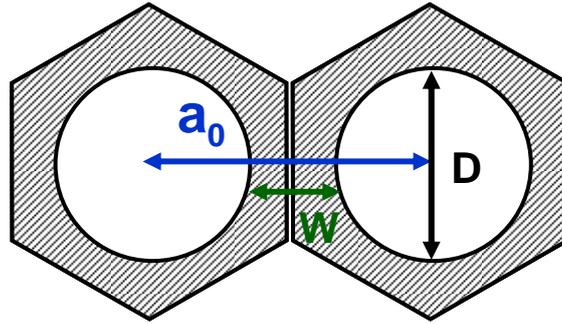


Fig. 1-20 SBA-15 孔洞結構示意圖

其中：

$a_0$ ：單位晶格參數 (lattice parameter)

$D$ ：孔洞直徑 (mesopore diameter)

$W$ ：孔壁厚度 (wall thickness)

$d_{100}$ ：Hexagonal 100 晶面之間的距離 (可由Bragg's law求得)

使用以上所述之孔洞結構分析之前，必需先判斷所分析的材料之孔洞結構為何種結構，方能代入相關的結構公式。

#### 1.5.4 中孔矽材料之應用

近年來，無機多孔性材料例如：黏土(clay) (Lei et al. 1999)、蒙脫石 (montmorillonite)(Fan et al. 2000; Lei and Deng 1996; Salles et al. 2000)、多孔性氧化鋁(porous alumina)(Ikeda et al. 1998)、MCM-41(Dai et al. 2007)與 SBA-15(Dai et al. 2008)等廣泛被使用於酵素固定化，由於這類的無機材料具有良好的機械、熱與化學穩定性及優良的吸附與可滲透性。多孔性材料具有巨大的比表面積的優點，很適合用來當酵素固定化的基材，酵素可經由物理吸附或化學鍵結固定於多孔性材料中。為了固定不同種類與尺寸的酵素，近幾年有許多的研究學者探討如何於合成多孔性材料的製程中控制孔徑尺寸大小(Aburto et al. 2005; Zhao et al. 1998)，以及在材料的表面進行官能基改質(functionalization) (Yiu et al. 2001a)，提升酵素固定化的負載量與穩定性。當酵素固定於有秩序性排列之奈米尺寸孔洞中，鄰近的酵素氧化還原活性中心可扮演電流奈米集電器(nanocollector)的角色，並進一步將電流傳遞到電極上(Xiao et al. 2003)。

使用中孔矽材料固定化酵素，製備成生物感測電極之文獻中，Dai 等人曾將血紅素(hemoglobin)固定於六角中孔矽(hexagonal mesoporous silica; HMS)材料中，再使用聚乙烯醇(polyvinyl alcohol; PVA)為黏著劑固定於玻璃碳電極上，製備成過氧化氫感測器，於-0.4V

(vs. Ag/AgCl)的條件下，其感測過氧化氫之濃度線性範圍為  $0.4 \mu\text{M} \sim 6 \mu\text{M}$  (Dai et al. 2004)。另外，Dai 等人亦將辣根過氧化酵素(HRP)酵素與葡萄糖氧化酵素(glucose oxidase; GOD)進行共固定於 SBA-15 中，製備成 GOD-HRP/SBA-15/GCE 電極，於  $-0.4\text{V}$  (vs. Ag/AgCl)的電壓條件下，感測葡萄糖的濃度線性範圍為  $3\mu\text{M} \sim 34 \text{mM}$  (Dai et al. 2008)

## 1.6 研究動機

生物感測器的研究中所面臨最大的挑戰為電極上酵素活性的維持，對於增進固定化酵素的穩定性探討，曾有學者提出使用交聯法進行酵素固定化過程中添加牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA) (Cosnier and Popescu 1996; Morrin et al. 2003; Ruan and Li 2001)之惰性蛋白質進行共交聯，可減少分子內酵素分子的交聯反應，增加酵素與酵素或惰性蛋白分子間的交聯，以達到酵素固定化後仍保有較佳活性與較好的固定化效果的目的。另一類延長酵素固定化活性的方法為將酵素固定於奈米孔徑結構之載體中，目前最常被使用來固定化酵素的載體為中孔矽材料如 MCM-41(Dai et al. 2007)、SBA-15(Dai et al. 2008)與中孔碳材料如 CMK-3(Feng et al. 2007)等。

文獻中使用導電高分子修飾電極所製備之過氧化氫生物感測器研究，鮮少對於導電高分子膜性質改良進行探討，本研究中將添加牛血清蛋白(BSA)於苯胺單體容易中，使用電化學法進行共聚合，製備成 PANI(BSA)複合膜及分析其結構，並將其所製備之酵素電極與純 PANI 膜所製備的酵素電極，以批次系統使用電化學之循環伏安法(CV)探討其感測性質。

另外，對於增進電極固定化酵素之穩定性方面的探討，亦自製不同孔徑之中孔矽材料 SBA-15，做為 HRP 酵素固定化的載體，並探討其最佳固定化條件，最後將已固定 HRP 酵素 SBA-15 製備成過氧化氫生物感測器，並探討其感測性質。

本論文的內容分述如下：

第一章 緒論

第二章 研究架構簡介

第三章 研究設備與藥品

第四章 過氧化氫感測電極製備與感測性質分析

第五章 探討添加牛血清蛋白對於聚苯胺高分子膜的影響

第六章 中孔矽材料 SBA-15 之合成與製備為電極之感測性質分析

第七章 探討過氧化氫感測過程中溶氧的影響

第八章 綜合討論

第九章 結論與建議

## 第二章 研究架構簡介

本論文之研究架構可分為四部份：

### I. 過氧化氫感測電極製備與感測性質分析 (第四章)

過氧化氫感測電極製備之流程圖如 Fig. 2-1 所示，首先於氧化鋁基材表面使用離子濺鍍法濺鍍白金，製備成 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，經清洗程序處理後，將 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極為工作電極，使用電聚合法聚合 PANI 於電極上，製備成 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，再使用電吸附法及交聯劑戊二醛(GA)的使用，將 HRP 固定於 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上，製備成 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極。

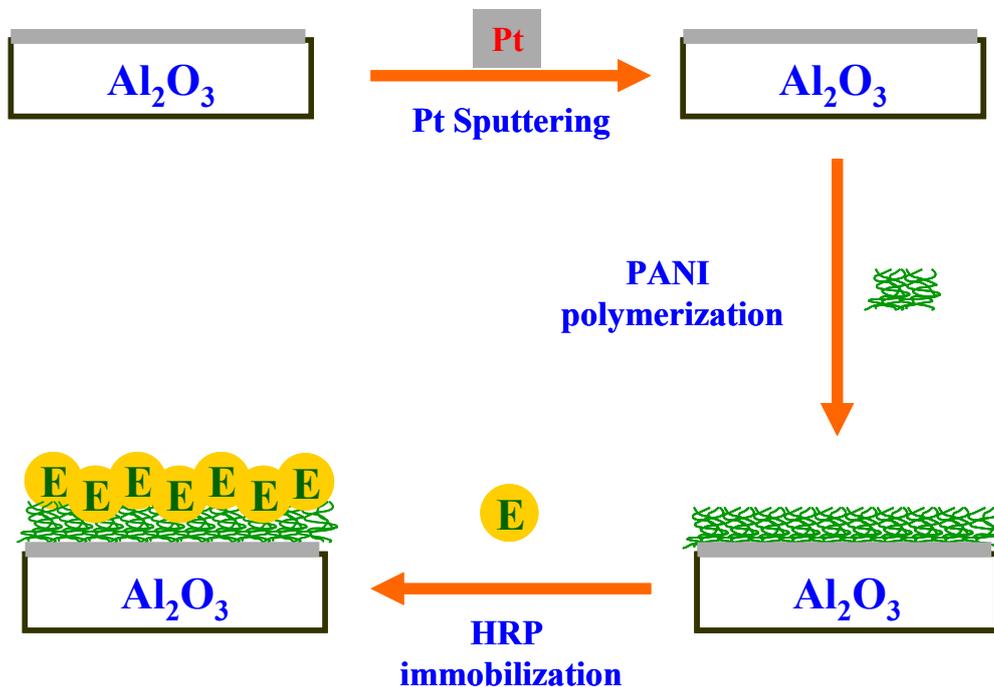


Fig. 2-1 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極製備流程示意圖

使用掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察製備所得之 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極表面組態。在感測性質分析部份，使用循環伏安法感測不同濃度之過氧化氫，並探討其靈敏度、感測濃度線性範圍、偵測極限與穩定性等感測性質探討。

## II. 探討添加牛血清蛋白對於聚苯胺高分子膜的影響 (第五章)

此部份的研究將對 PANI 的改質進行探討，PANI 的聚合時添加牛血清蛋白(BSA)於苯胺(aniline)單體溶液中，在含有 1.0 M 鹽酸的 aniline 單體溶液(pH = 0)中，BSA 的結構呈現直鏈狀態的結構，藉由聚合過程中將 BSA 包埋於 PANI 膜的結構中，如 Fig.2-2 所示，製備成為 PANI(BSA)複合膜。分別使用 SEM、FTIR、TGA 分析所製備的複合膜結構，並探討 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極與 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極對於過氧化氫之感測性質。

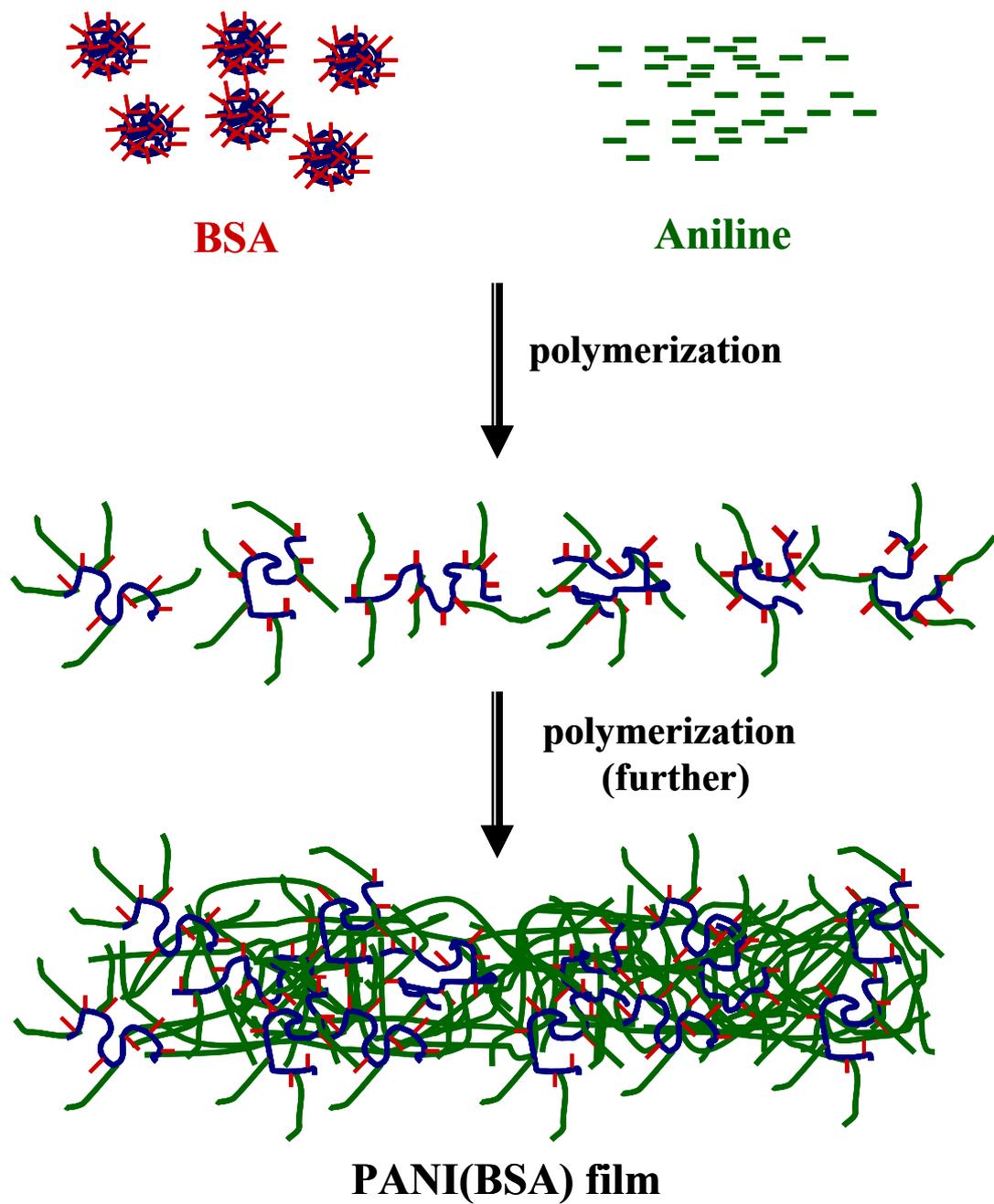


Fig. 2-2 BSA 包埋於 PANI 膜中之示意圖

### III. 中孔矽材料 SBA-15 之合成與製備為電極之感測性質分析 (第六章)

SBA-15 的孔洞尺寸可經由合成的過程中改變擴孔劑三甲基苯 (Mesitylene) 的添加量來調整，當添加三甲基苯於 SBA-15 合成時所使用的微胞模板溶液時，由於三甲基苯的疏水性特性，將會進入微胞的疏水性內部，使得微胞的體積變大，可合成出孔洞尺寸較大的 SBA-15 材料，合成示意圖如 Fig. 2-3 所示。藉由 SEM 與穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察其表面與孔洞結構，並且使用氮氣等溫吸/脫附儀、X-光繞射儀分析其孔洞性質，製備出最適合 HRP 酵素固定化孔徑之 SBA-15，經由 HRP 酵素定量分析探討 HRP 於 SBA-15 中之負載量。最後將已固定 HRP 之 SBA-15 製備成 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，並探討其感測過氧化氫之感測特性，此部份研究架構如 Fig. 2-4 所示。

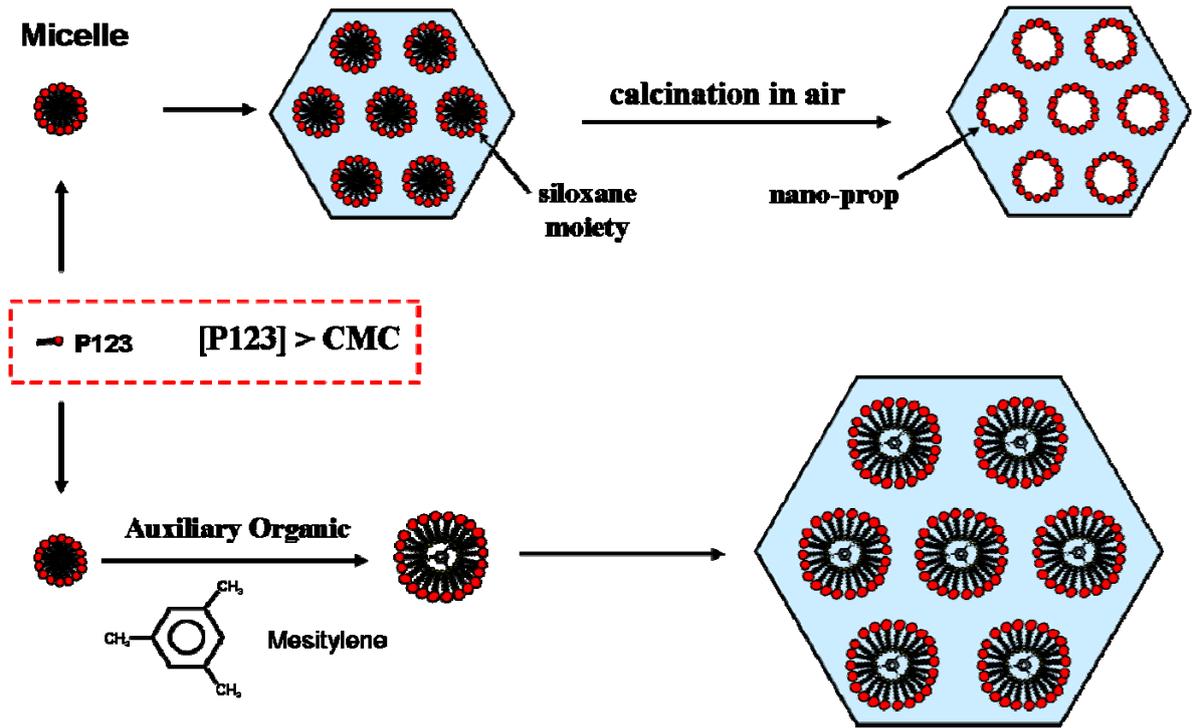


Fig. 2-3 中孔矽材料 SBA-15 合成示意圖

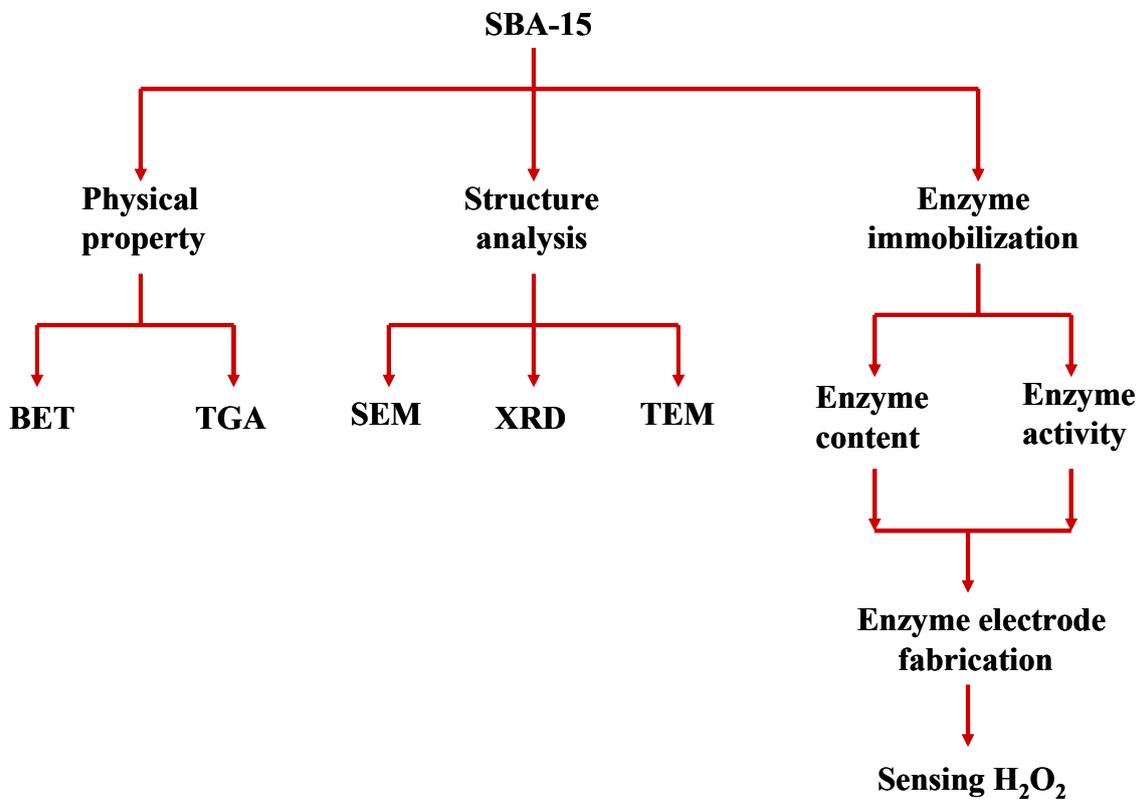


Fig. 2-4 中孔矽材料 SBA-15 研究架構圖

#### IV. 探討過氧化氫感測過程中溶氧的影響 (第七章)

使用循環伏安法感測過氧化氫的過程中，感測溶液中的溶氧影響是須要考慮的因素之一，溶氧於電極上還原之電流會影響過氧化氫濃度感測的準確性。此部份溶氧對於感測的影響實驗中，分別使用 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極與 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極比較對於溶氧感測的比較。並試著尋找適合的除氧劑 (oxygen scavenger) 添加於感測溶液中，達到有效去除溶氧對於過氧化氫感測的影響，並探討在不影響過氧化氫感測的情形下，最佳除氧劑的添加量。

### 第三章 研究設備與藥品

#### 3.1 實驗儀器

本研究中所使用儀器之出廠公司與型號如下：

儀器名稱	出廠公司	型號
紫外線/可見光光譜儀	SPECTRONIC (New York, U.S.A)	GENESYS 2
X-光粉末繞射儀	PHILIPS (Amsterdam, Nederland)	X'PERT Pro MPD
傅立葉紅外線吸收光譜儀	Bomem (Zurich, Switzerland)	DA8.3
氮氣等溫吸附 / 脫附儀	Micrometrics (Norcross, U.S.A)	ASAP 2020
熱重量分析儀	TGA (Delaware, U.S.A)	Q50
掃瞄式電子顯微鏡	JEOL (Tokyo, Japan)	JSM-7000F
穿透式電子顯微鏡	JEOL (Tokyo, Japan)	JEM-2010
電化學分析儀	CHI (Austin, U.S.A)	621B
	CHI (Austin, U.S.A)	6081B
金屬濺鍍儀	JEOL (Tokyo, Japan)	1200
超純水製造系統	BARNSTEAD (Dubuque, Iowa, U.S.A)	D4741
數位式電子天平	MITTLER TOLEDO (Zuerich, Switzerland)	AB54-S
磁石攪拌器	CORNING (Taipei, Taiwan)	PC-420D
恆溫水槽	YIH DER (Taipei, Taiwan)	BL720
三用電表	HILA (Taipei, Taiwan)	DM-3000
酸鹼度計	Suntex (Taipei, Taiwan)	SP-701
家用冰箱	TECO (Taipei, Taiwan)	RE7222
移液吸取器 pipette	Eppendorf (Hamburg, Germany)	1000/100/20
烘箱	DENG YNG (Taipei, Taiwan)	DOV30
超音波洗淨器	BRANSON (U.S.A)	3200
高溫爐	NEY (U.S.A)	3-130

### 3.2 實驗藥品

本研究中所使用藥品皆為試藥級以上的純度，其廠商與產品編號如下：

藥品名稱	廠商	產品編號
辣根過氧化酶 (Horseradish peroxidase)	Sigma	P8375
苯胺 (Aniline)	Merck	1.01261.1000
鹽酸 (Hydrochloric acid)	Merck	1.00317.2500
硝酸 (Nitric acid)	Merck	1.00456.1000
氯化鈉 (Sodium chloride)	Merck	1.06404.1000
過氧化氫 (Hydrogen peroxide)	Merck	1.08600.1000
戊二醛 (Glutaraldehyde, GA)	Lancaster	14351
磷酸二氫鉀 (Potassium phosphate monobasic)	USB	20227
磷酸氫二鉀 (Potassium phosphate dibasic)	USB	20274
氫氧化鉀 (Potassium hydroxide)	Merck	1.05033.1000
牛血清蛋白 (Bovine serum albumin)	Sigma	A7030
氫氧化鈉 (Sodium hydroxide)	Merck	1.06498.1000
抗壞血酸 (Ascorbic acid)	Sigma	A5960-25G
Poly (ethylene oxide)- poly (propylene oxide) - poly (ethylene oxide)	Aldrich	435465-250
Tetraethoxysilicate	Aldrich	S46886-158
三甲基苯 (1,3,5-Trimethylbenzene)	Aldrich	S29028
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> plate	U.E. Co., LTD	---
硫代硫酸鈉 (Sodium thiosulfate)	Sigma	S7026.250

磷酸 (Phosphoric acid)	Merck	1.00565.0500
尿素 (urea)	Sigma	U5128-500G
尿酸 (Uric acid)	Sigma	U0881-10G
銀線 (Ag wire)	L.P. metal Co.,	99.9%
白金線 (Pt wire)	L.P. metal Co.,	99.9%
澱粉 (Starch)	Sigma	S2630-500G
碘化鉀 (Potassium iodide, KI)	Sigma	P4286
碘酸鉀 (Potassium iodate, KIO <sub>3</sub> )	Merck	1.05051.0100
Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio-Rad	---
ABTS Kit	Pierce	37615

---

### 3.3 研究中所使用之貴重儀器簡介

本研究中將利用掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察所製備之PANI與PANI(BSA)高分子膜表面組態及中孔矽材料SBA-15粒子外觀型態，利用穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察SBA-15粒子之孔洞結構。使用熱重量分析儀(TGA)與傅立葉紅外線光譜(FTIR)分析製備所得之PANI與PANI(BSA)高分子膜組成，另外亦使用TGA分析SBA-15煅燒後模板去除的效果。並使用X-光繞射儀(XRD)與氮氣等溫吸 / 脫附儀測定SBA-15粒子之孔洞結構。

#### I. 掃描式電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscope ; SEM)

本研究中以SEM觀察PANI與PANI(BSA)高分子膜表面組態，將使用電化學聚合法製備完成之PANI與PANI(BSA)膜及SBA-15粉末，利用真空乾燥方式在室溫下乾燥12小時，再以SEM觀察表面組態。

#### II. 穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscope ; TEM)

使用TEM觀察製備所得之SBA-15粒子孔洞結構，實驗前取適量SBA-15樣品與99.5% 乙醇混合，並放入超音波震盪器內震盪20分鐘，再將樣品滴於銅網上，最後放入烘箱中乾燥12小時。

### III. 熱重量分析儀 (Thermo Gravimetric Analyzer ; TGA)

TGA的基本原理是在程式控溫的環境下，測量物質重量與溫度的關係，最後可由熱重曲線得知高分子材料的熱穩定性以及熱裂解溫度。本研究中使用TGA分析製備所得之PANI與PANI(BSA)高分子膜組成差異，並使用於分析中孔矽材料SBA-15煅燒後模板去除的效果。

實驗時首先將白金空盤置於熱重量分析儀的天秤中進行歸零的動作，將 5 ~ 6 mg 的樣品置入白金盤中，在氮氣流量100 mL/min，以10 °C/min得升溫速率，從25°C升溫到800°C，將所得的圖形作一階微分，找尋開始熱裂解的溫度。

### IV. 傅立葉紅外線吸收光譜儀 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy ; FTIR)

紅外線光譜學的原理是分子中的原子產生振動和轉動模式時吸收了適當的能量而產生的光譜，特定官能基有特定的吸收譜帶，一般分子振動所吸收的能量較小，大致是紅外光區的範圍，依波數大小不同可分為三個部分：12800 ~ 4000  $\text{cm}^{-1}$  為遠紅外光區，4000 ~ 200  $\text{cm}^{-1}$  為中紅外光區，200 ~ 10  $\text{cm}^{-1}$  為近紅外光區，一般最常用的範圍是泛指中紅外光區的部分，專門提供有關分子振動的訊息，而有機物的重要吸收區均位於此區。

為了避免PANI與PANI(BSA)高分子膜置放於空氣中，因受氧氣及水氣影響所造成的誤差，高分子膜皆於分析前製備，將聚合PANI與PANI(BSA)

高分子膜之電極片直接使用ATR方式進行分析，掃描範圍  $500 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 。

## V. X-光繞射儀 (X-Ray Diffractometer ; XRD)

當帶電粒子在加速或減速的過程中會釋放出電磁波，而在巨大加速過程中所放出之電磁波具有高能量，當其波長在  $10^{-12} \sim 10^{-8} \text{ m}$  則為 X 光。當以高電壓加速之電子束撞擊陽極標靶，高速電子受到標靶原子的阻擋急劇停止下來，電子在這種非彈性碰撞過程中的能量損失部分轉變成 X 光子的能量，由於這些碰撞能以許多不同的方式發生，故會形成連續 X 光帶。當 X 射線被晶體內有規則的環境散射時，散射的光線間會產生干涉現象，同時發生建設性干涉以及破壞性干涉，進而產生繞射。

利用布拉格方程式(Bragg's law) (3-1 式所示)，可以計算晶格之間距離。當 X 光照射晶體時，光束不僅由表面層之原子所反射，而且從相當深的原子層反射，所以建設性干涉僅發生在非常嚴格之條件下，有關這種條件的定律就是布拉格定律。

$$2 d \sin\theta = n \lambda \quad (3-1)$$

d：相鄰兩平面距離

n：1,2,3,...

$\theta$ ：X 光束之入射角或反射角

$\lambda$ ：X 光波長 ( $\lambda (\text{CuK}\alpha) = 1.54 \text{ \AA}$ )

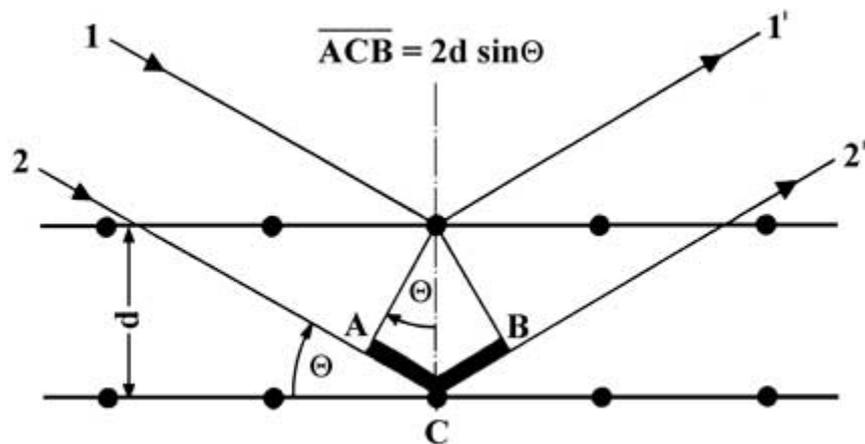


Fig. 3-1 布拉格定律示意圖

由Fig. 3-1 可看出距離 AC 及 CB 皆等於  $d \sin\theta$ ，故距離  $AC + CB$  等於  $2d \sin\theta$ ，如果這段路徑差等於波長整數倍 ( $n\lambda$ )，繞射訊號就會有建設干涉。這就是所熟知的布拉格定律。

當符合布拉格定律時，反射線  $1'$  及  $2'$  為同相，進而產生建設性干涉。當一束細窄之 X 光照射未變形之晶體時，產生建設性干涉之角度非常明確，這是因為反射係源自於千萬個平行的晶格面，在此種情況下，縱使稍偏離滿足關係式之角度，也會引起反射光的破壞性干涉。因此，離開晶體的反射光束非常細窄，可以產生明顯的影像。

分析時取適當量的SBA-15粉末樣品於載玻片樣品槽上，再將樣品槽置

於樣品台上。掃描速度為  $0.03^\circ/\text{s}$ ，掃描角度範圍從  $2\theta = 0.3^\circ \sim 3^\circ$ 。

## VI. 氮氣等溫吸 / 脫附儀 ( $\text{N}_2$ Adsorption / Desorption ; BET)

對於SBA-15的表面積、孔洞大小與孔洞體積利用氮氣等溫吸/脫附儀來測得，量測樣品在 77k 下的氮氣等溫吸/脫附曲線。

### (a) BET (Brunauer-Emmett-Teller) 表面積之求法

在適當的  $P/P_0$  的範圍中，可以根據 3-2式的方程式作圖，便可求出樣品的表面積。

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_M} + \frac{(C-1)P}{V_M C P_0} \quad (3-2)$$

式中

$V$ ：壓力  $P$  時所吸附之氣體體積

$V_m$ ：單層吸附之氣體體積

$P$ ：實驗溫度下之壓力

$P_0$ ：實驗溫度下吸附氣體之飽和蒸氣壓

$C$ ：常數

### (b) 孔洞大小分布

樣品的孔洞大小分析是依照在特定相對壓力 ( $P/P_0$ ) 時，氣態的被

吸附物以毛細凝結現象被吸入樣品的圓柱型孔洞之中，由相對壓力的值帶入 Kelvin equation (3-4)式 所計算所得。

$$RK = [-2 \gamma VL / R T] \times \ln [P / P_0] \quad (3-3)$$

式中

RK : Kelvin 半徑

$\Gamma$  : 被吸附物的液體表面張力

VL : 被吸附物的液體莫耳體積

R : 氣體常數

T : 絕對溫度

P : 實驗溫度下之壓力

$P_0$  : 實驗溫度下所吸附氣體之飽和蒸氣壓

之後再以 BJH (Barrett-Joyner-Halenda ) 的方法以及 Haley equation 計算出氮氣之吸附量，並分析各樣品的氮氣吸附/脫附曲線，求出其孔洞大小的分布圖。(Barrett et al. 1951)

## 第四章 過氧化氫感測電極製備與感測性質分析

### 4.1 研究目的

過氧化氫為生物體內有氧化代謝過程，所產生的含氧自由基的一種。在 Long 等人的研究結果中指出人體尿液中的過氧化氫濃度高於 100  $\mu\text{M}$  時，將會與癌症、腦神經病變與心血管疾病發生有直接關係(Long et al. 1999)。由於尿液的組成複雜，干擾成份眾多，目前檢測尿液中過氧化氫濃度以同位素法(Kuge et al. 1999; Varma 1989)與螢光顯色法(Varma and Devamanoharan 1991)為主，其檢測方法昂貴且費時。

於本章節中將製備 GA-HRP/PANI/Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  電極，並於製備過程中改變 PANI 聚合圈數、戊二醛(GA)的使用條件等變因，藉由分析不同製備條件下所得的電極對於過氧化氫的感測性能，找尋較佳的電極製備條件。希望能製備出高靈敏度、高選擇性之過氧化氫生物感測電極，能應用於尿液中過氧化氫的感測。

## 4.2 實驗方法與程序

### 4.2.1 溶液配製

實驗所使用的所有溶液皆使用去離子水配製，經純化後所得，電阻係數為  $18.0 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

#### I. 磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffer, 0.1 M)

本研究中，實驗所使用的磷酸鹽緩衝溶液配製步驟分別先配製 1.0 M 磷酸氫二鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 與 1.0 M 磷酸二氫鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 之標準儲備溶液 (standard stock solution)。然後，依 Table 4-1 取不同體積之磷酸氫二鉀與磷酸二氫鉀溶液配製所需之不同 pH 值磷酸鹽緩衝溶液，最後再使用 3.0 M 氫氧化鉀( $\text{KOH}$ )與 3.0 M 磷酸( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )溶液校正到所需之 pH 值。

**Table 4-1 配製不同 pH 值之 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液所需體積表**

<b>pH</b>	<b>Volume of 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (ml)</b>	<b>Volume of 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (ml)</b>
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94	6

II. 苯胺單體溶液 (0.1 M aniline with 1.0 M HCl)

1. 取 500 ml 的去離子水加入 1000 ml 體積的燒杯中，再緩慢加入 83.5 ml 濃度為 36 % 的鹽酸。
2. 另外於體積為 100 ml 的燒杯中加入 30 ml 去離子水，並將燒杯置於電子天平上，重量歸零後使 pipet 加入苯胺單體 9.313 g。
3. 將燒杯內的苯胺單體加到步驟 1. 含有鹽酸溶液的燒杯中，混合後將溶液倒入體積為 1000 ml 的定量瓶中，再加入去離子水到溶液總體積達 1000 ml。
4. 以鋁箔紙包裹步驟 4. 之定量瓶，並於磁石攪拌器上攪拌 15 分鐘。

#### 4.2.2 過氧化氫濃度標定

為了確保實驗過程中，所使用之過氧化氫濃度的準確，對於過氧化氫濃度進行標定化為必要的工作。本研究中使用的標定化方法係依據 "Vogel's textbook of quantitative chemical analysis." (Jeffery 1989) 手冊之過氧化氫分析程序，以硫代硫酸鈉(sodium thiosulfate)滴定過氧化氫，實驗程序如下所示。

##### I. 澱粉溶液配製

1. 取 5 ml 去離子水加入 0.1 g 可溶性澱粉中，配製成泥漿狀，隨後將澱粉泥倒入 95 ml 攪拌的沸水中，倒入後持續攪拌並且沸騰 1 分鐘。
2. 待配製完成之澱粉溶液冷卻後，加入 2 g 碘酸鉀(potassium iodide, KI)，攪拌至溶解，配製成濃度為 1 %之澱粉溶液。

##### \*\* 澱粉溶液使用注意事項

1. 澱粉溶液必須每次使用前新鮮配製。
2. 體積 2 ml, 濃度為 1 %的澱粉溶液約可使用於 100 ml 體積的滴定溶液。
3. 在進行碘滴定(titration of iodine)時，澱粉溶液必須在滴定終點前才加入。

##### II. 硫代硫酸鈉(sodium thiosulphate, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )溶液配製

1. 秤取 16 g 之硫代硫酸鈉及 0.1 g 的碳酸鈉(sodium carbonate,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

2. 將所稱取之硫代硫酸鈉及碳酸鈉溶解於煮沸過的去離子水中，配製成濃度為 0.1 M 之硫代硫酸鈉溶液。

### III. 硫代硫酸鈉濃度標定(使用碘酸鉀進行標定)

1. 稱取 4.28 g 之碘酸鉀(potassium iodate,  $\text{KIO}_3$ )。
2. 將所稱取之碘酸鉀溶解於 1.0 L 煮沸過冷卻後去離子水中，配製成濃度為 0.02 M 之碘酸鉀溶液。
3. 取 1 g 碘化鉀粉末(potassium iodide, KI) 及 3 ml 的 1 M 硫酸溶液(sulphuric acid,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 加入步驟 2 中之碘酸鉀溶液中並均勻攪拌。
4. 取 0.02 M, 25 ml 碘酸鉀溶液於三角錐形瓶中，緩慢加入濃度為 0.1 M 之硫代硫酸鈉溶液進行滴定，直到溶液呈現淡黃色時，加入濃度為 1 % 之澱粉溶液 2 ml，此時溶液會由淡黃色轉變為深藍色，並繼續加入硫代硫酸鈉溶液滴定，直到錐形瓶中之溶液轉變為無色時即達到滴定終點，此時記錄下滴定所使用的硫代硫酸鈉溶液體積。

### IV. 過氧化氫濃度標定

1. 取濃度為 35 % 之過氧化氫 167  $\mu\text{l}$  加入 25ml 去離子水中，配製 25 ml, 0.069 M 過氧化氫溶液。
2. 將步驟 1 之過氧化氫溶液置於 250 ml 三角錐形瓶中，以磁石攪拌，加入 1g 碘化鉀及 100 ml 1.0 M 硫酸溶液，使用封口膜封閉瓶口，

並攪拌 15 min。

3. 緩慢添加已標定濃度之硫代硫酸鈉溶液於步驟 2 中之過氧化氫溶液進行滴定，待溶液顏色轉為淡紅棕色，加入 2 ml 濃度為 1 % 的澱粉溶液，再添加硫代硫酸鈉溶液滴定至溶液轉變成無色即為滴定終點，記錄下滴定所使用的硫代硫酸鈉溶液體積。

### 4.2.3 蛋白質定量分析

#### I. 分析原理

本研究中使用 Bio-Rad Protein Assay 試劑，進行蛋白質定量分析。其測定原理為試劑中之 Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) 染劑在過氯酸溶液中呈現紅棕色，在與測定樣品中的蛋白質結後則變成藍色，可經由測量 595 nm 下之吸光值，經由蛋白質濃度與吸光值之線性關係標準曲線，對蛋白質進行定量分析。

#### II. 蛋白質濃度與吸光值線性關係標準曲線之分析程序

使用牛血清蛋白(BAS)為測定標準品，求得於不同蛋白質濃度下之吸光值線性關係，其實驗步驟如下：

1. 秤 10 mg 的牛血清蛋白(BSA) 溶於 10 ml 的磷酸根緩衝液(0.1 M, pH 6.2)中，配製成濃度為 1 mg/ml 的儲備溶液(stock solution)，使用

vortex 將 BSA 溶液混合均勻。

2. 將牛血清蛋白溶液稀釋為 1.2 ~ 10.0  $\mu\text{g/ml}$  等不同濃度的 BSA 溶液，且使用 vortex 充分混合。
3. 分別取 800  $\mu\text{l}$  不同濃度的牛血清蛋白溶液加入比色槽(cuvette)中。
4. 於每個比色槽中加入 200 $\mu\text{l}$  Bio-Rad Protein Assay 試劑，使用封口膜蓋住比色槽開口混合均勻，於  $25\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  下靜置反應 10 分鐘。
5. 使用紫外光-可見光分光光度計量測波長 595 nm 下之吸光值。
6. 依據各個不同蛋白質濃度下所測得之吸光值對蛋白質濃度作圖，建立蛋白質濃度與吸光值線性關係標準曲線。

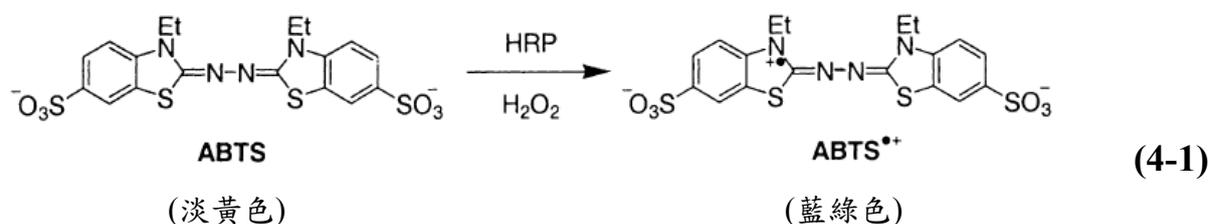
### III. 樣品中蛋白質定量分析程序

1. 取適量之蛋白質樣品溶液，使用 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.2) 將體積稀釋到 800  $\mu\text{l}$ ，加入比色槽中。
2. 於比色槽中加入 200  $\mu\text{l}$  Bio-Rad Protein Assay 試劑，使用封口膜蓋住比色槽開口混合均勻，於  $25\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  下靜置反應 10 分鐘。
3. 使用紫外光-可見光分光光度計量測波長 595 nm 下之吸光值。

## 4.2.4 HRP 酵素活性測定

### I. 測定原理

在過氧化氫存在環境下，HRP 可與2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) 進行反應，經由一個電子的轉移，將ABTS反應成自由基陽離子型態 (ABTS<sup>•+</sup>)，反應溶液由淡黃色轉變為藍綠色，並於410與750 nm 波長下有吸引波峰產生，如(4-1)式所示。本研究中HRP酵素活性測定方法係利用紫外光-可見光分光光度計，量測(ABTS<sup>•+</sup>)於波長410 nm處之吸光值。(Kadnikova and Kostic 2002)



### II. HRP酵素活性與吸光值線性關係標準曲線之測定程序

為了得知實驗過程中含有 HRP 酵素的樣品之活性，必須事先建立 HRP 酵素活性與吸光值之線性關係標準曲線，其實驗步驟如下：

1. 取出分裝保存之 HRP 酵素，解凍後使用磷酸鹽緩衝溶液(0.1M, pH 6.2)稀釋，分別配製 0.0025、0.005、0.01、0.015、0.02 與 0.025 unit/ml 等六種不同活性之 HRP 酵素溶液。

2. 分別取 1000  $\mu\text{l}$  步驟 1.中之不同活性酵素溶液加入比色槽中。
3. 於每個比色槽中加入 150  $\mu\text{l}$  ABTS 試劑，使用封口膜蓋住比色槽開口混合均勻，於  $25\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  下靜置反應 5 分鐘。
4. 使用紫外光-可見光分光光度計量測波長 410 nm 下之吸光值。
5. 依據各個不同 HRP 酵素活性下所測得之吸光值對 HRP 酵素活性作圖，建立 HRP 酵素活性與吸光值線性關係標準曲線。

### III. 樣品中 HRP 酵素活性測定程序

1. 取適量含有 HRP 酵素之樣品溶液，使用 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.2) 將體積稀釋到 1000  $\mu\text{l}$ ，加入比色槽中。
2. 於比色槽中加入 150 $\mu\text{l}$  ABTS 試劑，使用封口膜蓋住比色槽開口混合均勻，於  $25\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  下靜置反應 5 分鐘。
3. 使用紫外光-可見光分光光度計量測波長 410 nm 下之吸光值。

## 4.2.5 電極之製備

### 4.2.5.1 Ag/AgCl(3M NaCl)參考電極之製備

1. 將銀線含浸在 3 M HNO<sub>3</sub> 溶液 10 分鐘，溶解表面被氧化的銀，產生新表面。

2. 使用去離子水清洗銀線，隨後將銀線在 0.1 M HCl 溶液中，陽極極化 30 分鐘 (電流密度 0.4 mA/cm<sup>2</sup>)。

[極化所需的電流值:  $0.06 \times \pi \times 5 \times 0.4 \times 5 = 1.885(\text{mA})$ ]

4. 將銀線插入含飽和 3 M NaCl 溶液的玻璃管中，使用熱縮收管加熱封住開口，Ag/AgCl(3M NaCl)參考電極組裝示意圖如 Fig. 4-1 所示。

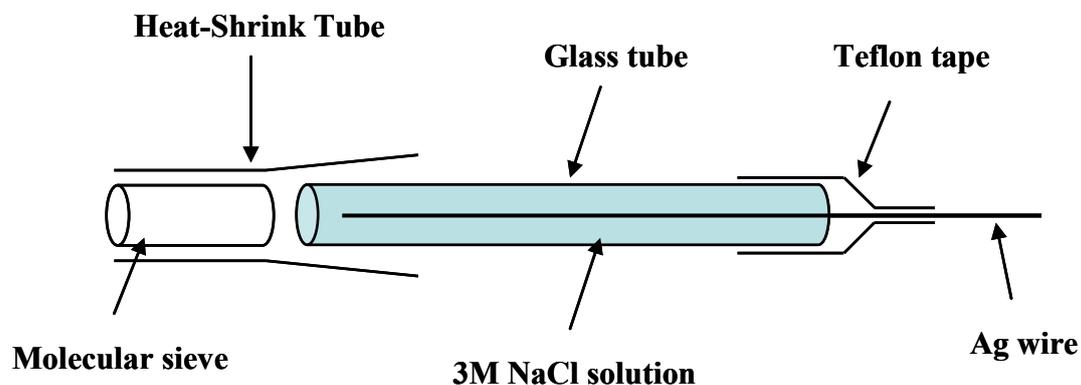


Fig. 4-1 Ag/AgCl (3M NaCl)參考電極組裝示意圖

#### 4.2.5.2 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之製備

在本系統中，利用離子濺鍍法製備 Pt 於 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 基材上，清洗烘乾後再以銀膠連接導線，製備成 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，如 Fig. 4-2 所示。

##### I. 實驗裝置

在製備 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極過程中，主要使用離子濺鍍機(JFC-1200)，將 Pt 濺鍍於氧化鋁基板上。

##### II. 實驗步驟

###### (A) 氧化鋁基板之前處理

1. 將氧化鋁基板使用鑽石刀裁切成 1 cm × 2 cm 大小。
2. 先後使用濃度為 3 M NaOH 溶液及 3 M HCl 溶液浸泡 10 分鐘，分別於兩次浸泡後使用去離子水洗淨，再烘乾後備用

###### (B) 濺鍍 Pt 於氧化鋁基板

1. 在投影片繪製出工作電極之線路圖，其面積為 0.28 cm<sup>2</sup>，再將電極圖樣挖空，完成影子光罩(shadow mask) 之準備。
2. 噴上完稿膠後，將其貼在 (A)步驟中所處理備用的氧化鋁基板上。
3. 將其置入濺鍍儀中濺鍍白金，濺鍍時間為 10 分鐘，再次分別浸泡於 3 M NaOH 及 3 M HCl 溶液各 10 分鐘，使用去離子水洗淨，完成 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

電極的白金濺鍍。

### (C) 外線路之連接

1. 截取適長度之導線，利用銀膠將導線黏接於上述製備所得之 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 連接點上。
2. 將步驟 1 中已黏接導線之 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極置於 50 °C 之烘箱烘乾 12 小時。
3. 待銀膠乾燥後，使用環氧樹脂塗佈在銀膠上，置於 50 °C 之烘箱中烘乾 3 小時。
4. 使用熱熔膠塗佈覆蓋於陶瓷基板表面，只露出工作電極之 Pt 部份。

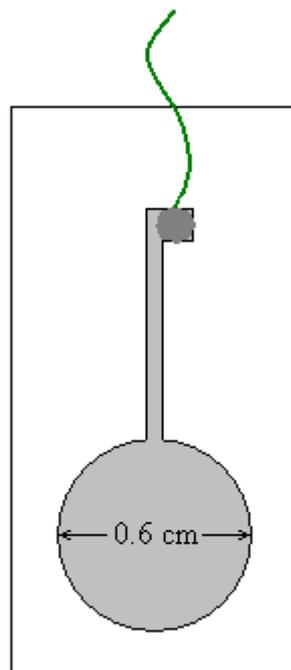


Fig. 4-2 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極示意圖

### 4.2.5.3 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之製備

PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之製備為使用電化學聚合法，將 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於含有苯胺單體溶液中，以循環伏安法(Cyclic voltammetry, CV)將 PANI 膜聚合於 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上製備成 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，幾何示意圖如 Fig. 4-3 所示。

#### I. 實驗裝置

製備 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之 PANI 聚合為使用三電極系統，Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極為工作電極、Ag/AgCl(3 M NaCl)為參考電極，白金絲為參考電極，實驗裝置如 Fig. 4-4 所示。

#### II. 實驗步驟

1. 將 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極置於 30 ml 含有 0.1 M 苯胺單體與 1.0 M HCl 之聚合液中，以 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 為工作電極，白金絲為相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，使用循環伏安法將 PANI 聚合於白金表面。
2. 循環伏安法聚合聚苯胺之條件：掃瞄電位範圍：0.0 ~ 1.0 V (vs. Ag/AgCl(3M NaCl))，掃瞄速率：10 mVs<sup>-1</sup>，聚合溫度：25±0.5 °C。
3. 聚合完成後將 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極浸泡於去離子水中 6 小時後於空氣中陰乾。
4. 將 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極置於 30 ml 的磷酸鹽緩衝溶液(0.1 M, pH 4.0) 中

使用定電位法先將 PANI 膜上之氯離子去摻雜，首先固定電位為-0.5 V 持續 20 分鐘。

5. 更換 30 ml 的磷酸鹽緩衝溶液(0.1 M, pH 4.0) 中再以定電位法先將 PANI 摻雜磷酸根離子，固定電位 +0.6 V 維持 10 分鐘，完成 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極製備，並將電極保存於去離子水中。

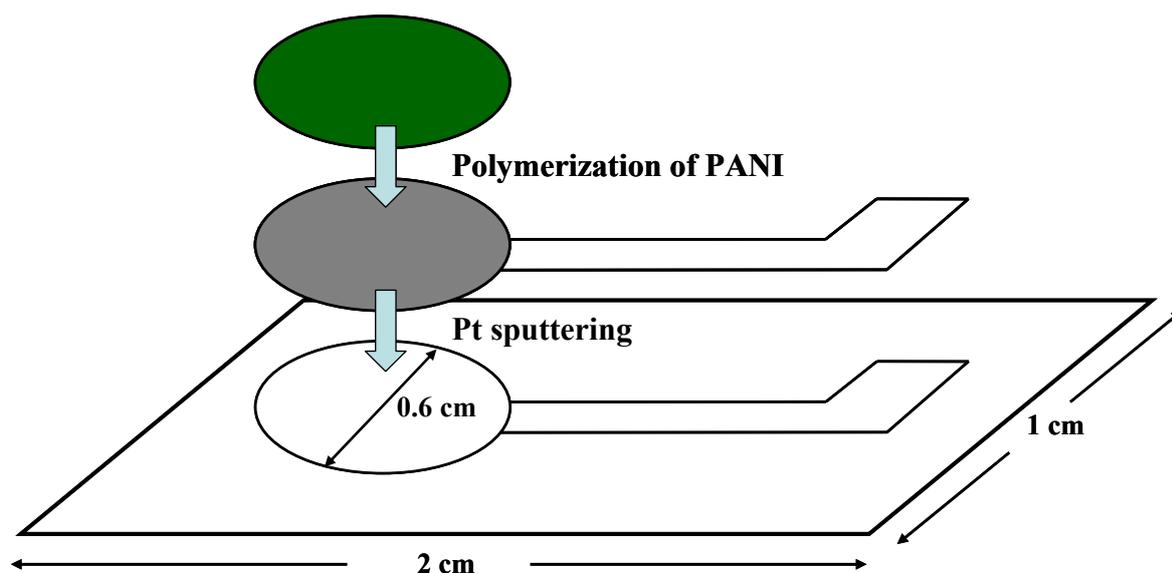


Fig. 4-3 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之幾何示意圖

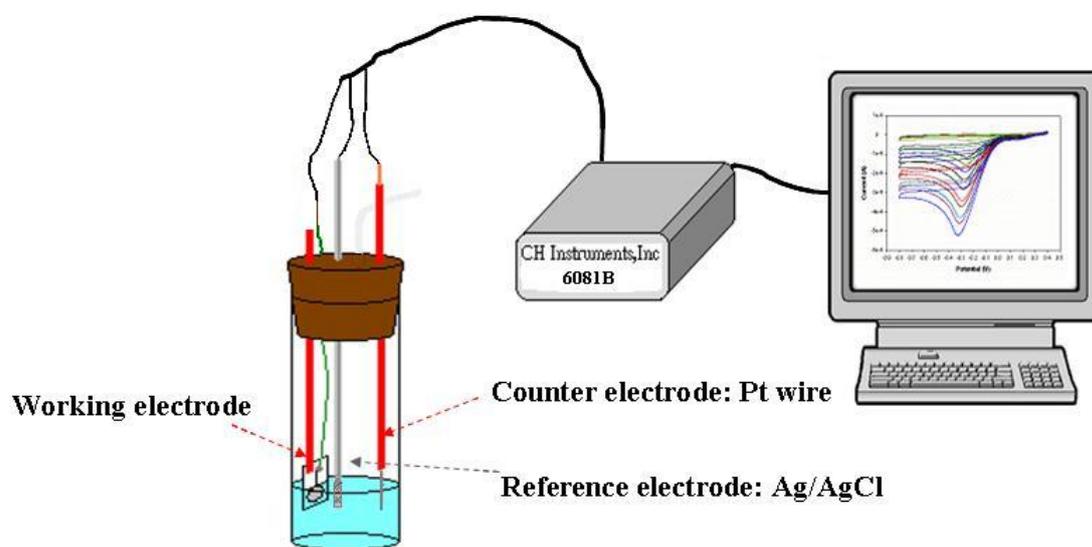


Fig. 4-4 PANI 聚合與過氧化氫感測之實驗裝置圖

#### 4.2.5.4 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極之製備

本研究中所使用的酵素為辣根過氧化酵素(HRP)，購入後，於使用前先溶解於保存 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.0)中，並依據後續實驗之使用量，分裝保存。

##### I. 酵素分裝

1. 將 HRP 酵素(5000 units)粉末由冰箱取出，置於碎冰中解凍 1 小時，同時取適量 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.0) 置於碎冰中預冷。
2. 取 1 ml 磷酸鹽緩衝溶液(0.1 M, pH 6.0)加入 HRP 酵素粉末中，混合均

勻後配製成 5 unit/ $\mu\text{l}$  貯存溶液(stock solution)，分裝成適量體積，保存於 $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中備用。

## II. GA-HRP/PANI/Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ 酵素電極之製備

1. 取出分裝保存之 HRP 酵素，置於碎冰上解凍 1 小時，取 20  $\mu\text{l}$  酵素溶液加入 6 ml 磷酸鹽緩衝液(0.1 M, pH 5.6)中混合均勻。
2. 以 PANI/Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  當作工作電極，置入步驟 1 中含有 HRP 酵素磷酸鹽緩衝溶液中，於  $25^{\circ}\text{C}$  的恆溫水浴中，以白金絲為相對電極，Ag/AgCl (3 M NaCl) 為參考電極，以定電位法，固定電壓為  $-0.5\text{ V}$ ，時間為 20 分鐘，將 HRP 酵素以電吸附方式固定於 PANI/Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  電極上。
3. 待酵素電吸附程序完成後，取 3  $\mu\text{l}$  GA 溶液 (2.5 v/v %) 澆注於已吸附 HRP 酵素之 HRP/PANI/Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  電極表面，並將電極置於  $4^{\circ}\text{C}$  的乾燥器中乾燥 24 小時，完成 GA-HRP/PANI/Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  電極之製備，幾何示意圖如 Fig. 4-5 所示。

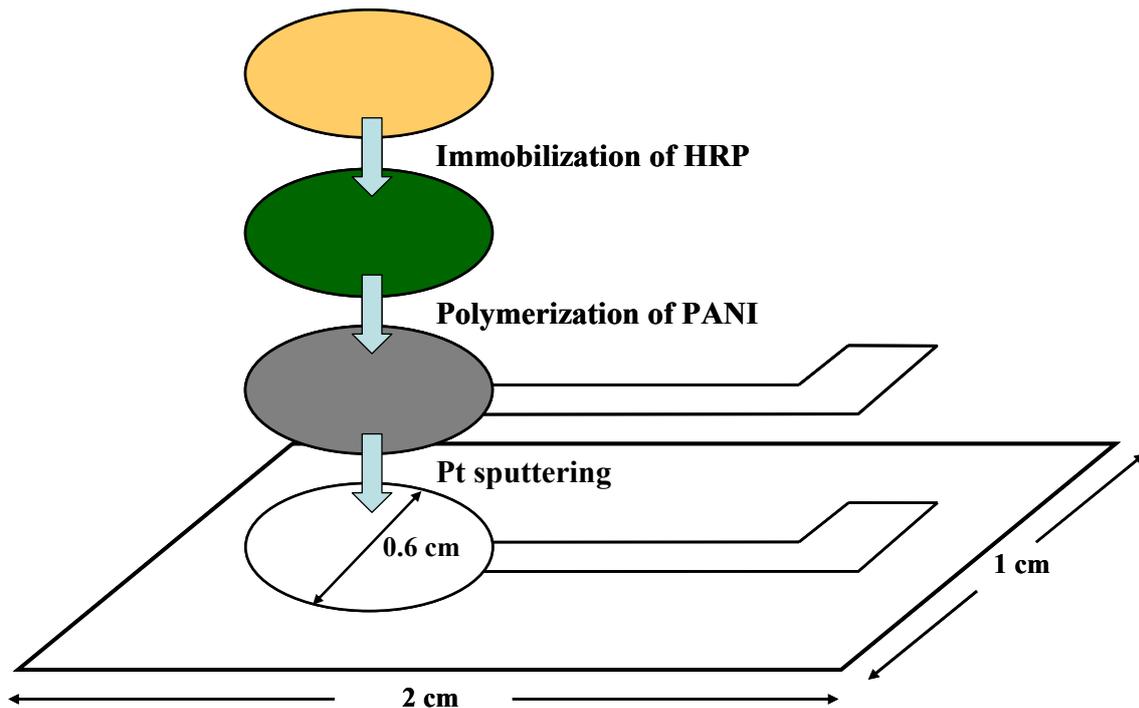


Fig. 4-5 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極之幾何示意圖

#### 4.2.6 過氧化氫感測性質測定

1. 實驗前取 35ml 之磷酸鹽緩衝溶液(0.1 M, pH 6.2)通入高純度氮氣 40 分鐘，去除溶液中之溶氧。
2. 量取 6 ml 已除氧之磷酸鹽緩衝溶液置於 25±0.5 °C 水浴中恆溫，並於液表面持續通入高純度氮氣。
3. 將 4.2.5 小節中所製備完成之電極為工作電極，置於上步驟中所述之磷酸鹽緩衝溶液中，分別使用白金絲為相對電極，Ag/AgCl(3M NaCl)為參考電極，並將其如 Fig. 4-4 之過氧化氫感測裝置，利用循環伏安法掃瞄並記錄其各個電位下之應答電流，CV 法感測條件之掃瞄電位範圍：

-0.6 ~ 0.4 V (vs. Ag/AgCl(3MNaCl)), 掃瞄速率為 20 mVs<sup>-1</sup>。

4. 將濃度為 35 %之過氧化氫溶液使用步驟 1.中已除氧之磷酸鹽緩衝溶液稀釋，並依序取適量已稀釋過後之氧化氫溶液加入感測系統中，調配出不同之過氧化氫感測濃度進行感測。

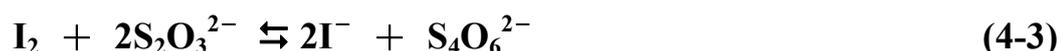
### 4.3 實驗結果與討論

#### 4.3.1 過氧化氫濃度標定

為了確認感測所使用的過氧化氫濃度的準確，使用碘滴定法滴定過氧化氫。在使用硫代硫酸鈉滴定過氧化氫之前，必須先使用碘酸鉀作為滴定濃度標準品對於硫代硫酸鈉濃度進行標定。

##### I. 硫代硫酸鈉( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )濃度標定

硫代硫酸鈉標定所使用之化學反應式如(4-2)與(4-3)式所示，在酸性的環境下， $\text{IO}_3^-$  與  $\text{I}^-$  離子可反應生成碘分子( $\text{I}_2$ )，以硫代硫酸鈉滴定所產生之  $\text{I}_2$ ，硫代硫酸根( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ )會被  $\text{I}_2$  氧化成  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ，經由滴定過程所使用的硫代硫酸鈉消耗量，可得知硫代硫酸鈉濃度。



由實驗結果計算硫代硫酸鈉濃度：

(1) 滴定標準品使用量(碘酸鉀,  $\text{IO}_3^-$ ): 0.02 M, 25 ml

$$\text{IO}_3^- \text{ 使用莫耳數} : 0.02 \text{ M} \times 0.025 \text{ L} = 5 \times 10^{-4} \text{ mole}$$

(2) 須滴定之  $\text{I}_2$  莫耳數 :  $3 \times (5 \times 10^{-4}) = 1.5 \times 10^{-3} \text{ mole}$

(3) 滴定  $\text{I}_2$  所須之  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  莫耳數 :  $2 \times (1.5 \times 10^{-3}) = 3 \times 10^{-3} \text{ mole}$

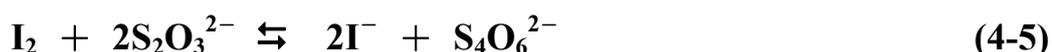
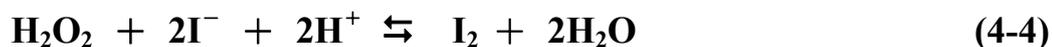
滴定 0.02 M, 25 ml 碘酸鉀的過程中，總共使用了 30.13 ml 硫代硫酸鈉，計算硫代硫酸根( $S_2O_3^{2-}$ )濃度：

$$3 \times 10^{-3} \text{ mole} / 0.03013 \text{ L} = 0.0996 \text{ M}$$

標定所得硫代硫酸鈉濃度，與滴定實驗時所配置 0.1 M 一致。

## II. 過氧化氫濃度標定

使用以標定濃度之硫代硫酸鈉溶液進行過氧化氫濃度滴定，標定所使用之化學反應式如(4-4)與(4-5)式所示， $H_2O_2$  將  $I^-$  還原成  $I_2$ ， $I_2$  再將滴定所使用的硫代硫酸根( $S_2O_3^{2-}$ )氧化成  $S_4O_6^{2-}$ ，經由滴定過程所使用的硫代硫酸鈉消耗量，可得知過氧化氫濃度。



由實驗結果計算硫代硫酸鈉濃度：

滴定所使用之硫代硫酸鈉(0.0996 M) 體積： 33.98 ml

→ 硫代硫酸鈉莫耳數： $0.0996 \times 0.03388 = 3.384 \times 10^{-3} \text{ mole}$

→  $H_2O_2$  莫耳數： $1.692 \times 10^{-3} \text{ mole}$

→  $H_2O_2$  濃度： $1.692 \times 10^{-3} \text{ mole} / 0.025 \text{ L} = 0.068 \text{ M}$

→ 原始之  $H_2O_2$  濃度 =  $10.18 \text{ M} \div 34.61 \%$

標定所得之過氧化氫濃度，與所購買之 35 % 濃度接近。

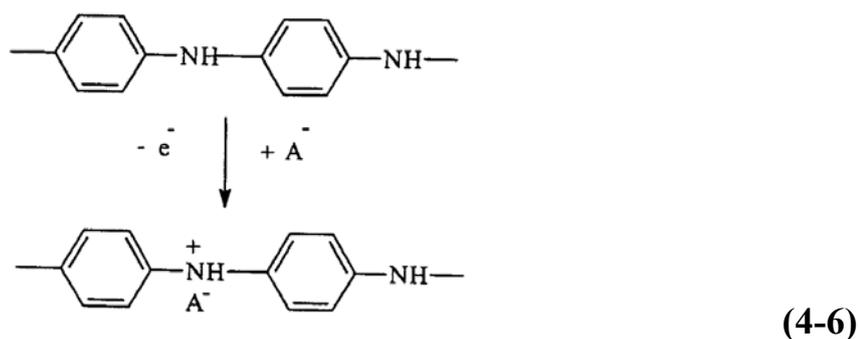
### 4.3.2 電極之製備與感測性質測定

於此小節中，將探討 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的製備行為與感測性質分析。電極的製備首先使用濺鍍法於氧化鋁基材表面濺鍍白金，製備成 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，再使用循環伏安法(CV)於 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極表面電聚合聚苯胺，製備成 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，再將 HRP 酵素使用電吸附方式固定於 PANI 高分子膜上，其固定化的原理為 HRP 酵素的等電點(pI) 值為 7.2 (Yang and Mu 1997)，當 HRP 酵素於低於 pH 值 7.2 的溶液中時呈現帶正電荷狀態，因此將 HRP 酵素溶於 pH 5.6 的磷酸鹽緩衝溶液中，將 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極置於酵素溶液中並於電極上固定 -0.5 V 之電位，將帶正電荷的 HRP 酵素吸附於電極上。最後於電極上澆注交聯劑戊二醛(GA)輔加以交聯固定，製備成 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極，於此小節之實驗結果中將探討電極的製備條件與感測性質分析。

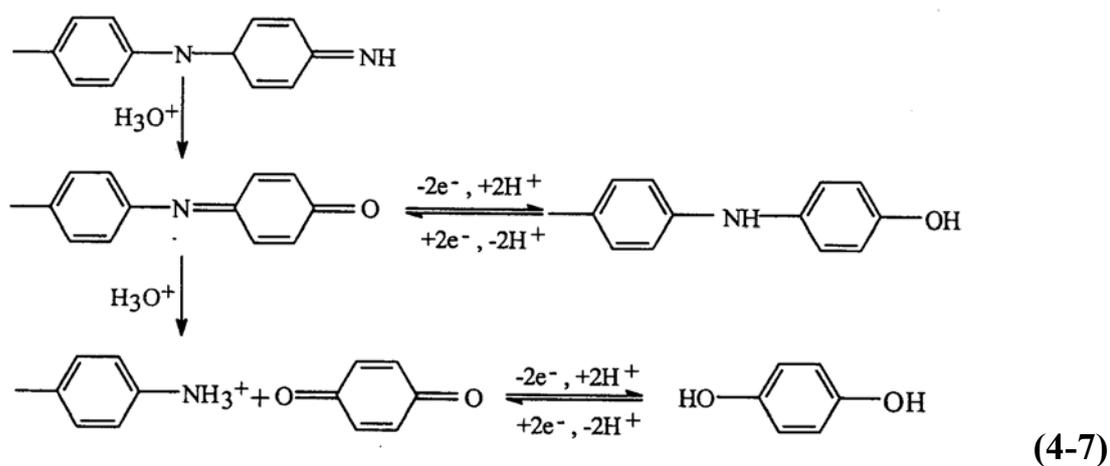
#### 4.3.2.1 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之製備

Fig. 4-6 為使用電化學循環伏安法於 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極表面聚合 PANI 之循環伏安圖譜，由圖中可看出苯胺的聚合過程中有(a)、(b)與(c)三個氧化波峰，第一個氧化波峰(a)，為 PANI 高分子膜於質子酸中進行氧化反應，

伴隨著聚合溶液中氯離子之摻雜，其反應式如(4-6)式所示(Kobayashi et al. 1984)，PANI 鏈上的氮原子於電極上被氧化而失去一個電子，形成帶正電的狀態，而引起聚合溶液中的氯離子進入 PANI 膜中，進行摻雜作用。



第二個氧化波峰(b)，為 PANI 分子鏈上的亞胺基上碳氮鍵之水解反應，其反應式如(4-7)式所示(Genies and Lapkowski 1987; Kobayashi et al. 1984)：



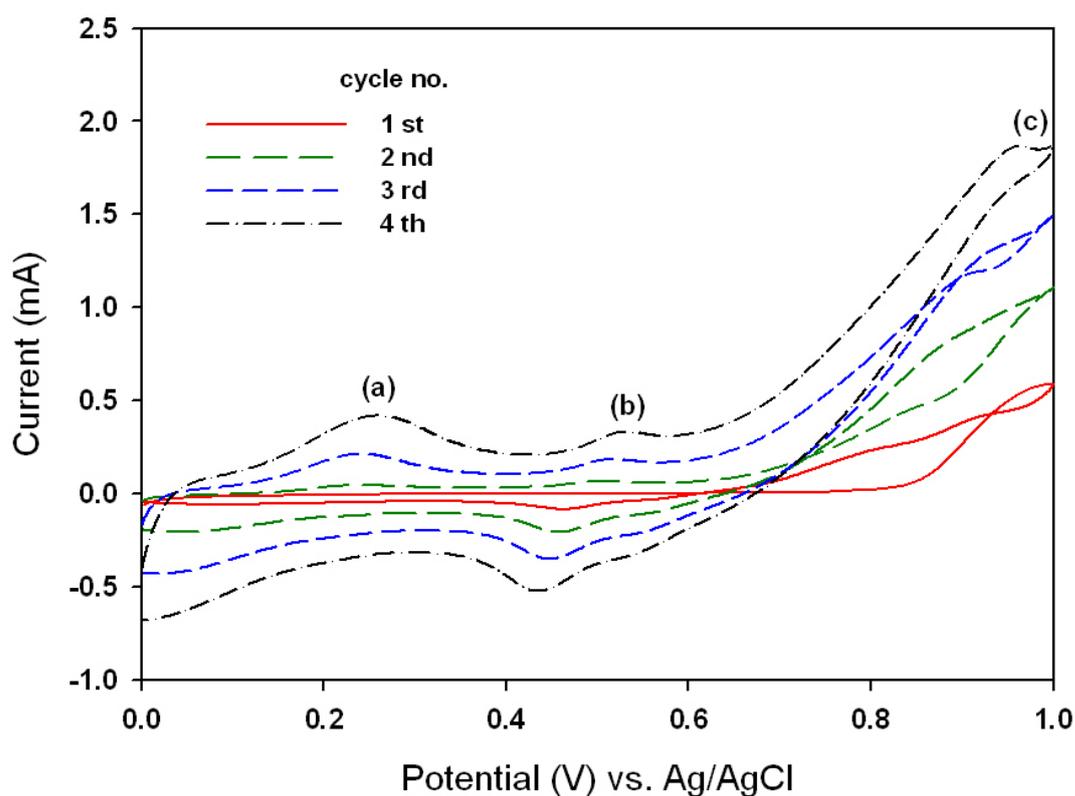


Fig. 4-6 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上聚合 PANI 之循環伏安圖譜

Condition for preparing PANI film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 V ~ 1.0 V, temperature: 25±0.5 °C.

第三個氧化波峰(c)，為苯胺單體之氧化聚合反應，其反應機構如 Fig.

4-7 所示：

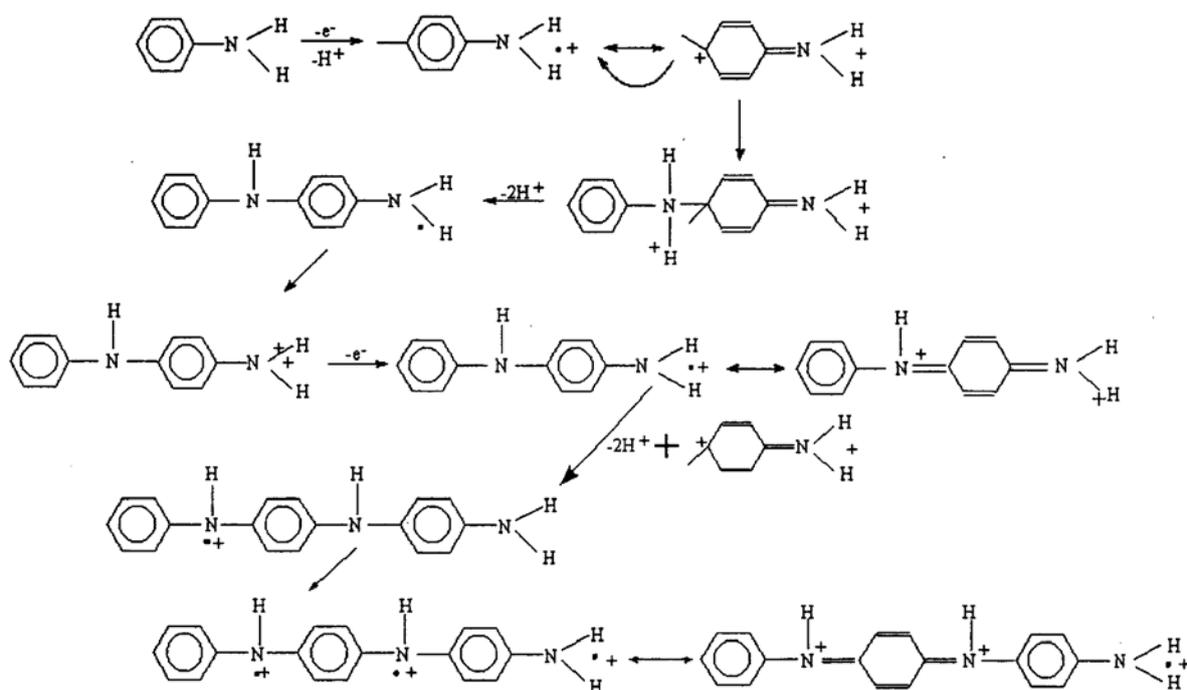


Fig. 4-7 電化學聚合法聚合 PANI 之反應機構(Kobayashi et al. 1984)

Fig. 4-6 中 PANI 的聚合電位方向為 0 V 往 1.0 V 掃瞄，在第一圈聚合時，因未產生苯胺單體的氧化反應(波峰(C))，在電極上未聚合出 PANI，故於第一圈的循環伏安圖譜未產生 PANI 鏈上之氧化波峰(a)與(b)。第二圈後，無論是摻雜反應、水解反應和聚合反應的氧化波峰電流均隨著掃瞄圈數增加而增加，其原因為隨著掃瞄圈數增加，聚合於電極上的 PANI 量增加，使得電化學活性面積增加，因此電流增加，Fig. 4-8 為不同圈數下，於 1.0 V 處進行聚合反應之氧化波峰(c)的電流值對聚合圈數作圖，可發現 PANI 聚合反應之氧化電流值與聚合圈數呈線性正比關係。

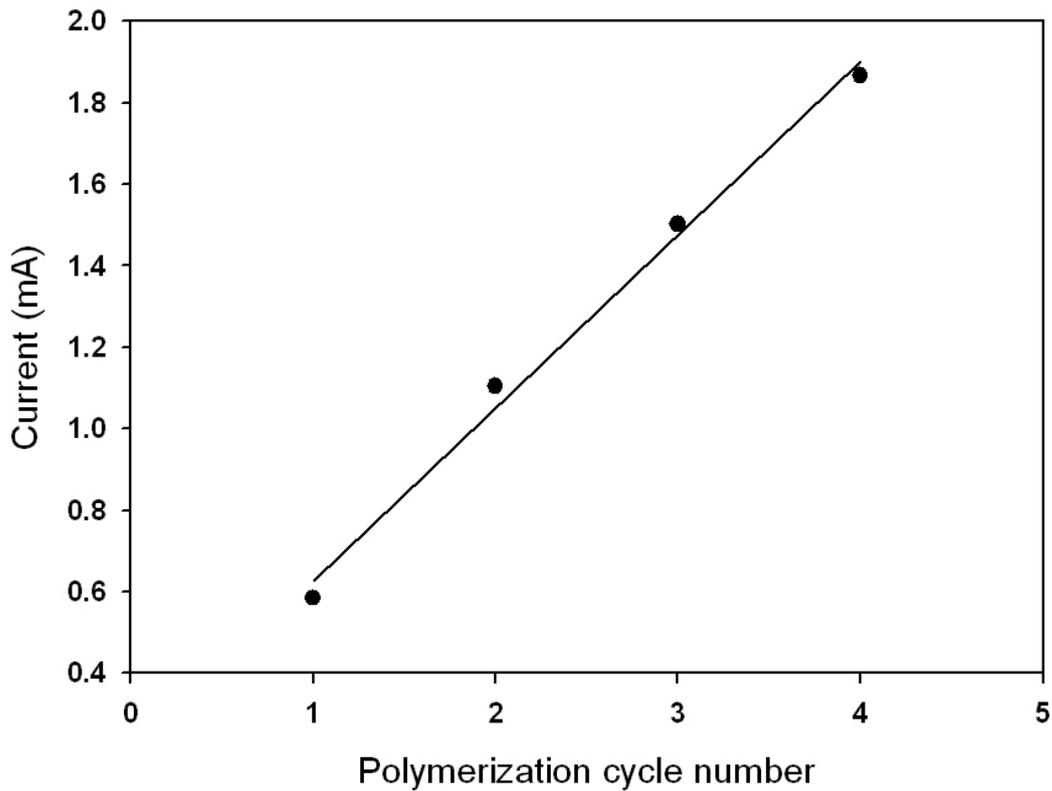
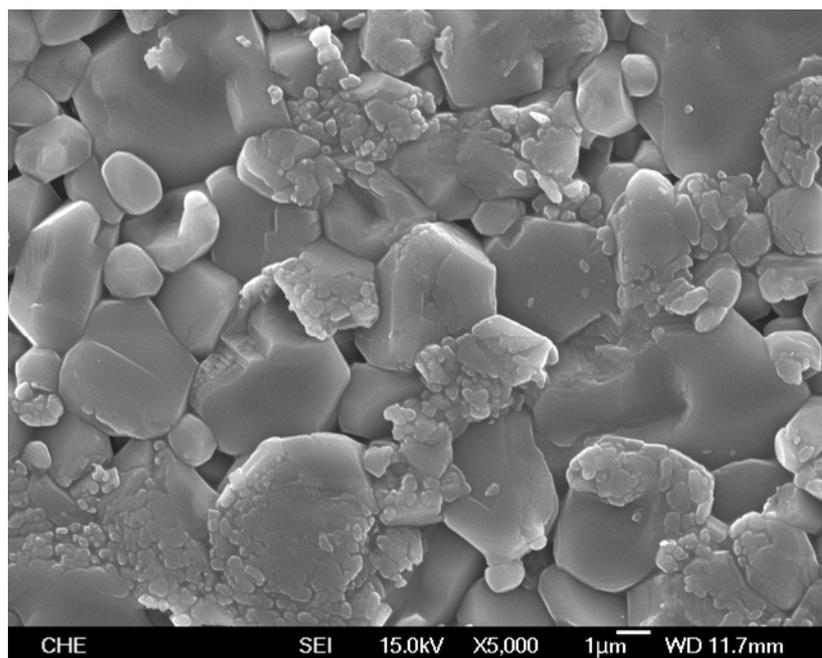


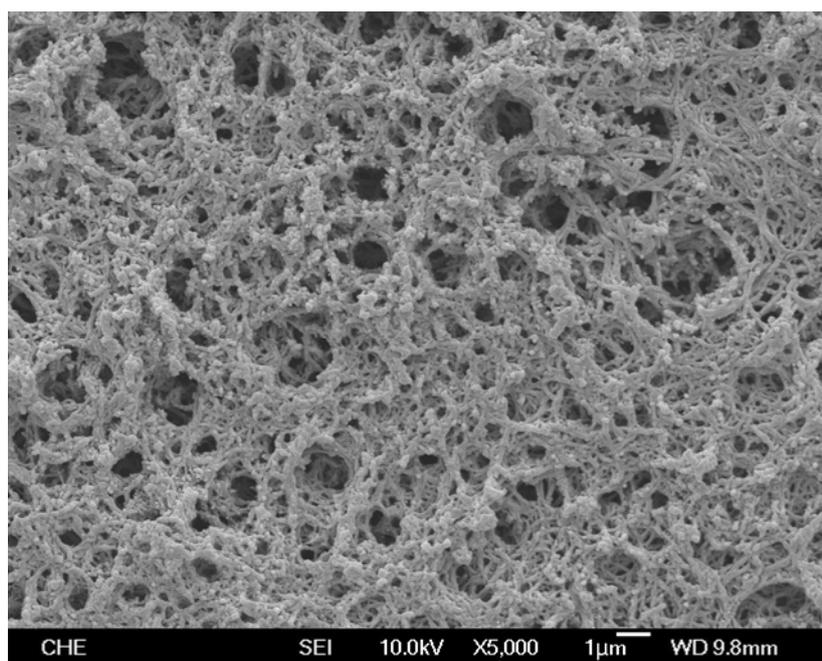
Fig. 4-8 循環伏安法聚合 PANI 之聚合反應氧化電流與聚合圈數關係圖

#### 4.3.2.2 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之表面型態觀察

使用 SEM 對於製備所得之 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極進行表面型態的觀察，由 Fig. 4-9(a)可發現苯胺聚合前，氧化鋁基板呈現由氧化鋁粉末堆疊之平面。而 Fig. 4-9(b)為苯胺聚合後之 PANI 高分子膜表面型態，呈現均勻之纖維多孔狀之網狀結構，其 PANI 的纖維寬度約為 150 nm，PANI 高分子膜的孔洞介於 0.1 ~ 2 μm，與文獻中使用循環伏安法聚合之 PANI 結構一致(Mathebe et al. 2004)。



(a)



(b)

**Fig. 4-9 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極(a) 與 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極(b)之表面 SEM 圖**

Condition for preparing PANI film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 V ~ 1.0 V, scanning number: 4, temperature: 25±0.5 °C.

### 4.3.2.3 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之性質分析

Fig. 4-10 為 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極與 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.2)中之循環伏安圖。比較苯胺聚合前後之背景電流，圖中曲線(a)為 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，可觀察到分別於-0.6 V 與-0.5 V 有一對明顯之氧化還原波峰，此對波峰分別為溶液中，氫於白金電極表面之吸附/脫附行為，其可能的反應機構如下所示(Croissant et al. 1998)：

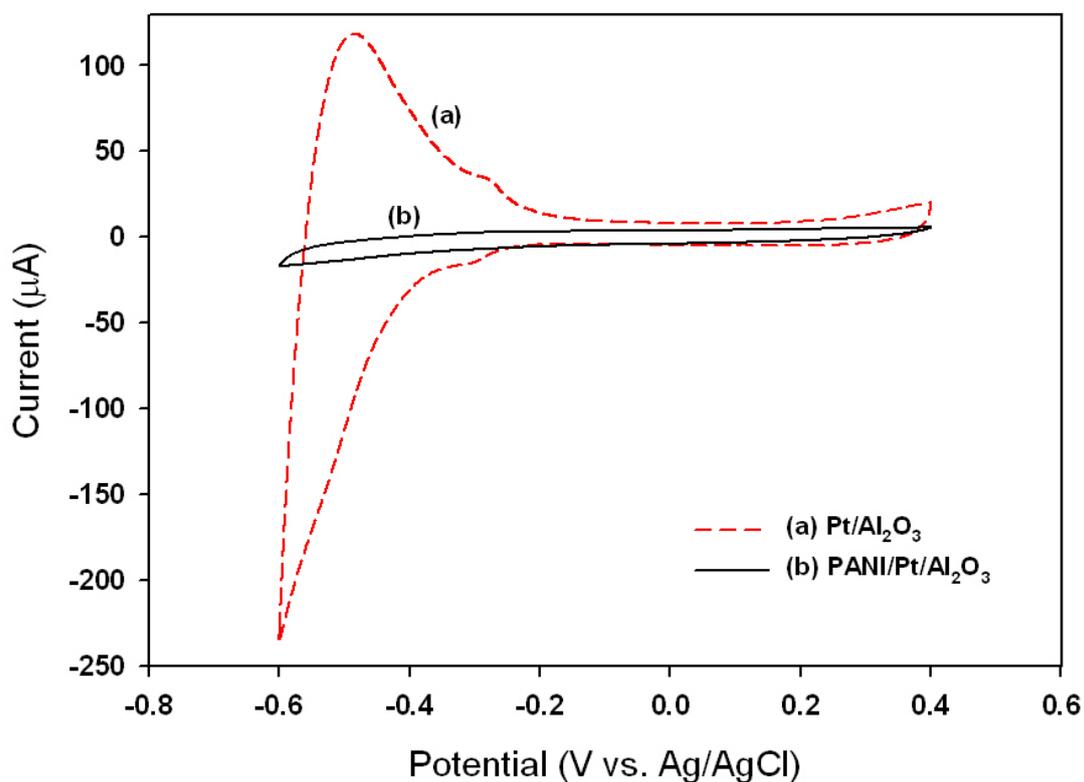


使用白金電極進行感測時，因水於電極上被電解而產生氫氣與氧氣，溶液中的氫氣擴散至白金電極表面，如(4-8)式所示，電極表面的氫氣吸附於電極表面形成 2 個吸附態的氫原子，如(4-9)式所示。脫附反應如(4-10)所示，吸附態的氫原子脫附至溶液中，並釋放出一個電子。吸脫附全反應如(4-11)式所示。由於氫氣於白金電極的吸脫附反應伴隨著電子轉移，使得白金電極於 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.2)進行循環伏安掃瞄時有較大之背景電流。

當使用碳、黃金、白金、銀等材料之裸電極(Bare electrode)進行感測

時，經常會遇到三個難題：(1) 電極表面於感測過程吸附物質而鈍化，影響偵測的靈敏度與再現性；(2) 感測物質於電極表面的反應速率太慢，需要在很大的過電壓下才能偵測到欲感測的物質，過電壓太大容易引發其它物質於電極上反應；(3) 僅限於偵測電活性物質(Electroactive species)，於應用上受到限制。為了改善以上缺點，生物感測電極的製備廣泛於電極表面進行化學修飾(Murray et al. 1987)。

經由 PANI 修飾之電極可減少氫於電極表面吸/脫附而產生的背景電流訊號，較小的背景電流訊號於感測時，雜訊干擾亦會較小。Fig. 4-10 中曲線(b)為 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之循環伏安掃瞄曲線，由此可發現白金電極修飾 PANI 膜後，其背景氧化還原訊號大為降低。



**Fig. 4-10 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>與 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.2)中掃瞄之循環伏安圖**

Condition for preparing PANI film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 V ~ 1.0 V, scanning number: 4, temperature: 25±0.5 °C.

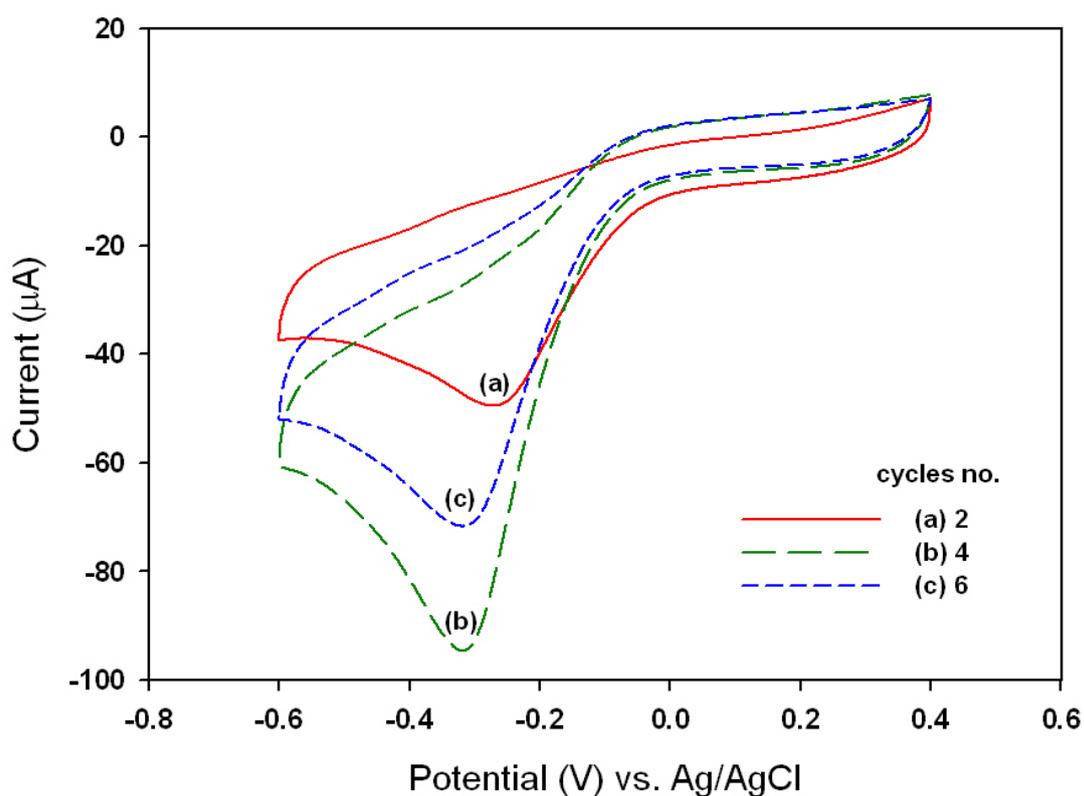
Condition for sensing: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrodes, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 V ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

#### 4.3.2.4 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極之 PANI 聚合圈數對過氧化氫感測性質的影響

使用循環伏安法聚合 PANI，可經由改變聚合時的掃描圈數、聚合溫度等條件控制電極表面 PANI 膜的厚度。Fig. 4-11 為改變苯胺聚合圈數所製備之 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極感測 2.39 mM 過氧化氫之循環伏安圖。圖中曲線(a)與(b)之 PANI 膜的聚合圈數分別為 2 圈與 4 圈，在感測相同濃度的過氧化氫時其還原波峰電流分別為 49.5  $\mu\text{A}$  與 94.6  $\mu\text{A}$ ，將其感測電流對過氧化氫作圖之直線斜率為感測的靈敏度(sensitivity)，由聚合 2 圈時的 16.74  $\mu\text{A mM}^{-1}$  增加到 4 圈時的 37.55  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，其相關係數( $r^2$ )皆為 0.99，偵測極限由 2 圈時的 40  $\mu\text{M}$  降低到 4 圈時的 10  $\mu\text{M}$ 。推論其原因為當聚合圈數由 2 圈增加到 4 圈時，電極上聚合所得之 PANI 量增加，高分子膜之電活性面積增加，故其感測電流與靈敏度皆提高。聚合 4 圈之 PANI 的電極感測過氧化氫的還原波峰電位較聚合 2 圈的電極往左偏移，其原因可能是 PANI 膜厚度增加，使參考電極與工作電極之間的電阻值增加所導致。

然而，由 Fig. 4-11 圖中曲線(c)可見當聚合圈數增加到 6 圈時，其感測還原電流下降至 71.66  $\mu\text{A}$ 。Fig. 4-12 為不同聚合圈數所製備 PANI 膜之表面 SEM 圖，可觀察到當聚合圈數增加至 6 圈時，PANI 膜的結構局部較為密集，如 Fig. 4-12(c)中所圈選之(a)區域所示，推測其感測電流下降的原

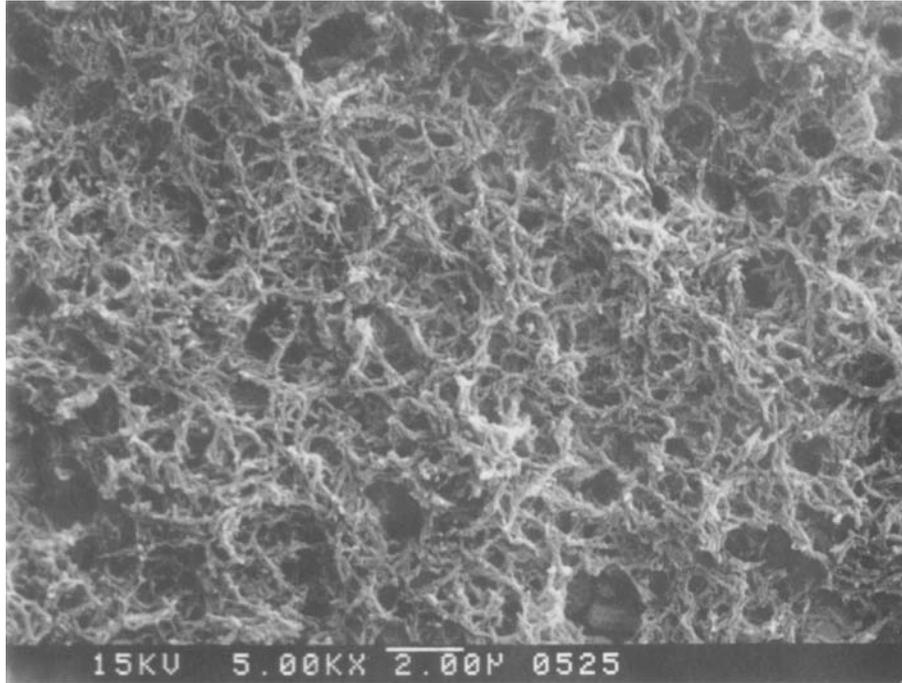
因可能因質傳阻力與 PANI 膜電阻增加。另一方面，因聚合 6 圈之 PANI 纖維結構呈現較不均勻狀態，導致局部的 PANI 膜附著力較差，如 Fig. 4-12(c)中所圈選之(b)區域所示，當聚合後將電極浸泡於去離子水的過程中可明顯觀察到，電極表面 PANI 膜有局部片狀脫落的現象，亦可能為影響其感測電流下降的原因。比較其 PANI 膜的聚合圈數對於酵素電極感測過氧化氫的實驗結果，於本研究中後續實驗選擇 PANI 膜的聚合圈數為 4 圈。



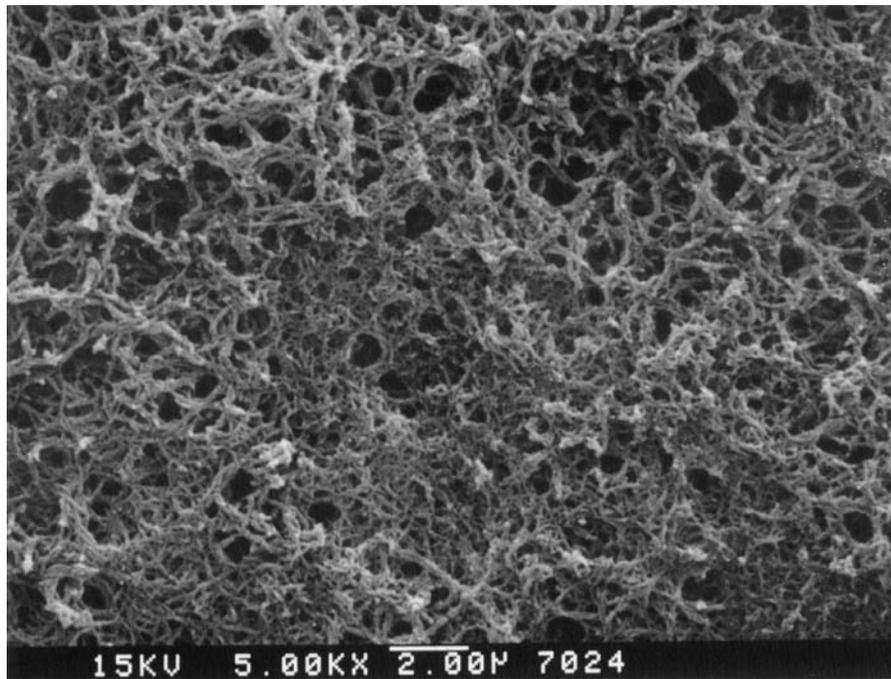
**Fig. 4-11 改變PANI聚合圈數之GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極感測2.39 mM 過氧化氫之循環伏安圖**

Condition for preparing PANI film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 V ~ 1.0 V, scanning number: 2, 4, 6, temperature: 25±0.5 °C.

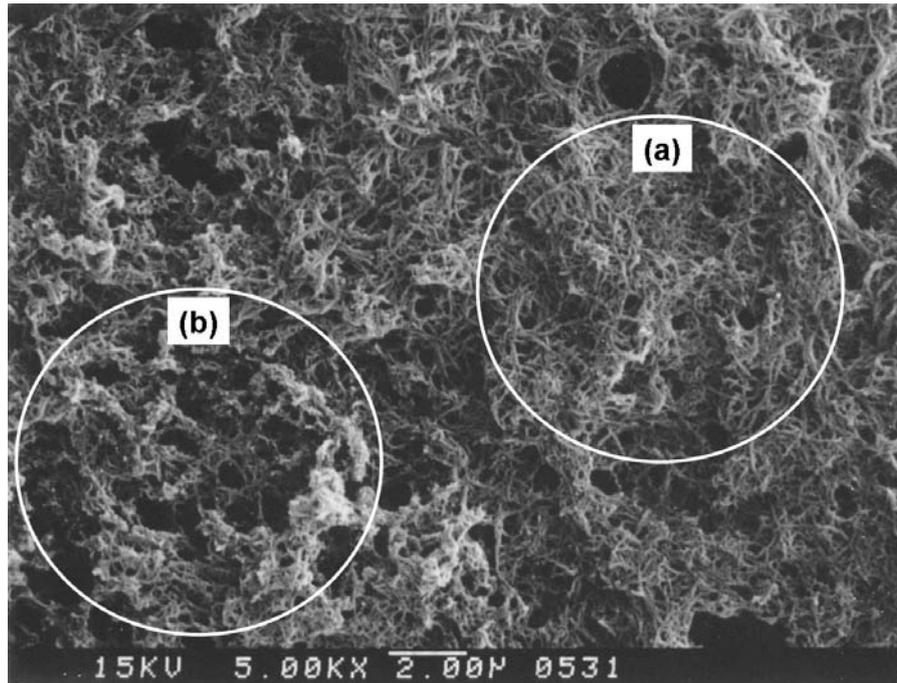
Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]: 2.39 mM, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 V ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.



(a)



(b)



(c)

**Fig. 4-12** 不同聚合圈數之PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極表面SEM圖 (a) 2 圈, (b) 4 圈, (c) 6 圈

The accelerating voltage and the magnification of the image were 15 kV and 5000 $\times$ , respectively.

Conditions for preparing PANI film : W.E.: Pt electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 V ~ 1.0V, temperature: 25 $\pm$ 0.5  $^{\circ}$ C

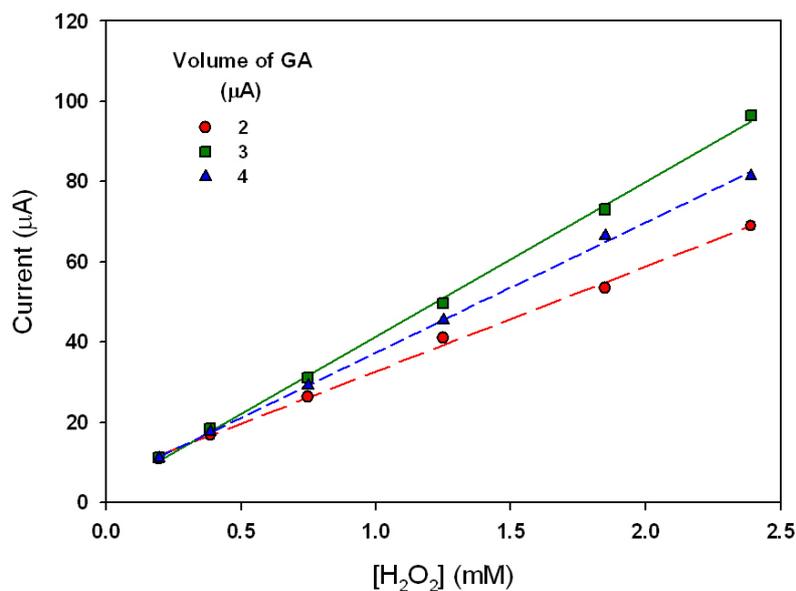
#### 4.3.2.5 戊二醛(GA)使用體積與濃度對於 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測之影響

於製備 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極過程中，先將 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極置於含有 HRP 酵素之磷酸鹽緩衝溶液中，以定電位方式固定電位於-0.5 V，使用定電吸附方式將酵素固定於 PANI 膜上，待電吸附程序完成後，再於電極表面澆注 GA 進一步行酵素交聯反應，將吸附於 PANI 膜上之 HRP 更穩定固定於電極上。本實驗室周筱惇在研究影響 HRP 於聚苯胺電極固定化之因素時 (周筱惇 2007)，其實驗結果發現固定化時之 GA 使用方式會影響到固定化之效果與 HRP 活性，在較高的 GA 濃度下進行酵素固定化會降低固定後之 HRP 活性。於本小節中將探討進行 HRP 固定化時 GA 使用體積與濃度對於 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於過氧化氫感測的影響。

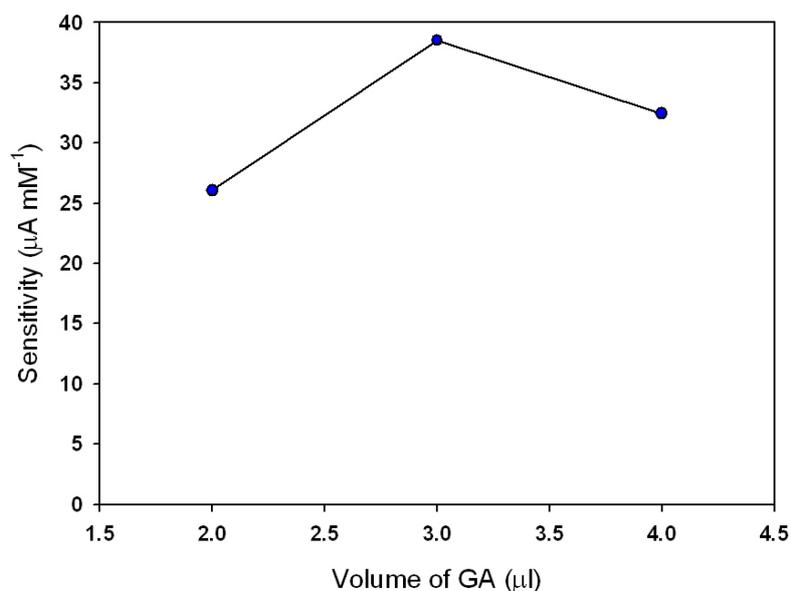
在探討固定化時 GA 體積的影響部份，於經過-0.5V 下電吸附製備之 HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上澆注濃度為 2.5 (v/v %) 之 GA 體積分別為 2、3、4 μl，Fig.4-13 (a)為分別在 3 種不同 GA 澆注體積下所製備之 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫之還原波峰電流與過氧化氫濃度之關係圖。利用 Fig. 4-13 (a)中每條直線之斜率所求得之感測靈敏度對 GA 體積作圖即為 Fig. 4-13 (b)所示。結果顯示 GA 澆注體積由 2 μl 增加到 3 μl 時，GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫之感測靈敏度由 26.07

增加到  $38.53 \mu\text{A mM}^{-1}$ ，增加的百分比達到 47.8%，推測靈敏度增加的原因為 GA 使用量增加有助於電極表面結構之穩定性。然而 GA 澆注體積增加到  $4 \mu\text{l}$  時，其靈敏度略有下降到  $32.45 \mu\text{A mM}^{-1}$ ，推測可能是使用過多的 GA 使用量造成 HRP 酵素分子內的交聯而影響了酵素的活性。GA 與酵素進行交聯反應相當複雜，反應機制目前還不是很清楚。文獻中指出 GA 在酸或鹼性的水溶液中可自行交聯形成不同型式的聚合物(Greg 1996)，如 Fig. 4-14 所示。GA 及其聚合物可與酵素分子鏈上不同形式的胺根進行交聯反應，形成不同形式的官能基，Fig. 4-15 為三種 GA 與酵素進行交聯的可能反應機制示意圖。

由 Fig. 4-13 的實驗結果可清楚的發現於本研究所使用的 GA-HRP/PANI/Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  電極上，GA 澆注體積為  $3 \mu\text{l}$  時，感測過氧化氫有最高的靈敏度。



(a)



(b)

**Fig. 4-13** 改變 GA 使用體積所製備 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫之感測電流與濃度之關係圖(a)及靈敏度與 GA 使用體積關係圖(b)

Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, [GA]: 2.5 (v/v %), sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 V ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

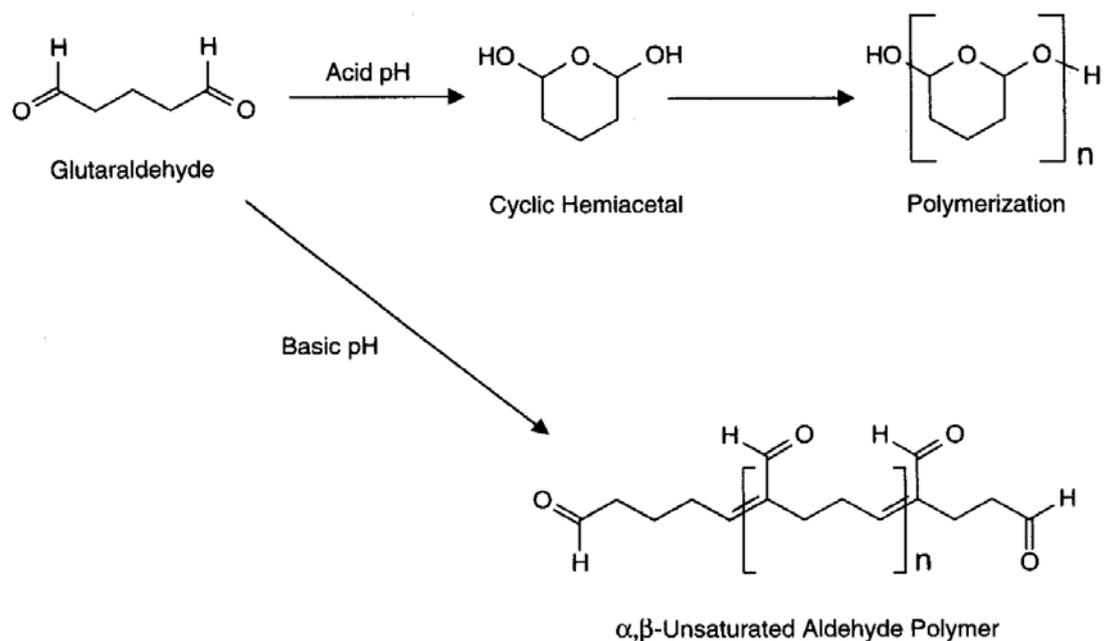


Fig. 4-14 戊二醛於水溶液中自行交聯反應示意圖 (Greg 1996)

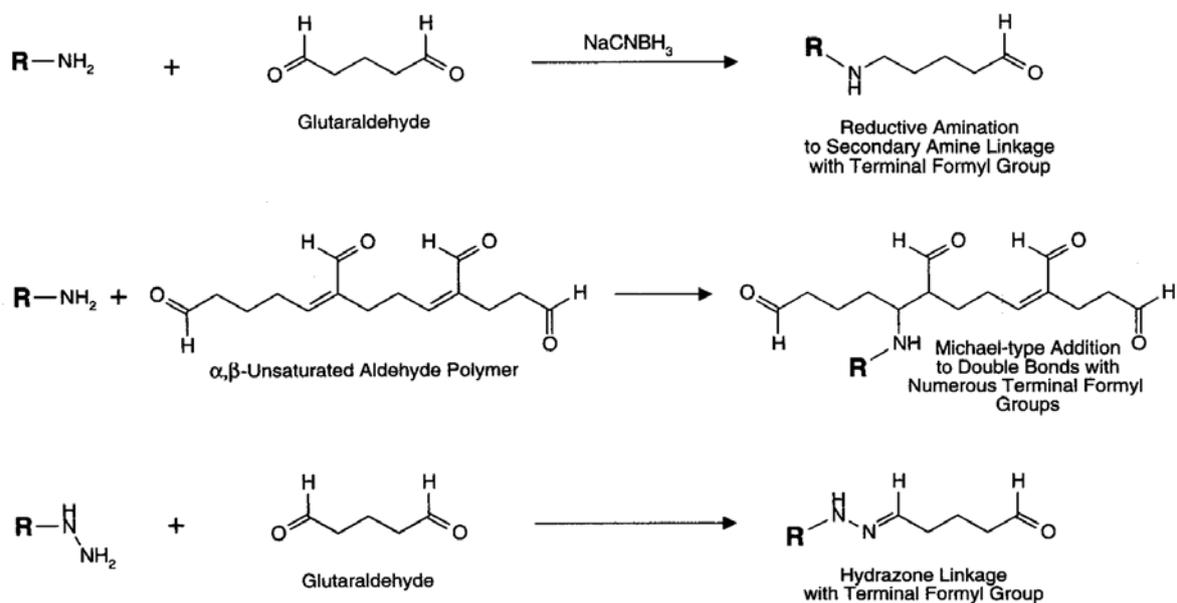
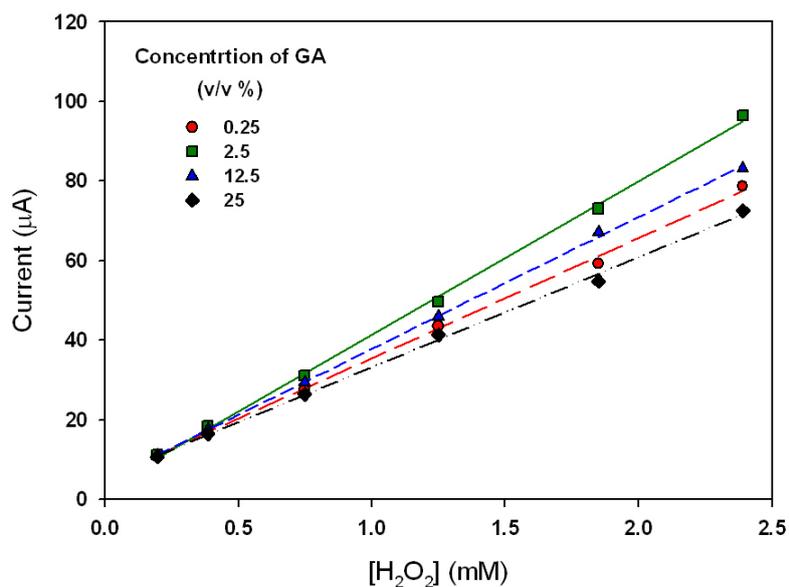
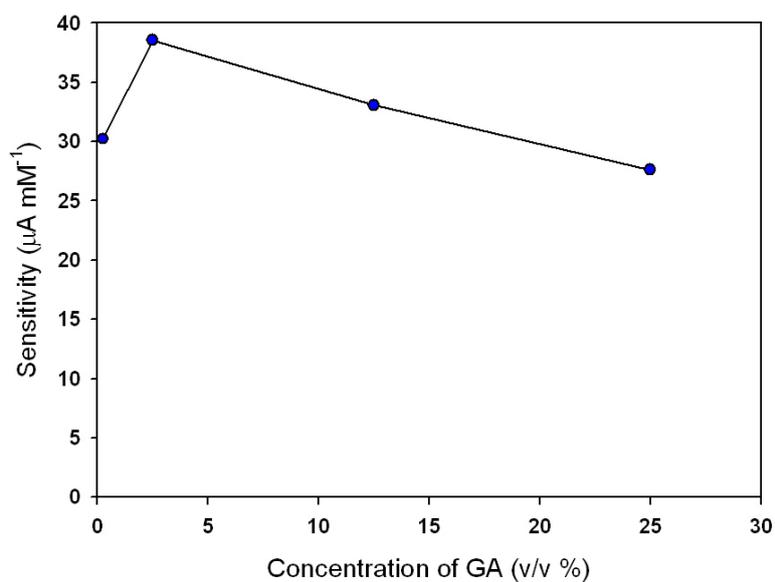


Fig. 4-15 戊二醛及其聚合物與酵素進行交聯反應之可能反應機制示意圖 (Greg 1996)

另一方面，在探討 GA 濃度對於過氧化氫感測的影響方面，於 HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上分別澆注 3 μl 濃度為 0.25、2.5、12.5 與 25 % 之 GA。Fig. 4-16(a) 為分別使用上述不同濃度 GA 所製備 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫之還原波峰電流與過氧化氫濃度之關係圖。由其感測靈敏度對 GA 濃度作圖之結果如 Fig. 4-16 (b)所示，由圖中可發現當 GA 濃度由 0.25 % 增加到 2.5 % 時，感測過氧化氫之靈敏度由 30.23 增加到 38.53 μA mM<sup>-1</sup>，增加的百分比為 27.46 %，在推測靈敏度增加的原因為 GA 使用濃度增加，對於電極表面酵素固定化的穩定性提高所致。之後，隨著 GA 濃度的增加，感測之靈敏度也隨之下降，當 GA 濃度增加到 25 (v/v %) 時，感測過氧化氫之靈敏度下降至 27.62 μA mM<sup>-1</sup>。在周筱惇的研究中也呈現相同的實驗結果，將 HRP 酵素與不同濃度之 GA 溶液混合進行交聯反應後，使用紫外光-可見光分光光度計於 410 nm 波長下量測 HRP 的活性，可發現 HRP 活性隨著 GA 的濃度增加而下降。在探討 GA 濃度對於 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測的影響部份，影響感測靈敏度的因素有兩項，一項為 GA 濃度增加有助於 HRP 固定於電極表面之穩定性，會使的感測靈敏度增加；另一項為 GA 濃度增加會造成 HRP 的活性下降，而降低感測的靈敏度，在此兩個因素的影響之下，希望藉由此部份實驗尋找 GA 最佳使用濃度。由 Fig. 4-16 的實驗結果可得知 GA 使用濃度選擇 2.5 (v/v %) 時，感測過氧化氫有最佳的感測靈敏度。



(a)



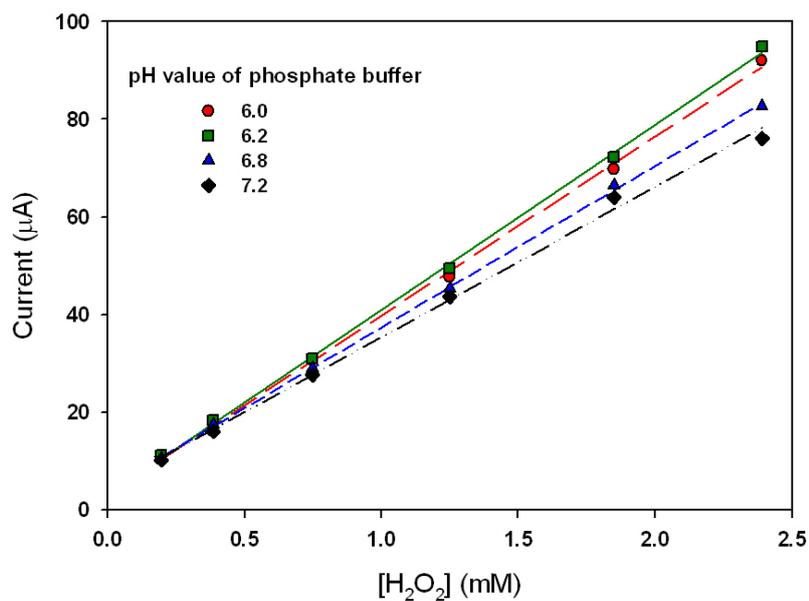
(b)

**Fig. 4-16** 改變 GA 使用濃度所製備 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫之感測電流與濃度之關係圖(a)及靈敏度與 GA 使用濃度關係圖(b)

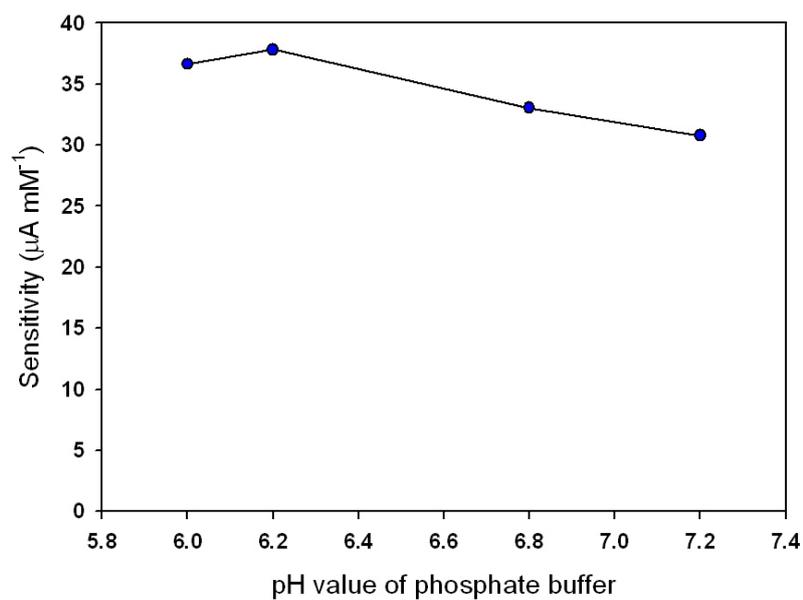
Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, GA volume: 3 μl, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 V ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C

#### 4.3.2.6 感測溶液 pH 值對於 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測之影響

在此小節中，將探討 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於不同 pH 值之 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液中進行感測之感測特性。Fig. 4-17 (a)與 Fig. 4-17 (b)分別為不同 pH 下感測之還原波峰電流值與過氧化氫濃度之關係圖，及其靈敏度對 pH 值之關係圖。由 Fig. 4-17 (b)的結果顯示，當感測溶液之 pH 由 6.0 增加到 6.2 時，其靈敏度由 36.63  $\mu\text{A mM}^{-1}$  些微增加到 37.55  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，當 pH 值增加到 7.2 時，靈敏度則下降到 30.78  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，其原因推測是因為 HRP 於 pH 6.2 時有最佳的活性，當 HRP 在較酸或較鹼的環境中皆會使其活性下降，而導致感測靈敏度下降。此感測實驗結果與 Guo 等人的研究結果相符合，其實驗顯示 HRP 酵素於 pH 值 6.2 時有最大的活性(Guo et al. 1999)。



(a)



(b)

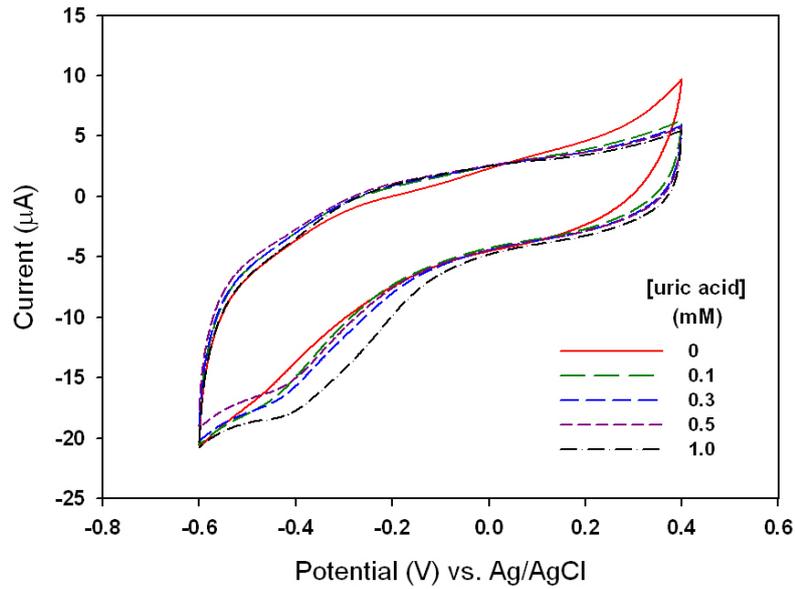
**Fig. 4-17** 使用 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於不同 pH 值下感測過氧化氫之感測電流與濃度之關係圖(a)及靈敏度與 pH 值關係圖(b)

Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 V ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

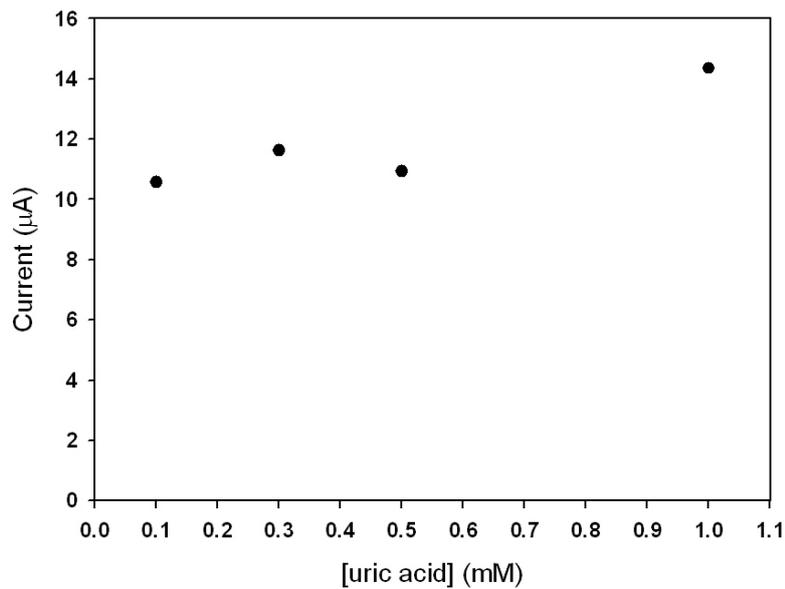
#### 4.3.2.7 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測之選擇性

尿液的組成份複雜，其中包括尿酸、尿素與維他命 C 等成份。於本小節中將探討 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極對於尿酸、尿素與維他命 C 之選擇性。首先，分別將 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極置於含有 0、0.1、0.3、0.5 與 1.0 mM 濃度之尿酸、尿素與維他命 C 中進行感測，其感測之 CV 圖如 Fig. 4-18 (a)、Fig. 4-19 (a)與 Fig. 4-20 (a)所示，再分別取圖中電位位於-0.3 V (過氧化氫在 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的還原波峰電位為-0.3 V)下之還原電流值對尿酸、尿素與維他命 C 濃度作圖如 Fig. 4-18 (b)、Fig. 4-19 (b)與 Fig. 4-20 (b)所示。

由 Fig. 4-18、Fig. 4-19 與 Fig. 4-20 實驗結果可發現，使用 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測尿酸、尿素與維他命 C 時，電壓位於-0.3 V 下之還原電流皆僅有些微的增加，以感測相同 0.5 mM 濃度為例，尿酸、尿素與維他命 C 位於-0.3 V 下的還原電流值分別為 10.94、11.67 與 12.55  $\mu$ A，相較於為未添加時之背景電流值分別增加了 0.38、1.41 與 3.79 $\mu$ A。由實驗結果可得知 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於電位-0.3 V 下對於尿酸、尿素並無顯著之還原電流產生，所測試的三種組成份只有維他命 C 於 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上有較明顯的還原電流訊號。



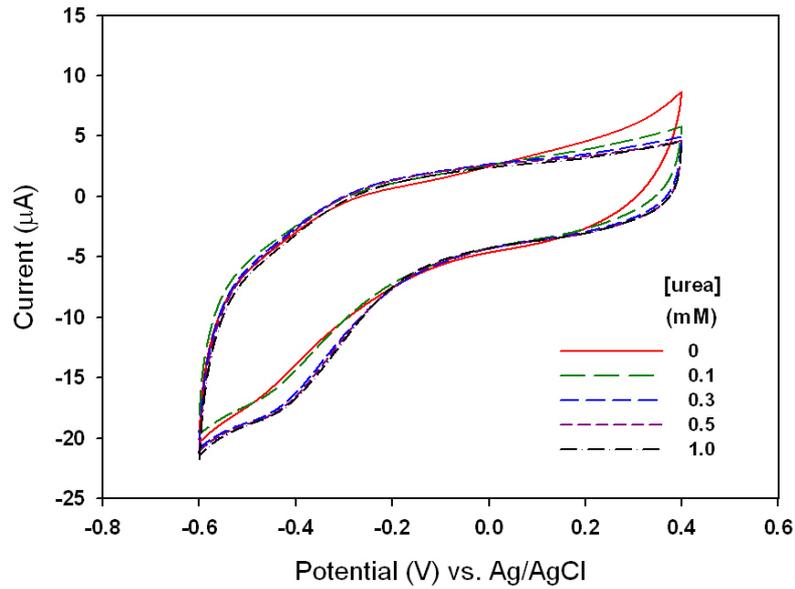
(a)



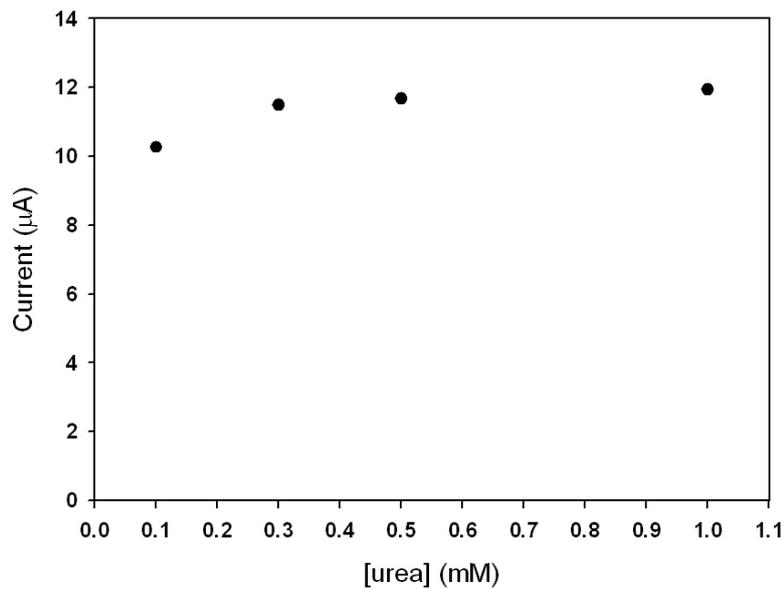
(b)

**Fig. 4-18 使用 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測尿酸之循環伏安圖 (a)及其位於-0.3 V 電位下之還原電流與尿酸濃度關係圖(b)**

Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 V ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.



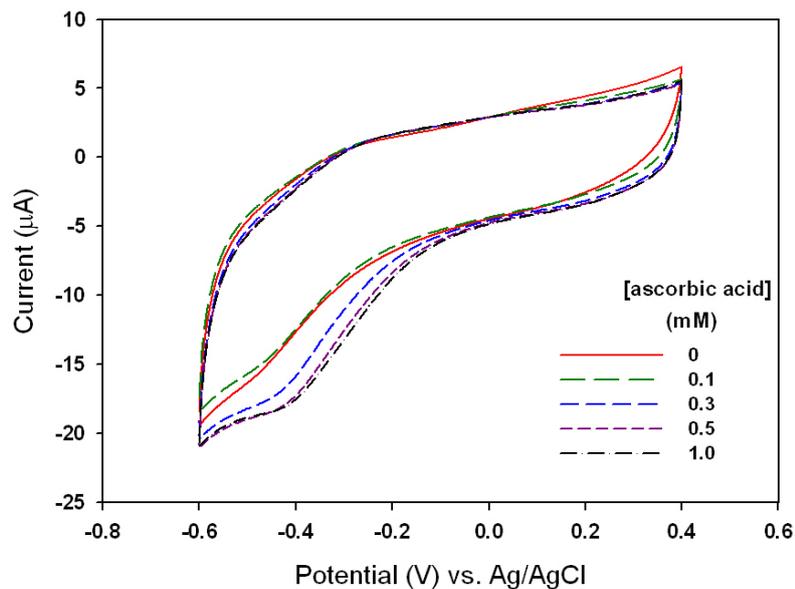
(a)



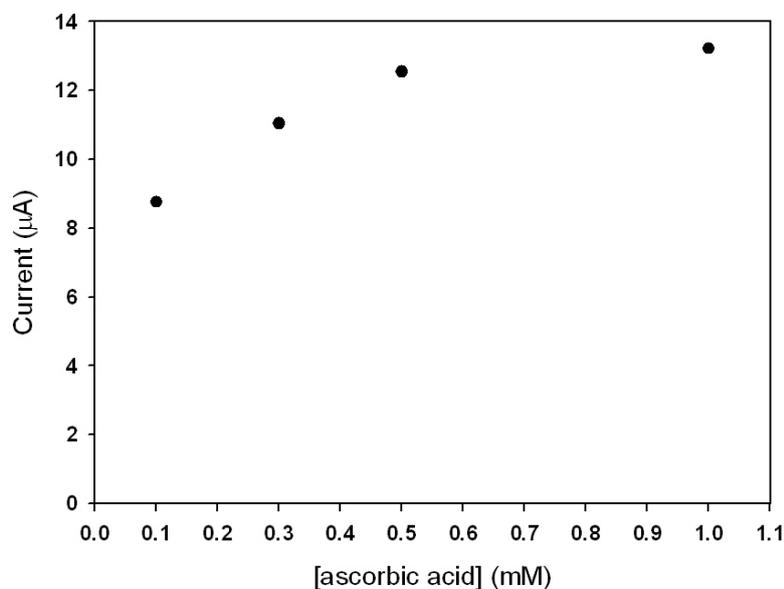
(b)

**Fig. 4-19** 使用 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測尿素之循環伏安圖(a) 及其位於-0.3 V 電位下之還原電流與尿素濃度關係圖(b)

Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 V ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.



(a)

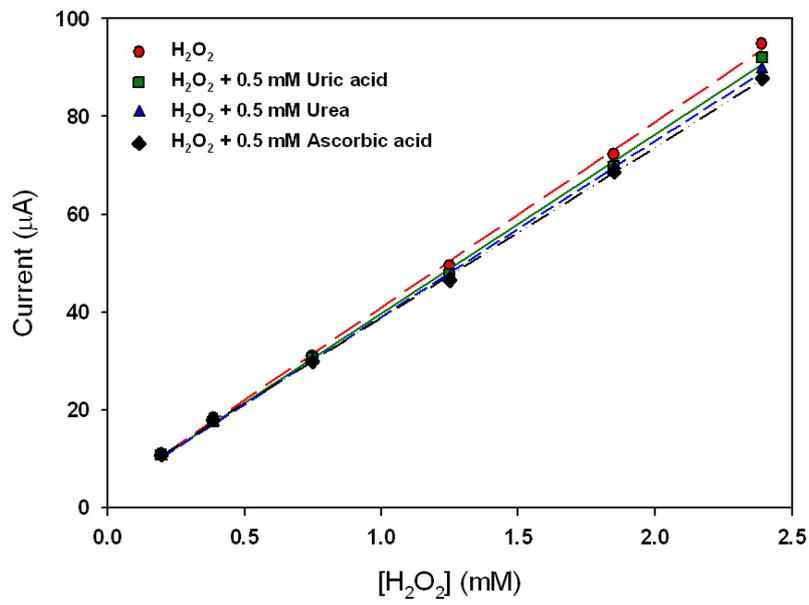


(b)

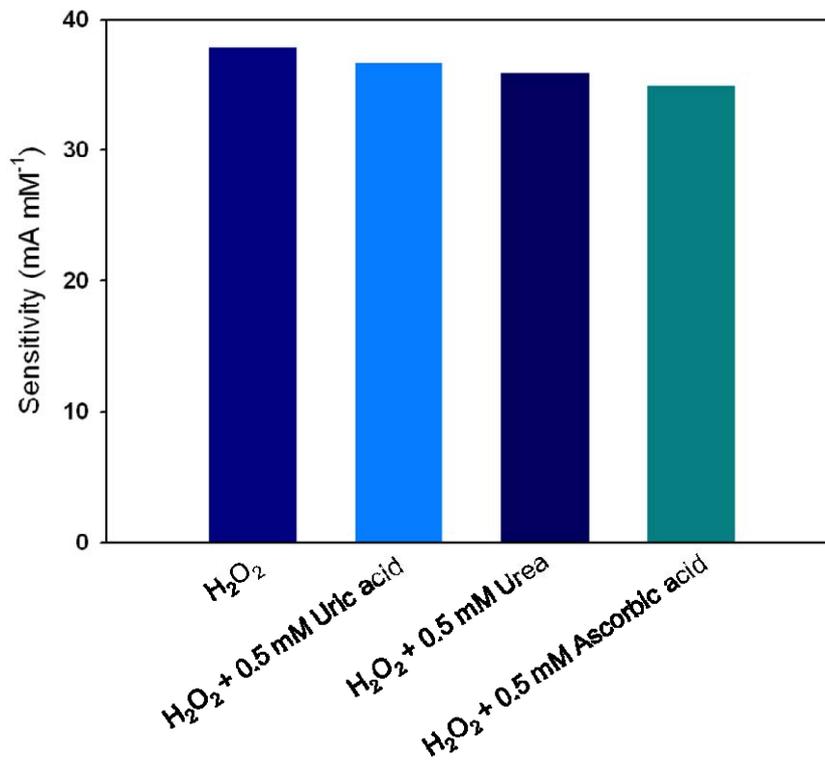
**Fig. 4-20 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測維他命 C 之循環伏安圖(a) 及其位於-0.3 V 電位下之還原電流與維他命 C 濃度關係圖(b)**

Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 V ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

選擇性探討部份，使用 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測不同濃度的過氧化氫時，分別於感測溶液中添加濃度各為 0.5 mM 之尿酸、尿素與維他命 C 的干擾影響。將其還原波峰電流對過氧化氫濃度作圖如 Fig. 4-21 (a)所示，由其實驗結果可發現當尿酸、尿素或維他命 C 的添加濃度為 0.5 mM 時對於過氧化氫感測的干擾皆不顯著。將 Fig. 4-21 (a)中每條直線之斜率所求得之感測靈敏度對不同感測添加物作圖即為 Fig. 4-21 (b)所示。結果顯示溶液中添加尿酸、尿素與維他命 C 之感測靈敏度分別為 36.63、35.91 與 34.95  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，相較於不含任何干擾物之 37.83  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，下降百分比分別為 3.17、5.08 與 7.6%，其中亦以維他命 C 的干擾影響稍大。



(a)



(b)

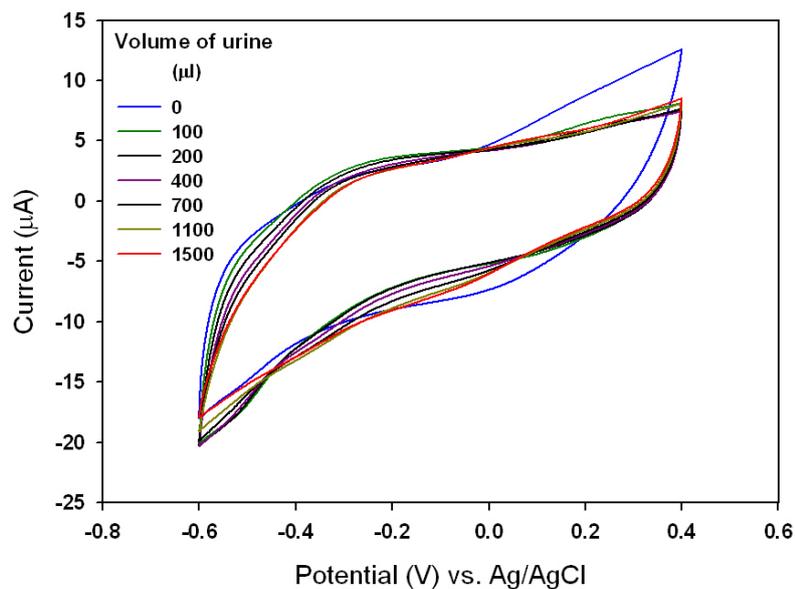
Fig. 4-21 於 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫系統中添加不同干擾物之循環伏安圖(a)及其感測靈敏度與添加干擾物關係圖(b)

#### 4.3.2.8 使用 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測尿液樣品

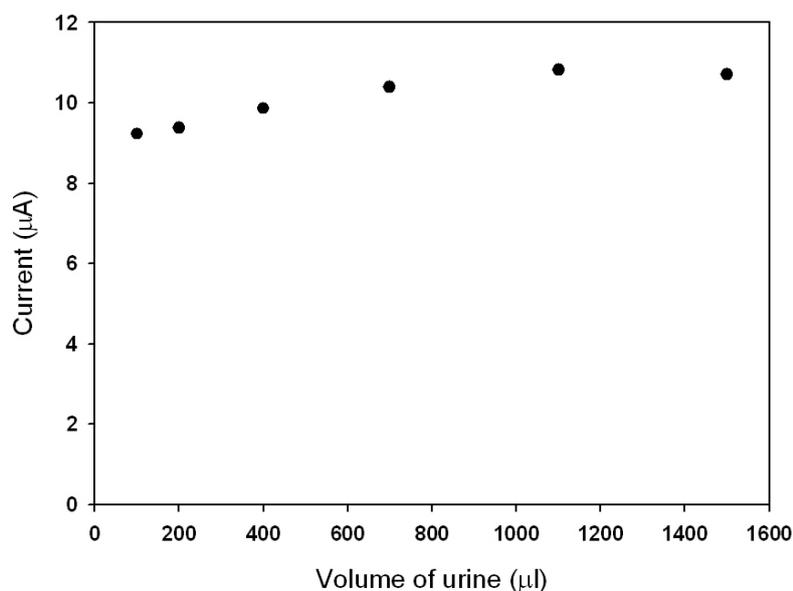
在本小節中，將探討 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液 (pH 6.2) 中添加不同人體尿液體積之感測性質。Fig. 4-22(a) 為 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測尿液之循環伏安圖，分別於 6 ml 磷酸鹽緩衝溶液 (0.1 M, pH 6.2) 中添加 100、200、400、700、1100 與 1500  $\mu$ l 之尿液溶液，再分別使用 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極進行感測，由圖中可發現還原電流值隨著尿液添加體積增加有些微的增加。取過氧化氫於 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上之還原波峰電位 -0.3 V 下的還原電流值對尿液添加體積作圖，如 Fig. 4-22(b) 所示，當尿液添加量由 100 增加到 1100  $\mu$ l 時，於 -0.3 V 下之還原電流隨之增加，推測是因為於電極上之還原物質濃度增加所導致。然而，當尿液體積增加至 1500  $\mu$ l 時，-0.3 V 處之還原電流未再增加，推測其原因為添加尿液的體積增加時，會造成溶液中電解質濃度降低，而使得感測電流減少。

雖然尿液體積增加會使得感測物濃度增加而提高其還原電流值，但同時也造成感測緩衝溶液中之電解質濃度下降，而且每次實驗所使用的尿液樣品的電解質含量與感測物濃度有所差異，故尿液樣品感測的結果也會有所差異。另外，尿液中的組成份複雜包含尿酸、尿素、維他命 C 等物質，根據 Long 等人的研究指出正常人尿液中過氧化氫濃度低於 100  $\mu$ M (Long et al. 1999)，遠低於尿酸濃度：1.0 ~ 8.9 mM 與尿素濃度：1.7 ~ 8.3 mM

(Eggenstein et al. 1999; Grases et al. 2000)，尿液中組成複雜且部份物質的濃度較過氧化氫濃度高，故於感測尿液之還原電流不確定是否為過氧化氫進行還原反應所產生。



(a)



(b)

**Fig. 4-22** 使用 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測尿液樣品之循環伏安圖(a)及其位於-0.3 V 電位下之還原電流與所添加尿液體積之關係圖(b)

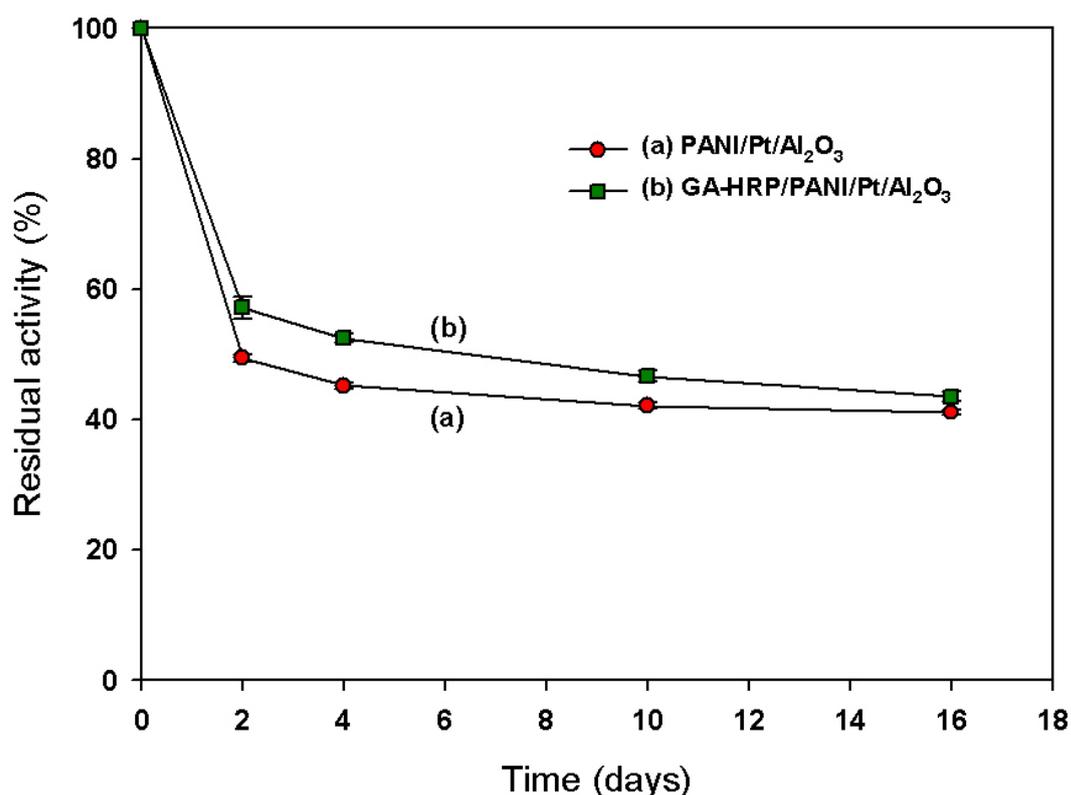
Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 V ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

#### 4.3.2.9 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之穩定性探討

分別使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，於 16 天內多次感測濃度為 1.96 mM 過氧化氫，其實驗結果如 Fig. 4-23 所示。將每次的感測電流值除以第一次感測之電流值所得的比值，定義為剩餘活性 (Residual activity)，由圖中可發現 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極在第 2 天感測之剩餘活性為 49.43 %，第 4 天感測之剩餘活性下降為 45.23 %，於第 16 天感測的剩餘活性下降至 41.13 %，如 Fig. 4-23 中之曲線(a)所示，感測電流下降的原因推測為過氧化氫破壞了 PANI 膜的結構，使得 PANI 膜的電阻增加，此結果與 Mathebe 等人的研究研究相似 (Mathebe et al. 2004)。

在 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的穩定性測試部份，由 Fig. 4-23 中之曲線(b)可看出在第 2 天進行感測時其剩餘活性為 57.17 %，第 4 天感測之剩餘活性下降為 52.5 %，於第 16 天時感測的剩餘活性下降至 43.53 %。相較於 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於第 2 天感測的剩餘活性高出 7.74 %，在 16 天感測的剩餘活性只高出 2.4 %，其原因推測為電極上之 HRP 隨著 PANI 膜結構不穩定而脫落及隨著保存天數增加而失活所造成。由實驗結果可發現電極的感測電流下降的原因主要是因為 PANI 膜的不穩定所造成。另外，電極上 HRP 酵素固定化後的活性維持亦會影響電極感測的穩定性。為了增進 PANI 膜的穩定，於後續的實驗中將添加牛血清蛋白(BSA)於 PANI 膜的聚合過程中，對於 PANI 膜進行改質

來提高膜穩定性。對於 HRP 酵素固定化後活性維持的探討，將使用中孔矽材料 SBA-15 來固定化 HRP，增加 HRP 活性之穩定性。



**Fig. 4-23 使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測 1.96 mM 過氧化氫之剩餘活性與保存天數之關係**

Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrodes, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] : 1.96 mM, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 V ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

#### 4.4 小結

1. 使用循環伏安法聚合 PANI 所製備之 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極，最佳的聚合圈數為 4 圈，GA 使用量為 3  $\mu$ l, 2.5% (v/v)，感測過氧化氫濃度線性範圍為 0.01 ~ 23.9 mM，於 pH 值下有最大感測靈敏度為 37.55  $\mu$ A mM<sup>-1</sup>。
2. 在選擇性的探討部份，以 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極感測濃度為 2.39 mM 過氧化氫時，分別於溶液中加入 0.5 mM 尿酸、尿素與維他命 C，其感測靈敏度分別下降了 3.17 %、5.08 %與 7.6 %，其中以維他命 C 的干擾較大。
3. 在穩定性測試部份，使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，歷經 16 天期間感測 1.96 mM 過氧化氫溶液 15 次，於第 16 天的感測剩餘活性百分比分別只剩下 41.13 %與 43.53 %。

## 第五章 探討添加牛血清蛋白對於聚苯胺高分子膜的影響

### 5.1 研究目的

在第四章中對於 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極的製備與對於過氧化氫感測性質探討的實驗結果顯示 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極的穩定性皆不佳，其不穩定的可能原因主要來自於 PANI 膜於過氧化氫感測過程中衰退所造成。於此章節中將對於 PANI 膜進行改質，在使用電化學循環伏安法聚合 PANI 膜時，於苯胺單體溶液中添加牛血清蛋白(BSA)，探討在 PANI 聚合過程中將 BSA 包埋於 PANI 纖維結構中，形成 PANI(BSA)複合膜的型態，提升膜結構的穩定度的可能性。

另一方面，在 Chang 與 Mahoney 的研究結果中顯示，BSA 結構中富含 30-35 個一級胺根，若添加於酵素固定化的過程中，藉由疏水性的作用力及其所帶的電荷影響下，可提升酵素固定化後的穩定性 (Chang and Mahoney 1995)。

於此章節的實驗，將製備 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極與 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極，分析 PANI(BSA)膜結構後，比較兩種電極對於過氧化氫的感測性質與電極穩定性的影響。

## 5.2 實驗方法與程序

### 5.2.1 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之製備

PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極與 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之製備程序相似，皆使用電化學循環伏安法聚合，不同之處為添加牛血清蛋白(BSA)於苯胺單體溶液中，在聚合過程中將 BSA 包埋於 PANI 膜中，製備成 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，幾何示意圖如 Fig. 5-2 所示。

#### I. 實驗裝置

製備 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之 PANI(BSA)聚合為使用三電極系統，以 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極為工作電極、Ag/AgCl(3M NaCl)為參考電極，白金絲為參考電極，實驗裝置如 Fig. 4-4 所示。

#### II. 實驗步驟

1. 將 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極置於 30 ml 含有不同 BSA 濃度之 0.1 M 苯胺單體與 1.0 M HCl 聚合液中，以 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 為工作電極，白金絲為相對電極，Ag/AgCl 為參考電極，使用循環伏安法將 PANI(BSA)膜聚合於白金表面。
2. 循環伏安法聚合 PANI(BSA)之條件：掃瞄電位範圍：0.0 ~ 1.0 V (vs. Ag/AgCl)，掃瞄速率：10 mVs<sup>-1</sup>，聚合溫度：25±0.5 °C。
3. 聚合完成後將 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極浸泡於去離子水中 6 小時後於

空氣中陰乾。

- 將 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極置於 30 ml 的磷酸鹽緩衝溶液(0.1 M, pH 4.0) 中使用定電位法先將 PANI(BSA)膜上之氯離子去摻雜，固定電位為-0.5 V 持續 20 分鐘。
- 更換 30 ml 的磷酸鹽緩衝溶液(0.1 M, pH 4.0) 中再以定電位法先將 PANI(BSA)摻雜磷酸根離子，固定電位 +0.6 V 維持 10 分鐘，即完成 PANI(BSA)/ Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極製備，並將電極保存於去離子水中。

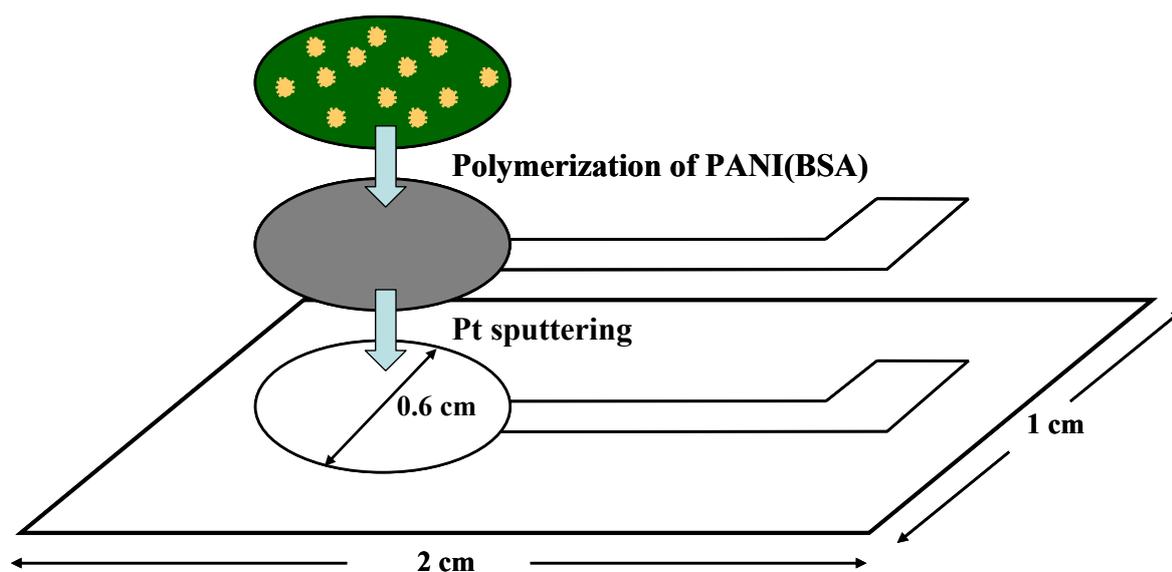


Fig. 5-1 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之幾何示意圖

### 5.2.2 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極之製備

- 取出分裝保存之 HRP 酵素，置於碎冰上解凍 1 小時，取 20  $\mu$ l 酵素溶液加入 6 ml 磷酸鹽緩衝液(0.1 M, pH 5.6)中混合均勻。

2. 以 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 當作工作電極，置入步驟 1 中含有 HRP 酵素磷酸鹽緩衝溶液中，於 25°C 的恆溫水浴中，以白金絲為相對電極，Ag/AgCl (3 M NaCl) 為參考電極，以定電位法，固定電壓為 -0.5 V，時間為 20 分鐘，將 HRP 酵素以電吸附方式固定於 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上。
3. 待酵素電吸附程序完成後，取 3 μl GA 溶液(2.5 v/v %) 澆注於已吸附 HRP 酵素之 HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極表面，並將電極置於 4 °C 的乾燥器中乾燥 24 小時，完成 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之製備，Fig. 5-2 為電極之幾何示意圖。

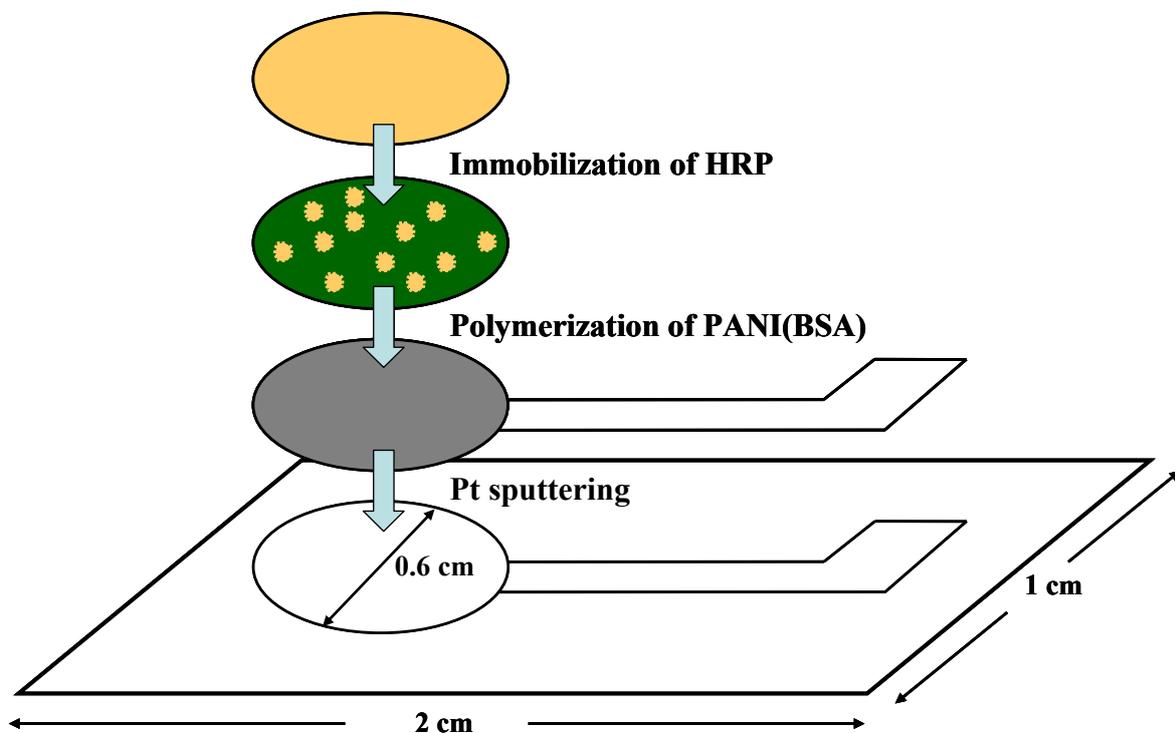


Fig. 5-2 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極之幾何示意圖

## 5.3 實驗結果與討論

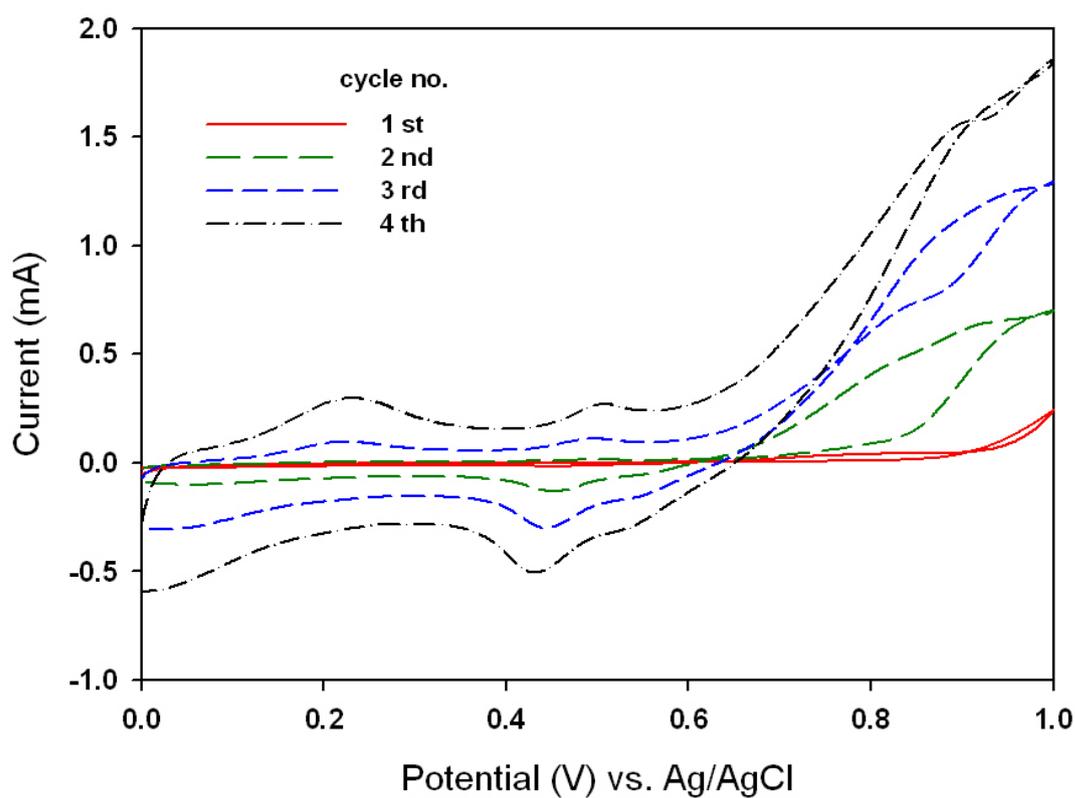
### 5.3.1 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 複合膜電極之製備與性質分析

使用戊二醛(GA)為交聯劑進行交聯反應時，其交聯反應機制為 GA 兩端的醛基分別與交聯物質的一級胺根進行交聯。然而於第四章的實驗結果中，酵素電極的製備過程使用 GA 將 HRP 酵素交聯於 PANI 高分子膜上，製備成 GA-HRP-PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測 2.39 mM 過氧化氫的還原電流只比未固定酵素之 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極提升 31.28 %，使用 HRP 酵素感測過氧化氫的效率並不理想，可能的原因為 PANI 高分子鏈之胺根型態主要為二級與三級胺根，與 GA 之醛基交聯的效率較低。

牛血清蛋白(BSA)為富含一級胺根之惰性蛋白質，於本小節中將探討於 PANI 聚合時添加 BSA 於聚合單體溶液中，製備成 PANI(BSA)複合膜的性質探討，並進一步製備成過氧化氫感測電極之感測性質分析。

### 5.3.1.1 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之製備

Fig. 5-3 為聚合 PANI(BSA)於 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之循環伏安法圖，與 Fig 4-6 之 PANI 聚合於 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之循環伏安法圖比較，可發現聚合 PANI(BSA)的過程中，位於+ 1.0 V 處之苯胺單體氧化聚合反應波峰電流比聚合 PANI 時的氧化波峰電流小，尤其是第一圈聚合之氧化波峰電流為 0.24 mA，比 PANI 聚合時之氧化波峰電流 0.58 mA 減少了 58.6%電流值。推測其原因為當聚合的苯胺單體溶液含有 BSA 時，因 BSA 之 pI 值為 4.9 (Shiomori et al. 1998)，於電解質濃度為 1.0 M 的鹽酸(pH = 0)之苯胺聚合液中呈現帶正電的狀態，當 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極處於+1.0 V 的氧化聚合電位時，因帶相同電性相互排斥會使得帶正電的 BSA 遷移遠離電極表面，遷移的效應影響了苯胺於 Pt 電極表面的成核速率，使聚合速度減慢。由圖中可發現隨著苯胺聚合圈數增加其聚合電流迅速增加，推測其原因為在聚合的過程中有部份的 BSA 被包埋於 PANI 膜中，BSA 結構鏈上與苯胺單體上之胺根皆為一級胺根(-NH<sub>2</sub>)，有部份的苯胺單體聚合於 BSA 結構上，使得聚合電流值快速增加，當 PANI(BSA)聚合到第四圈時聚合電流快速增加到 1.85 mA，接近於 PANI 聚合四圈時的 1.87 mA。



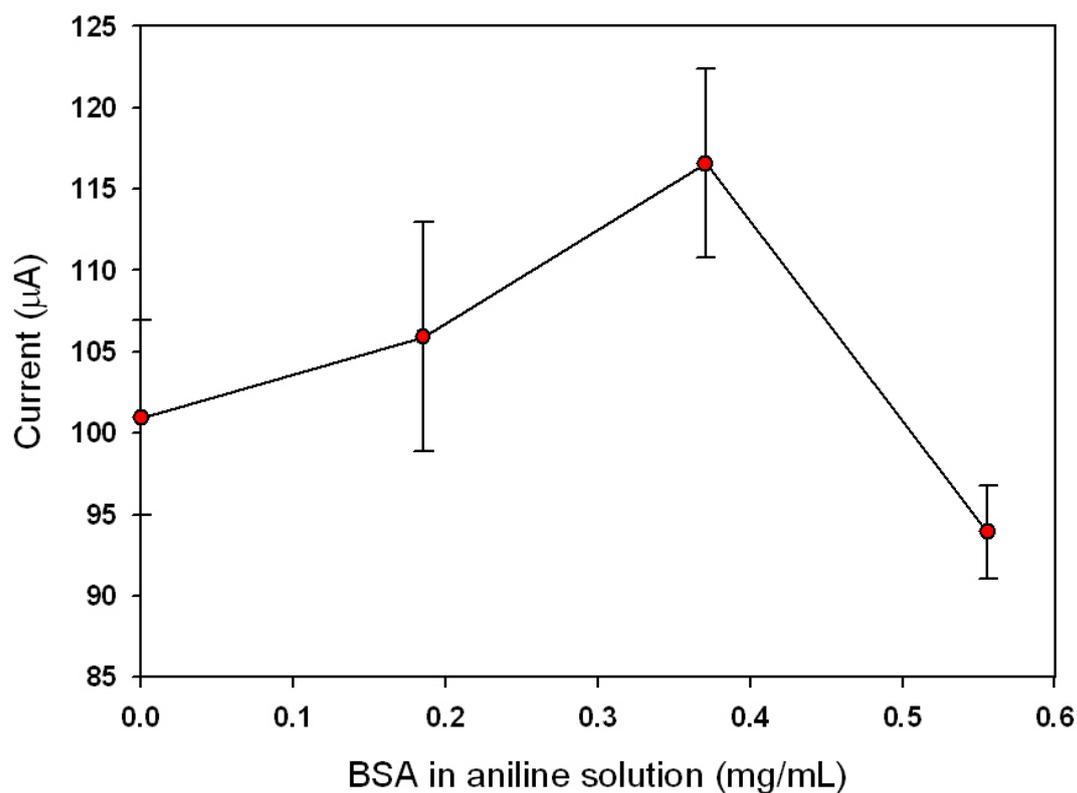
**Fig. 5-3** Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上聚合 PANI(BSA)之循環伏安圖譜

Condition for preparing PANI(BSA) film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, [BSA] = 0.37 mg/ml, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 ~ 1.0 V, temperature: 25±0.5 °C.

### 5.3.1.2 BSA 最適添加量探討

於苯胺聚合溶液中，添加適量之 BSA 進行共聚合製備 PANI(BSA)複合膜，Fig. 5-4 為使用不同 BSA 添加量進行共聚合之 PANI(BSA)複合膜所製備之 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極於含 2.39 mM 過氧化氫溶液中感測的循環伏安圖。由實驗結果可得知，BSA 於苯胺聚合溶液中最佳添加濃度為 0.37 mg/ml，此時的感測電流值相較於未添加 BSA 之電極增加 16%，推測其原因為添加適量的 BSA 對於 PANI 膜結構的穩定度有提升作用。然而，當 BSA 添加量再增加時，可能會由於 PANI(BSA)複合膜中不導電之 BSA 蛋白質含量增加使得電子傳遞阻力增加，因而感測電流降低。

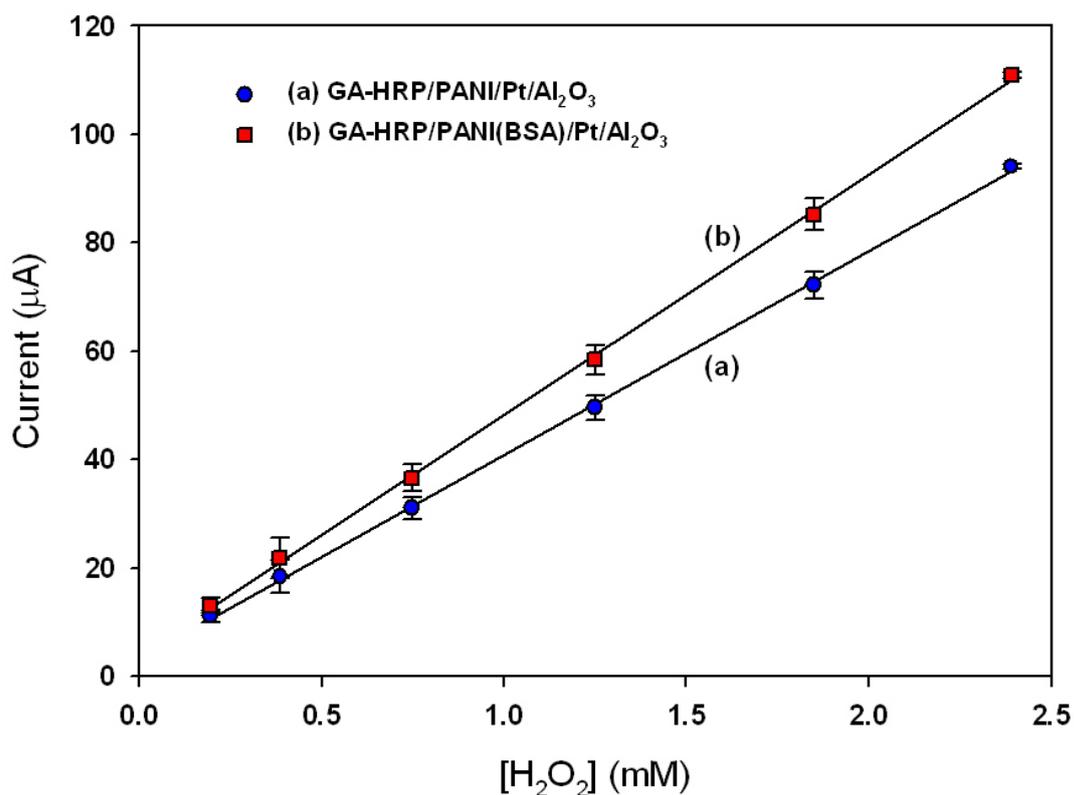
Fig. 5-5 為 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極，於不同之過氧化氫濃度中，以循環伏安法感測所得之還原波峰電流對過氧化氫濃度作圖之結果，兩酵素電極皆具有良好的感測濃度線性關係，各分別使用三片相同製備條件之電極進行感測，其相關係數( $r^2$ )皆有 0.96，含有 BSA 酵素電極的靈敏度由未含 BSA 酵素電極之 37.55  $\mu\text{A mM}^{-1}$  提升至 44.31  $\mu\text{A mM}^{-1}$ 。GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極感測過氧化氫的濃度線性範圍為 10  $\mu\text{M}$  ~ 23.9 mM；添加 BSA 於 PANI 聚合過程中所製備的 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極感測過氧化氫的濃度線性範圍增加至 10  $\mu\text{M}$  ~ 35.2 mM，如 Fig. 5-6 所示。



**Fig. 5-4 不同BSA添加量所製備的GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測2.39 mM過氧化氫之感測電流與BSA添加量關係圖**

Condition for preparing PANI(BSA) film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 ~ 1.0V, scanning number: 4, temperature: 25±0.5 °C.

Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]: 2.39 mM, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.



**Fig. 5-5** GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫之感測電流與過氧化氫濃度關係圖

Condition for preparing PANI(BSA) film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, [BSA] = 0.37 mg/ml, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 ~ 1.0V, scanning number: 4, temperature: 25±0.5 °C.

Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrodes, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

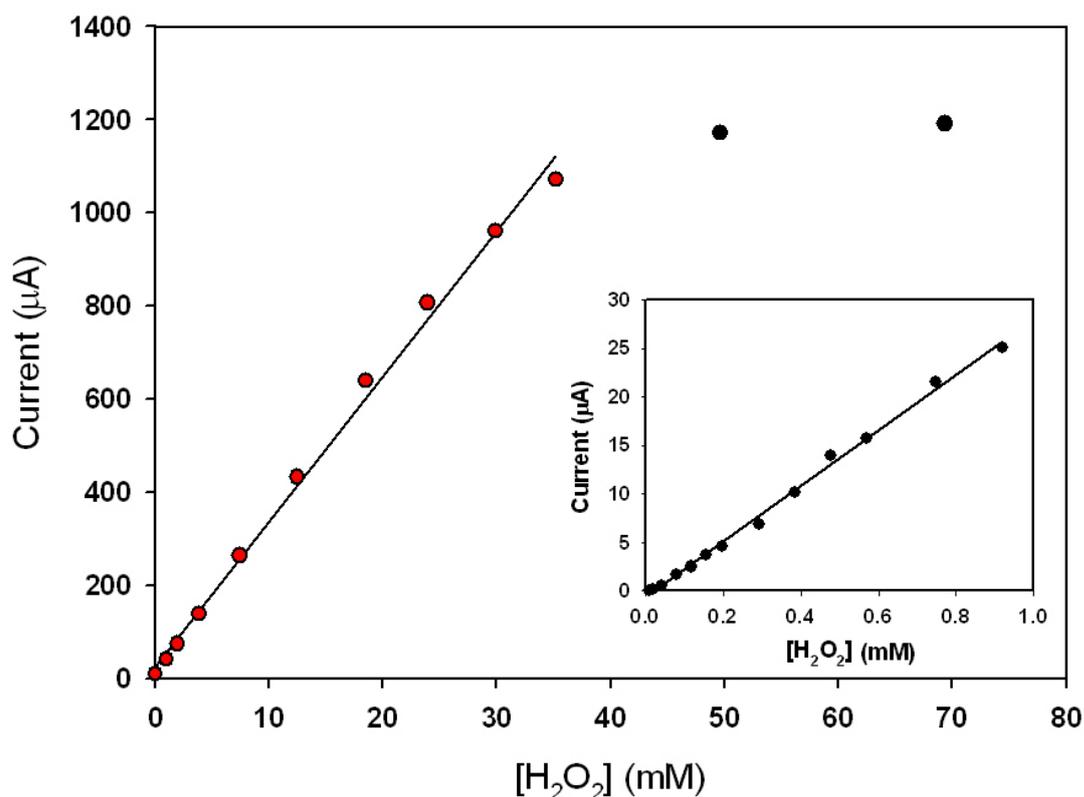


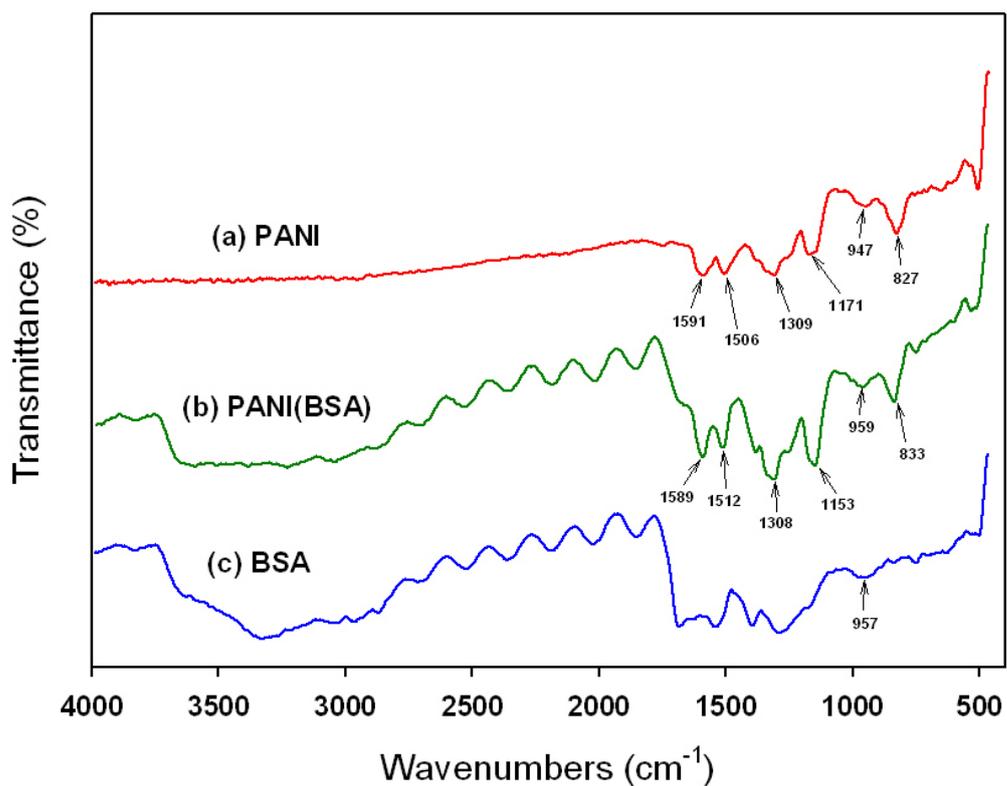
Fig. 5-6 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫之感測電流與濃度關係圖 (插圖為小於 1.0 mM 之低濃度範圍關係圖)

Condition for preparing PANI(BSA) film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 ~ 1.0V, scanning number: 4, temperature: 25±0.5 °C.

Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

### 5.3.1.3 FTIR 分析

使用 FTIR 分析 PANI、PANI(BSA)與 BSA 之化學鍵結與成份，分析結果如 Fig. 5-7 所示。由圖中可發現 PANI 膜分別在  $1591\text{ cm}^{-1}$  與  $1506\text{ cm}^{-1}$  處有 C=N 及 C=C 雙鍵之特性波峰，苯環上之 C-N 共振鍵結於  $1309\text{ cm}^{-1}$  與  $1253\text{ cm}^{-1}$  處有特性波峰，於  $1170\text{ cm}^{-1}$  與  $827\text{ cm}^{-1}$  處分別為 PANI 結構鏈上之 C-N 與 C-H 鍵結。BSA 分別於  $1684\text{ cm}^{-1}$ 、 $1539\text{ cm}^{-1}$  與  $1394\text{ cm}^{-1}$  處有特性波峰，並於  $1750\sim 2700\text{ cm}^{-1}$  處有因 BSA 結晶粉末結構所造成之繞射波峰，且於  $3000\sim 3500\text{ cm}^{-1}$  處具有蛋白質結構中之 N-H 鍵結所產生之波峰。觀察圖中 PANI(BSA)複合膜之分析結果，發現 PANI(BSA)不但具有 PANI 膜的特性波峰也同時具有 BSA 之波峰型態，並且由  $3000\sim 3500\text{ cm}^{-1}$  處吸收波峰的增加可驗證添加 BSA 於苯胺的聚合過程中增加了 PANI 膜之胺根含量。由此分析結果可確認 BSA 成功包埋於 PANI 膜結構中，形成 PANI(BSA)之複合膜型態。



**Fig. 5-7 PANI、PANI(BSA)與 BSA 之紅外線光譜**

Condition for preparing PANI(BSA) film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, [BSA] = 0.37 mg/ml, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 ~ 1.0 V, scanning number: 4, temperature: 25±0.5 °C.

### 5.3.1.4 TGA 分析

為了進一步分析 PANI(BSA)複合膜之組成，使用 TGA 分析 PANI、PANI(BSA)與 BSA 之熱裂解溫度。

Fig. 5-8 為 TGA 分析結果，圖中曲線(a)可發現 PANI 膜在溫度 100°C 以前的重量損失約為 5%，此部份為 PANI 膜中水份的重量損失，溫度於 200~250°C 的區間有 5% 的重量損失，是由於 PANI 膜中之摻雜質子酸去除所造成的重量損失(Chan et al. 1989; Neoh et al. 1990; Oh et al. 1997)，溫度於 480~600°C 的區間有 9% 的重量損失，是因 PANI 分子鏈進行熱裂解的重量損失(Lee and Char 2002; Pielichowski 1997; Wei and Hsueh 1989)。在曲線(b)的純 BSA 的分析結果，分別於 100°C 以前及 200~500°C 兩個溫度區間有主要的重量損失，100°C 以前因蛋白質中水份蒸發重量損失 10%，溫度於 200~600°C 的區間有 63% 的重量損失，是因 BSA 蛋白質熱裂解所造成的重量損失，經過 800°C 熱裂解後，剩餘重量為 19.55%，與 Tunc 等人的 TGA 分析結果顯示蛋白質經過 800°C 熱裂解後的剩餘約 20% 重量近似(Tunc et al. 2007)。圖中曲線(c)為 PANI(BSA)的分析結果，可發現其熱裂解溫度結合了 PANI 與 BSA 的結果，溫度於 480~600°C 的區間有 23% 的重量損失，相較於 PANI 分子鏈裂解的重量損失的 9% 多了 14%，推論為 BSA 於 PANI 結構中跟隨著 PANI 主鏈熱裂解所造成。

另一方面，由 Fig. 5-8 中可發現 PANI(BSA)主鏈的裂解溫度範圍略高

於 PANI 的主鏈溫度，且比純 BSA 的裂解溫度高出許多，代表 BSA 包埋於 PANI 膜中所形成的 PANI(BSA)複合膜的穩定度比 PANI 膜與純 BSA 的穩定度高。

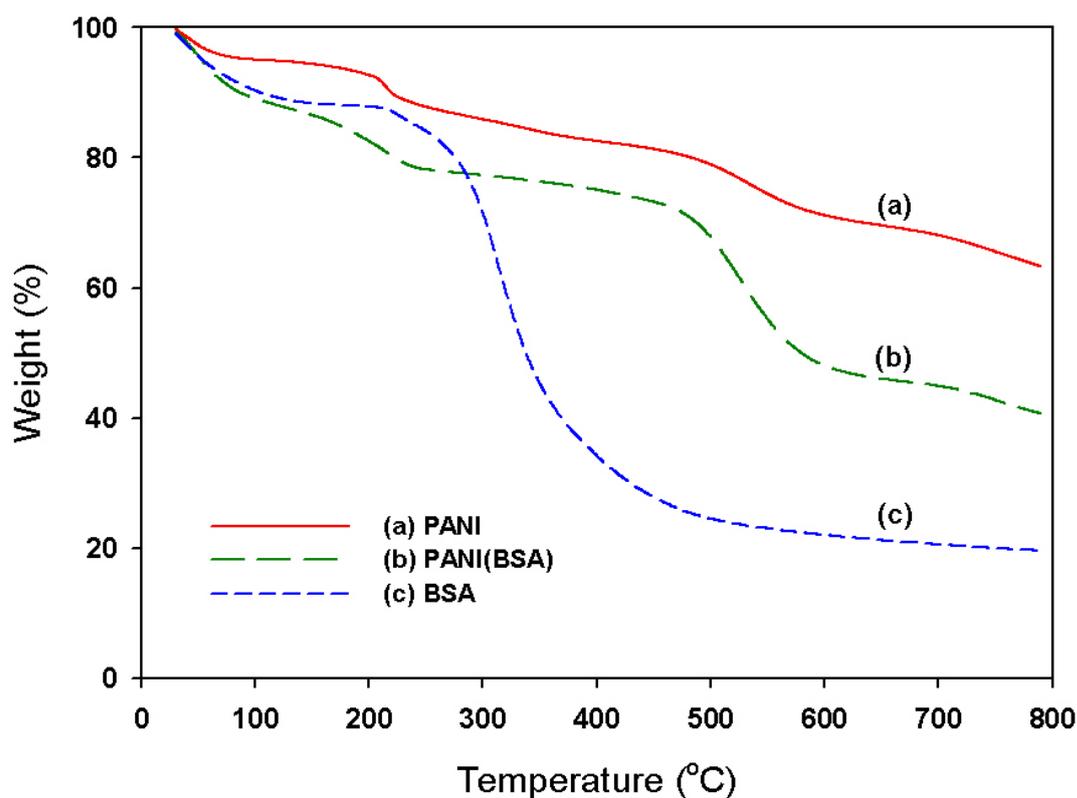


Fig. 5-8 PANI、PANI(BSA) 與 BSA 樣品之 TGA 分析圖

Condition for preparing PANI(BSA) film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, [BSA] = 0.37 mg/ml, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 ~ 1.0 V, scanning number: 4, temperature: 25±0.5 °C.

### 5.3.1.5 探討添加 BSA 所製備的電極對於過氧化氫感測穩定性的影響

文獻中指出導電性高分子聚苯胺會因受高溫或氧化作用造成主鏈上的分子鍵結斷裂，致使其導電度下降與苯胺纖維結構的破壞(Dalas et al. 2000; Vitoratos et al. 2007)。於本小節中將探討包埋BSA蛋白質後對於電極感測過氧化氫穩定性的影響。

分別製備了PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>與PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極各三片，並於17天中21次感測濃度為2.39 mM的過氧化氫溶液，其每次感測之還原波峰電流對時間作圖，如Fig. 5-9所示。將每次的感測電流值除以第一次感測之電流值所得的比值，定義為剩餘活性(Residual activity)，將各次感測之剩餘活性與保存天數作圖，如Fig. 5-10所示。由Fig. 5-9與Fig. 5-10實驗結果可發現，PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極第1天感測電流平均值為76  $\mu$ A，於隔天進行第2次感測時其感測電流平均值為43.3  $\mu$ A，剩餘活性為57.08%，經過17天的感測，剩餘活性下降至40.80%。PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極穩定性測試結果，第1天感測電流平均值為92.7  $\mu$ A，隔天第2次感測之電流平均值為84.6  $\mu$ A，剩餘活性為91.17%，經過17天的感測，剩餘活性仍保有80.15%。

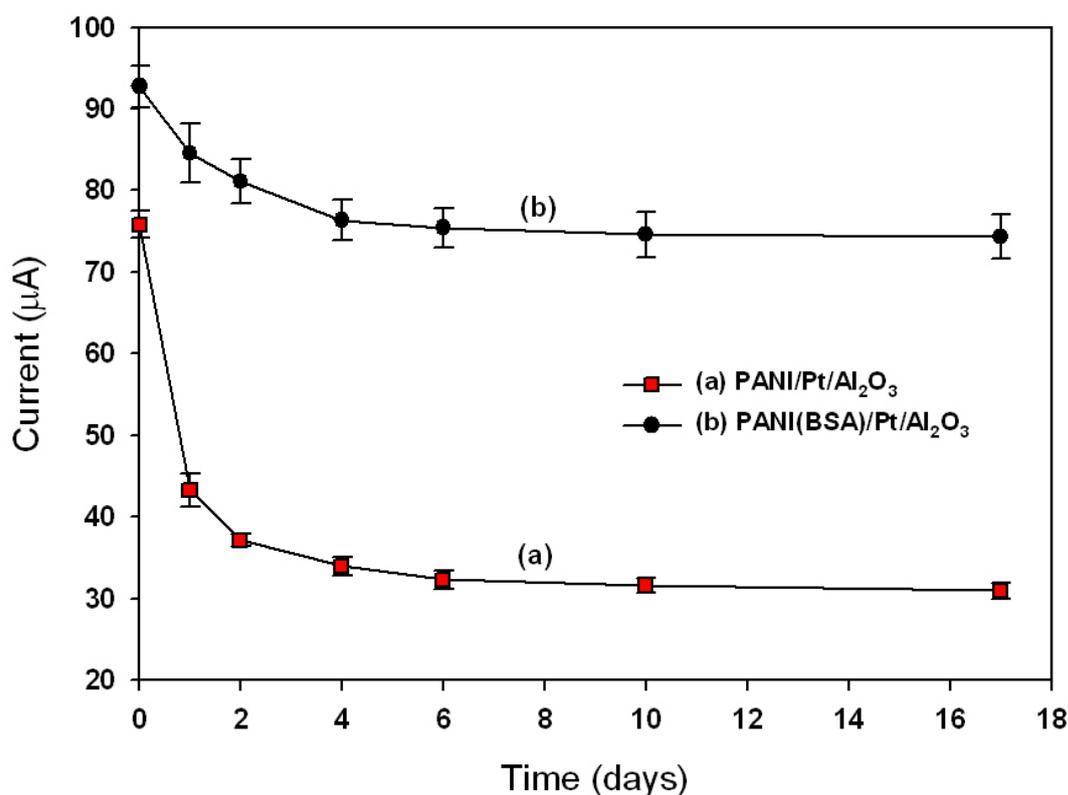
另一方面，分別將PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極與PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極之第1天、第4天與第17天感測不同濃度過氧化氫之還原波峰電流值對過氧化氫濃度作圖，如Fig. 5-11(a)與Fig. 5-12(a)所示。將Fig. 5-11(a)與Fig. 5-12(a)中各直線之斜率即為感測靈敏度對感測時間作圖，如5-11(b)與Fig. 5-12(b)所

示，由Fig. 5-11 (b)可得知PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極製備後第1天感測過氧化氫有最佳靈敏度，其值為29.12  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，於第4天感測時衰退到10.16 $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，在歷經17天多次感測後，感測靈敏度剩下9.3  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，其值只為第1天感測之31.94 %。另外，於PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極感測的部份，其第1天感測之靈敏度高達37.02  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，在第4天感測衰退到29.83  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，於第17天感測僅衰退到28.71  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，其靈敏度為第1天感測之77.55 %，如Fig. 5-12 (b)所示。由實驗結果可發現BSA包埋於PANI膜中對於膜的穩定性有很大的幫助，這與Fig. 5-8之TGA實驗結果顯示BSA包埋於PANI中，對於膜穩定度提升互相吻合。

為了觀察感測過氧化氫前後 PANI 與 PANI(BSA)結構狀態的差異，使用掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測前後表面結構型態。Fig. 5-13 (a)與(b)分別為 PANI 膜與 PANI(BSA)複合膜感測過氧化氫前的表面結構，由圖中可觀察到 PANI(BSA)複合膜較 PANI 膜密實且表面呈現若干的球狀結構，如 Fig. 5-13(b)中箭頭所指處。

於歷經 17 天 21 次感測過氧化氫後，分別再觀察這兩種電極的表面結構，Fig. 5-14 (a)與 (b)分別為 PANI 膜與 PANI(BSA)複合膜感測過氧化氫後的表面結構，由 Fig. 5-14 (a)可發現 PANI 膜於多次感測過氧化氫後，其表面纖維結構變的較感測前疏鬆，纖維結構相較於感測之前較為稀疏。然

而，由 Fig. 5-14 (b) 可觀察到多次感測過氧化氫後，PANI(BSA)膜依然保持完整，與感測前的變化不大，再次顯示 BSA 包埋於 PANI 中有助於 PANI 膜的纖維結構穩定性。



**Fig. 5-9 使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測 2.39 mM 過氧化氫之感測電流與保存天數之關係圖**

Condition for preparing PANI(BSA) film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, [BSA] = 0.37 mg/ml, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 ~ 1.0V, scanning number: 4, temperature: 25±0.5 °C.

Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrodes, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

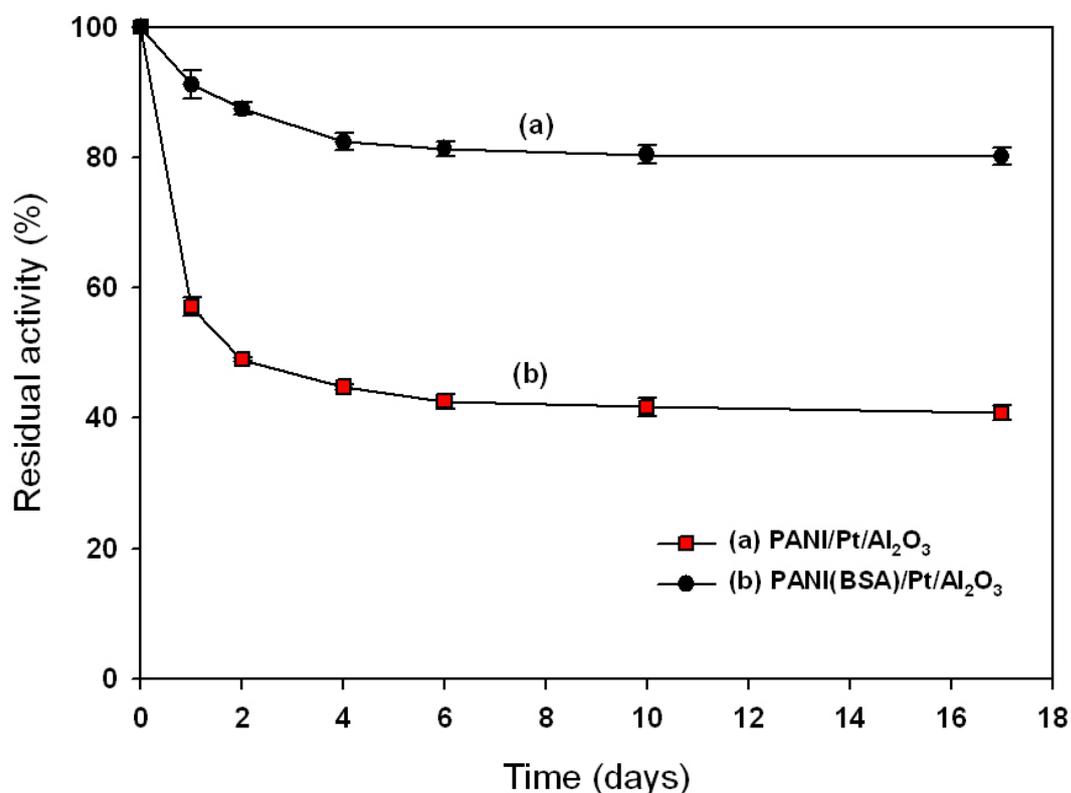
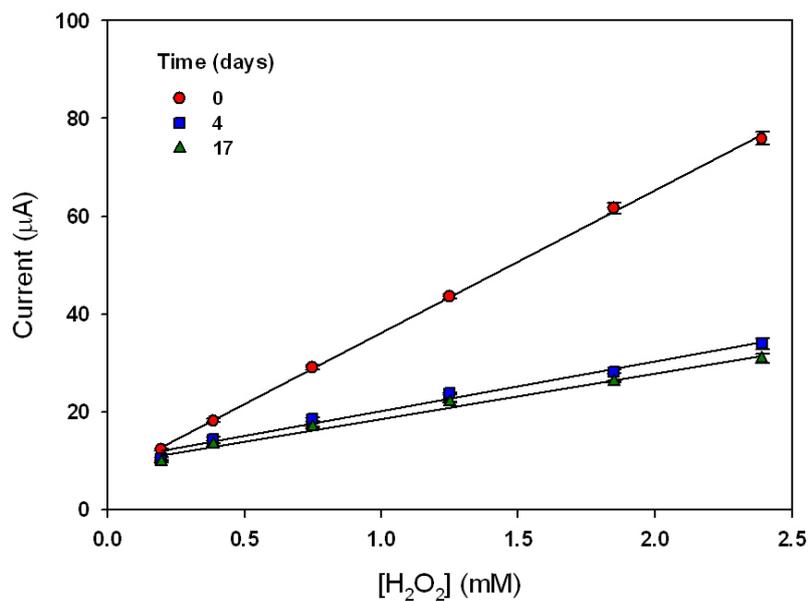


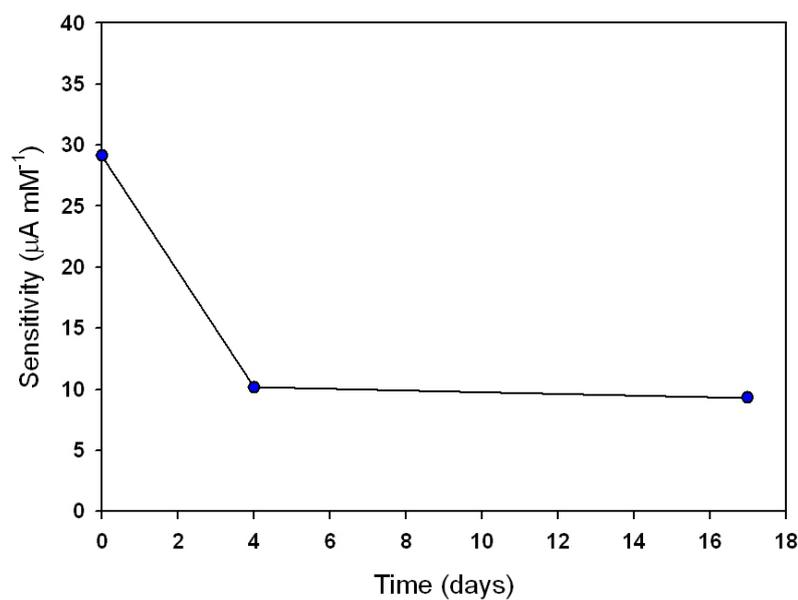
Fig. 5-10 使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測 2.39 mM 過氧化氫之剩餘活性與保存天數之關係圖

Condition for preparing PANI(BSA) film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, [BSA] = 0.37 mg/ml, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 ~ 1.0V, scanning number: 4, temperature: 25±0.5 °C.

Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrodes, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.



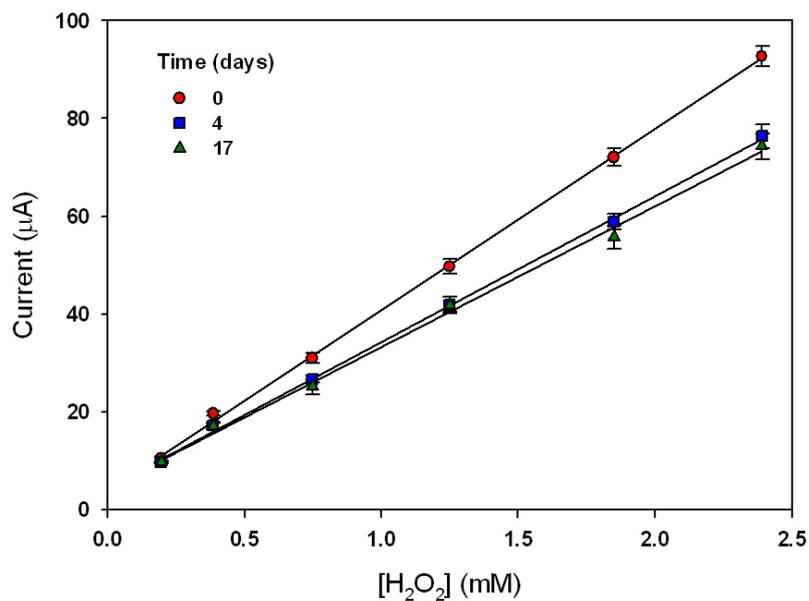
(a)



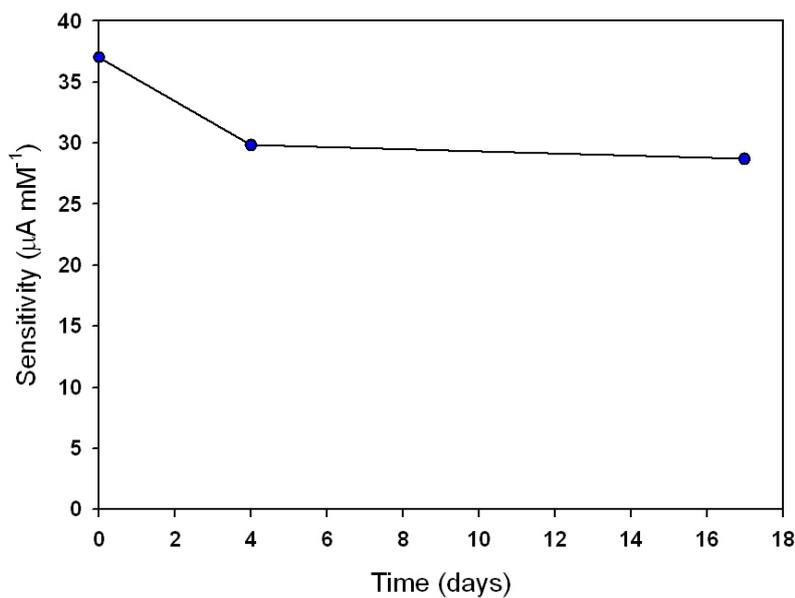
(b)

**Fig. 5-11** 使用 PANI/Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  電極於不同保存天數下感測過氧化氫之感測電流與濃度之關係圖(a)與靈敏度與保存天數關係圖(b)

Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M  $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ , electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate:  $20 \text{ mVs}^{-1}$ , sweep potential range:  $-0.6 \sim +0.4 \text{ V}$ , scanning number: 5, temperature:  $25 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



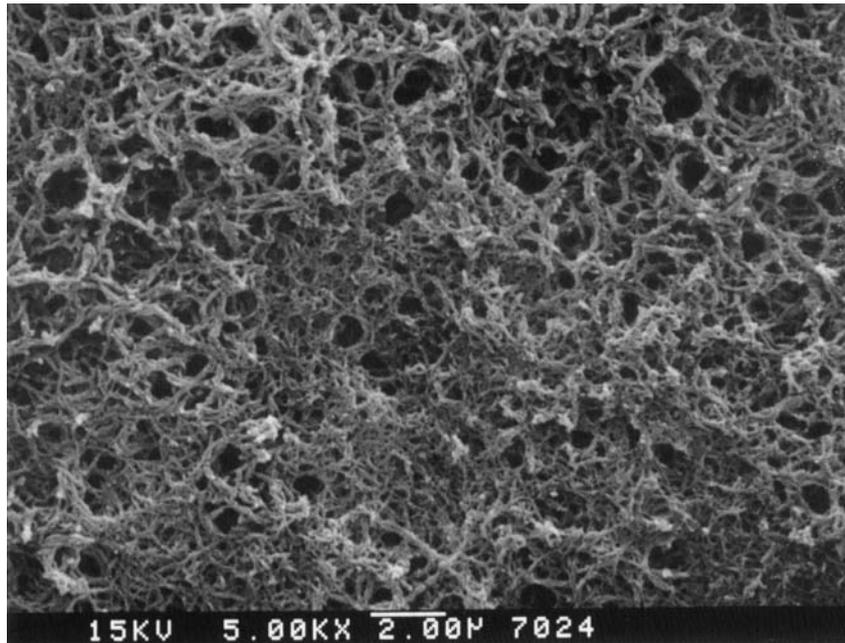
(a)



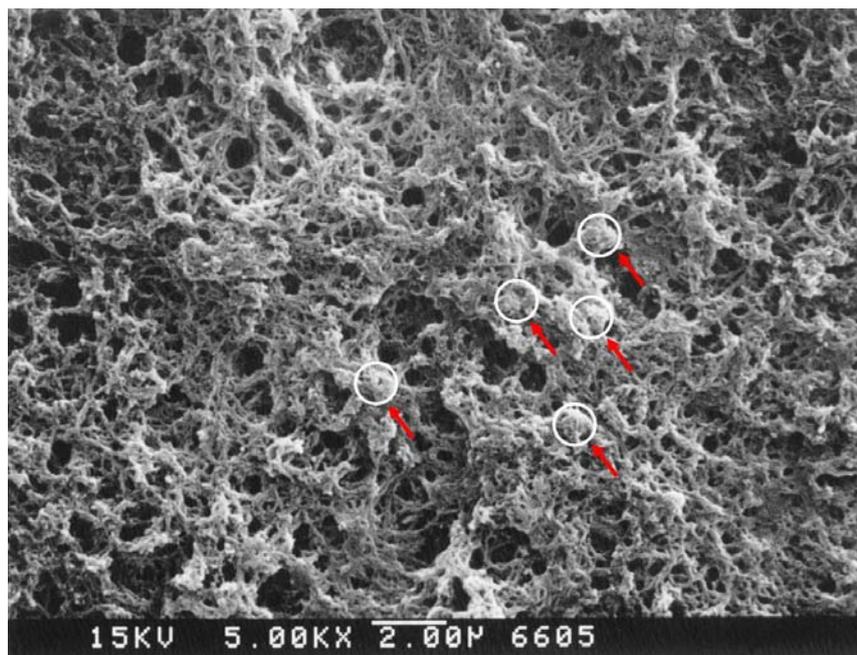
(b)

**Fig. 5-12** 使用 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於不同保存天數下感測過氧化氫之感測電流與濃度之關係圖(a)與靈敏度與保存天數關係圖(b)

Condition for sensing: W.E.: PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

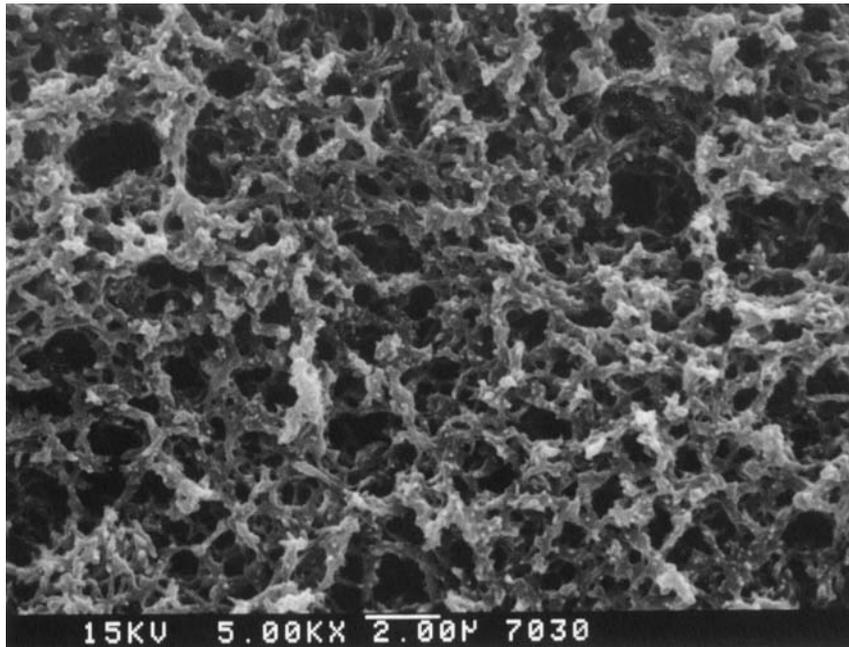


(a)

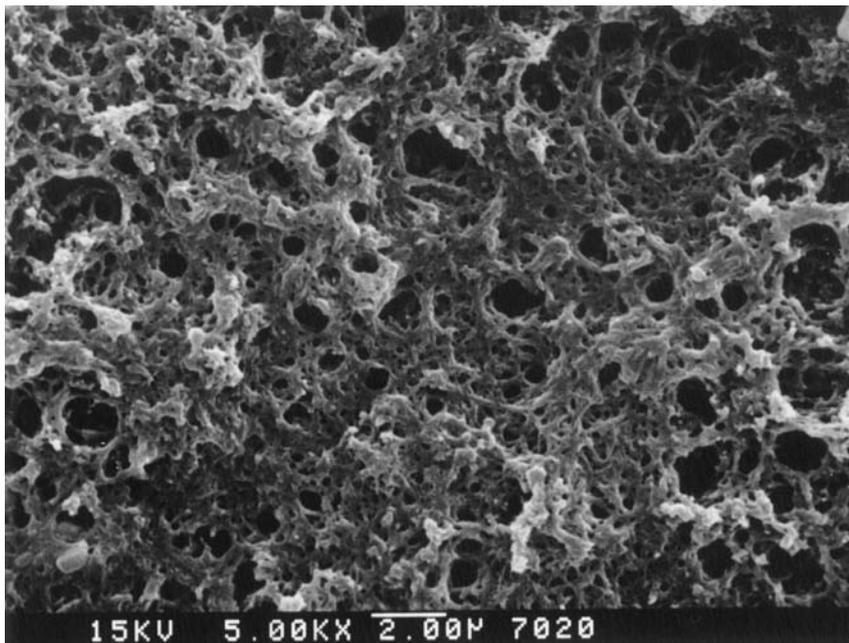


(b)

Fig. 5-13 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (a)與 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (b)電極感測過氧化氫前之 SEM 表面形態圖



(a)



(b)

Fig. 5-14 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (a)與 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (b)電極於 17 天多次感測過氧化氫後之 SEM 表面形態圖

## 5.4 小結

1. 由 FTIR 與 TGA 的分析結果驗證 BSA 成功包埋於 PANI 中，形成 PANI(BSA)複合膜型式，可提高 PANI 膜的熱穩定性，且可增加 PANI 膜中的胺根數量。
2. 添加 BSA 於 PANI 聚合過程中，製備 PANI(BSA)複合膜，BSA 最佳添加濃度為 0.37 mg/ml，使用此添加量所製備之 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極相較於 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極，感測靈敏度由 37.55  $\mu\text{A mM}^{-1}$  提升至靈敏度為 44.31  $\mu\text{A mM}^{-1}$ 。
3. 在穩定度方面測試，比較 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，歷經 17 天期間感測 2.39 mM 過氧化氫溶液 21 次，於第 17 天的感測剩餘活性百分比由 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的 40.8 % 提升至 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的 80.5 %，結果顯示添加 BSA 對於 PANI 膜的穩定度有明顯提昇。

## 第六章 中孔矽材料 SBA-15 之合成與製備為電極之感測性質分析

### 6.1 研究目的

中孔材料具有高表面積、高孔洞體積等優點，近年來有相當多的研究結果顯示將酵素固定於中孔材料中有助於酵素活性的穩定性維持(Essa et al. 2007; Kim et al. 2006)。中孔矽材料中以 SBA-15 的研究最受到矚目，由於其具有良好的水熱穩定性且其具秩序性排列的孔徑範圍(4.6 ~ 30 nm)最符合酵素固定化所須的孔洞尺寸，SBA-15 的表面化學結構如 Fig. 6-1 所示，表面具有 OH 基，等電點(pI)值為 4.0 (Essa et al. 2007)；HRP 酵素的等電點(pI)值為 7.2 (Yang and Mu 1997)，當 HRP 酵素與 SBA-15 置於 pH 值介於 4.0 ~ 7.2 之間的緩衝溶液中時，兩者會因所帶的電性相異而產生吸引力，使得酵素吸附進入 SBA-15 孔洞中。然而，影響酵素吸附量的因素包含孔洞尺寸、孔洞形狀與兩者所帶的電荷，當孔洞尺寸太小酵素無法進入，孔洞太大酵素又容易脫落。

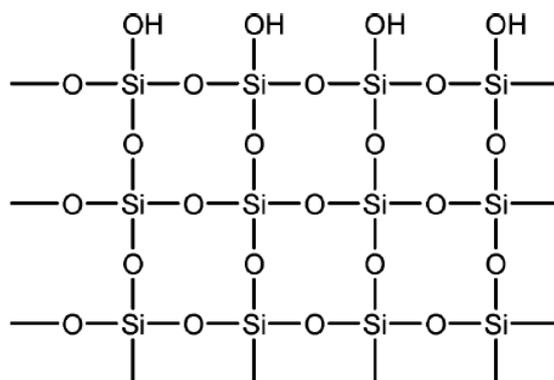


Fig. 6-1 SBA-15 表面化學結構 (Hudson et al. 2005)

在先前的緒論中曾經介紹過當酵素固定於有秩序性排列之奈米尺寸孔洞中，鄰近的酵素氧化還原活性中心可扮演電流奈米集電器 (nanocollector) 的角色，並進一步將電流傳遞到電極上 (Xiao et al. 2003)，具有加強感測訊號的功能。故於本章節中將改變 SBA-15 製備條件，合成出最適合固定 HRP 酵素之 SBA-15，並尋求較佳的 HRP 酵素固定化方式，將 HRP 酵素固定於 SBA-15 孔洞中。最後將已固定 HRP 酵素之 SBA-15 結合 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極製備成 GA-SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極探討其感測過氧化氫之感測性能。

## 6.2 實驗方法與程序

### 6.2.1 SBA-15 之合成

1. 取 2.0 g 的界面活性劑(P123) 加入 75 ml 的 1.6 M HCl中，於35°C下攪拌1小時至P123完全溶解。
2. 若製備擴孔之SBA-15，取擴孔劑三甲基苯(TMB)添加於P123溶液中(添加之TMB/P123重量百分比分別為10 % 與 20 %)，並於35°C下攪拌1小時。
3. 加入4.25 g 的TEOS，於35°C下持續攪拌 24 小時後，靜置於100 °C溫度下進行熟成反應，分別製備熟成時間為12、24、48、72小時之SBA-15，接著將熟成完成的產物使用抽氣過濾以去離子水清洗，直到濾液中無泡沫，最後將產物置入100 °C烘箱中乾燥24小時。
4. 將步驟 3 所得之產物置於高溫爐中，於空氣的環境下，升溫速率為 2 °C/min，在 600°C溫度下煅燒 2 小時，即可製得白色之 SBA-15 粉末。
5. 將各個製備條件所製得之 SBA-15 粉末以瑪瑙研鉢研磨後，置放於乾燥箱中備用。

未擴孔之 SBA-15 合成程序流程圖如 Fig. 6-2 所示，擴孔之 SBA-15 合成程序流程圖如 Fig. 6-3 所示。

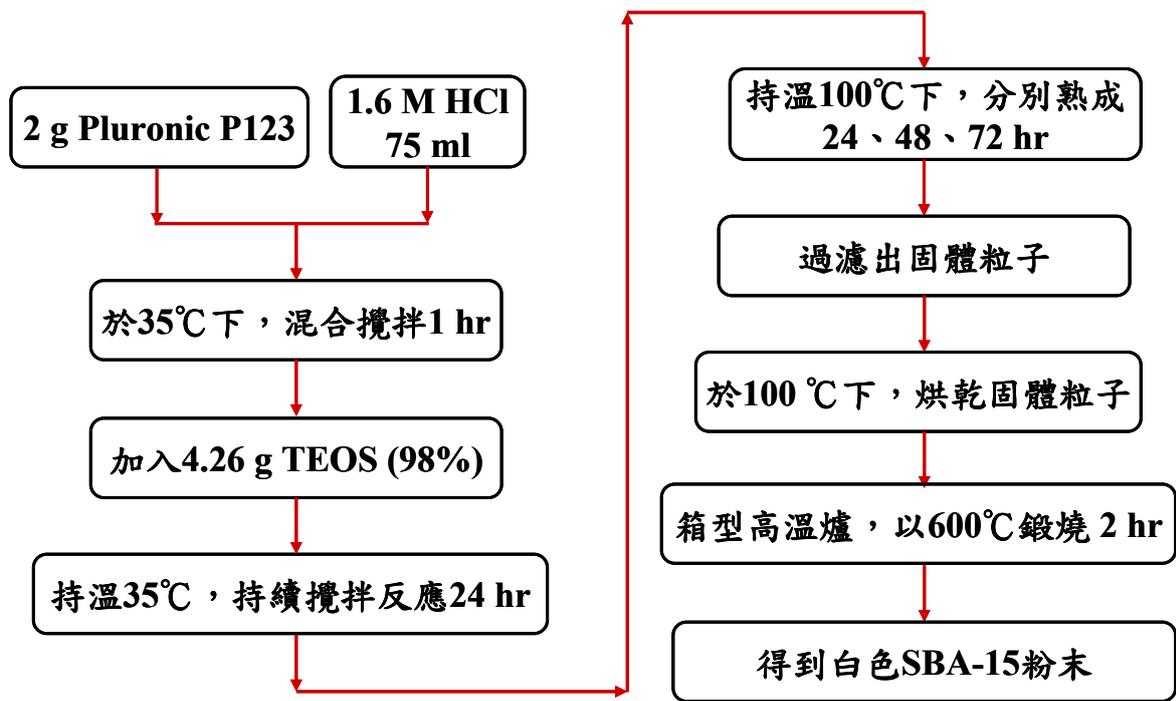


Fig. 6-2 未擴孔之 SBA-15 合成程序之流程圖

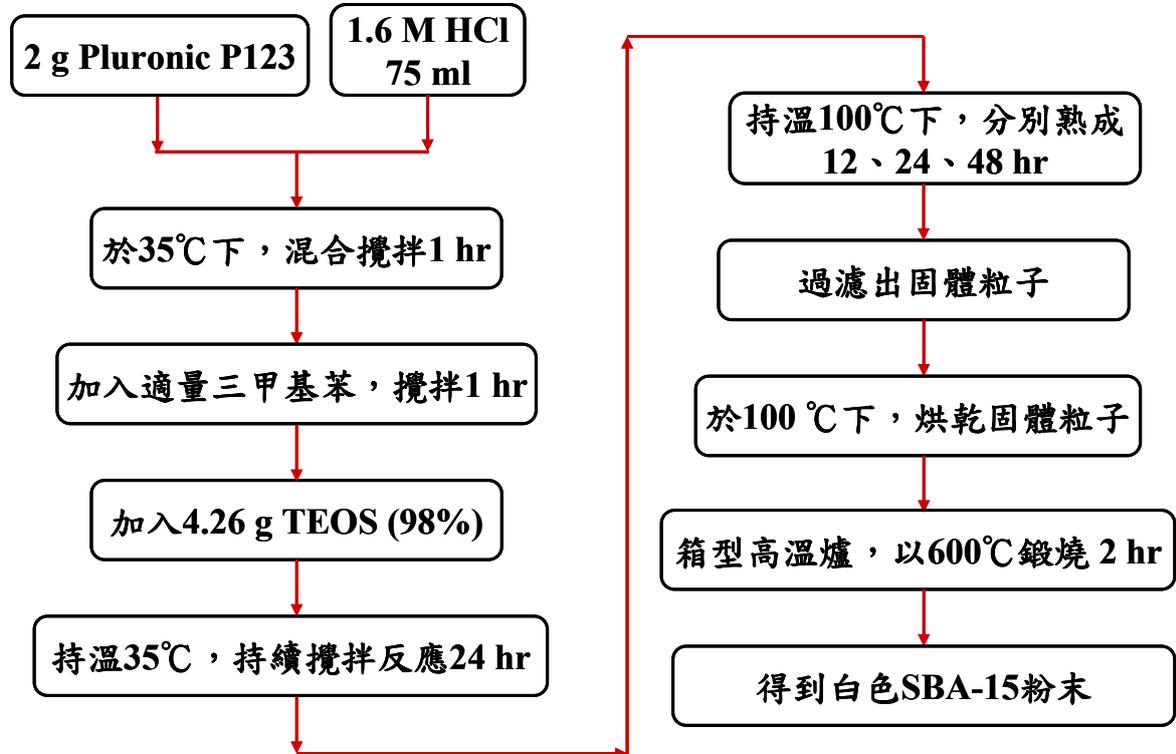


Fig. 6-3 擴孔之 SBA-15 合成程序之流程圖

## 6.2.2 以SBA-15為載體固定HRP酵素探討

### I. 探討不同含浸方法對於HRP酵素固定量的影響

本小節探討以自製之不同孔徑之 SBA-15 為酵素固定化載體，進行 HRP 酵素固定化探討。本研究中使用兩種固定化程序分別為一般含浸法 (Impregnation method) 與初濕含浸法 (Incipient Wetness Impregnation method)，比較其 HRP 酵素固定於 SBA-15 中之吸附量。

#### (A) 一般含浸法(Impregnation method)

1. 分別取出分裝保存之HRP酵素21  $\mu\text{l}$ ，置於碎冰上解凍1小時，使用0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 5.6) 稀釋到210  $\mu\text{l}$ ，混合均勻後取200  $\mu\text{l}$ 加入800  $\mu\text{l}$  磷酸鹽緩衝溶液 (0.1 M, pH 5.6) 稀釋至1000  $\mu\text{l}$ 。
2. 將上步驟之1000  $\mu\text{l}$  酵素溶液加入10 mg 之不同製備條件SBA-15 粉末中，使用Vortex震盪混合均勻後，置於4°C的環境下持續攪拌1小時。
3. 攪拌完成後於4°C下以7000 rpm 離心 5 分鐘，並分別取上層酵素溶液10  $\mu\text{l}$ 進行蛋白質定量分析。

#### (B) 初濕含浸法(Incipient Wetness Impregnation method)

1. 分別取出分裝保存之HRP酵素21  $\mu\text{l}$ ，置於碎冰上解凍1小時，使用0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液 (pH 5.6) 稀釋到210  $\mu\text{l}$ 。
2. 取上步驟之HRP酵素溶液200  $\mu\text{l}$  加入10 mg 之不同製備條件SBA-15 粉

末中，使粉末呈現濕潤狀態，使用Vortex震盪混合均勻後，置於4°C的環境下持續攪拌1小時。

3. 攪拌完成後使用 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 5.6) 稀釋到 1000  $\mu$ l，於 4°C 下以 7000 rpm 離心 5 分鐘，並分別取上層酵素溶液 10  $\mu$ l 進行蛋白質定量分析。

## II. 探討吸附時間對於HRP酵素固定量的影響

本小節中將以製備條件為擴孔劑添加比例為10%、熟成時間為48 小時之SBA-15-M1-48粉末進行探討固定化之含浸時間對於HRP酵素固定量的影響，所使用的固定化方式為初濕含浸法，實驗步驟如下：

1. 分別取出分裝保存之HRP酵素21  $\mu$ l，置於碎冰上解凍1小時，使用磷酸鹽緩衝溶液 (0.1 M, pH 5.6) 稀釋到210  $\mu$ l。
2. 各取上步驟之HRP酵素溶液200  $\mu$ l 分別加入10 mg 之SBA-15-M1-48 粉末中，使粉末呈現濕潤狀態，使用Vortex震盪混合均勻後，置於4 °C 的環境下分別持續攪拌1、4、8、16、24 小時。
3. 攪拌完成後使用磷酸鹽緩衝溶液 (0.1 M, pH 5.6) 稀釋到 1000  $\mu$ l，於 4°C 下以 7000 rpm 離心 5 分鐘，並分別取上層酵素溶液 10  $\mu$ l 進行蛋白質定量分析。

### III. 探討吸附溶液pH 值對於HRP酵素固定量的影響

本小節中亦以製備條件為擴孔劑添加比例為10%、熟成時間為48 小時之SBA-15-M1-48粉末進行探討固定化之pH 值對於HRP酵素固定量的影響，實驗步驟如下：

1. 分別取出分裝保存之HRP酵素21  $\mu\text{l}$ ，置於碎冰上解凍1小時，分別使用pH值為3.8、 4.5、 5.6、 6.2、 7.2、 8.0之0.1 M磷酸鹽緩衝溶液稀釋到210  $\mu\text{l}$ 。
2. 各取上步驟之HRP酵素溶液200  $\mu\text{l}$  分別加入10 mg 之SBA-15-M1-48 粉末中，使粉末呈現濕潤狀態，使用Vortex震盪混合均勻後，置於4°C的環境下分別持續攪拌1小時。
3. 攪拌完成後，各自使用相同 pH 值之磷酸鹽緩衝溶液稀釋到 1000  $\mu\text{l}$ ，於4°C下以 7000 rpm 離心 5 分鐘，並分別取上層酵素溶液 10  $\mu\text{l}$  進行蛋白質定量分析。

### 6.2.3 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極之製備

於先前 6.2.2 小節中所探討的HRP酵素固定於SBA-15中之較佳固定化條件，於本小節中將選擇其較佳固定化條件，將HRP固定於SBA-15-M1-48中，再結合PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極製備成GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>酵素電極，電極之製備步驟如下：

1. 分別取出分裝保存之HRP酵素21  $\mu$ l，置於碎冰上解凍1小時，使用0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 5.6) 稀釋到210  $\mu$ l。
2. 取上步驟之HRP酵素溶液200  $\mu$ l 加入10 mg 之SBA-15-M1-48 粉末中，使粉末呈現濕潤狀態，使用Vortex震盪混合均勻後，置於4°C的環境下持續混合1小時。
3. 攪拌完成後使用0.1 M磷酸鹽緩衝溶液(pH 5.6)稀釋到6 mL，混合均勻後於4°C下以7000 rpm 離心 5 分鐘，回收上層液5.5 mL (稱之為第一次清洗液)。
4. 再次加入5.5 mL 磷酸鹽緩衝溶液(0.1M, pH 5.6)於 SBA-15(HRP)中，混合均勻後，再次於4°C下以7000 rpm 離心 5 分鐘，回收上層液5.5 mL (稱之為第二次清洗液)，重複以上相同清洗程序共5次。
5. 最後，將清洗完成之SBA-15(HRP)使用0.1 M磷酸鹽緩衝溶液( pH 6.2) 稀釋到10 mL。
6. 將步驟 4.中之 SBA-15(HRP)溶液混合均勻後，取 20  $\mu$ l 澆注於製備完成

之 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極表面，置於 4°C 乾燥器中乾燥 12 小時。

7. 將 GA 溶液濃度使用去離子水稀釋為 2.5 (v/v %)，取 20  $\mu$ l 澆注於已乾燥之 SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極表面，再度放入 4°C 乾燥器中乾燥 1 天，完成 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極製備，其製備流程如 Fig. 6-4 所示。

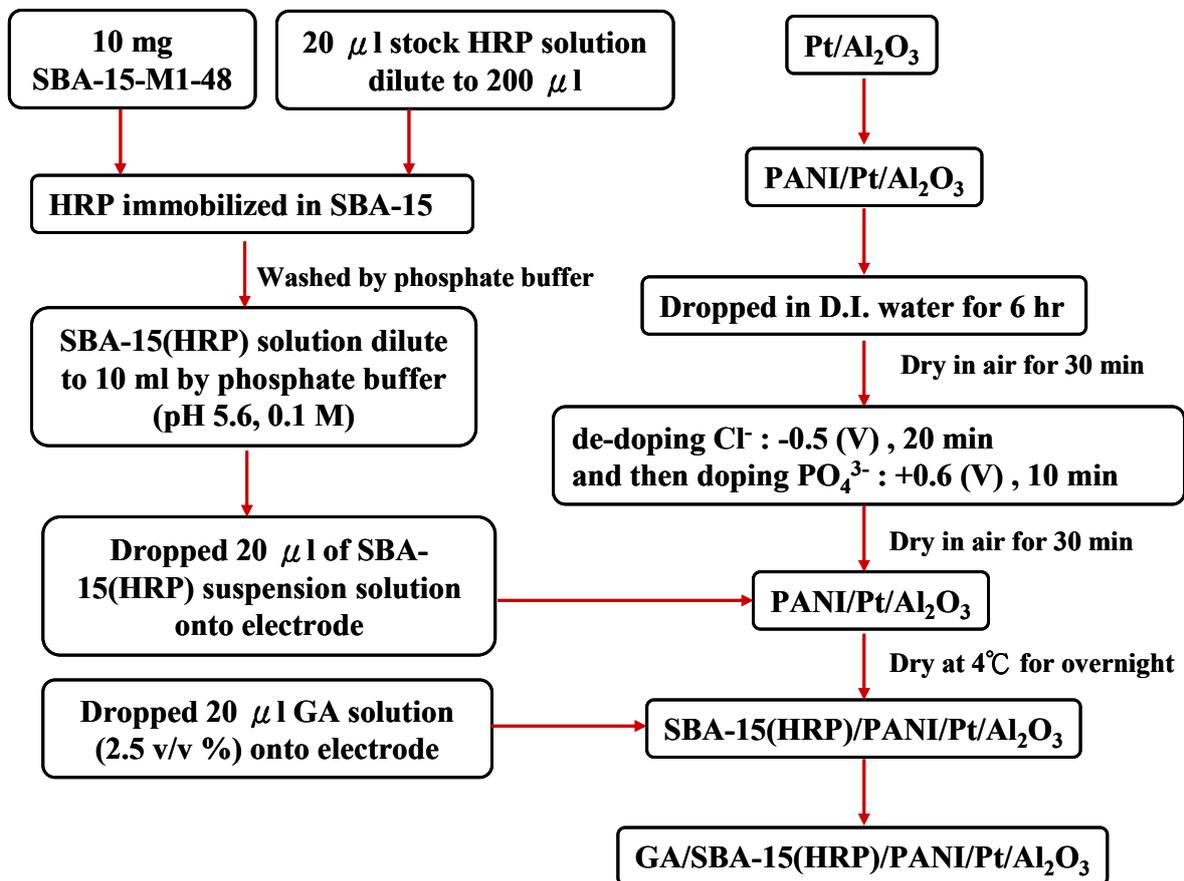


Fig. 6-4 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極製備流程圖

## 6.3 實驗結果與討論

### 6.3.1 SBA-15 之製備條件探討

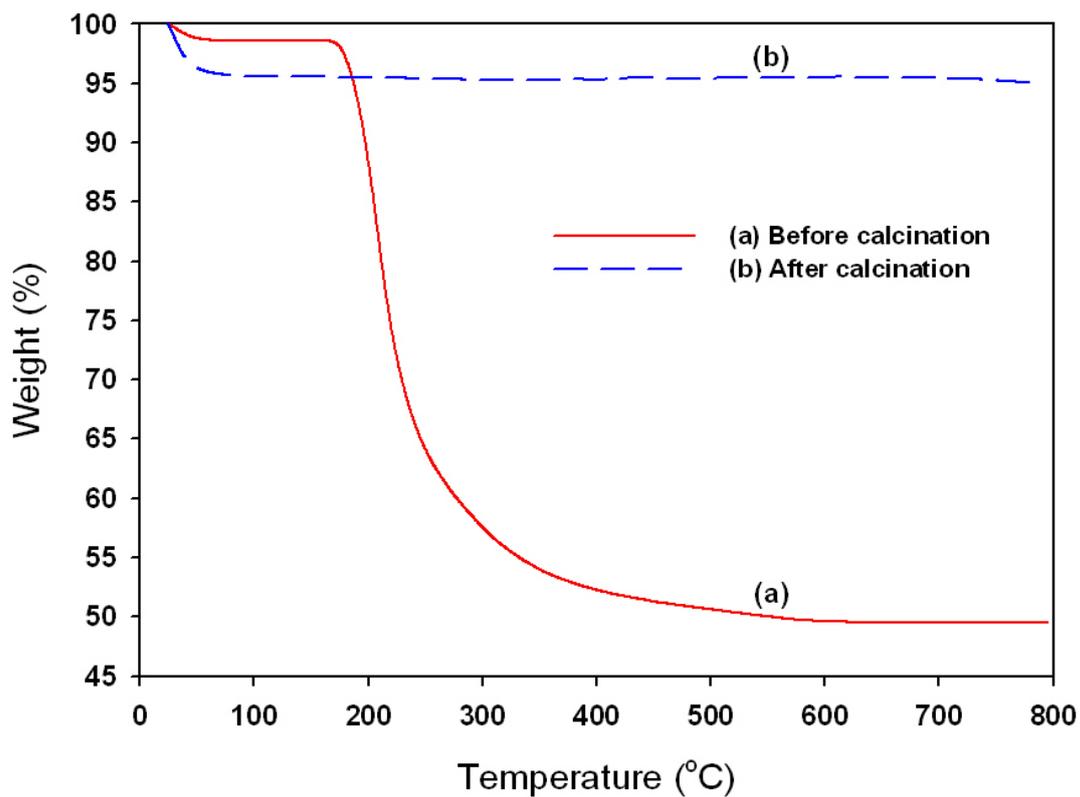
於此章節中將探討 SBA-15 合成條件，為了合成出最適合固定 HRP 之 SBA-15 孔徑，於合成過程中改變了熟成時間與添加不同濃度之擴孔劑。改變熟成時間部份，分別合成出熟成時間為 12、24、48、72 小時之 SBA-15，並分別將樣品命名為 SBA-15-12, SBA-15-24, SBA-15-48, SBA-15-72。改變合成過程擴孔劑三甲基苯添加濃度部份，分別合成出三甲基苯添加量為介面活性劑(P123)含量的 10 wt%與 20 wt%，熟成時間為 48 小時之 SBA-15 粉末，並將樣品命名為 SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M2-48。

分別使用 SEM 與 TEM 觀察 SBA-15 外觀型態與孔徑大小，以 BET 及 XRD 分析其孔徑結構與物理性質，再將不同合成條件之 SBA-15 進行酵素固定效率比較。

### 6.3.1.1 TGA 分析

首先為了確認製備程序中，使用 600°C 煅燒 2 小時的煅燒條件，是否可將模板去除乾淨，於是將煅燒前與煅燒後的 SBA-15-48 樣品進行 TGA 分析測試。

Fig. 6-5 為 SBA-15-48 的 TGA 分析結果，曲線(a)為煅燒前的樣品，曲線(b)為煅燒後的樣品。由圖可知，煅燒前的樣品在溫度 100°C 以前的重量損失為 1.5 %，此部份為水樣品中含水份的重量損失，溫度在 175 ~ 325°C 的區間有 43 % 的重量損失，此部份是由於界面活性劑及 SBA-15-48 孔洞表面的 Si-OH 官能基彼此縮合水解的重量損失部份。而煅燒後的樣品在溫度 100°C 以前的重量損失約為 4%，溫度在 175 ~ 325°C 的區間則完全沒有重量損失。經由 TGA 的分析結果可得知，使用 600°C 煅燒 2 小時可將 SBA-15 合成時所使用的界面活性劑模板完全去除。



**Fig. 6-5 SBA-15-48 煅燒前後之 TGA 分析圖**

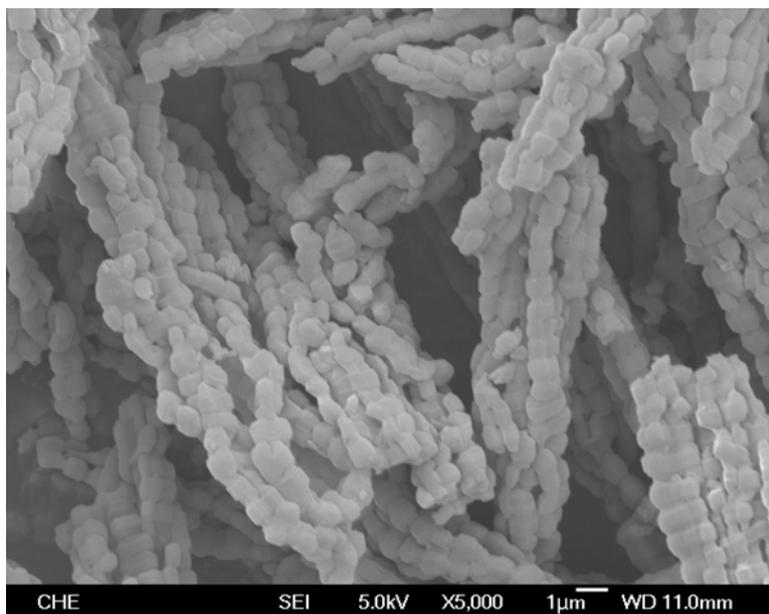
Condition for preparing SBA-15-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 48 hr, aged temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

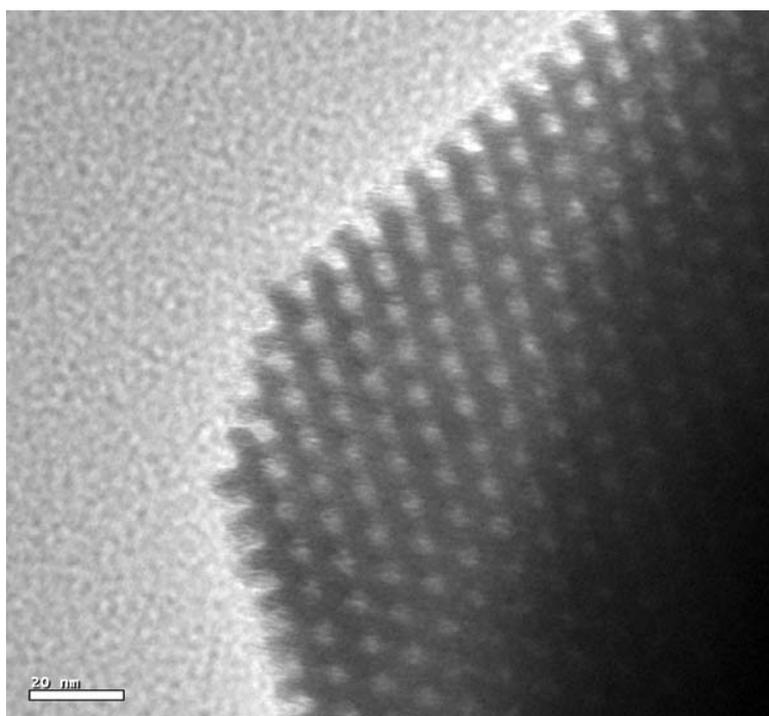
### 6.3.1.2 SEM 與 TEM 分析

將不同擴孔劑三甲基苯添加量所製備之 SBA-15 樣品分別使用 SEM 及 TEM 觀察其粉末外觀型態與孔徑大小變化。Fig. 6-6(a)為未擴孔之 SBA-15-48 樣品 SEM 圖，外觀呈現六角柱狀顆粒堆疊型態，Fig. 6-7(a)與 Fig. 6-8(a)分別為擴孔後之 SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M2-48 之 SEM 分析圖，擴孔劑添加量為 20 wt% 之 SBA-15-M2-48 外觀型態由未擴孔前的短柱狀轉變成球狀型態，單一顆粒尺寸由擴孔前的  $1\mu\text{m}$ ，擴孔後增加為約  $5\mu\text{m}$ ，擴孔劑添加量為 10 wt% 之 SBA-15-M1-48 之外觀較不規則，表面呈凹陷狀，介於 SBA-15-48 與 SBA-15-M2-48 兩者間之過渡型態。

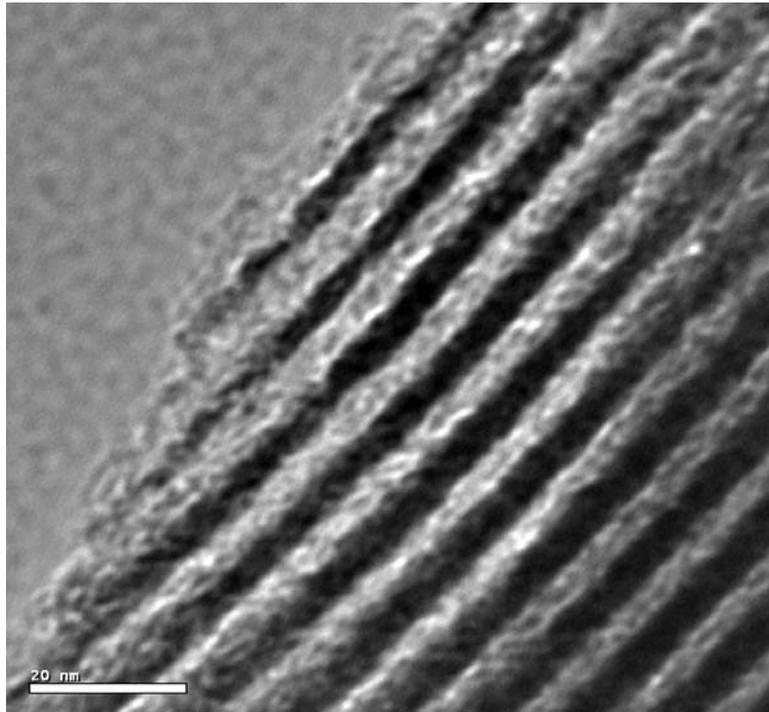
Fig. 6-6(b)、Fig. 6-7(b)與 Fig. 6-8(b)分別為 SBA-15-48、SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M2-48 之 TEM 圖。由圖中觀察可發現，SBA-15-48 與 SBA-15-M1-48 的孔洞結構仍然維持完整狀態，然而 SBA-15-M2-48 的孔壁變的不明顯，孔洞與孔洞之間形成相通的狀態，擴孔前之 SBA-15-48 之孔徑大小約為 7 nm，孔壁厚度約為 4 nm。擴孔後之 SBA-15-M1-48 之孔徑大小約為 9 nm，孔壁厚度約為 4 nm，進一步擴孔之 SBA-15-M2-48 之孔徑大小增加至約 15 nm，孔壁厚度縮小至約 0~3 nm。另外，由 Fig. 6-6(c)與 Fig. 6-7(c)為不同角度下所照的 TEM 圖，可明顯觀察到 SBA-15-48 與 SBA-15-M1-48 的晶格參數  $a_0$  (兩孔洞中心之間的距離)約分別為 12 與 14 nm，而 SBA-15-M2-48 樣品於 TEM 觀察下，未找到相同狀態的圖像。



**(a)**



**(b)**

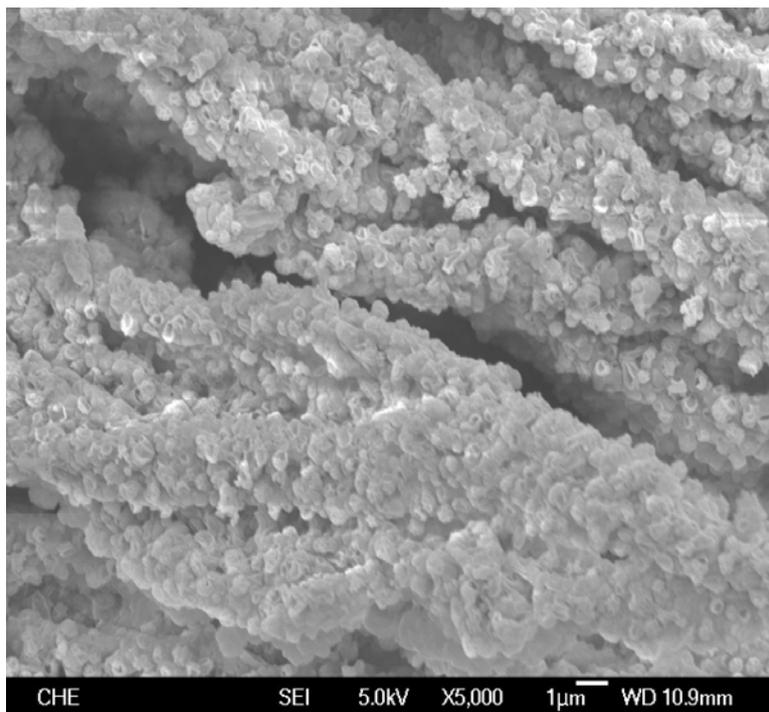


(c)

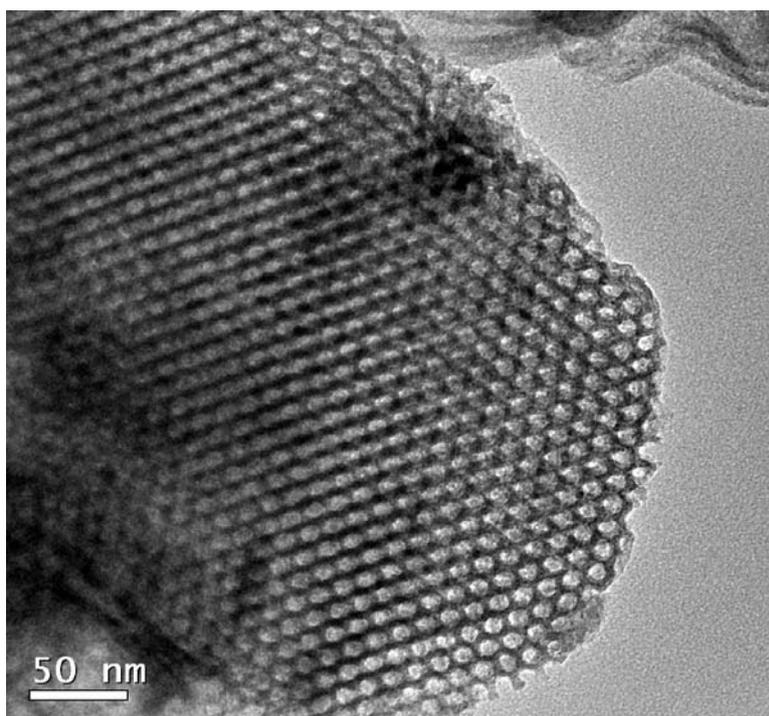
**Fig. 6-6 SBA-15-48 之 SEM 與 TEM 分析圖 (a) SEM, (b)與(c) TEM**

Condition for preparing SBA-15-48 :

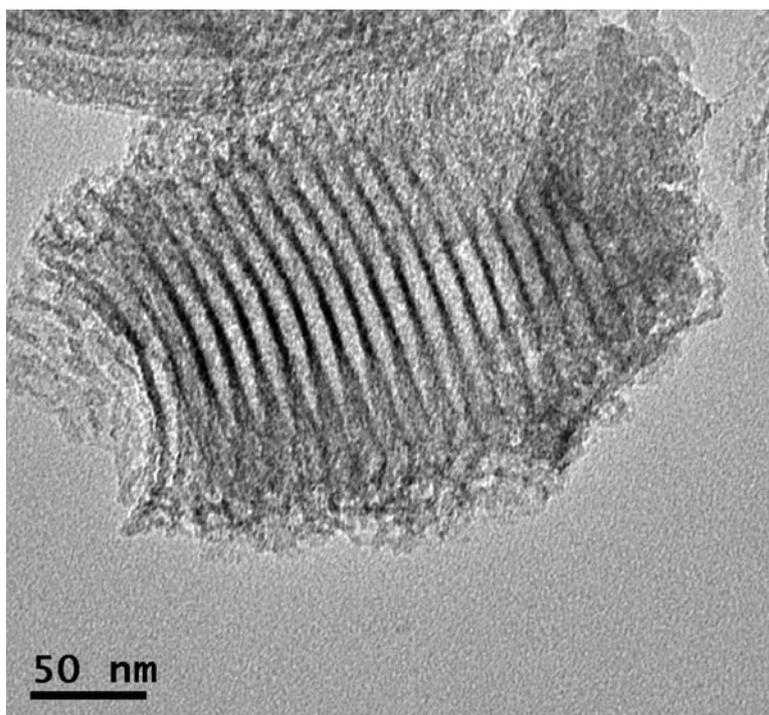
P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr,  
reacted temperature : 35 °C, aged time : 48 hr, aged temperature : 100 °C, calcined  
temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.



(a)



(b)

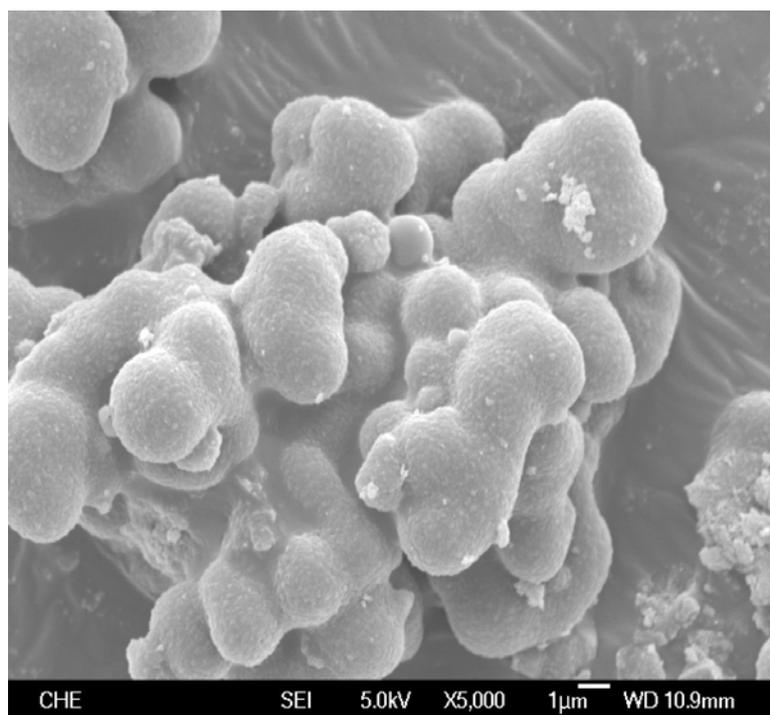


(c)

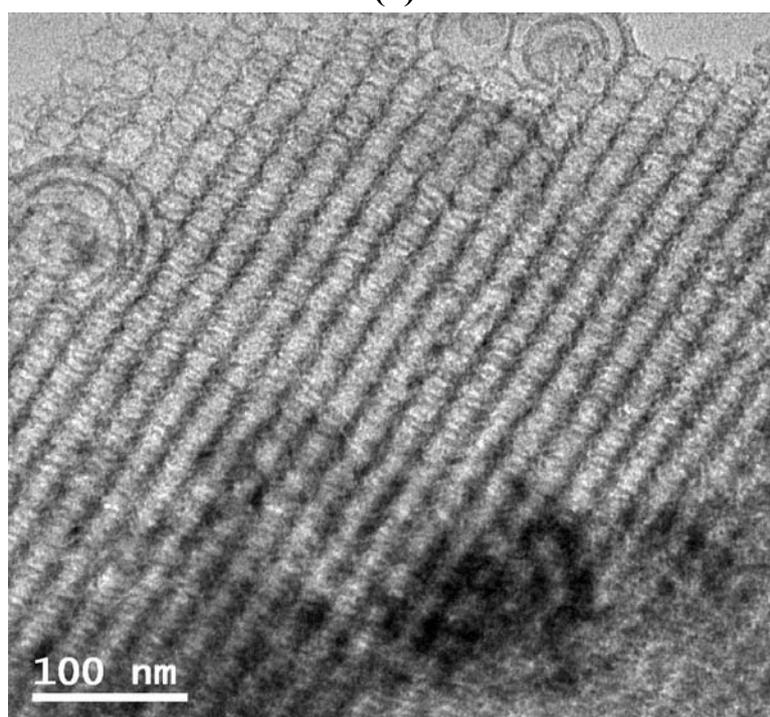
**Fig. 6-7 SBA-15-M1-48 之 SEM 與 TEM 分析圖 (a) SEM, (b) 與 (c) TEM**

Condition for preparing SBA-15-M1-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0.2 g, mixed time : 1 hr,  
synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 48 hr, aged temperature :  
100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.



(a)



(b)

**Fig. 6-8 SBA-15-M2-48 之 SEM 與 TEM 分析圖 (a) SEM (b) TEM**

Condition for preparing SBA-15-M2-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0.4 g, mixed time : 1 hr,  
synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 48 hr, aged temperature :  
100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

### 6.3.1.3 XRD 分析

當 X 光入射至材料晶體，晶體是由原子或原子團在空間中以規則排列而成的固體，會被原子散射，當存在某種相位關係(相位差)兩個或兩個以上散射波相互疊加後，就會產生繞射現象，而於特定的角度下產生繞射波峰。於中孔材料的孔洞結構分析，由於其孔洞是由為數個奈米至數十個奈米的尺寸規則排列所組成，當 X 光射入中孔材料時，會因規則排列的孔洞結構而產生散射，因其孔洞之間的距離相較於結晶材料的不同晶相間的距離大，所以其散射光束並不會相互干擾而形成繞射現象，只會於特定的小角度下形成散射波峰。

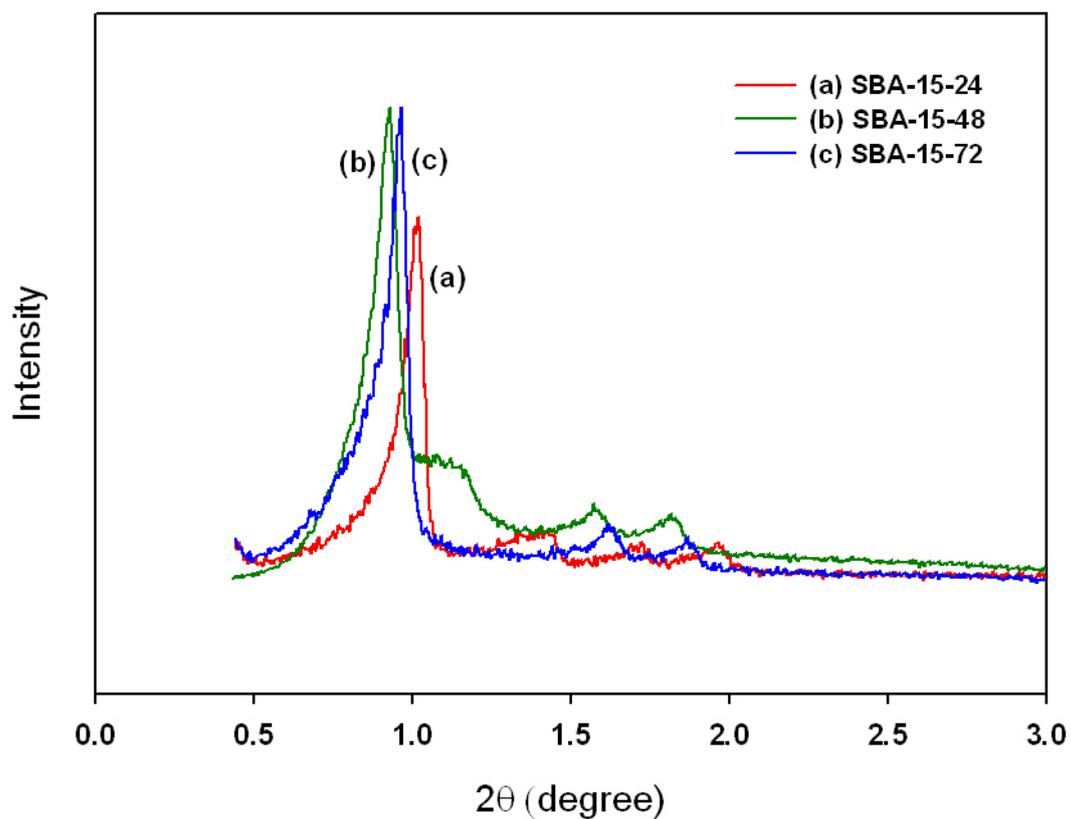
於本小節中，將使用 X 光繞射儀對不同條件製備所得之 SBA-15 中孔矽材料進行孔洞結構分析，經由不同 SBA-15 材料因孔洞結構的差異所產生的散射波峰角度不同，進一步分析孔洞結構。

Fig. 6-9 為不同熟成時間條件下所製備之 SBA-15 材料小角度 X 光散射圖譜，由圖中可看出 SBA-15-24、SBA-15-48 與 SBA-15-72 於(100)、(110)與(200)晶面的散射波峰角度位置分別位於  $2\theta$  為(1.018°、1.723°、1.968°)、(0.932°、1.572°、1.818°)與(0.968°、1.618°、1.868°)。於緒論 1.5 小節中所介紹的 SBA-15 孔洞結構分析可知，可由散射波峰角度比值得知孔洞排列型態，上述之 SBA-15-24、SBA-15-48 與 SBA-15-72 三種分析樣品的散射波峰角度比值皆符合六角排列(Hexagonal,  $p6mm$ )之  $1 : \sqrt{3} : 2$ 。晶格參數

( $a_0$ )的部份，由熟成時間 24 小時的 10.01 nm 增加至熟成時間為 48 小時的 10.94 nm，當熟成時間增加至 72 小時，其晶格參數略微下降至 10.53 nm，熟成時間增加晶格參數隨之增加的原因推測是熟成時間增加，有更多溶液中的矽源沉積至 SBA-15 結構上，而增加了孔壁厚度，因此晶格參數增加。當熟成時間增加至 72 小時，由 Fig. 6-16 的 BET 分析結果觀察到其孔徑分佈一致性變差，產生了部份孔徑大於 10 nm 的孔洞，其可能的原因是因為較長的熟成時間降低了 SBA-15 結構的穩定性所造成。

Fig. 6-10 為固定添加擴孔劑為介面活性劑(P123)含量的 10 wt%，改變熟成時間之小角度 X 光散射圖譜，由圖中可看出 SBA-15-M1-12、SBA-15-M1-24 與 SBA-15-M1-48 於(100)、(110)與(200)晶面的散射波峰角度位置分別位於  $2\theta$  為(0.882°、1.432°、1.717°)、(0.805°、1.375°、1.595°)與(0.812°、1.392°、1.588°)，散射波峰角度比值亦皆符合六角排列(Hexagonal,  $p6mm$ )之  $1 : \sqrt{3} : 2$ 。其 SBA-15-M1-12、SBA-15-M1-24 與 SBA-15-M1-48 的晶格參數( $a_0$ )分別為 11.55、12.66 與 12.56 nm，由數據可發現擴孔後其孔洞的結構型態仍然為六角排列，晶格參數由熟成時間 12 小時的 11.55 nm 大幅增加至熟成時間為 48 小時的 12.56 nm，結合 Table 6-1 中的氮氣吸/脫附分析之 BJH 平均孔徑數據，可得知適當的熟成時間增加更多的矽源沉積至 SBA-15 結構而減少細微孔洞的數量，而提升整體之 BJH 平均孔徑值。

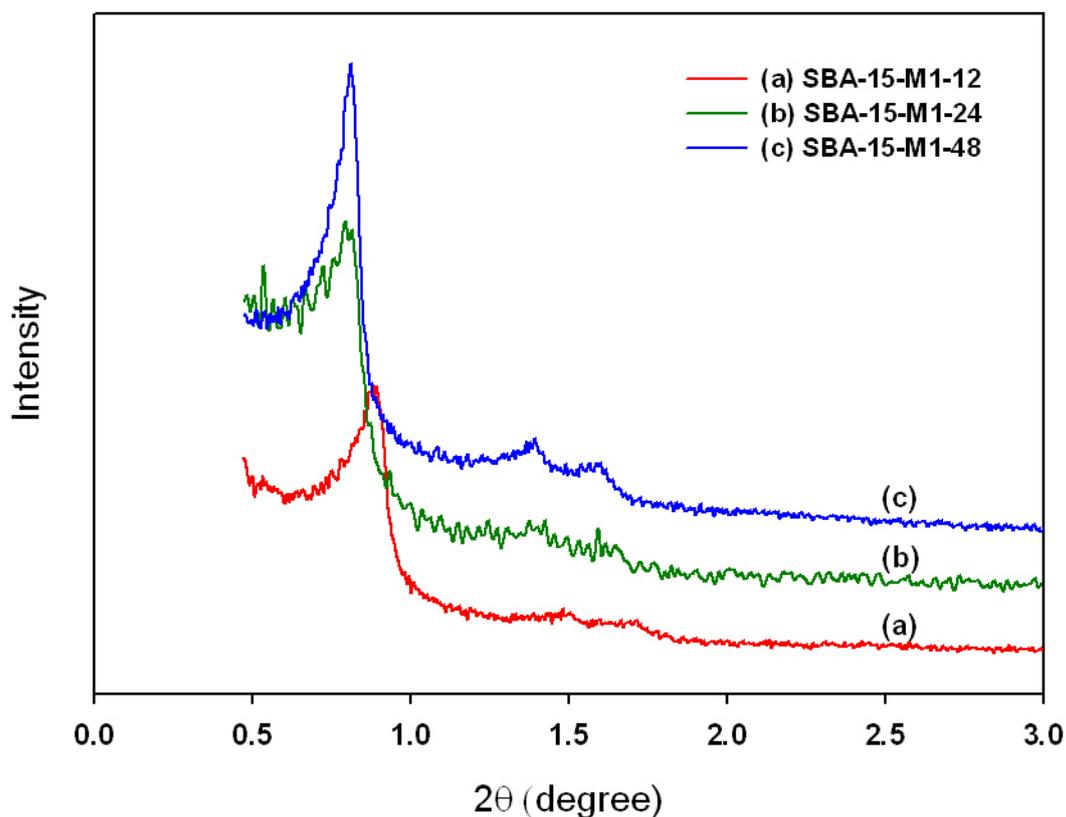
當進一步將擴孔劑添加量提升至 20%，製備出 SBA-15-M2-48 樣品進行孔洞結構分析，由 Fig. 6-11 可看出 SBA-15-M2-48 於(100)、(110)晶面的散射波峰角度位置分別位於  $2\theta$  為(0.413°、0.728°)處，並未發現(200)晶面之散射波峰，如 Fig. 4-37 中曲線(c)所示，並不符合六角排列(Hexagonal,  $p6mm$ )之  $1:\sqrt{3}:2$  散射波峰角度比值，顯示當擴孔劑添加比例至 20%時，SBA-15-M2-48 的孔洞結構已不再呈現典型六角排列結構型態，此分析結果與 Fig. 6-8(b)之 TEM 所觀察到的孔洞結構形態已被破壞相吻合。



**Fig. 6-9 SBA-15-24、SBA-15-48 與 SBA-15-72 粉末之小角度 X 光散射分析圖譜**

Condition for preparing SBA-15-24, SBA-15-48 and SBA-15-72 :

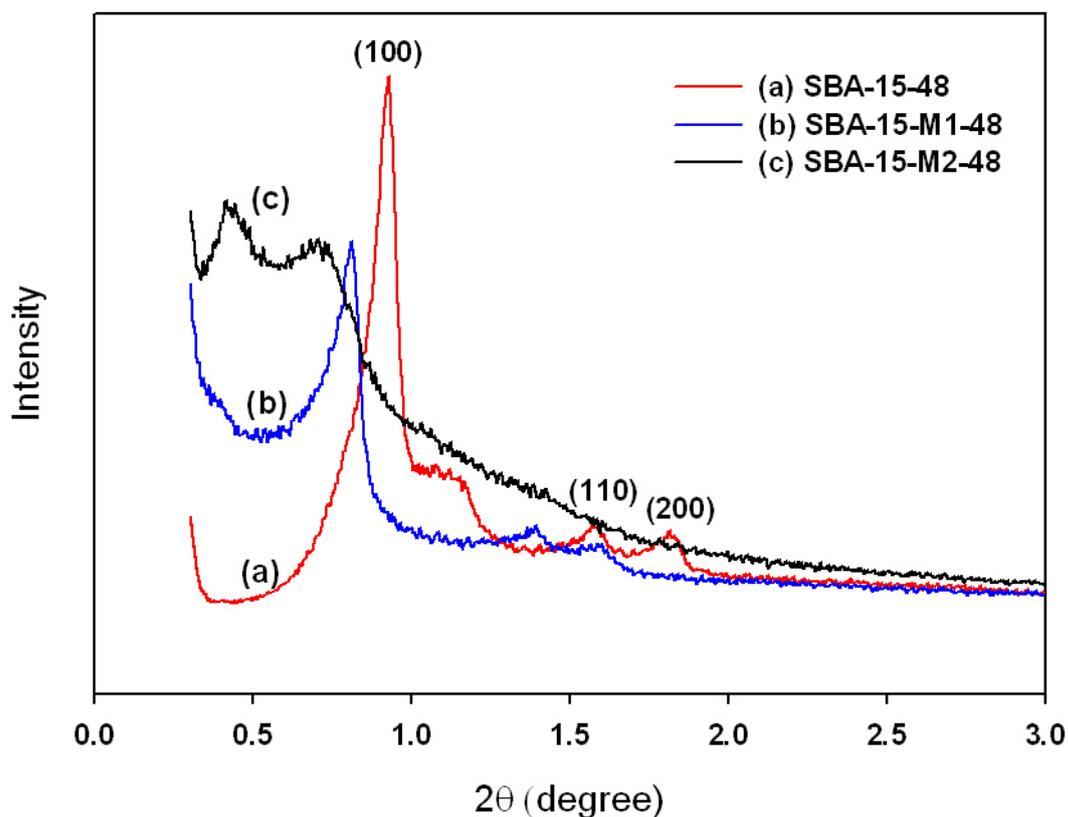
P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 24, 48, 72 hr, aged temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.



**Fig. 6-10 SBA-15-M1-12、SBA-15-M1-24 與 SBA-15-M1-48 粉末之小角度 X 光散射分析圖譜**

Condition for preparing SBA-15-M1-12, SBA-15-M1-24, SBA-15-M1-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0.2 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 12, 24, 48 hr, aged temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.



**Fig. 6-11 SBA-15-48、SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M2-48 粉末之小角度 X 光散射分析圖譜**

Condition for preparing SBA-15-48, SBA-15-M1-48, SBA-15-M2-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0, 0.2, 0.4 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 12, 24, 48 hr, aged temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

#### 6.3.1.4 BET 分析

使用型號為 Micromeritics ASAP2020 之氮氣等溫吸/脫附儀，分析於不同製備條件下所合成之 SBA-15 孔洞性質。Fig. 6-12、Fig.6-13 與 Fig.6-14 分別為未擴孔之 SBA-15-24、SBA-15-48 與 SBA-15-72 的氮氣等溫吸/脫附曲線(下方曲線為吸附曲線，上方曲線為脫附曲線)與孔徑分佈圖，分別將上述三種 SBA-15 樣品的氮氣等溫吸/脫附曲線與粒徑分佈整理於 Fig.6-15 與 Fig. 6-16。

由 Fig. 6-15 中可觀察到 SBA-15-24 的氮氣吸附量比 SBA-15-48 及 SBA-15-72 少，再與 Fig. 6-16 的孔徑分佈圖比較，可看出 SBA-15-24 與 SBA-15-48 的主要孔徑皆為 7.5 nm，但孔徑為 7.5nm 的孔洞體積 SBA-15-24 比 SBA-15-48 少，可能的原因為 SBA-15 合成溶液中的矽源隨著熟成時間增加，沉積到以界面活性劑形成的模板上的量增加，而形成了更多的孔洞數量，使單位重量下的孔洞體積增加，因此 SBA-15-48 的吸附量比 SBA-15-24 多。由 Fig. 6-15 中的 SBA-15-72 的吸附曲線，相對壓力( $P/P_0$ )介於 0.7~0.8 處的上升斜率比 SBA-15-24 及 SBA-15-72 的上升斜率小，這是因為由 Fig.6-16 中可看出 SBA-15-72 的孔徑比較大，因此在吸附過程中，隨著壓力上升，氮氣分子於孔洞中凝結而發現的毛細現象較不顯著。

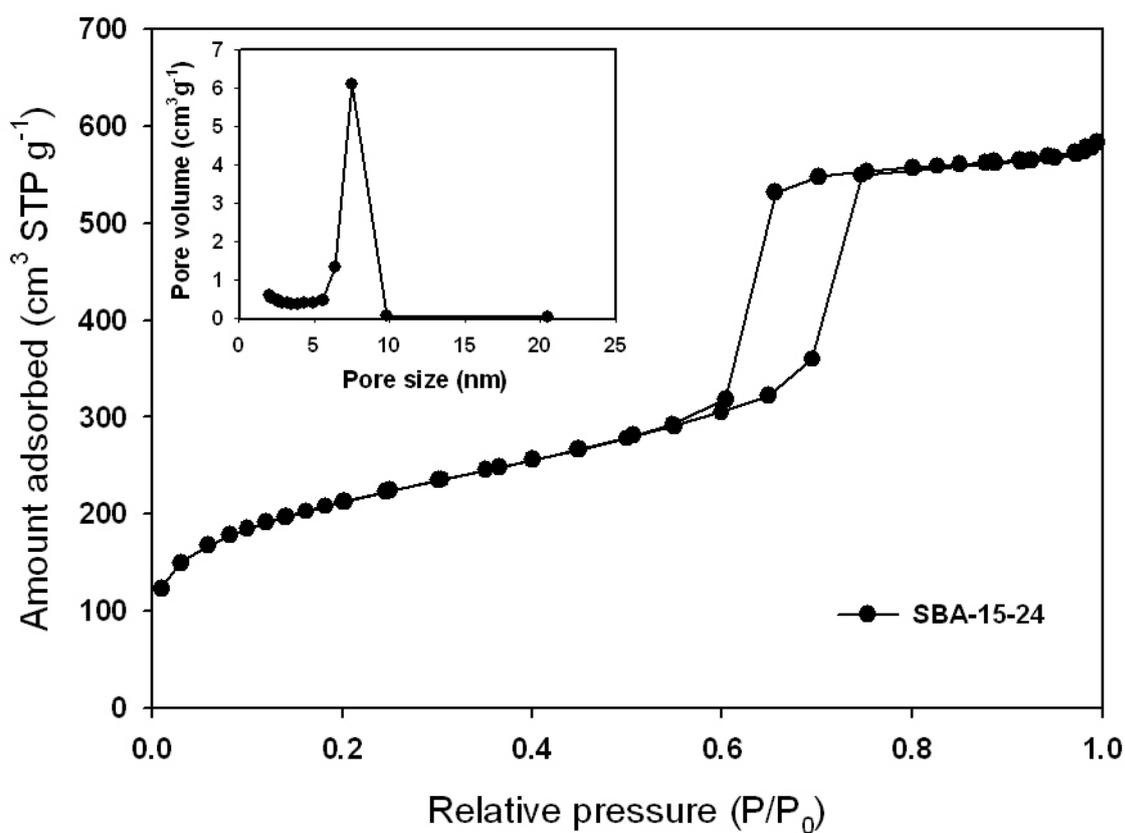


Fig. 6-12 SBA-15-24 之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖

Condition for preparing SBA-15-24 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr,  
 reacted temperature : 35 °C, aged time : 24 hr, aged temperature : 100 °C, calcined  
 temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

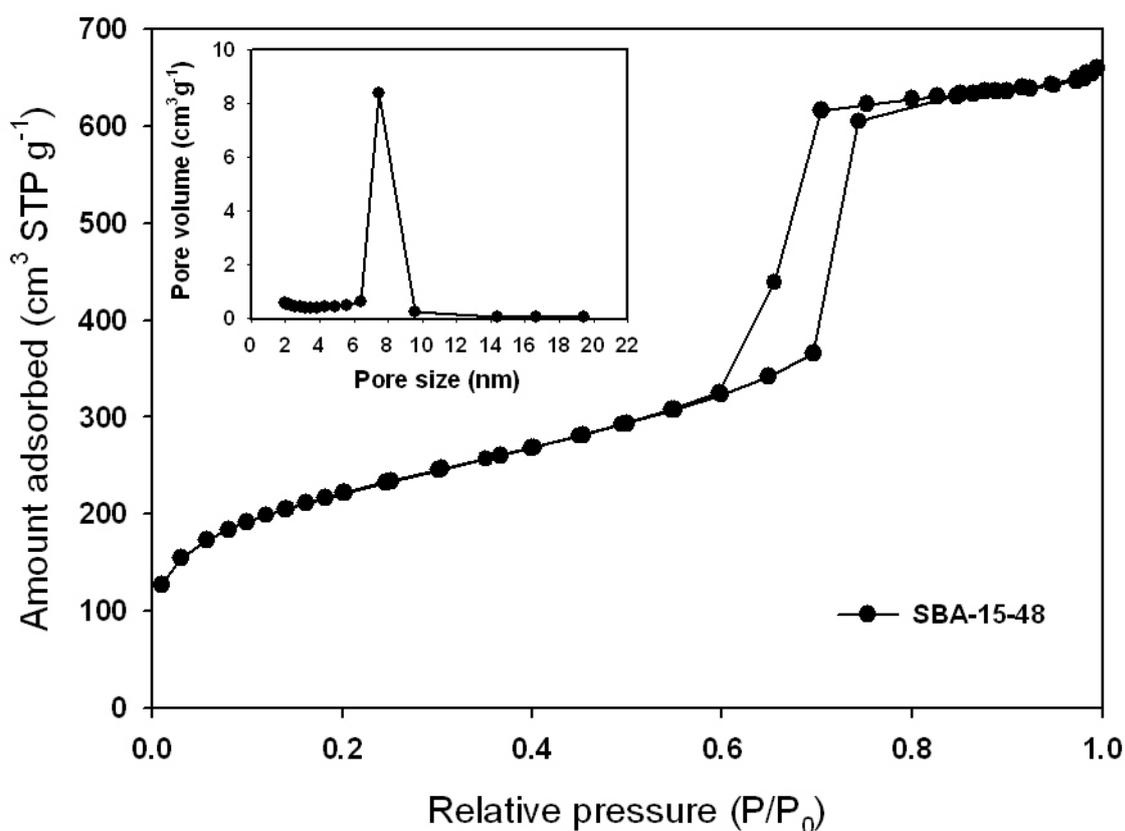


Fig. 6-13 SBA-15-48 之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖

Condition for preparing SBA-15-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 48 hr, aged temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

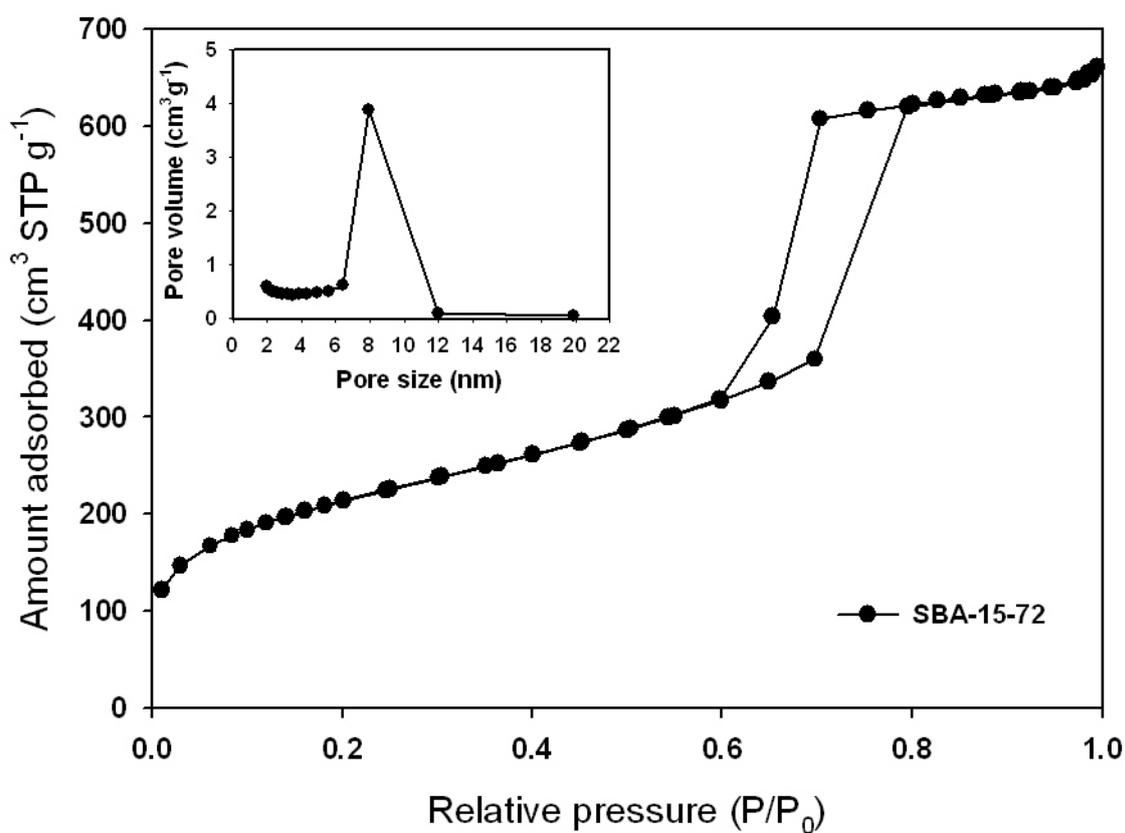


Fig. 6-14 SBA-15-72 之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖

Condition for preparing SBA-15-72 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr,  
 reacted temperature : 35 °C, aged time : 72 hr, aged temperature : 100 °C, calcined  
 temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

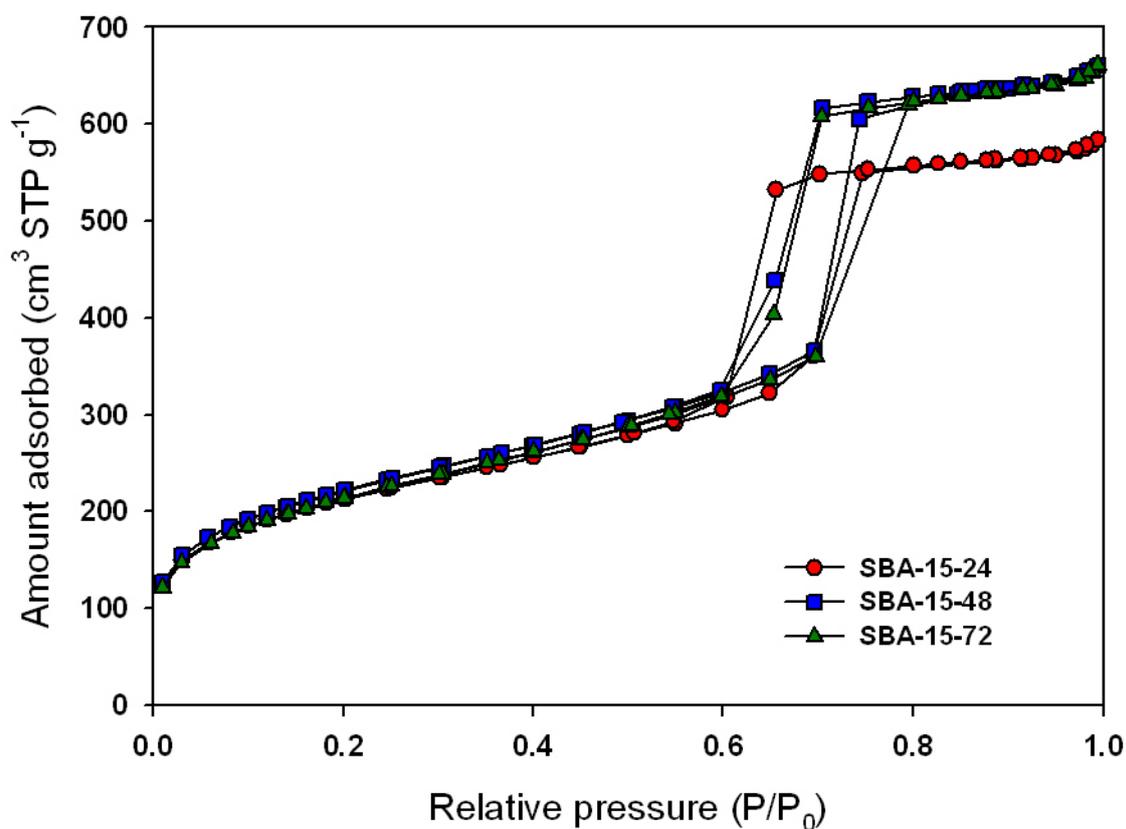
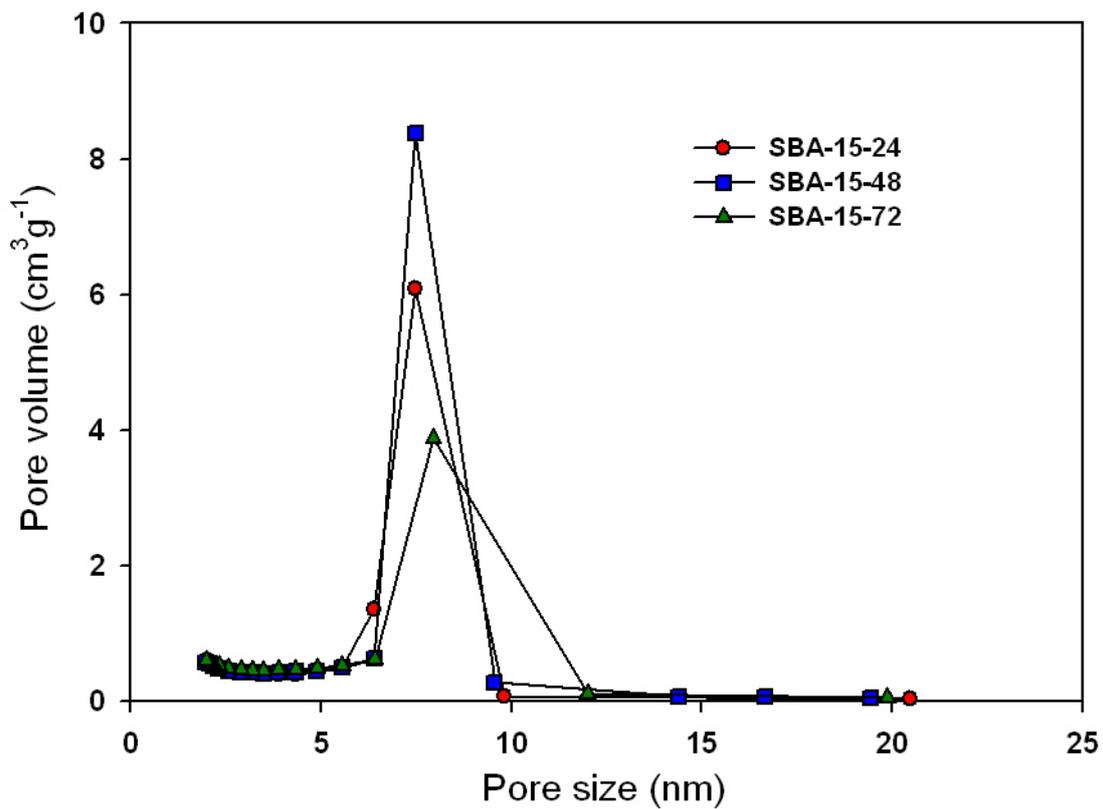


Fig. 6-15 SBA-15-24、SBA-15-48 與 SBA-15-72 之氮氣等溫吸/脫附曲線圖

Condition for preparing SBA-15-24, SBA-15-48 and SBA-15-72 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 24, 48, 72 hr, aged temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.



**Fig. 6-16 SBA-15-24、SBA-15-48 與 SBA-15-72 之孔徑分佈圖**

Condition for preparing SBA-15-24, SBA-15-48 and SBA-15-72 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 24, 48, 72 hr, aged temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

Fig. 6-17、Fig.6-18 與 Fig.6-19 為添加三甲基苯進行擴孔之 SBA-15-M1-12、SBA-15-M1-24 與 SBA-15-M1-48 的氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖，分別將氮氣等溫吸/脫附曲線與粒徑分佈整理於 Fig.6-20 與 Fig. 6-21。由 Fig. 6-20 中可看出擴孔後之 SBA-15 樣品因孔徑變大，於吸附時所產生的毛細現象比 Fig. 6-15 中的未擴孔樣品不明顯，且在相對壓力介於 0.75 ~ 1.0 時的吸附曲線呈現兩段不同的斜率，這是因為擴孔後的孔洞具有 2 種孔徑尺寸，不同的孔徑會於不同的壓力下產生毛細現象。由 Fig. 6-21 的孔徑分佈圖中可看出，擴孔後之 SBA-15-M1-12、SBA-15-M1-24 與 SBA-15-M1-48 的主要孔徑皆由擴孔前的 7.5 nm 增加 9.2 nm，並且產生了介於 10 ~ 30 nm 的大孔徑孔洞，其中又以 SAB-15-M1-48 的製備條件下所產生的大孔的比例最多，使得其孔洞體積也比 SBA-15-M1-12 與 SBA-15-M1-24 大，如 Table 6-1 所示。由於擴孔劑添加量為 10% 所合成的 SBA-15 樣品具有兩種孔徑，於 Fig. 6-20 中的脫附曲線中呈現氮氣脫附時因遲滯現象(hysteresis)而呈現兩種斜率。

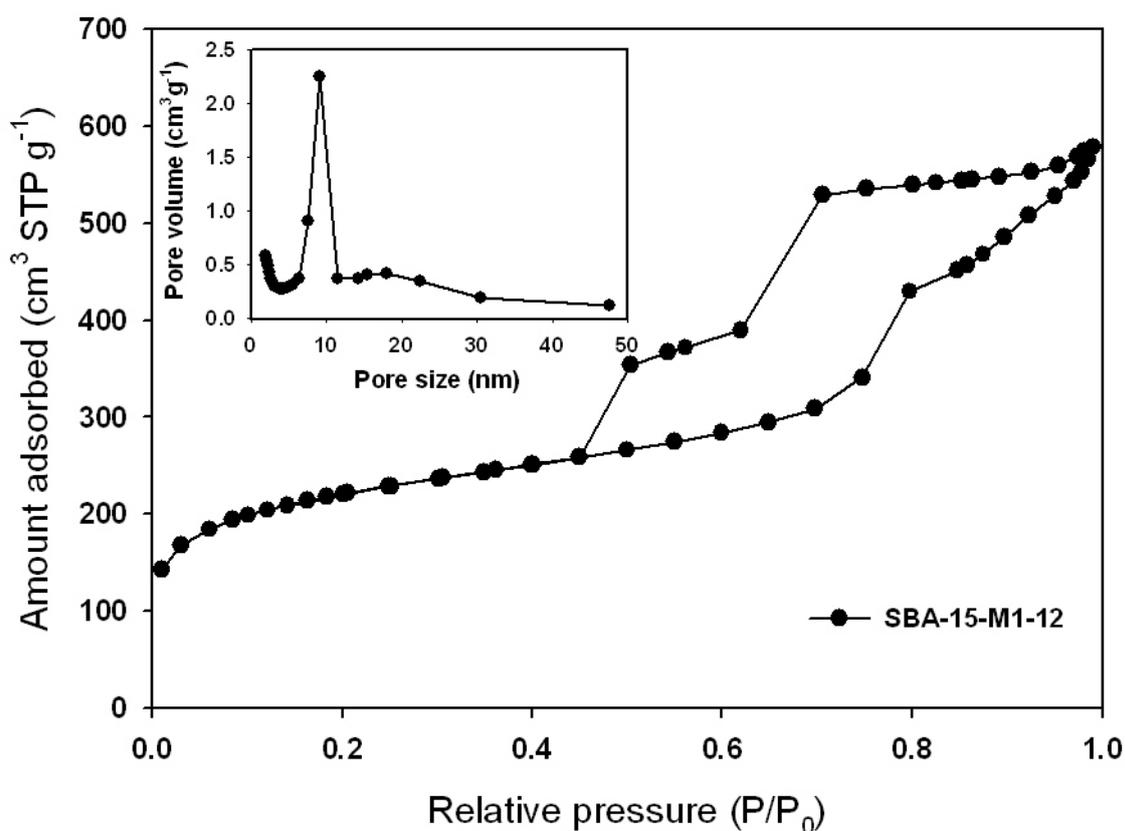


Fig. 6-17 SBA-15-M1-12 之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖

Condition for preparing SBA-15-M1-12 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0.2 g, mixed time : 1 hr,  
 synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 12 hr, aged temperature :  
 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

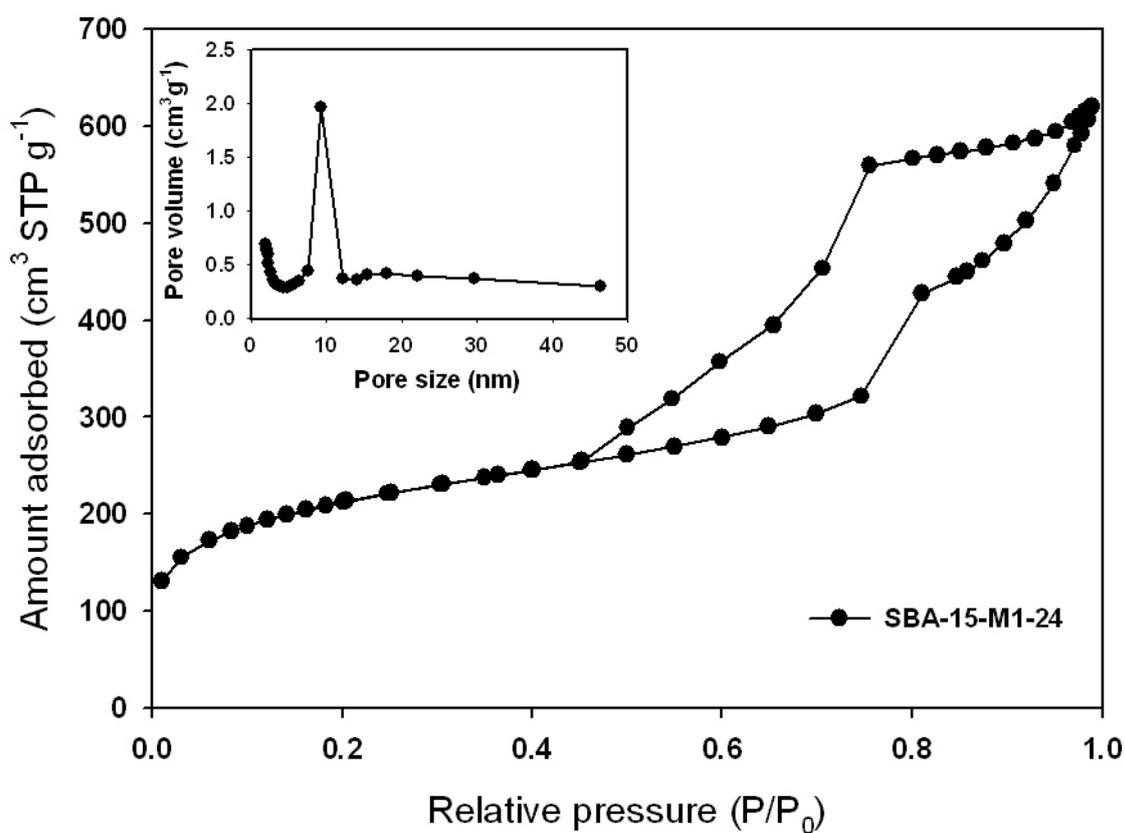


Fig. 6-18 SBA-15-M1-24 之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖

Condition for preparing SBA-15-M1-24 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0.2 g, mixed time : 1 hr,  
 synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 24 hr, aged temperature :  
 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

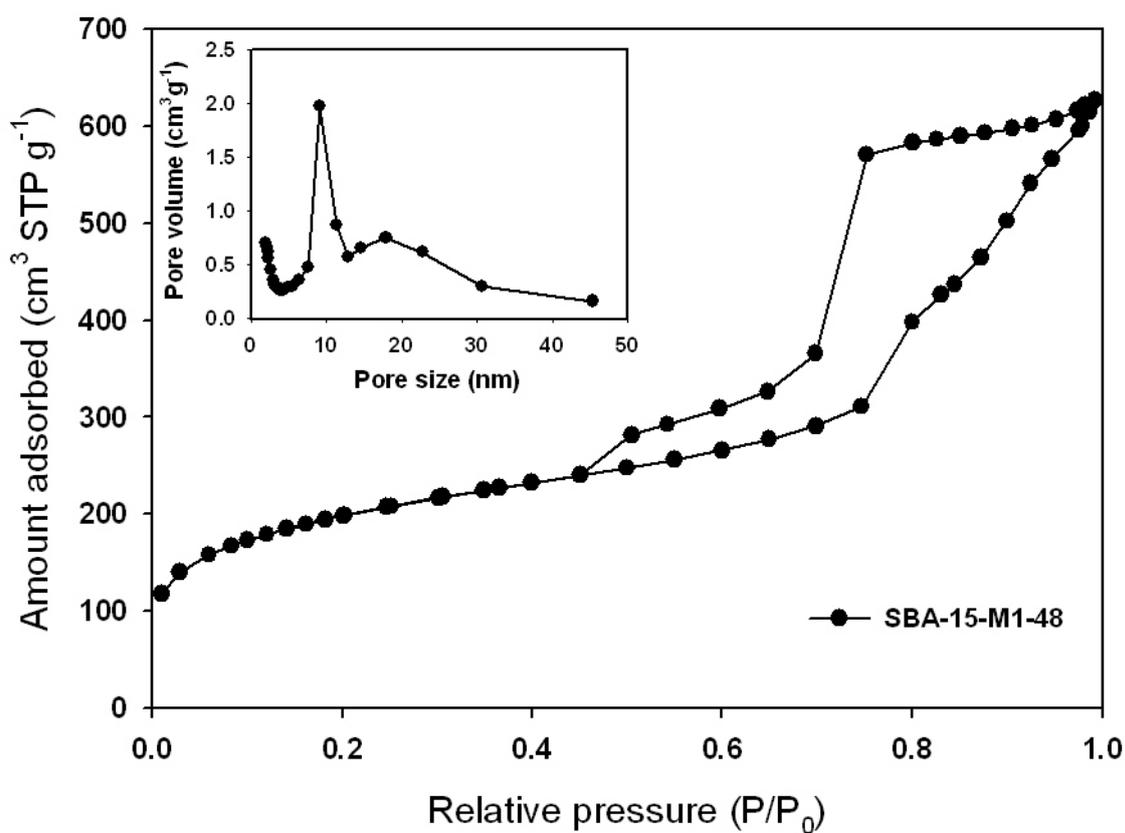
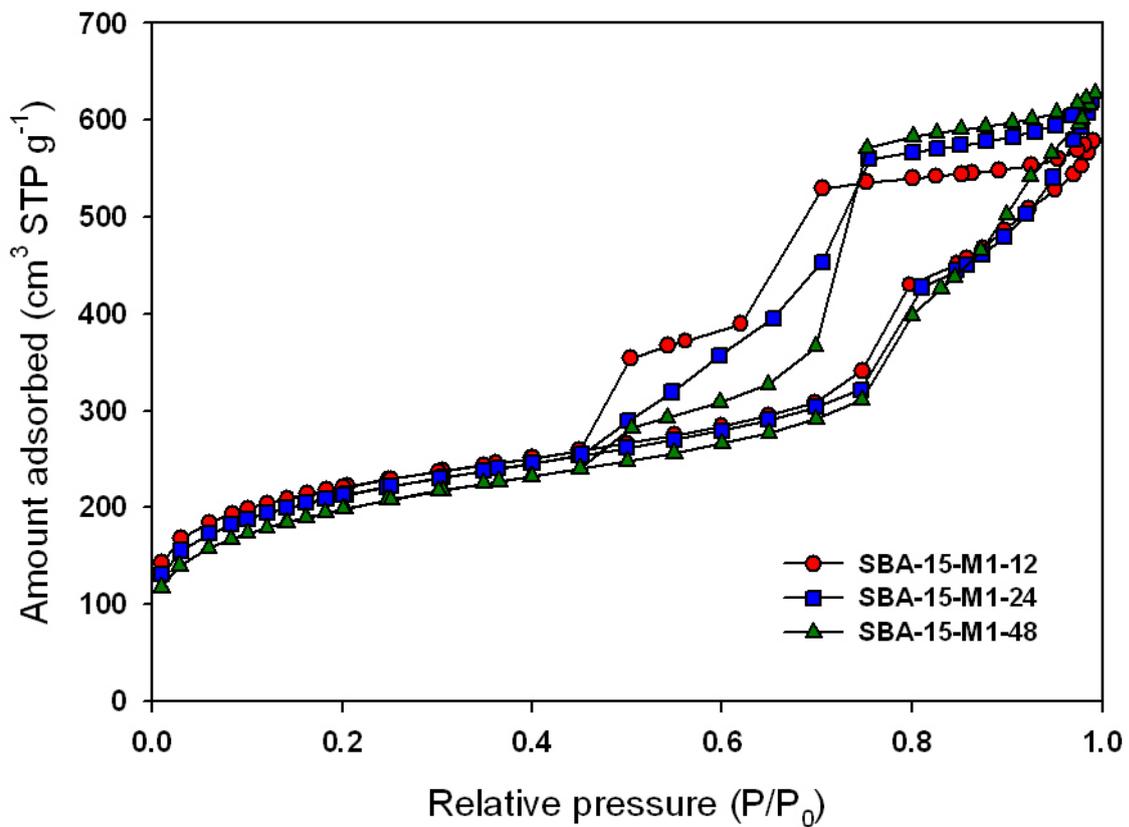


Fig. 6-19 SBA-15-M1-48 之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖

Condition for preparing SBA-15-M1-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0.2 g, mixed time : 1 hr,  
 synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 48 hr, aged temperature :  
 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.



**Fig. 6-20 SBA-15-M1-12、SBA-15-M1-24 與 SBA-15-M1-48 之氮氣等溫吸/脫附曲線圖**

Condition for preparing SBA-15-M1-12, SBA-15-M1-24, SBA-15-M1-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0.2 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 12, 24, 48 hr, aged temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

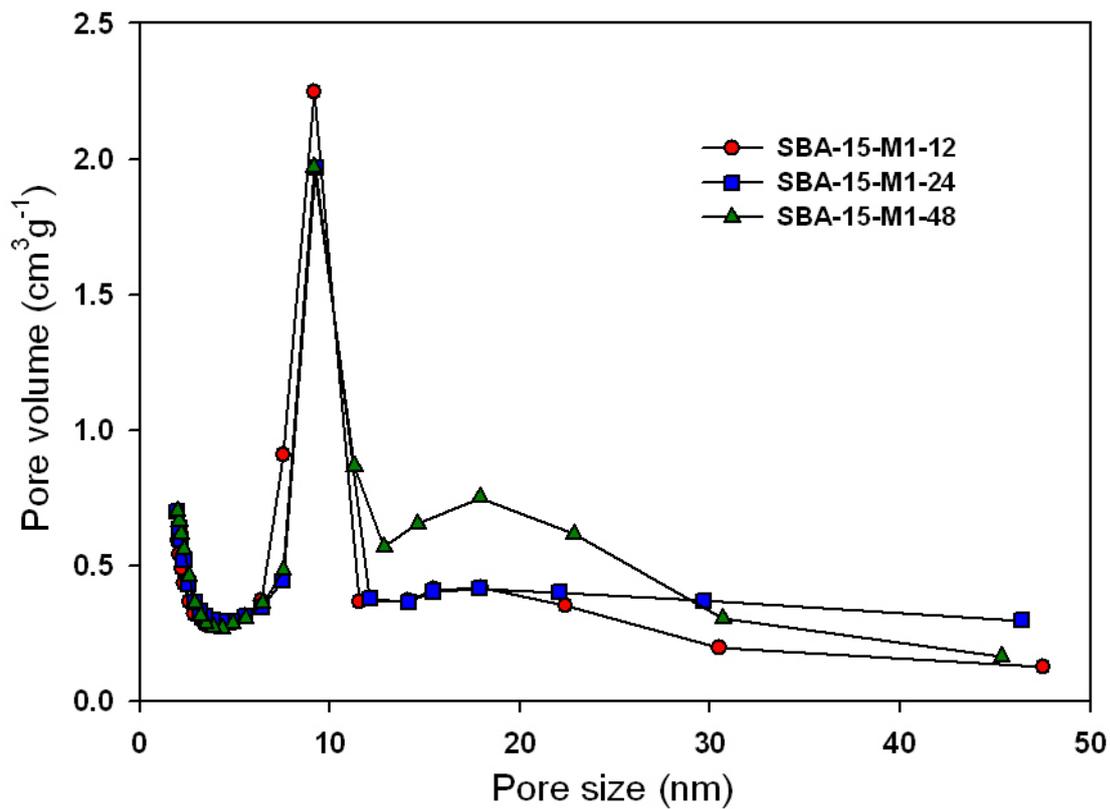


Fig. 6-21 SBA-15-M1-12、SBA-15-M1-24 與 SBA-15-M1-48 之孔徑分佈圖

Condition for preparing SBA-15-M1-12, SBA-15-M1-24, SBA-15-M1-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0.2 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 12, 24, 48 hr, aged temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

Fig. 6-22 為 SBA-15-M2-48 的氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖，由圖中可看出擴孔劑添加量增加至 20% 時，其主要孔徑由 SBA-15-48 的 7.5 nm，增加至 14.1 nm，孔洞體積也由  $1.0 \text{ cm}^3/\text{g}$  增加至  $1.26 \text{ cm}^3/\text{g}$ ，如 Table 6-1 所示。氮氣等溫吸/脫附曲線呈現球形孔洞所具有的吸脫附型態，與 Lettow 等人的研究結果一致(Lettow et al. 2000)。

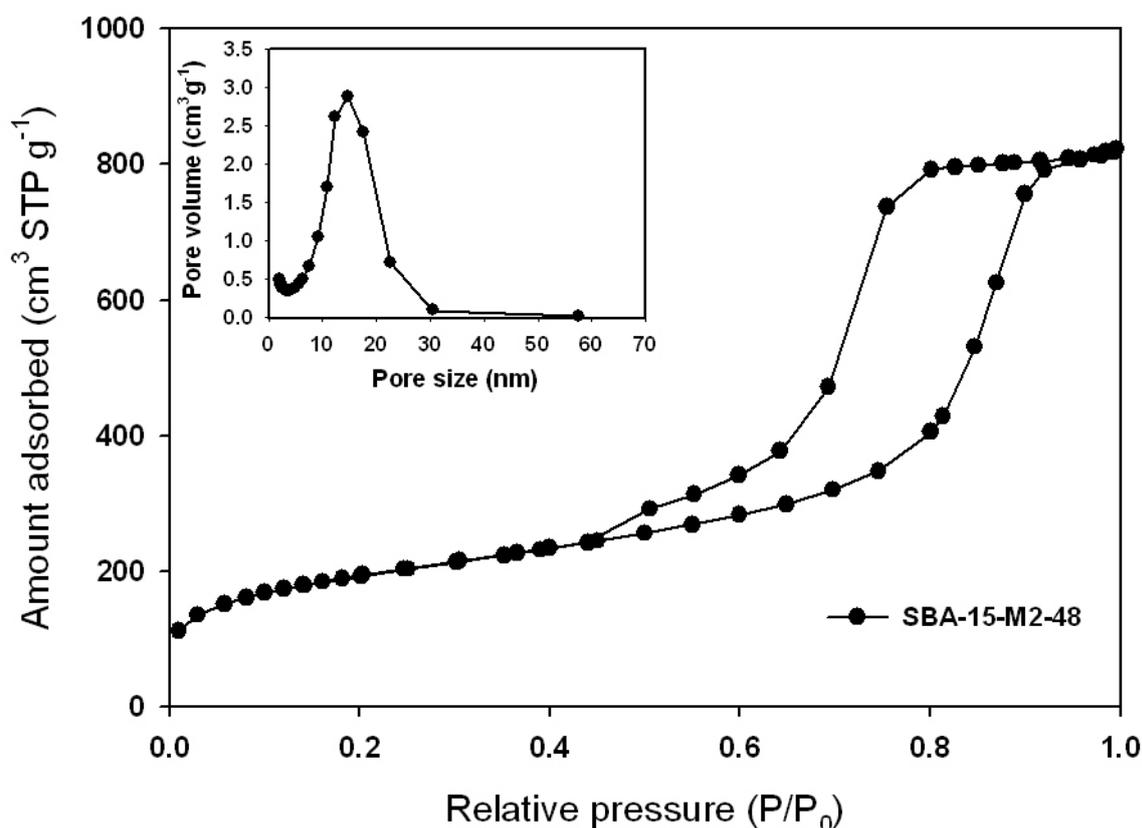


Fig. 6-22 SBA-15-M2-48 之氮氣等溫吸/脫附曲線與孔徑分佈圖

Condition for preparing SBA-15-M2-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0.4 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 48 hr, aged temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

**Table 6-1 Pore characterization of various SBA-15 samples.**

Type	$2\theta$ (degree)			$a_0$ (nm)	Pore size (nm)	BJH adsorption average pore size (nm)	BET surface (m <sup>2</sup> /g)	Pore volume (cm <sup>3</sup> /g)
	(100)	(110)	(200)					
SBA-15-24	1.018	1.723	1.968	10.01	7.5	5.6	762.0	0.88
SBA-15-48	0.932	1.572	1.818	10.94	7.5	5.9	796.2	1.00
SBA-15-72	0.968	1.618	1.868	10.53	8.0	5.2	769.7	1.00
SBA-15-M1-12	0.882	1.432	1.717	11.55	9.2	7.2	775.4	0.84
SBA-15-M1-24	0.805	1.375	1.595	12.66	9.2	7.5	754.5	0.89
SBA-15-M1-48	0.812	1.392	1.588	12.56	9.2	7.6	708.5	0.92
SBA-15-M2-48	0.413	0.728	—	—	14.1	7.2	694.6	1.26

## 6.3.2 以SBA-15為載體固定HRP酵素探討

### 6.3.2.1 探討不同含浸方法對於HRP酵素固定量的影響

於本小節中探討將 HRP 固定於不同條件製備所得之 SBA-15 之效果。首先，分別比較使用一般含浸法(Impregnation method)與初濕含浸法(Incipient Wetness Impregnation method)兩種固定化程序之效率，酵素固定化程序如 6.2.2 小節中所述。

在一般含浸法的部份，分別先將分裝保存之 HRP 酵素解凍後，使用 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液 (pH 5.6) 稀釋到 1000  $\mu$ l，加入 10 mg 之不同製備條件 SBA-15 粉末中，使用 Voltex 震盪混合均勻後，置於 4 $^{\circ}$ C 的環境下持續攪拌 1 小時，隨後於 4 $^{\circ}$ C 下以 7000 rpm 離心 5 分鐘，並分別取上層酵素溶液 10  $\mu$ l 與 790  $\mu$ l 磷酸鹽緩衝液(0.1 M, pH 5.6) 及 200 $\mu$ l Bio-Rad Protein Assay 試劑混合均勻後，於 25 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C 下靜置反應 10 分鐘，使用紫外光-可見光分光光度計量測波長 595 nm 下之吸光值，進行蛋白質定量分析。

Fig. 6-23 為使用一般含浸法將 HRP 酵素吸附於 SBA-15 中之離心後上清溶液 HRP 濃度比較結果。實驗的同時取 10 $\mu$ l 進行固定化時相同的 HRP 溶液進行定量分析，配合 Fig. 6-24 蛋白質定量分析之吸光值與濃度關係曲線，可得知進行固定化前的 HRP 溶液的濃度為 5.26  $\mu$ g/ml。於加入不同條件製備之 SBA-15 進行固定後，溶液中酵素濃度依序由 SBA-15-M1-12、

SBA-15-M1-24、SBA-15-M1-48、SBA-15-M2-48、SBA-15-72、SBA-15-48 與 SBA-15-24 為 4.87、4.26、4.05、4.26、4.55、4.65 與 4.68  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，其中以 SBA-15-M1-48 吸附 HRP 的負載量最高。SBA-15 樣品吸附 HRP 酵素之吸附量比較結果，如 Table 6-2 所示。0.01 g 之 SBA-15-M1-48 樣品對於溶液中 HRP 酵素的吸附百分比為 23 %，單位重量的 SBA-15-M1-48 對於 HRP 的負載量為 1935.27  $\mu\text{g}/\text{g}$ ，相對於其他 SBA-15 樣品的吸附量高出許多，推測其原因為 SBA-15-M1-48 之孔洞結構如 Fig. 6-21 之孔徑分佈圖所示，呈現外孔較小、內孔徑較大之壺形雙孔徑的孔洞型態，並且有較多介於 13 ~ 30 nm 之大孔徑孔洞存在，可吸附較多的酵素量。

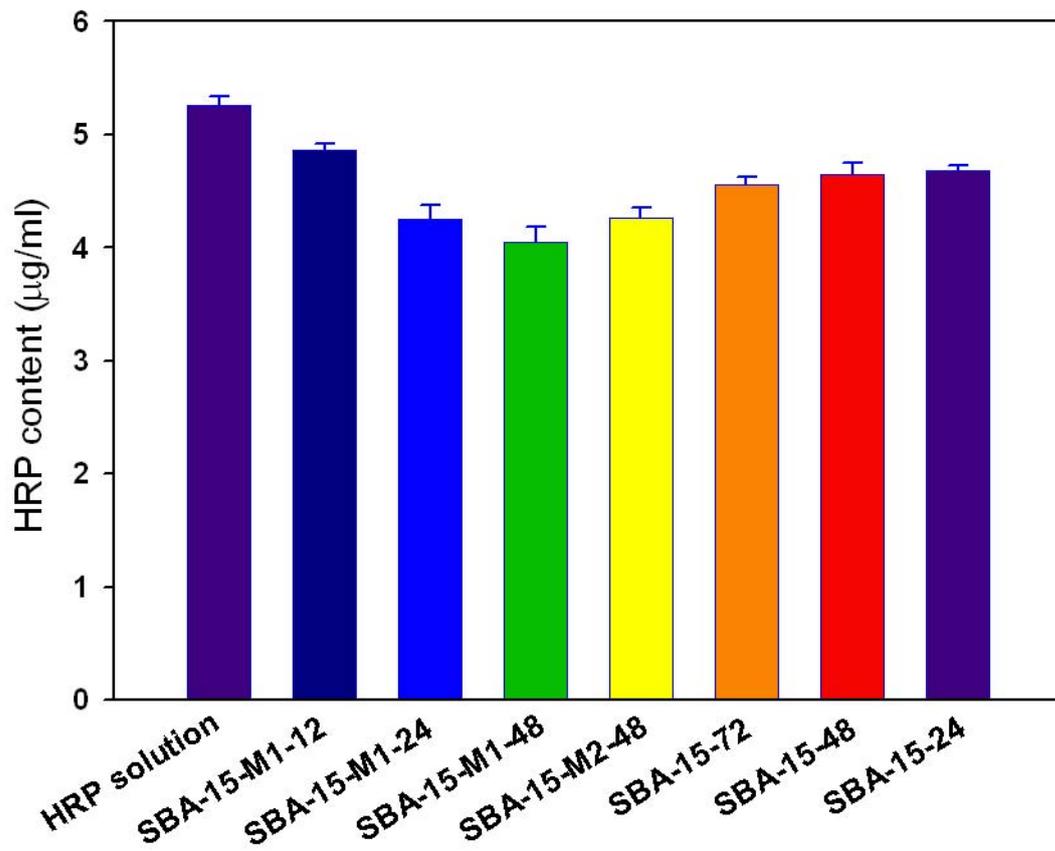


Fig. 6-23 使用一般含浸法於 SBA-15 樣品吸附 HRP 酵素後於溶液中 HRP 濃度變化圖

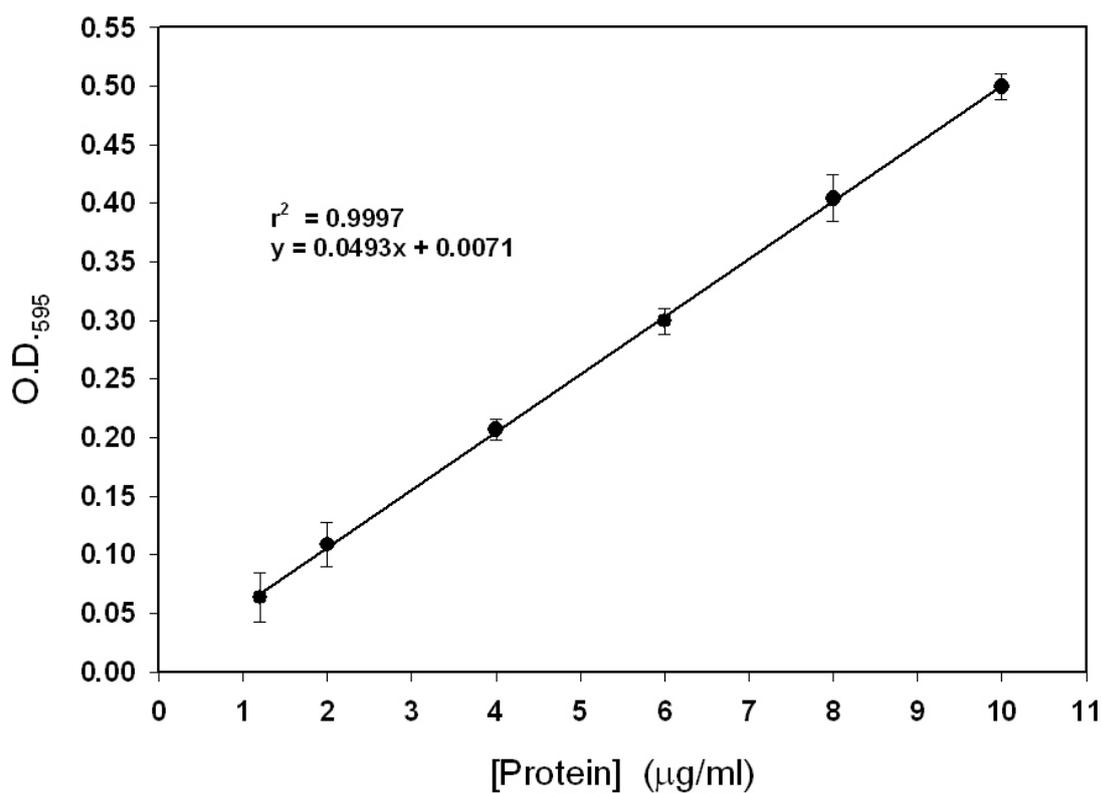


Fig. 6-24 蛋白質定量分析之濃度檢量曲線

Table 6-2 使用一般含浸法於SBA-15樣品吸附HRP酵素之吸附量比較

樣品	SBA-15重量 (g)	吸附後溶液中HRP濃度 (µg/ml)	SBA-15對HRP的吸附量 (µg)	SBA-15對HRP的吸附百分比 (%)	單位重量的SBA-15對酵素的負載量 (µg/g)
HRP	0	5.26	0	0	0
SBA-15-M1-12	0.01	4.87	6.29	7.41	628.86
SBA-15-M1-24	0.01	4.26	16.08	19.01	1607.88
SBA-15-M1-48	0.01	4.05	19.35	23.00	1935.27
SBA-15-M2-48	0.01	4.26	15.98	19.01	1597.60
SBA-15-72	0.01	4.55	11.32	13.49	1131.78
SBA-15-48	0.01	4.65	9.72	11.60	971.83
SBA-15-24	0.01	4.68	9.26	11.03	926.34

於使用初濕含浸法的部份，實驗程序為先分別取分裝冷凍保存之HRP 酵素21  $\mu\text{l}$ 解凍後，使用0.1 M磷酸鹽緩衝溶液 (pH 5.6) 稀釋到210  $\mu\text{l}$ ，取其中200  $\mu\text{l}$  加入10 mg 之不同條件製備所得SBA-15 粉末中，此時粉末會剛好呈現濕潤狀態，使用Vortex震盪混合均勻後，置於4°C的環境下持續攪拌1 小時，隨後使用0.1 M磷酸鹽緩衝溶液(pH 5.6) 將體積稀釋到1000  $\mu\text{l}$ ，再次混合均勻後於4 °C下以7000 rpm 離心 5 分鐘，並分別取上層酵素溶液10  $\mu\text{l}$  進行蛋白質定量分析。

Fig. 6-25 為使用初濕含浸法固定化 HRP 酵素於 SBA-15 之實驗結果，由結果顯示於各個條件下製備之 SBA-15-M1-12、SBA-15-M1-24、SBA-15-M1-48、SBA-15-M2-48、SBA-15-72、SBA-15-48 與 SBA-15-24 於吸附 HRP 酵素後，上層溶液的濃度分別為 3.28、3.08、2.59、3.07、3.58、3.68 與 3.76  $\mu\text{g/ml}$ 。Table 6-3 為不同 SBA-15 樣品吸附 HRP 酵素之吸附量比較結果。如表中所示，0.01 g 之 SBA-15-M1-48 樣品對於溶液中 HRP 酵素的吸附百分比為 50.76%，單位重量的 SBA-15-M1-48 對於 HRP 的負載量高達 4278.45  $\mu\text{g/g}$ ，其中亦以 SBA-15-M1-48 吸附 HRP 的負載量最高。相對於使用一般含浸法進行吸附時，HRP 的負載量為 1935.27  $\mu\text{g/g}$ ，使用初濕含浸法的單位重量負載量增加了 121.07%，其可能的原因為使用初濕含浸法吸附 HRP 酵素時，此時含有酵素溶液的 SBA-15 呈現微濕潤狀態，並且在較高的濃度 HRP 下進行吸附，在此狀態下有更多的 HRP 酵素藉由

毛細現象的作用力進入 SBA-15 孔道內。

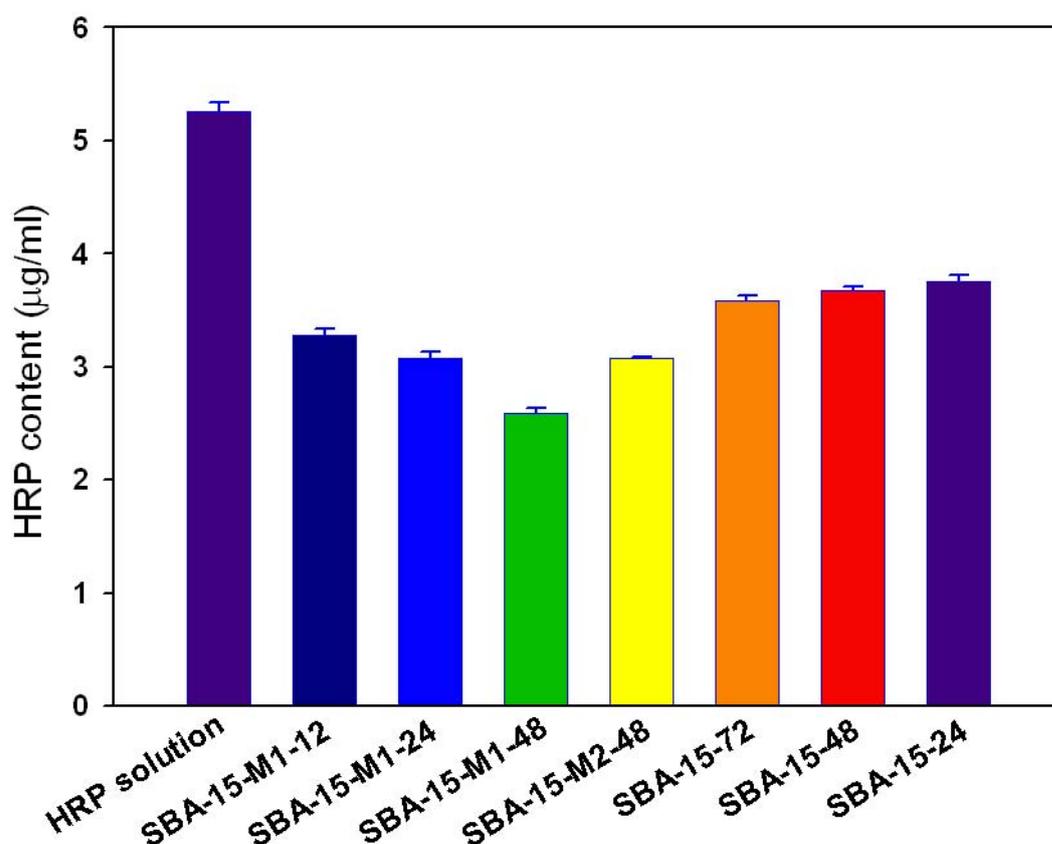


Fig. 6-25 使用初濕含浸法於 SBA-15 樣品吸附 HRP 酵素後於溶液中 HRP 濃度變化圖

Table 6-3 使用初濕含浸法於 SBA-15 樣品吸附 HRP 酵素之吸附量比較

樣品	SBA-15 重量 (g)	吸附後溶液中 HRP 濃度 (µg/ml)	SBA-15 對 HRP 的吸附量 (µg)	SBA-15 對 HRP 的吸附百分比 (%)	單位重量的 SBA-15 對酵素的負載量 (µg/g)
HRP	0	5.26	0	0	0
SBA-15-M1-12	0.01	3.28	31.74	37.64	3174.34
SBA-15-M1-24	0.01	3.08	34.85	41.44	3485.43
SBA-15-M1-48	0.01	2.59	42.78	50.76	4278.45
SBA-15-M2-48	0.01	3.07	34.99	41.63	3498.77
SBA-15-72	0.01	3.58	26.82	31.94	2682.18
SBA-15-48	0.01	3.68	25.35	30.04	2535.03
SBA-15-24	0.01	3.76	24.02	28.52	2402.18

### 6.3.2.2 探討吸附時間及 pH 值對於 HRP 酵素固定量的影響

在前一小節所探討了 HRP 酵素固定於不同製備條件之 SBA-15 中，無論是使用一般含浸法或初濕含浸法進行吸附，其 HRP 酵素負載量皆以 SBA-15-M1-48 的樣品最高。故於本小節中，將進一步探討改變吸附時間與溶液 pH 值對於 SBA-15-M1-48 吸附 HRP 酵素負載量的影響。Fig. 6-26 為使用初濕含浸法於不同吸附時間時 SBA-15-M1-48 吸附 HRP 負載量的變化圖，由實驗結果顯示當 HRP 酵素在剛加入 SBA-15-M1-48 進行吸附時，其負載量已達到 4195.67  $\mu\text{g/g}$ ；吸附 1 小時後，其負載量為 4278.45  $\mu\text{g/g}$ ；吸附 4 小時後，其負載量為 4257.45  $\mu\text{g/g}$ ，可發現其吸附量並不會隨著吸附時間增加有太顯著的改變，固於後續的實驗中將選用吸附時間為 1 小時進行含浸吸附。

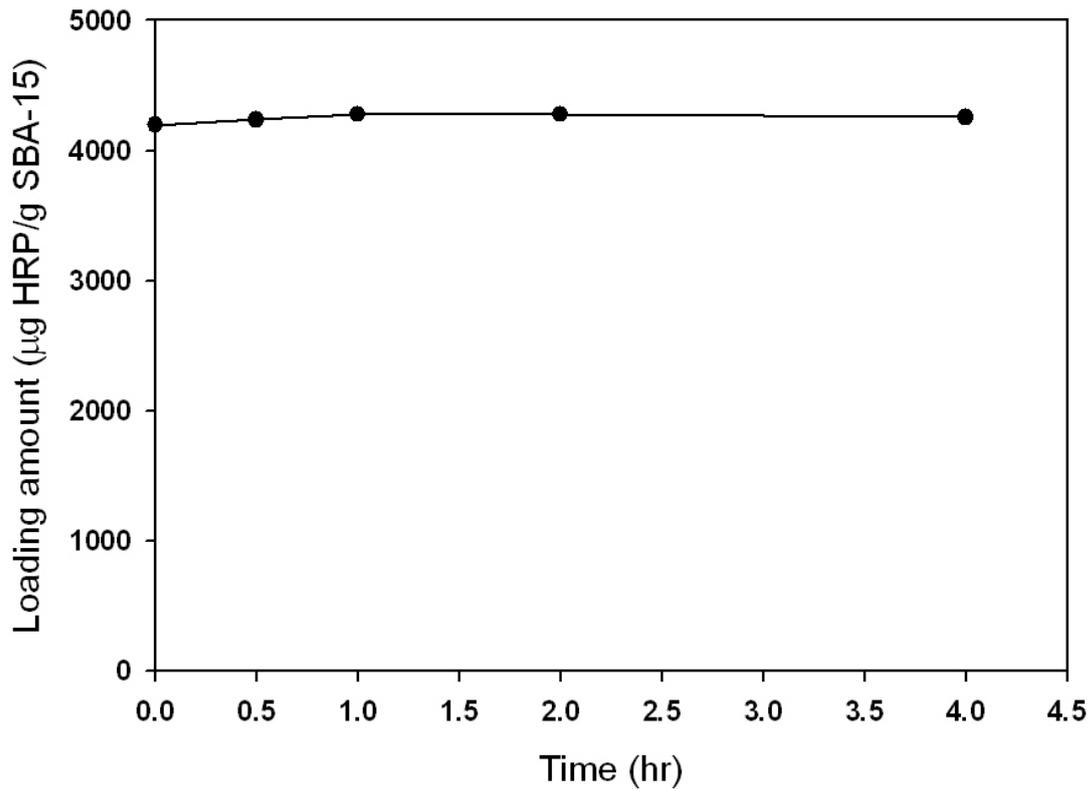


Fig. 6-26 HRP 酵素於不同吸附時間下負載量變化圖

另外在探討 pH 值對於負載量的影響部份，由 Fig. 6-26 示意圖中可看出 HRP 的等電點(pI)為 7.2，SBA-15 的等電點(pI)為 4.0，當物質所在溶液的 pH 值低於該物質的 pI 值，其物質所帶的電性為正電荷；反之則帶負電荷。由圖中可看出當溶液的 pH 值介於 4~7.2 之間，HRP 酵素與 SBA-15 所帶的電性相反，故可利用靜電吸引力將 HRP 酵素固定於 SBA-15 上，藉由改變溶液的 pH 值來調整兩者之間的吸引力大小，可改變 SBA-15 吸附 HRP 酵素的負載量。

Fig. 6-28 為 HRP 酵素於不同 pH 值下，吸附於 SBA-15-M-48 的負載

量變化圖，由圖中可發現在比較酸的環境( $\text{pH} \leq 5.6$ )下 HRP 吸附於 SBA-15-M1-48 上有較高的負載量，推測其原因為在比較酸的環境下，HRP 所帶的正電荷的數量較多，由於吸附行為的進行是 HRP 酵素吸附到 SBA-15-M1-48 顆粒上，當 HRP 所帶的正電荷越強其吸引力越強。然而，吸附溶液的 pH 值選擇必須同時考慮到 HRP 酵素的活性，HRP 於 pH 值為 6 附近的溶液下有較佳的活性，故在 HRP 的吸附實驗所選擇的吸附溶液 pH 值為 5.6，其吸附 1 小時的負載量為  $4278.45 \mu\text{g/g}$ ，相較於 pH 6.2 下的負載量  $1931.87 \mu\text{g/g}$ ，高出 124.47 %。

	pH 4.0		pH 7.2
<b>HRP酵素的電性 (pI = 7.2)</b>	+	+	-
<b>SBA-15的電性 (pI = 4.0)</b>	+	-	-

**Fig. 6-27 HRP 酵素與 SBA-15 於不同 pH 溶液下所帶電性示意圖**

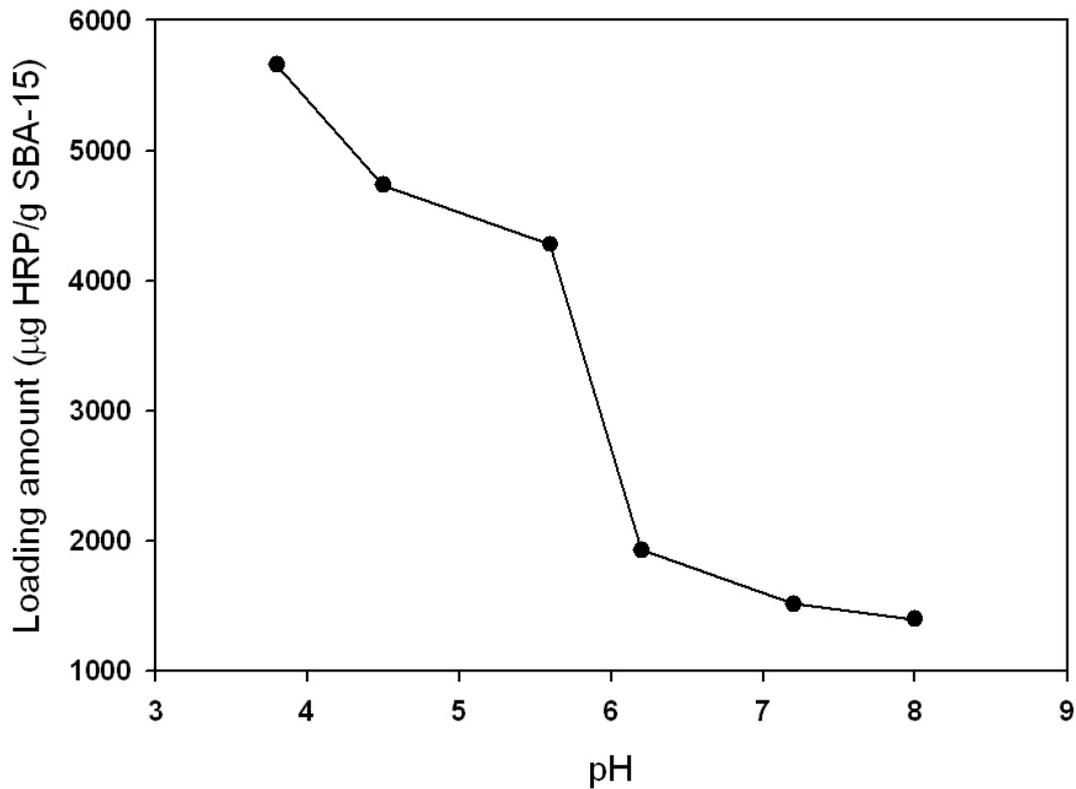


Fig. 6-28 HRP 酵素於不同 pH 值下負載量變化圖

將固定 HRP 酵素效果最佳之 SBA-15-M1-48 以初濕含浸法固定 HRP 後，使用去離子水將 SBA-15-M1-48(HRP)清洗 5 次後，以冷凍乾燥機方式粉末乾燥後，再分別使用 X 光繞射儀與氮氣等溫吸/脫附儀進行孔洞結構分析。Fig. 6-29 為 SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M1-48(HRP)之小角度 X 光散射圖譜，其中 SBA-15-M1-48(HRP)分別在  $2\theta$  角度為 0.838、1.51 與 1.73 處有散射波峰產生，其散射波峰的角度比值符合  $1:\sqrt{3}:2$  之六角排列孔

洞結構，如 Fig. 6-29 (b) 曲線所示，此分析結果與固定化前之 SBA-15-M1-48 的分析結果一致，如 Fig. 6-29(a) 曲線所示。

Fig. 6-30 為 SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M1-48(HRP) 之氮氣等溫吸/脫附分析結果。由實驗結果可看出酵素固定化前後氮氣等溫吸/脫附曲線形狀相似，唯有固定 HRP 酵素的 SBA-15-M1-48(HRP) 每克粉末所能吸附氮氣的體積比未固定酵素的 SBA-15-M1-48 小，其原因為 HRP 酵素固定於 SBA-15-M1-48 孔洞中之後，可供氮氣吸/脫附的體積減少所導致。由 Fig. 6-30 中之插圖為 SBA-15-M1-48 及 SBA-15-M1-48(HRP) 孔洞體積與孔動直徑關係圖，由圖中可發現 HRP 酵素固定後，SBA-15-M1-48 於 13 ~ 30 nm 之間的孔洞體積大為減少，顯示酵素主要是固定於壺形孔洞的內部。將 SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M1-48(HRP) 之孔洞性質分析結果整理於 Table 6-4，由表中顯示 HRP 酵素固定後之 BET 比表面積由 708.5 減少至 632.3  $\text{m}^2/\text{g}$ ，減少比例為 11.7 %；孔洞體積由 0.92 減少至 0.85  $\text{cm}^3/\text{g}$ ，減少 7.6 %；晶格參數( $a_0$ )由 12.56 略微減少至 12.16 nm，其中 SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M1-48(HRP) 之主要孔洞直徑皆為 9.2 nm 並未減少，推測其原因為 HRP 酵素固定化後，於分析之前使用去離子水徹底清洗，已將吸附於孔洞表面周圍的 HRP 去除，所以並未阻礙氮氣吸/脫附程序進行而影響孔洞直徑測定。

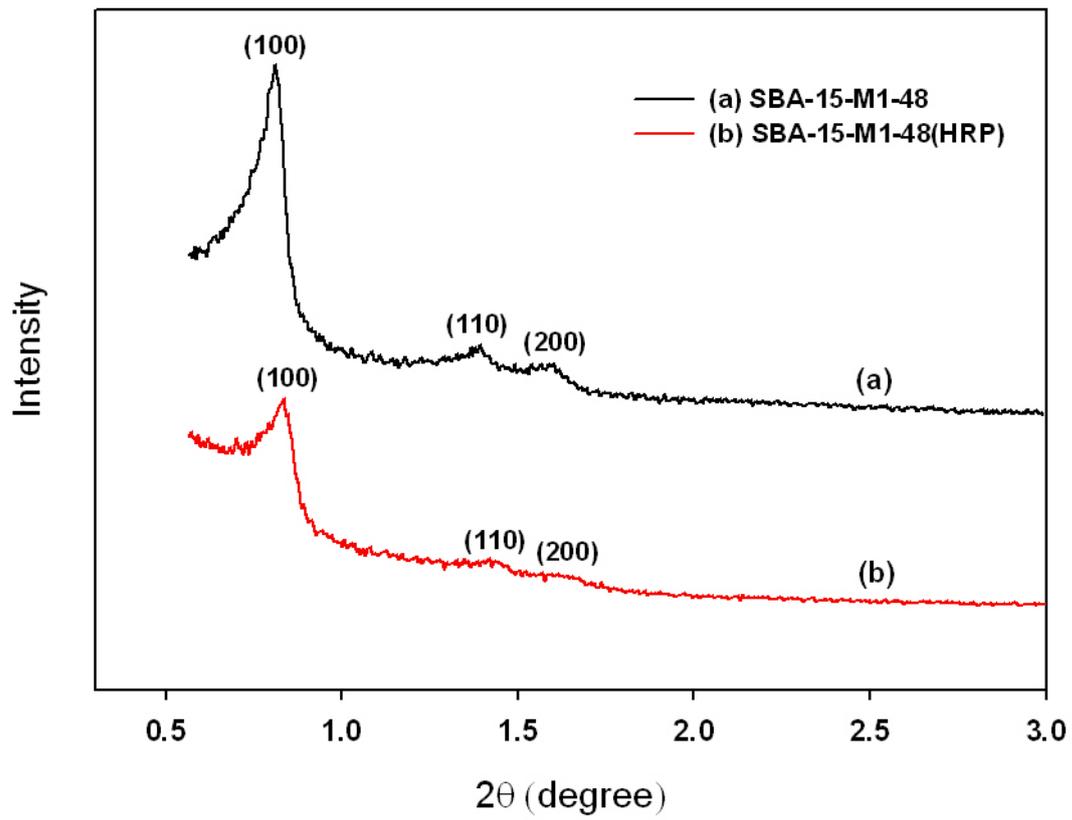


Fig. 6-29 SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M1-48(HRP)之小角度 X 光散射分析圖譜

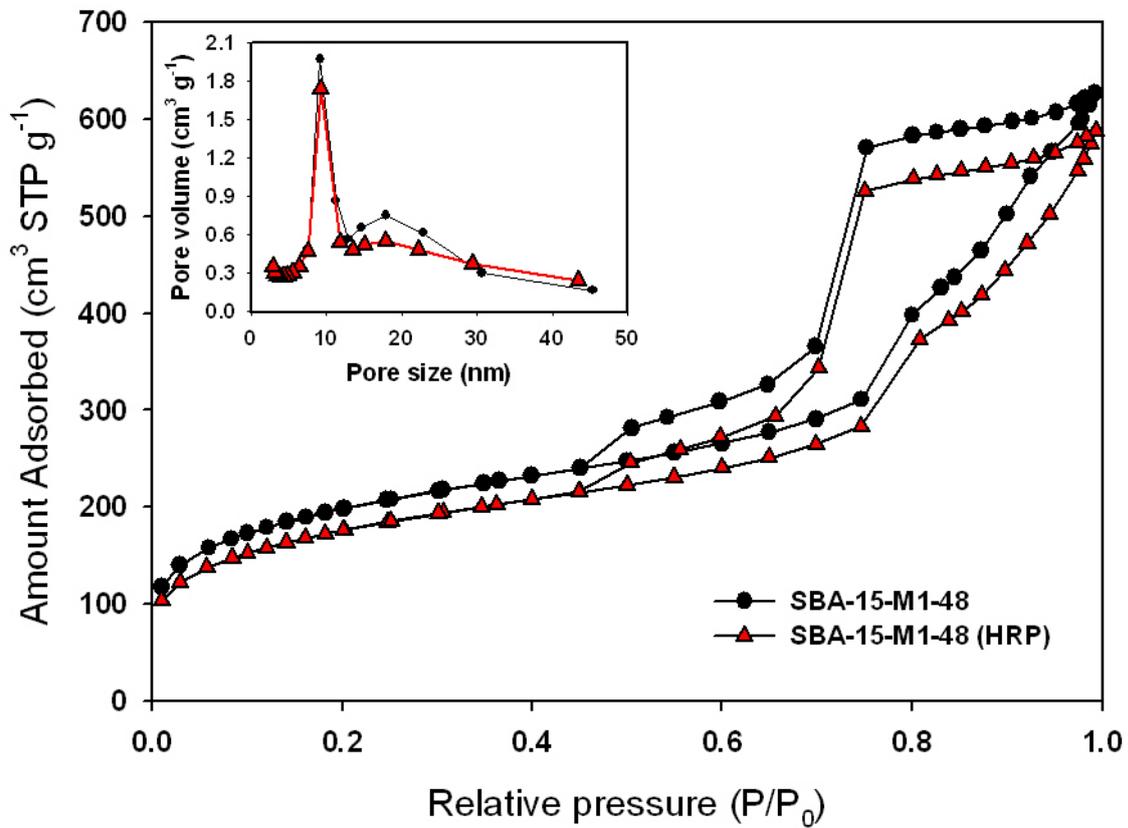


Fig. 6-30 SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M1-48(HRP)之氮氣等溫吸/脫附曲線與粒徑分佈圖

Table 6-4 SBA-15-M1-48 酵素固定化前後對孔洞特性的影響

Sample	$A_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$V_{\text{total}}$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	$a_0$ (nm)	D (nm)
SBA-15-M1-48	708.5	0.92	12.56	9.2
SBA-15-M1-48(HRP)	623.3	0.85	12.16	9.2

$A_{\text{BET}}$  : BET specific surface;  $V_{\text{total}}$  : total pore volume;  $a_0$  : lattice parameter; D : pore diameter.

### 6.3.2.3 GA-/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之性質分析

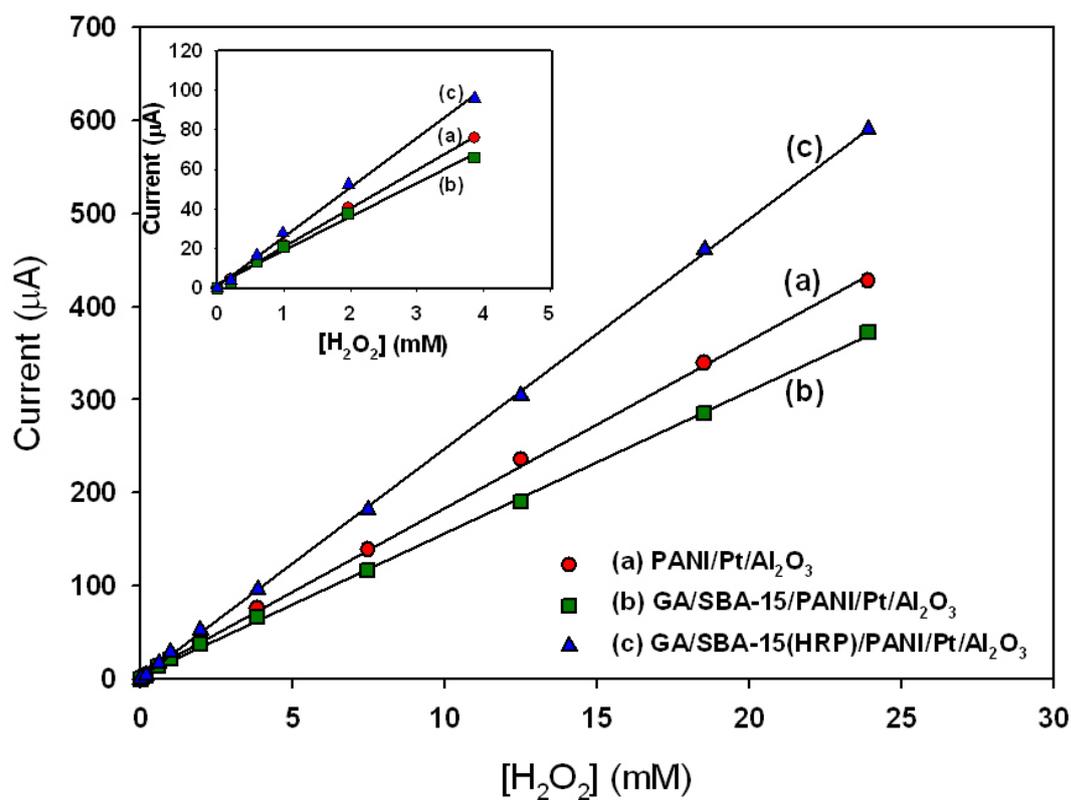
於本小節中，進一步分別將 SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M1-48(HRP) 粒子結合 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極製備成為 GA/SBA-15/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極進行過氧化氫感測，電極之製備程序如 6.2.3 小節中所述。另外，為了比較皆含有 GA 之電極的感測特性，同時製備了亦澆注 GA 之 GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極。

Fig. 6-31 為使用 GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、GA/SBA-15/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測不同濃度過氧化氫之還原波峰電流與過氧化氫濃度關係圖，於 Fig. 6-31 中直線(a)可發現澆注 GA 之 GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫的靈敏度為 18.54  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，其值小於 5.3.1.5 小節中的 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫的靈敏度 29.12  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，推測原因為於 PANI 膜表面澆注的 GA 乾掉後會形成一層薄膜覆蓋於電極表面，如 Fig. 6-32 (a)之 GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極表面 SEM 圖所示，導致 PANI 的電活性面積減少所造成。

使用 GA/SBA-15/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測相同濃度過氧化氫之還原波峰電流值比 GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的還原波峰電流小，如 Fig. 6-31 中直線(b)所示，其靈敏度減少為 15.04  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，由 Fig. 6-32(c)可看出 GA/SBA-15/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極表面覆蓋上一層 GA 與 SBA-15 所形成的膜，PANI 膜上所覆蓋之 SBA-15 增加過氧化氫的質傳阻力，而使得位於

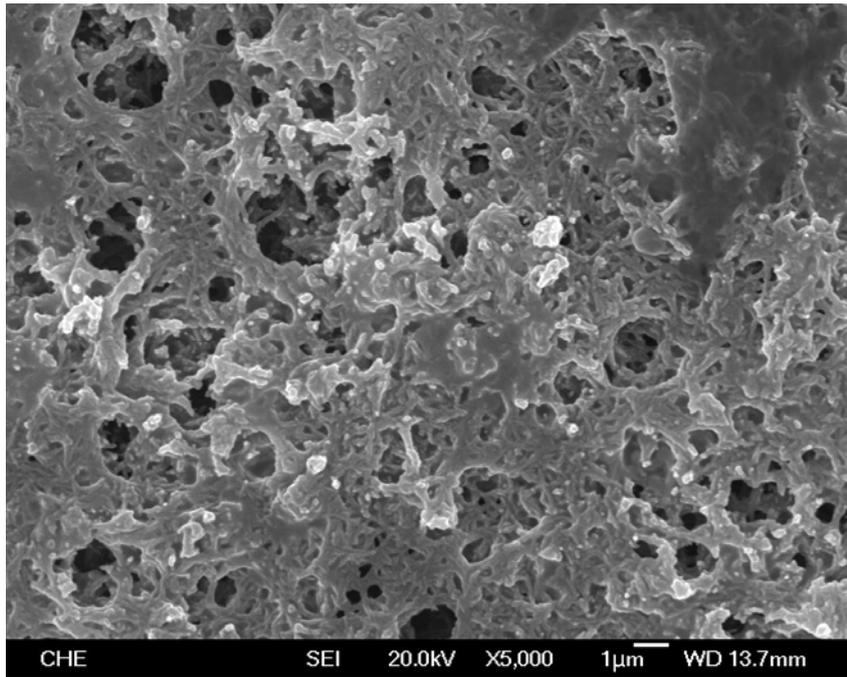
下層之 PANI 膜感測過氧化氫的靈敏度降低。

當使用固定 HRP 酵素之 SBA-15-M1-48(HRP) 所製備的 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫，其電極表面形態如 Fig. 6-32(d)之 SEM 圖所示。於相同的濃度下的還原波峰電流相較於 GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA/SBA-15/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極增加，如 Fig. 6-31 直線(c)所示，其感測靈敏度為 25.05  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，分別比 GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA/SBA-15/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的靈敏度增加了 35.11 %與 66.56 %。此實驗結果與文獻所驗證，當酵素固定於有秩序性排列之奈米尺寸孔洞中，緊鄰的酵素氧化還原活性中心於電極上可扮演電流奈米集電器 (nanocollector) 的角色，而增加感測靈敏度的結果一致。(Budny et al. 2006; Dai et al. 2008; Fattakhova-Rohlfing et al. 2005; Walcarius 2005; Xiao et al. 2003)。

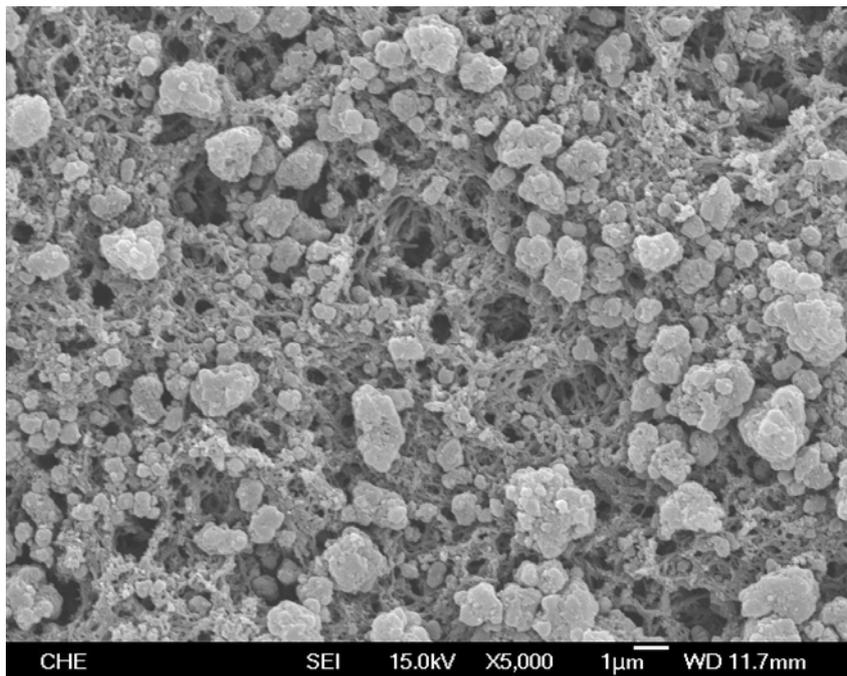


**Fig. 6-31** 使用(a) GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、(b) GA/SBA-15/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及(c) GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫之感測電流與過氧化氫濃度關係圖

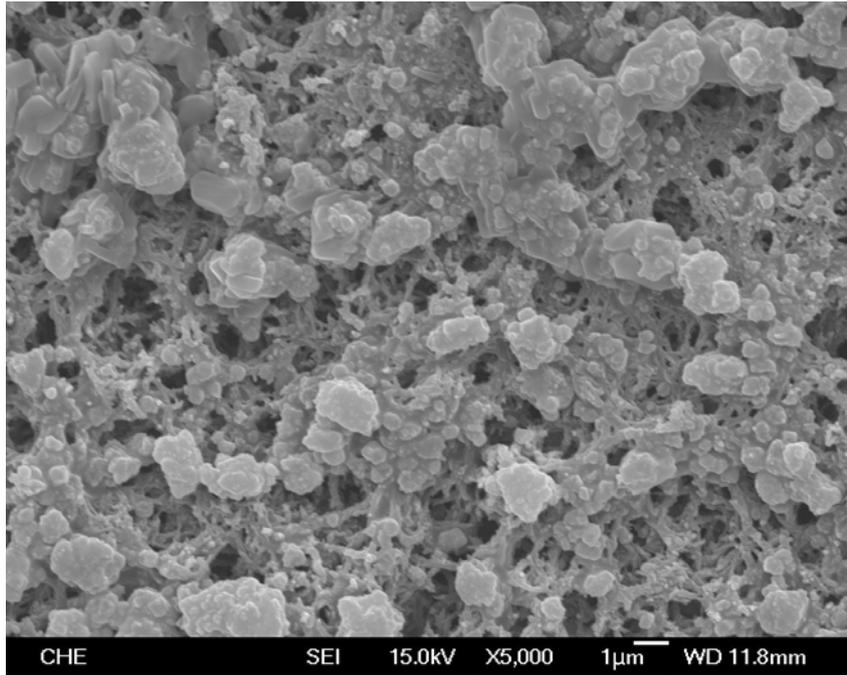
Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, GA/SBA-15-M1-48/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and GA/SBA-15-M1-48(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrodes, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C



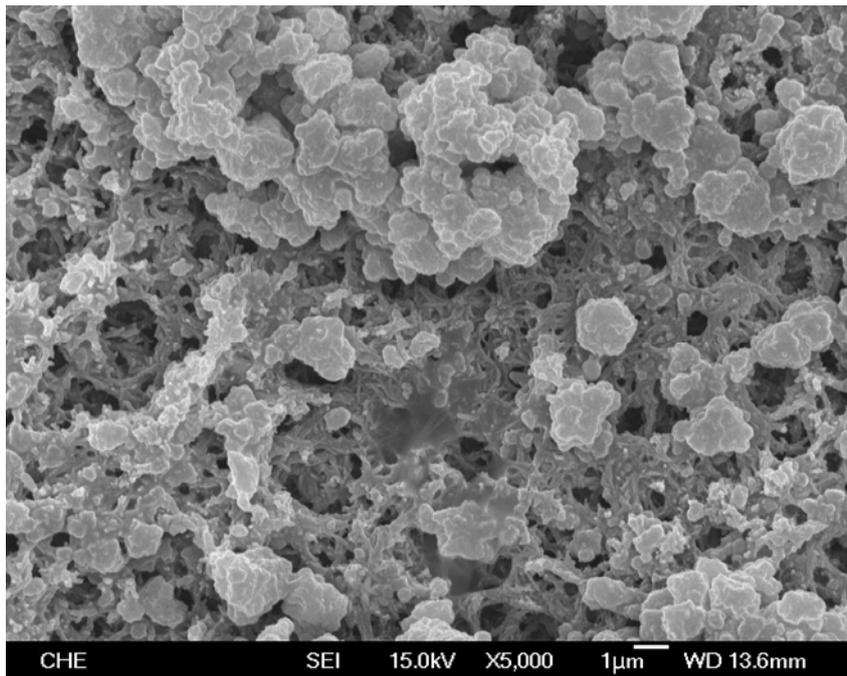
**(a)**



**(b)**



(c)



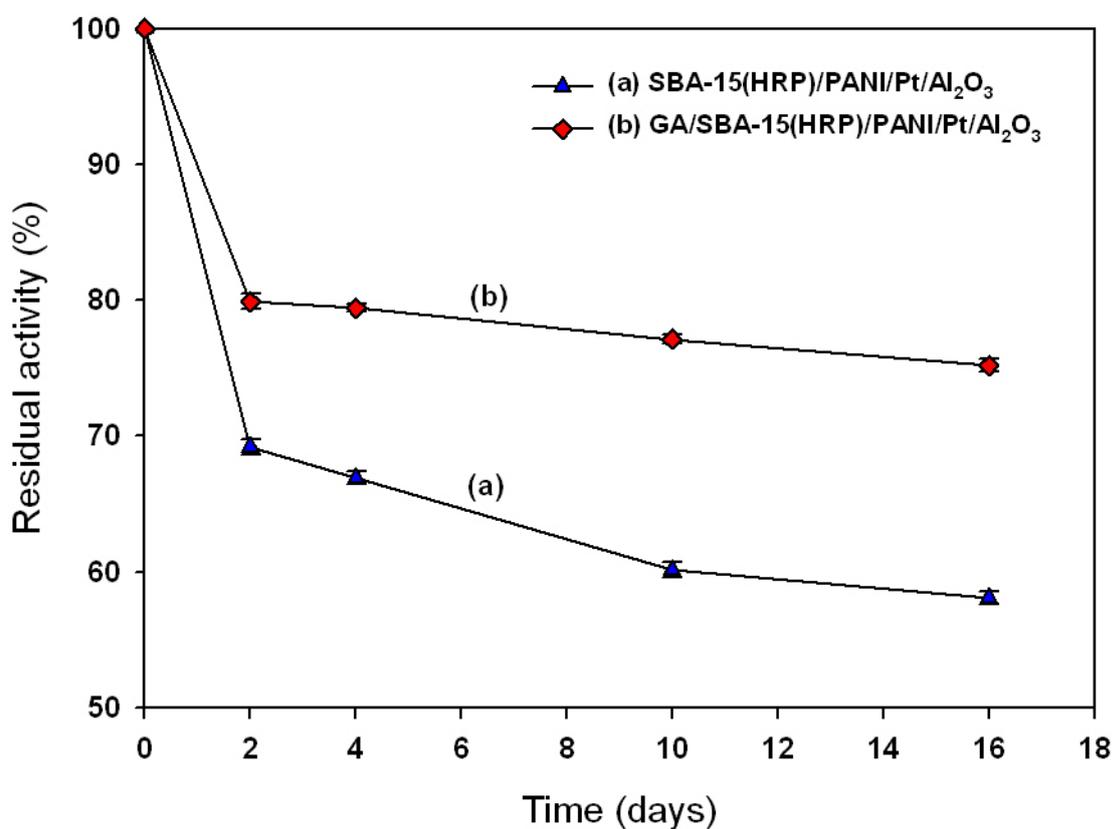
(d)

**Fig. 6-32** 不同電極表面之 SEM 圖 (a) GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、(b) SBA-15/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、(c) GA/SBA-15/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與(d) GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極

#### 6.3.2.4 GA-/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極之穩定性探討

於 GA-/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極製備過程中，待澆注於電極表面之 SBA-15-M1-48(HRP)粉末乾燥後再澆注 20  $\mu$ l 濃度為 2.5 (v/v %)之 GA 溶液於電極表面，希望借助 GA 乾燥後所形成的薄膜增加 SBA-15-M1-48(HRP)粉末固定於 PANI 膜上的穩定性，扮演黏著劑(binder)的角色。為了測試澆注 GA 之電極穩定性是否增加，於此小節中分別製備了未澆注 GA 之 SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極與澆注 GA 之 GA-/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，於 16 天內多次感測濃度為 1.96 mM 過氧化氫，其實驗結果如 Fig. 6-33 所示。將每次的感測電流值除以第一次感測之電流值所得的比值，定義為剩餘活性(Residual activity)，由結果中可發現未澆注 GA 之 SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極在第 2 天進行感測之剩餘活性為 69.2 %，於第 16 天感測的剩餘活性下降至 58.1 %，如 Fig. 6-33 中之曲線(a)所示。

在 GA-/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的穩定性測試部份，由 Fig. 6-33 中之曲線(b)可看出在第 2 天進行感測時其剩餘活性為 79.9 %，於第 16 天時感測的剩餘活性仍然保有 75.2 %，相較於 SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於 16 天感測的剩餘活性 58.1 %高出 21.8 %，由此實驗結果顯示澆注 GA 於 SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上，當作黏著劑使用，有助於電極的穩定性。



**Fig. 6-33 使用 SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測 1.96 mM 過氧化氫之剩餘活性與保存天數之關係**

Condition for sensing: W.E.: SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrodes, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

## 6.4 小結

1. 於 SBA-15 合成部份，以擴孔劑添加量為界面活性劑(P123)重量的 10%、熟成時間為 48 小時所製備的 SBA-15-M1-48，經氮氣等溫吸/脫儀分析，其主要孔徑 9.2 nm，BET 表面積分別為  $708.5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ，孔洞體積為  $0.92 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 。使用初濕含浸法於 pH 5.6 下進行含浸吸附 1 小時具有最佳酵素負載量，每克 SBA-15-M1-48 對於 HRP 酵素的負載量高達  $4278.45 \text{ } \mu\text{g/g}$ 。
2. 以 SBA-15 為 HRP 酵素載體所製備的 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，其感測過氧化氫的靈敏度為  $25.05 \text{ } \mu\text{A mM}^{-1}$ ，歷經 16 天期間 15 次感測 1.96 mM 過氧化氫，於第 16 天進行感測的剩餘活性百分比為 75.2%，相較於 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的 40.5 % 高出了 34.7%，其結果顯示以 SBA-15 為載體固定 HRP 酵素對於穩定度有顯著提昇。

## 第七章 探討過氧化氫感測過程中溶氧的影響

### 7.1 研究目的

水、過氧化氫與氧的氧化還原關係式如(7-1)所示，過氧化氫可氧化成氧也可還原成水。當藉由電化學式感測器感測過氧化氫於電極上還原成水的還原電流來檢測過氧化氫濃度時，若感測的溶液或樣品中含有溶氧時，亦可能也在電極上進行還原反應，其還原所產生的電流會影響到感測過氧化氫濃度的準確性。



在感測過氧化氫之前必須將感測所使用的緩衝溶液以高純度氮氣曝氣將溶氧去除，然而欲感測的樣品中過氧化氫的濃度通常都極低，若也使用高純度氮氣曝氣將會影響到樣品中的過氧化氫濃度。在本章節中將探討溶氧在 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上的還原特性，並且探討在感測溶液中添加除氧劑來去除溶氧干擾的可能性。

## 7.2 實驗方法與程序

### 7.2.1 溶氧感測性質測定

1. 實驗前分別取 35 ml 之磷酸鹽緩衝溶液(0.1 M, pH 6.2)通入高純度氮氣與高純度氧氣各 40 分鐘，配製無溶氧與飽和溶氧之磷酸鹽緩衝溶液。
2. 量取 6 ml 無溶氧之磷酸鹽緩衝溶液置於  $25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  水浴中恆溫，並於溶液表面持續通入高純度氮氣。
3. 分別以 4.2.5 小節中所製備完成之 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極與 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極為工作電極，置於步驟 2. 中所述之磷酸鹽緩衝溶液中，使用白金絲為相對電極，Ag/AgCl(3M NaCl) 為參考電極，並將其如 Fig.4-4 所示完成感測系統裝置，利用循環伏安(CV)法掃瞄並記錄其各個電位下之應答電流，CV 法感測條件之掃瞄電位範圍： $-0.6 \sim 0.4 \text{ V}$  (vs. Ag/AgCl(3MNaCl))，掃瞄速率為  $20 \text{ mVs}^{-1}$ 。
4. 將步驟 1. 中所配製含有飽和溶氧之磷酸鹽緩衝溶液，並依序取適量加入感測系統中，調配出不同濃度之溶氧溶液進行感測。

## 7.3 實驗結果與討論

### 7.3.1 探討過氧化氫感測過程中溶氧的影響

此章節中將使用 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極探討溶氧及過氧化氫於此兩種電極上之感測行為比較。

#### 7.3.1.1 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極部份

文獻中過氧化的感測方式也被使用量測於電位+0.6 V (vs. SCE) 下的氧化電流值(Tian and Zhu 2002)，然而使用將過氧化氫氧化成氧的感測方式，由於過氧化氫於電極上的氧化通常在比較高的電位下進行，容易會引發感測溶液中例如：維他命 C (ascorbic acid)、尿酸 (uric acid)與乙醯氨酚 (acetaminophen)等較易氧化物質的氧化，而干擾過氧化氫的感測(Dai et al. 2008)，干擾的情形為使用氧化的方式感測過氧化氫的最大缺點。

於此小節中嘗試使用氧化的方式感測過氧化氫。Fig. 7-1(a)為不同濃度過氧化氫於 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上感測之循環伏安圖，在-0.6 ~ +0.6 V 之掃瞄電位範圍下，分別於+0.5 V 與+0.1 ~ +0.2 V 附近有一對氧化還原波峰產生，於+0.5 V 位置之氧化波峰為過氧化氫氧化成氧之反應所產生，其反應式如(7-2)式所示：



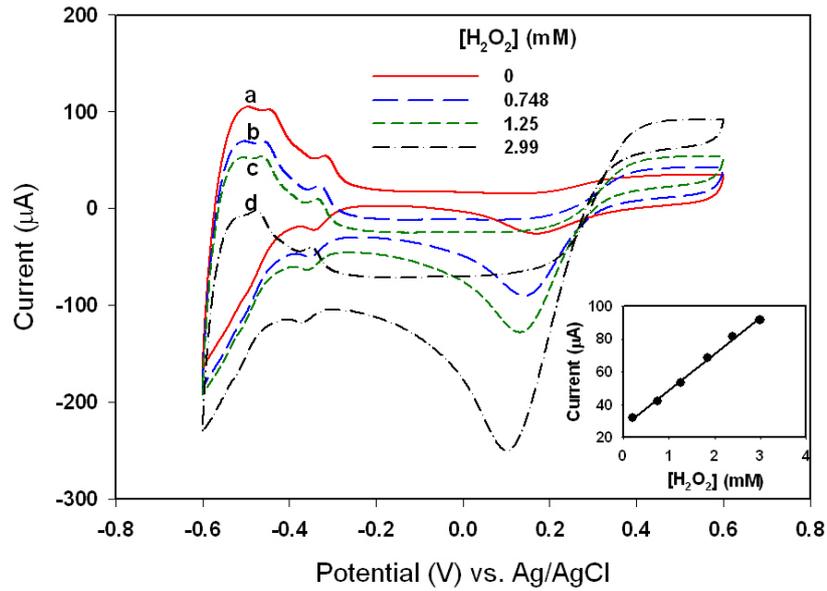
實驗中依序感測 0, 0.748, 1.25, 2.99 mM 之過氧化氫濃度，於+0.5 V 處之氧化波峰電流值隨之增加，將氧化電流值對過氧化氫濃度作圖，如 Fig. 7-1(a)中插圖所示，在 0 ~ 2.5 mM 的感測濃度範圍下，其感測靈敏度為 22.15  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，相關係數( $R^2$ )為 0.996。另外，於+0.1 ~ +0.2 V 附近之還原波峰可能伴隨著由過氧化氫氧化產生之氧的還原與溶液中剩餘之過氧化氫還原之結果。Fig. 7-1(b)為使用相同之 Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  電極於相同之掃瞄電位範圍下，感測溶液中之溶氧之循環伏安圖，由圖中可發現，當溶液中溶氧濃度增加時，電壓位於+0.5 V 處並沒有氧化波峰產生；然而於+0.2 V 附近有明顯之還原波峰產生，此波峰推論為溶氧經由 4 個電子的轉移，還原成水之反應所造成，其反應式如(7-3)式所示(Fischer and Heitbaum 1980)：



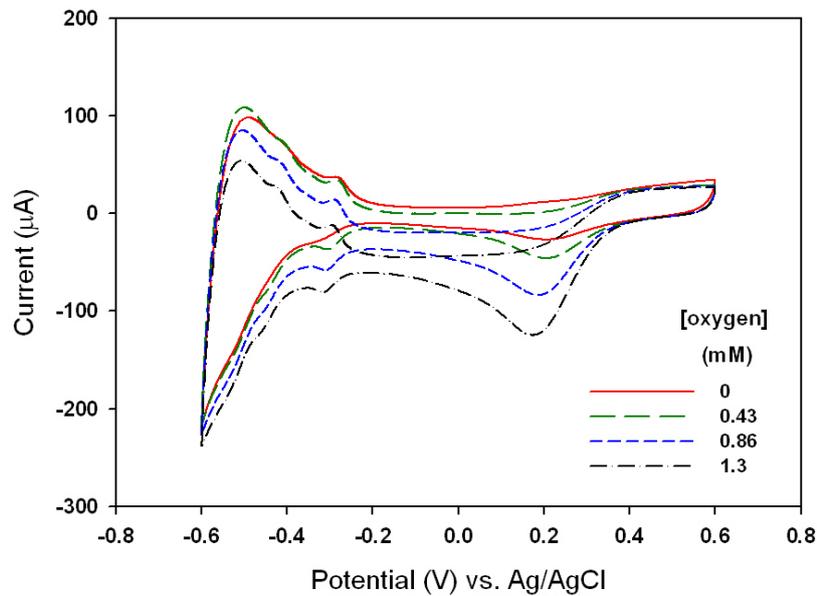
實驗中所感測之溶氧濃度依序為 0, 0.43, 0.86, 1.3 mM，由結果得知當溶氧濃度增加時，其還原電流值隨之增加。

為了進一步分辨 Fig. 7-1(a)中，電壓範圍於+0.1 ~ +0.2 V 附近之還原波峰是否為過氧化氫伴隨著溶氧於 Pt 電極上進行還原反應之波峰，在相同的感測條件下，將掃瞄電壓範圍改變為-0.6 ~ +0.4 V，避免於+0.5 V 電壓附近，過氧化氫氧化成氧，造成感測的干擾，其實驗結果如 Fig. 7-2 所示。由圖中可發現當掃瞄電位範圍縮減至-0.6 ~ +0.4 V 時，於 Fig. 7-2(a)

中，感測過氧化氫時，未於+0.5 V 電壓處產生氧化電流，同時其未於+0.2 V 處，在去除溶氧影響後其還原波峰電流值也伴隨著減少。在比較同樣使用 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與感測過氧化氫之 Fig. 7-2(a)與感測溶氧之 Fig. 7-2 (b)圖，可發現兩者之還原波峰皆未於+0.2 V 電壓附近，這樣的結果使得當使用 Pt 電極感測過氧化氫時，溶液中的溶氧將對於感測之還原電流造成干擾。



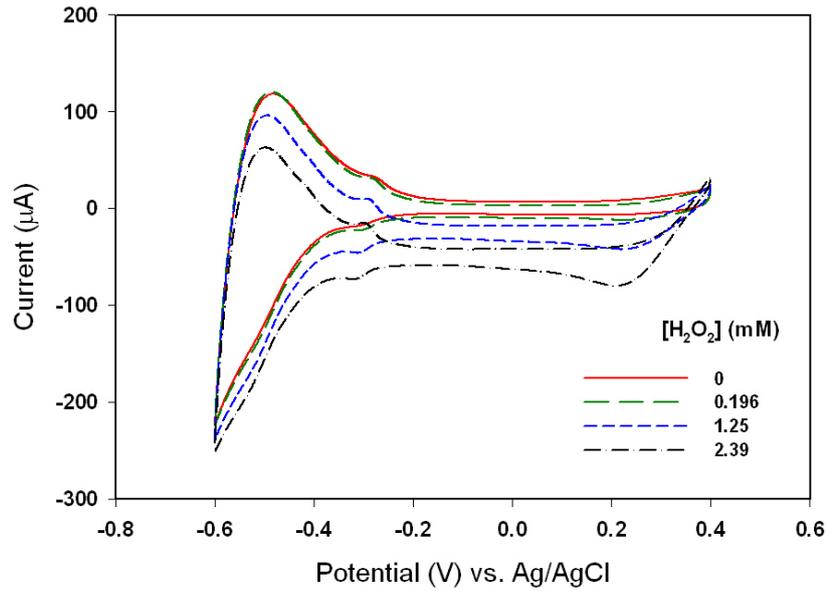
(a)



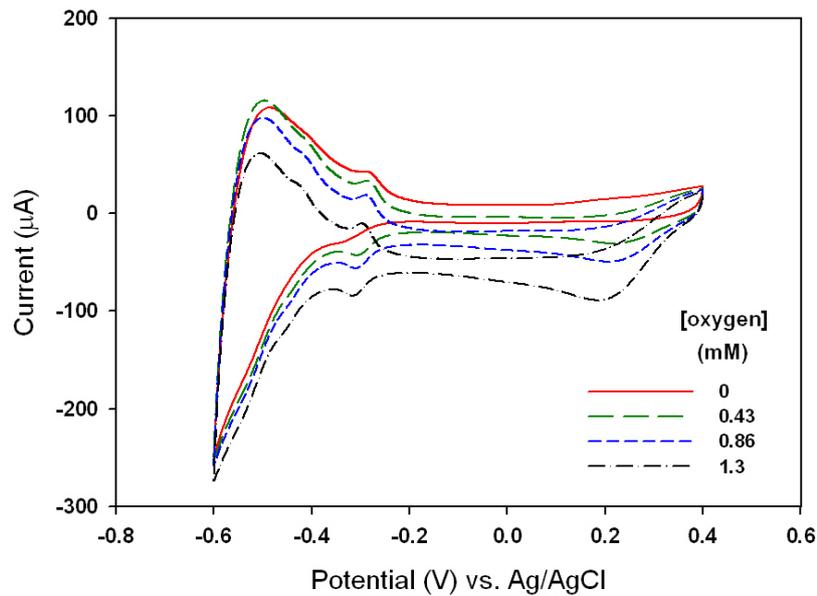
(b)

Fig. 7-1 使用 Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  電極於 -0.6 ~ 0.6 V 掃瞄電位下感測不同濃度之過氧化氫(a)與溶氧(b)之循環伏安圖

Condition for sensing: W.E.: Pt/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.6 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.



(a)



(b)

**Fig. 7-2 使用 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於-0.6 ~ 0.4 V 掃瞄電位下感測不同濃度之過氧化氫(a)與溶氧(b)之循環伏安圖**

Condition for sensing: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

### 7.3.1.2 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極部份

於此小節中，探討使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫時，感測溶液中溶氧的影響。

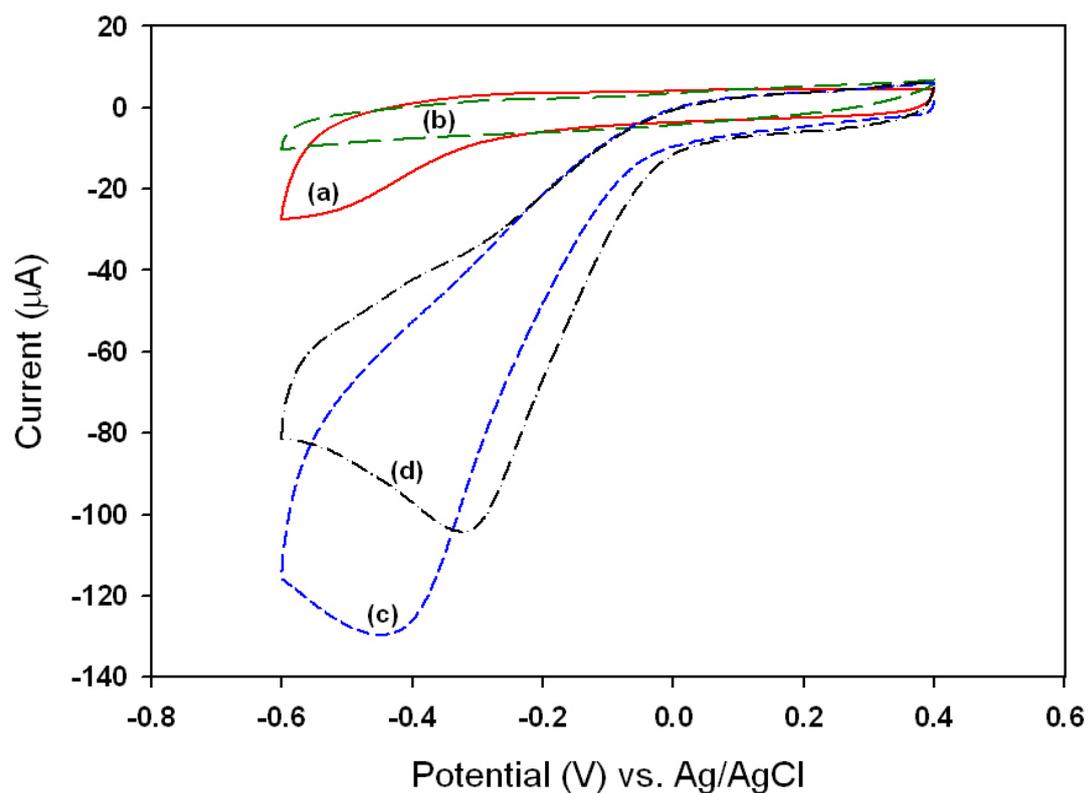
Fig. 7-3 為使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，探討溶氧於電極上進行還原反應之循環伏安圖。圖中曲線(a)為 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於使用高純度氮氣去氧之 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.2)中，以循環伏安法掃瞄至穩定後，接著於溶液中通入高純度氧氣 30 分鐘後，再於溶液中通入高純度氮氣 30 分鐘後，用循環伏安法掃瞄之第一圈循環伏安圖，於圖中可觀察到曲線(a)在電位介於-0.4 ~ -0.6 V 產生一個 PANI 受到氧氣氧化後的還原波峰(此波峰為 PANI 本身的還原波峰)；曲線(b)為掃瞄五圈後達到穩定之循環伏安圖，當掃瞄至穩定後，PANI 的還原波峰隨即消失。Fig. 7-3 曲線(c)為與曲線(b)相同的感測緩衝溶液中，緊接著再次通入高純度氧氣 30 分鐘後，進行循環伏安掃瞄之第一圈循環伏安圖，曲線(d)為掃瞄五圈後達到穩定之循環伏安圖。曲線(c)於電位-0.45 V 處有一溶氧還原成過氧化氫之還原波峰產生，其可能的反應式如(7-4)式所示：



當溶氧於 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上還原成過氧化氫，電極表面所產生之過氧化氫，於後續圈數的掃瞄中，過氧化氫將進一步被還原成水，其還原

波峰如圖中曲線(d)中-0.32 V 電位處所示。

於 Fig. 7-3 的實驗結果中，比較了受到溶氧氧化之 PANI 膜所進行還原反應的波峰(a)、溶氧於 PANI 膜上所進行還原反應的波峰(c)及反應所產生之過氧化氫於 PANI 膜上之還原波峰(d)之還原電位差異。

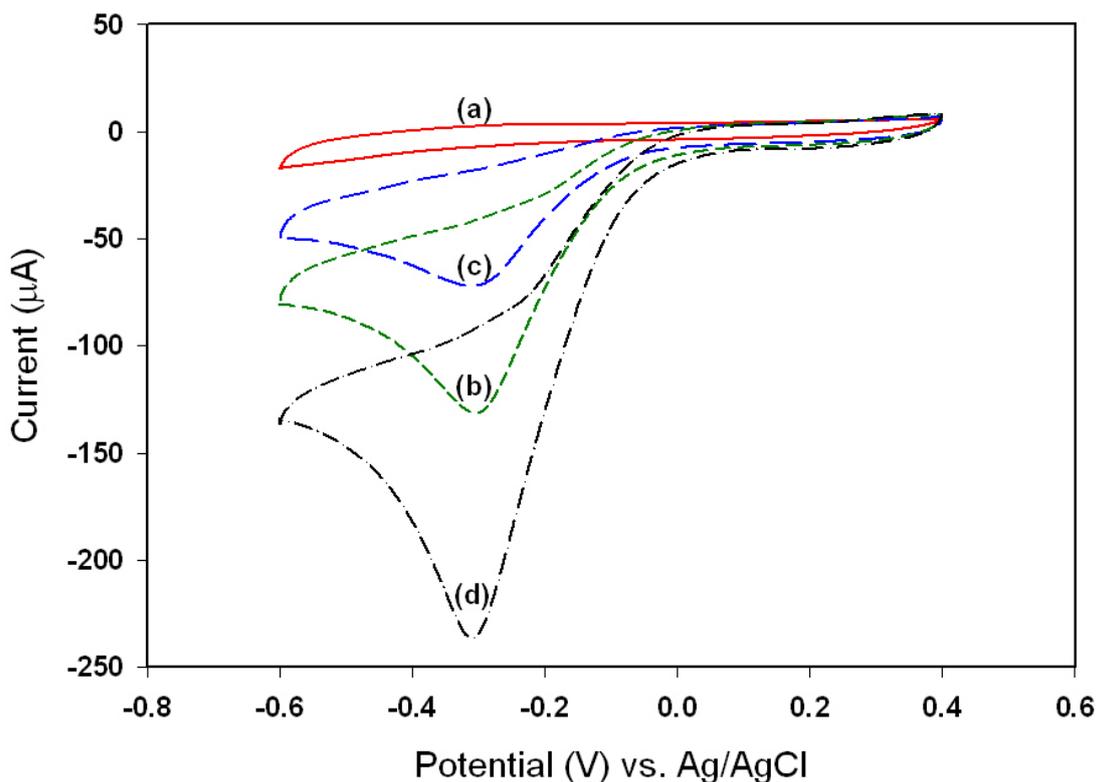


**Fig. 7-3** 使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測溶液中溶氧之循環伏安圖

Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, temperature: 25±0.5 °C.

Fig. 7-4 為使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極以 CV 法感測過氧化氫之循環伏安圖，圖中曲線(a)為 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於感測前以高純度氮氣去除溶氧的 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.2)中掃瞄之背景電流。曲線(b)為使用相同電極於未去除溶氧且含有過氧化氫濃度為 2.39 mM 之 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.2)中感測之還原波峰，於感測後接著使用高純度氮氣緩慢通入感測溶液中 10 分鐘，去除溶液中大部份溶氧後，再次以相同的感測條件進行 CV 掃瞄，曲線(c)掃瞄所得之過氧化氫於 PANI 膜上的還原波峰，其波峰電流值由去除溶氧前曲線(b)之 131.3  $\mu$ A，減少到去除溶氧後曲線(c)之 72.1  $\mu$ A，且波峰電位皆位於-0.31 V 處。再曲線(c)之感測完成後，於感測溶液中緩慢通入高純度氧氣 10 分鐘，使溶液中之溶氧達到飽和，再次以相同的感測條件進行 CV 掃瞄，其結果如 Fig. 7-4 中之曲線(d)所示，於-0.31 V 之相同電位下，波峰電流值增加至 235.7  $\mu$ A，由以上結果顯示，於溶液中所通入的氧氣於掃瞄的過程當中已經於 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極上還原成過氧化氫，使用於-0.31V 處之過氧化氫還原電流值增加。

當溶液中有溶氧存在時，會增加過氧化氫的還原電流值而高估了過氧化氫的濃度，影響感測結果之準確性。因此於此部份後續研究，將試著找尋適合之除氧劑添加於感測溶液中，以去除溶液中自然存在之溶氧，方便往後感測不適合以高純度氮氣曝氣去除溶氧之樣品使用。



**Fig. 7-4 使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於 2.39 mM 過氧化氫溶液中感測不同含量溶氧之循環伏安圖**

(a) 感測溶液中不含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與 O<sub>2</sub>；(b) 感測溶液中含 2.39 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與少量 O<sub>2</sub>；(c) 感測溶液中含 2.39 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與微量 O<sub>2</sub>；(d) 感測溶液中含 2.39 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與大量 O<sub>2</sub>

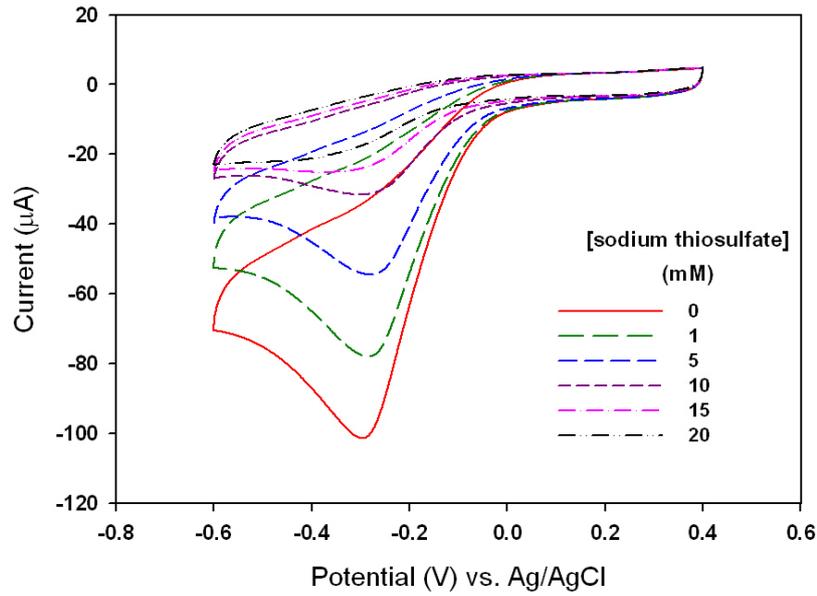
Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

### 7.3.2 探討添加除氧劑之除氧效果及對於過氧化氫感測的影響

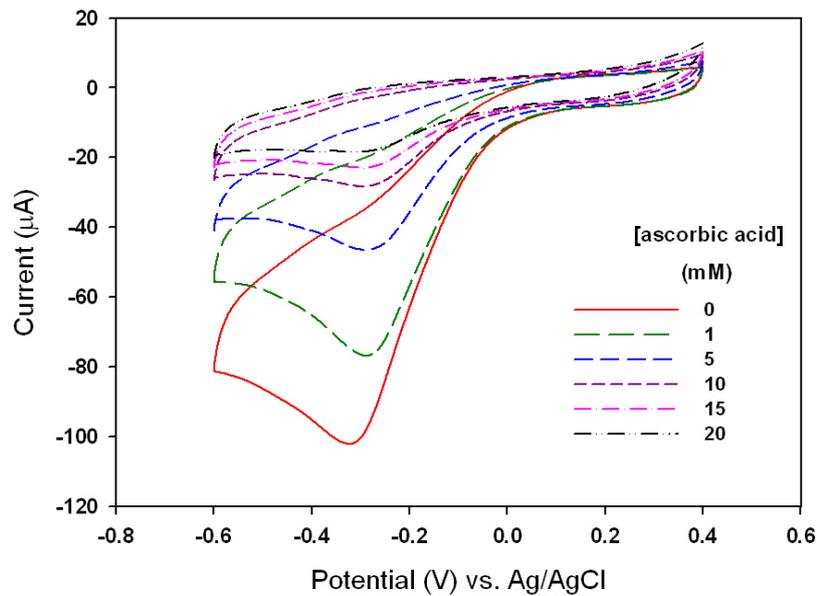
於此小節中將探討除氧劑的最佳添加量，並比較兩種除氧劑對於過氧化氫感測的影響。去除溶液中的溶氧最常使用的方法為在溶液中通入高純度的氮氣，藉由氮氣在溶液中的濃度提高，將溶氧去除。然而，在含有微量的過氧化氫濃度的樣品中，因過氧化氫本身的不穩定性，若使用氮氣曝氣的方法進行溶氧去除，將會影響過氧化氫的濃度。

為了克服此問題，在本研究中探討了添加除氧劑去除溶氧的可行性，實驗使用硫代硫酸鈉 (sodium thiosulfate) 與維他命 C (ascorbic acid) 兩種除氧劑進行溶氧去除。Fig. 7-5 (a) 與 (b) 為使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於感測系統中分別添加硫代硫酸鈉與維他命 C 去除溶氧之循環伏安圖。實驗前分別於磷酸鹽緩衝液中通入高純度氧氣 30 分鐘，使溶液中的溶氧濃度達到飽和，再分別加入不同濃度的硫代硫酸鈉與維他命 C 將溶氧去除。由 Fig. 7-5 (a) 添加硫代硫酸鈉之實驗結果可看出，在未添加硫代硫酸鈉時，PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測溶氧之還原波峰於電位 -0.29 (V) 處產生 101.3  $\mu$ A 之還原電流，隨著硫代硫酸鈉添加量增加，還原電流隨之減小，當硫代硫酸鈉添加濃度為 5 mM 其還原波峰電流減少至 54.8  $\mu$ A，相較於未添加時之還原波峰電流減少了 46%，當硫代硫酸鈉添加濃度增加至 10 mM 其還原波峰電流為 31.5  $\mu$ A，相較於未添加時之還原波峰電流減少了 69%。於 Fig. 7-5 (b) 添加維他命 C 亦可得到相似之實驗結果，隨著維他命 C 添加量

增加，還原電流亦隨之減小，當維他命 C 添加濃度為 5 mM 其還原波峰電流減少至 46.5  $\mu\text{A}$ ，相較於未添加時之還原波峰電流減少了 54 %，當維他命 C 添加濃度增加至 10 mM 其還原波峰電流為 28.3  $\mu\text{A}$ ，相較於未添加時之還原波峰電流減少了 72 %。由此實驗結果可得知，無論是添加硫代硫酸鈉或維他命 C 於感測溶液中，皆可有效去除溶液中的溶氧。



(a)

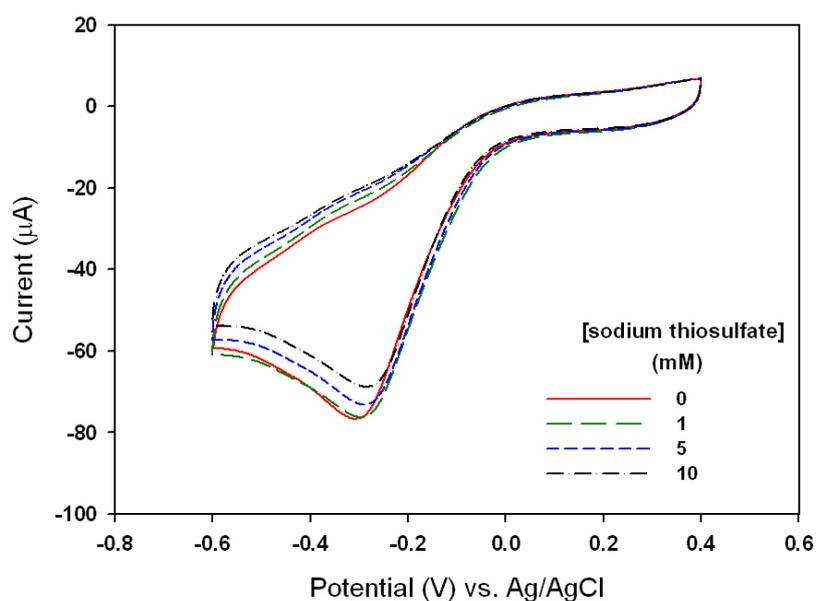


(b)

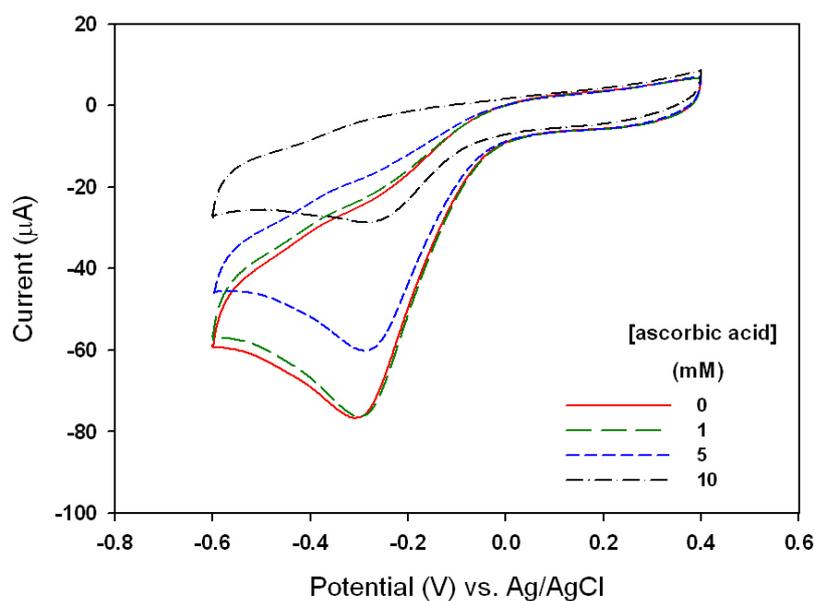
**Fig. 7-5** 添加不同濃度硫代硫酸鈉(a) 與維他命C(b)對於PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測溶氧影響之循環伏安圖

Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

除氧劑硫代硫酸鈉與維他命C皆為還原劑，若添加於過氧化氫的感測系統中，可能會與屬於氧化劑的過氧化氫產生氧化還原反應。因此，以下實驗中，將進一步探討硫代硫酸鈉與維他命C對於過氧化氫感測的影響。Fig. 7-6 (a)與(b)分別為使用PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極感測2.39 mM 過氧化氫時，於感測溶液中添加不同濃度之硫代硫酸鈉與維他命C之循環伏安圖。由圖可得知，當除氧劑添加濃度低於1 mM時，無論是硫代硫酸鈉與維他命C皆不會對於PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極感測過氧化氫造成影響。當除氧劑添加濃度為5 mM時，對於過氧化氫感測之還原電流的影響，添加硫代硫酸鈉的感測系統中，減少了4.5 %的電流值；添加維他命C的感測系統中，減少了22 %的感測電流值。當除氧劑添加濃度達10 mM時，添加維他命C對於過氧化氫的感測電流減少高達63 %，添加硫代硫酸鈉的感測系統中，過氧化氫的還原電流只減少了10 %，添加硫代硫酸鈉相較於維他命於感測系統中，對於過氧化氫的感測有較小的影響。



(a)



(b)

**Fig. 7-6 添加不同濃度硫代硫酸鈉(a) 與維他命C(b)對於PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測2.39 mM過氧化氫影響之循環伏安圖**

Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C

## 7.4 小結

溶氧影響的探討結果可得知，溶液中的溶氧在電極上的還原電位與過氧化氫的還原電位相近，對於過氧化氫的感測有顯著影響。添加硫代硫酸鈉或維他命 C 皆可有效去除溶液中的溶氧。當硫代硫酸鈉添加量小於 1 mM 時可在不影響過氧化氫的感測下有效減少溶氧的干擾。

## 第八章 綜合討論

### 8.1 探討 HRP 酵素對於過氧化氫感測電流的貢獻

使用電化學式感測器感測過氧化氫的方式可經由氧化反應，將過氧化氫氧化成氧，透過偵測反應過程中所產生的氧化電流值，來得知過氧化氫濃度。然而，使用氧化的方式感測過氧化氫，容易因電極產生氧氣而干擾感測的準確性，並且過氧會使得過氧化氫的感測濃度範圍受到限制。

另一種電化學式過氧化氫感測方式為透過還原反應，將過氧化氫還原成水，偵測於反應過程中所產生的還原電流值，可得知過氧化氫濃度與感測電流的關係，使用還原的方式感測過氧化氫，可減少電極上氧的干擾現象產生。

本研究中將使用還原方式感測過氧化氫。首先，於 Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極表面修飾導電性高分子 PANI，可有效減少感測的背景電流，降低感測過程中雜訊影響。另一方面，由於多孔性纖維結構之 PANI 具有高電極活性表面積，可提高感測的靈敏度。進一步再於 PANI 膜表面固定 HRP 酵素，經由酵素的專一性反應特性，可增加感測的選擇性與靈敏度。

Fig. 8-1 為分別使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極於 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.2)中，感測 2.39 mM 的過氧化氫之循環伏安圖。圖中曲線(a)為 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測之循環伏安曲線，可發現於-0.303 V 處有一還原波峰產生，其還原波峰電流為 72.02  $\mu$ A，此波

峰為過氧化氫於 PANI 表面進行還原反應所產生，其反應式如下所示：

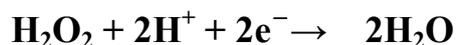
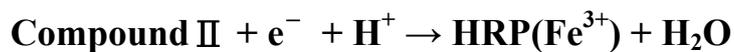
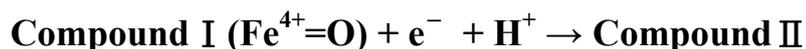


Fig. 8-1 中曲線(b)為 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測 2.39 mM 過氧化氫之循環伏安曲線，可發現於-0.315 V 處有一顯著還原波峰，其還原波峰電流為 94.55 μA，此還原波峰電流為過氧化氫於 PANI 表面進行還原反應所產生之電流加上過氧化氫與 HRP 酵素反應所產生的電流，過氧化氫與 HRP 酵素的反應式如下所示(Ruzgas et al. 1996)：

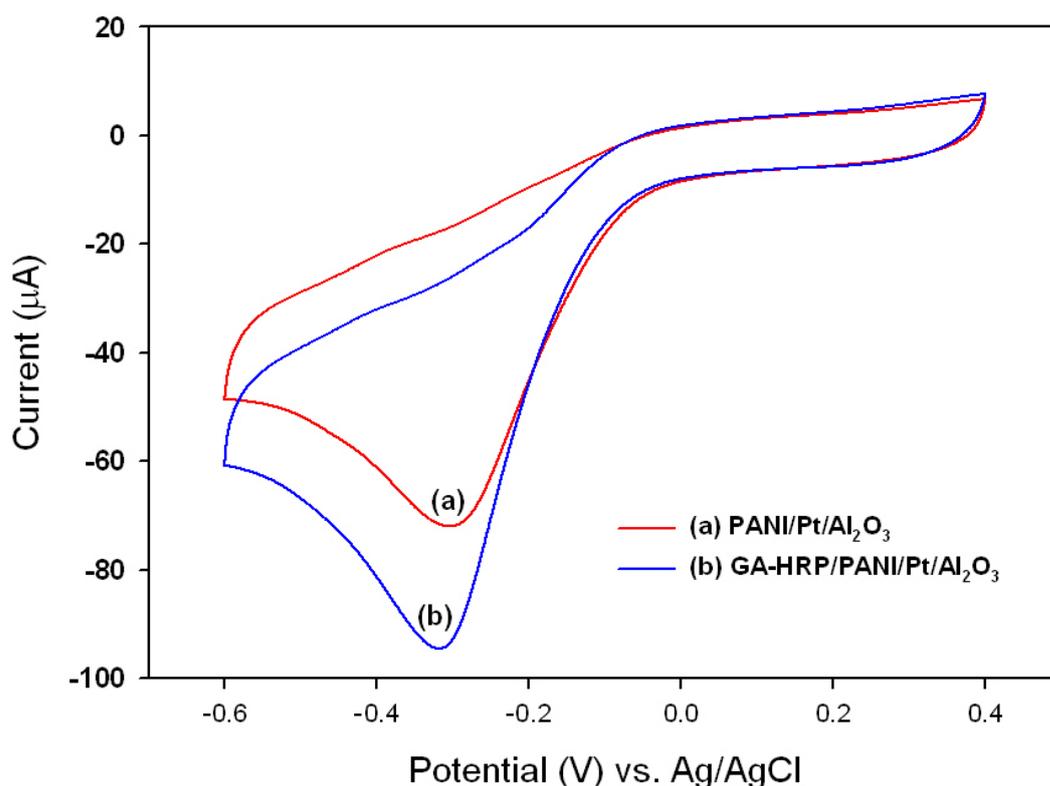


在 Fig. 8-1 圖中可觀察到 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫的還原波峰電位為-0.315 V，比使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測的還原波峰電位-0.303 V 略微往負電位方向偏移，推測其可能的原因為過氧化氫在 PANI 膜上所進行的還原反應與經由 HRP 催化所進行的反應，兩種不同的反應所需的活化能並不相同，所以反應在電極上發生的電位位置也會不同。

另外，為了測試電極表面的 GA 是否會造成 PANI 膜的電活性面積減少，於是製備了 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與澆注 GA 之 GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於磷酸鹽緩衝溶液中以循環伏安法進行背景掃描。由 Fig. 8-2 實驗結果可看出

GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的於-0.2 ~ -0.6V 電位下有較小的還原電流，代表 PANI 膜的電活性面積減少所致。

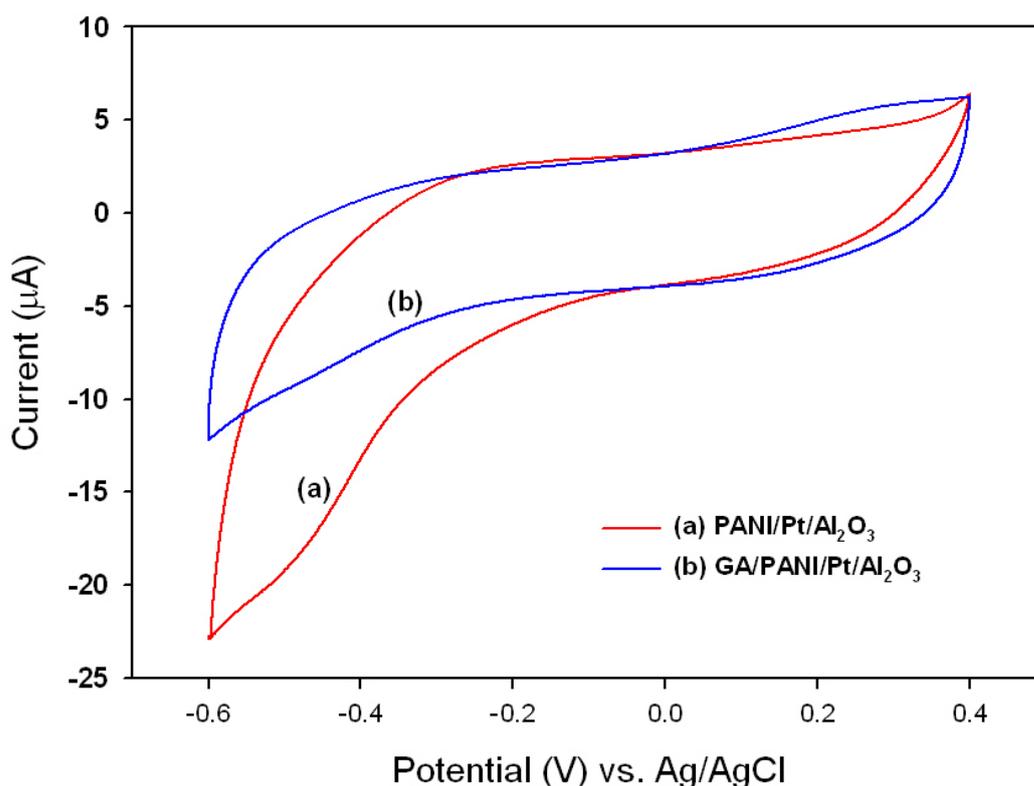
分別將 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測不同濃度過氧化氫，於不同濃度下的還原波峰電流值對濃度作圖如 Fig. 8-3 所示，可發現澆注 GA 之 GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極在感測相同過氧化氫濃度時，其還原電流值比 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的還原電流值小，這是因為 GA 減少了 PANI 膜的電活性面積。當固定 HRP 酵素於電極後，由圖中可看出 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測感測電流增加，所增加的電流來自於 HRP 酵素與過氧化氫的反應所產生。



**Fig. 8-1 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測 2.39 mM 的過氧化氫之循環伏安圖**

Condition for preparing PANI film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 V ~ 1.0V, scanning number: 4, temperature: 25±0.5 °C.

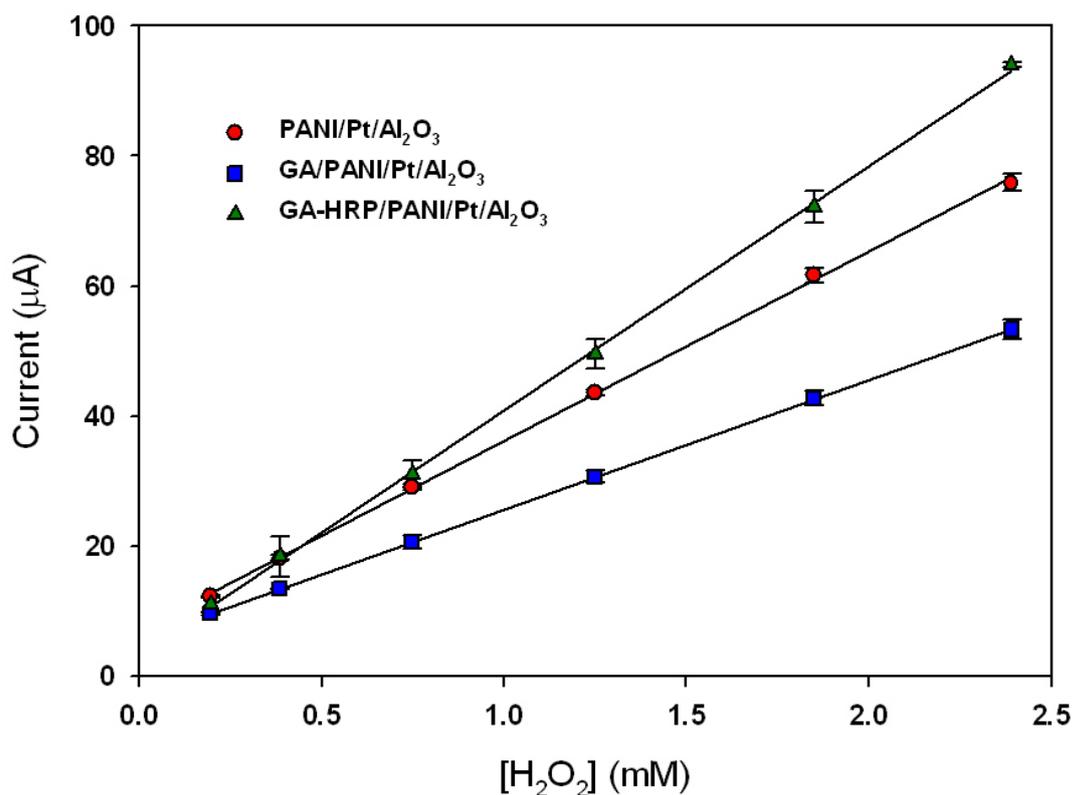
Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]: 2.39 mM, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.



**Fig. 8-2 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極於 0.1 M 磷酸鹽緩衝溶液(pH 6.2)中掃瞄之循環伏安圖**

Condition for preparing PANI film: W.E.: Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, geometric area: 0.28 cm<sup>2</sup>, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, [aniline] = 0.1 M, electrolyte: 1.0 M HCl aqueous solution, sweep rate: 10 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: 0.0 ~ 1.0V, scanning number: 4, temperature: 25±0.5 °C.

Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrodes, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.



**Fig. 8-3 使用 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極感測過氧化氫之感測電流與濃度關係圖**

Condition for sensing: W.E.: GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH 6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, [GA]: 2.5 (v/v %), sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

Condition for sensing: W.E.: PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, GA/PANI/Pt Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and GA/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrodes, C.E.: Pt wire, R.E.: Ag/AgCl/3M NaCl<sub>(aq)</sub>, electrolyte: 0.1 M phosphate buffer (pH6.2), the volume of electrolyte: 6 ml, sweep rate: 20 mVs<sup>-1</sup>, sweep potential range: -0.6 ~ +0.4 V, scanning number: 5, temperature: 25±0.5 °C.

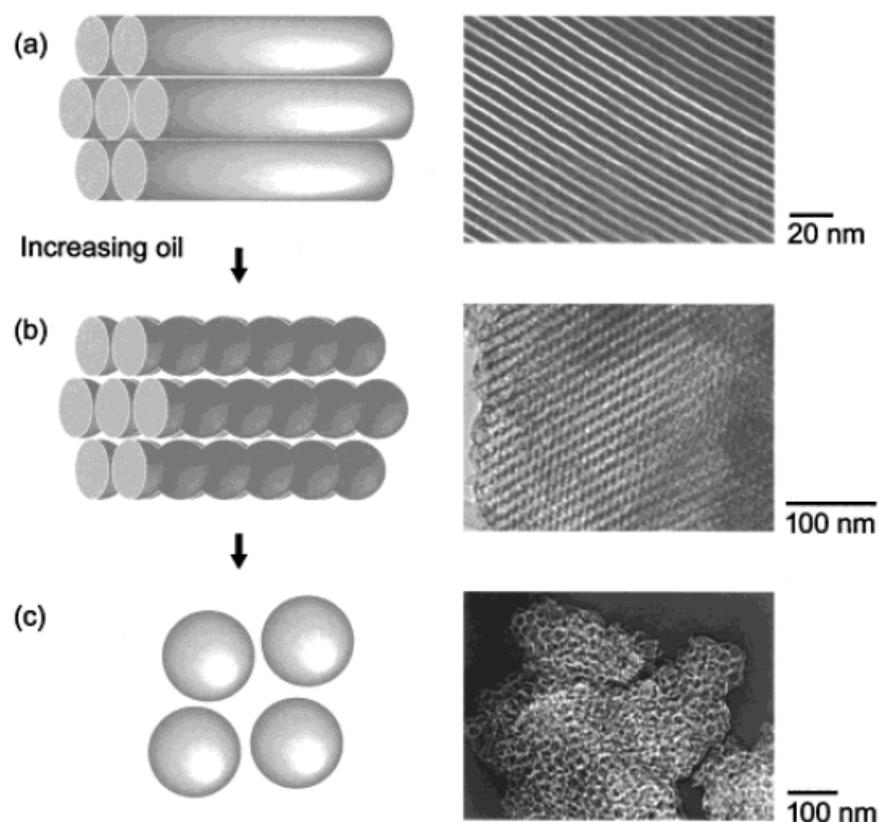
## 8.2 比較擴孔劑添加量對於 SBA-15 吸附 HRP 酵素的影響

影響酵素吸附於中孔材料孔洞中的效率的因素有兩項：(1) 酵素的尺寸大小是否能與孔洞尺寸配合，當孔洞太小會使得酵素無法進入；太大的孔洞酵素又容易脫離。(2) 孔洞材料的表面所帶的電性是否與酵素所帶的電性相異(Kim et al. 2006)。然而，除了孔洞尺寸會影響酵素是否能順利進入孔洞之，孔洞的型態亦會影響酵素固定於孔洞中的穩定性，由 Lettow 等人的研究結果顯示，未擴孔之 SBA-15 的孔道型態為直孔道，擴孔劑添加量為界面活性劑重量百分比之 21% 時，其孔道型態為相通的球形孔道，當擴孔劑添加量增加至 50 % 時，其孔洞型態為不相通的凹槽圓形孔洞，其示意圖如 Fig. 8-4 所示 (Lettow et al. 2000)。

本研究中針對此孔洞結構與電性兩項影響酵素固定效率的因素，藉由改變溶液 pH 來探討電性因素所造成的影響。另外，經由在合成 SBA-15 的過程中添加不同比例的擴孔劑，以製備不同孔徑尺寸與型態的 SBA-15，來達到 HRP 於 SBA-15 上有最高吸附量的目的。

Fig. 8-4 為擴孔劑添加比例為 0 %、10 % 與 20 % 所合成之 SBA-15-48、SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M2-48 的氮氣等溫吸/脫附曲線圖，Fig. 8-5 為其粒徑分佈圖。由 Fig. 8-4 圖中可觀察到，SBA-15-48 的氮氣吸/脫附曲線屬於直孔道型式，SBA-15-M1-48 為介於直孔到與球型孔洞之間的壺型孔道，SBA-15-M2-48 為球形孔道。由 Fig. 8-6 的粒徑分佈圖中可看出

SBA-15-48 之主要孔徑為 7.5 nm，SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M2-48 之孔徑分別為 9.2 nm 與 14.1 nm，此分析結果與 TEM 所觀察的擴孔前後孔徑分別為 7、9、15 nm 相當。以初濕含浸法進行吸附，單位重量之 SBA-15-48、SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M2-48 於 pH 5.6 之磷酸鹽緩衝溶液中吸附 1 小時，對於 HRP 酵素的負載量分別 2535.03、4278.45、3498.77  $\mu\text{g/g}$ 。於擴孔劑添加量探討的部份，由實驗結果顯示，以添加比例為界面活性劑重量 10% 所製備的 SBA-15-M1-48 具有最佳 HRP 酵素吸附量。



**Fig. 8-4** 不同擴孔劑添加比例之孔洞型態示意圖 (a) 0、(b) 21%、(c) 50% (Lettow et al. 2000)

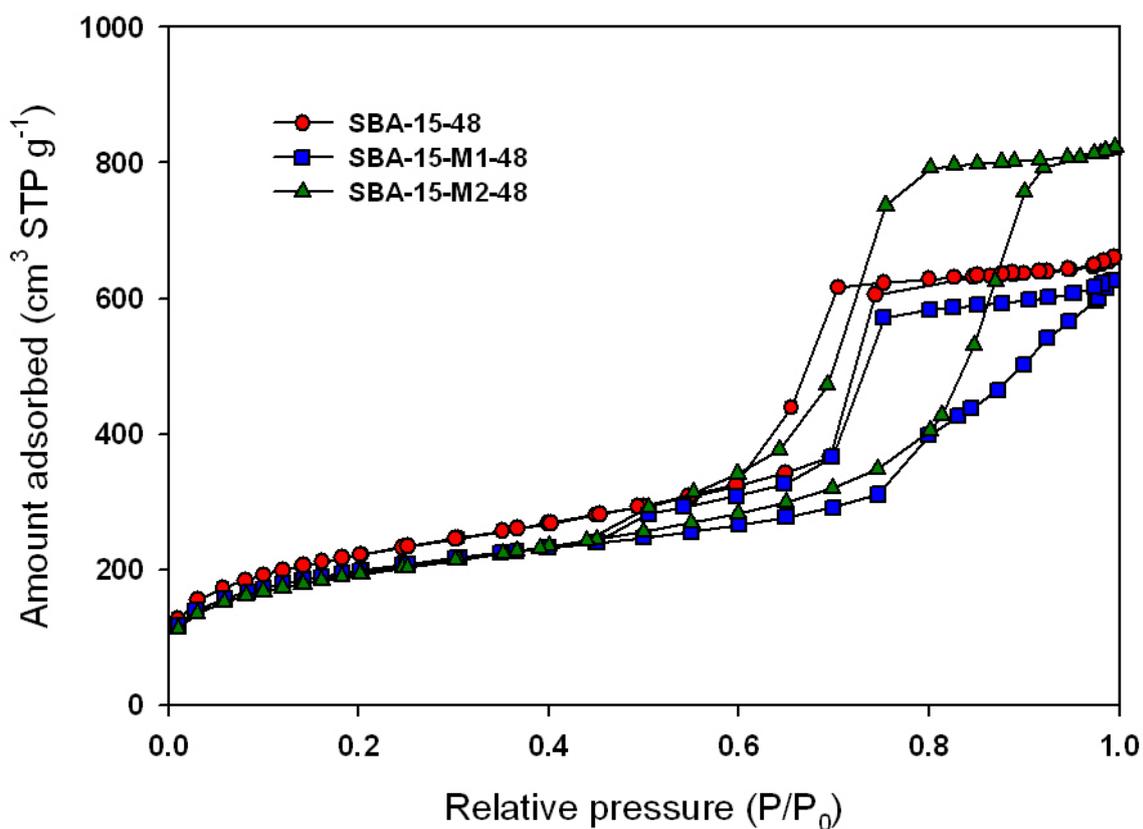


Fig. 8-5 SBA-15-48、SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M2-48 之氮氣等溫吸/脫附曲線圖

Condition for preparing SBA-15-48, SBA-15-M1-48, SBA-15-M2-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0, 0.2, 0.4 g, mixed time : 1 hr, synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 12, 24, 48 hr, aged temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

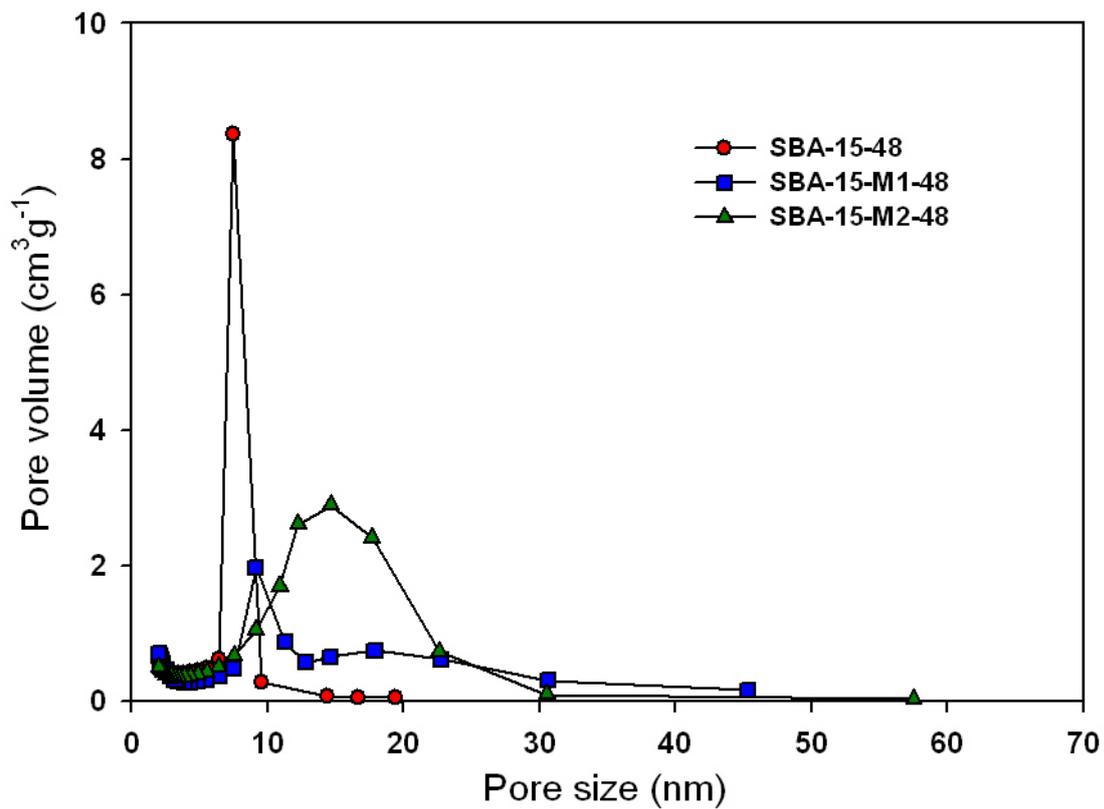


Fig. 8-6 SBA-15-48、SBA-15-M1-48 與 SBA-15-M2-48 之孔徑分佈圖

Condition for preparing SBA-15-48, SBA-15-M1-48, SBA-15-M2-48 :

P123 : 2 g, HCl : 1.6 M, 75 ml, TEOS : 4.26 g, TMB : 0, 0.2, 0.4 g, mixed time : 1 hr,  
 synthesized time : 24 hr, reacted temperature : 35 °C, aged time : 12, 24, 48 hr, aged  
 temperature : 100 °C, calcined temperature : 600 °C, calcined time : 2 hr.

### 8.3 探討 HRP 酵素是否固定於 SBA-15 孔洞中

為了進一步確認 HRP 酵素以吸附方式固定於 SBA-15-M1-48 時, HRP 酵素是否有固定孔洞中或只是吸附於 SBA-15-M1-48 粒子表面。根據文獻指出, 使用掃描隧道顯微鏡 (scanning tunneling microscopy, STM) 量測 HRP 酵素於中性磷酸鹽緩衝溶液中的尺寸為  $6.2 \times 4.3 \times 1.2 \text{ nm}^3$  (Zhang et al. 1996), 等電點(pI)為 7.2。在中孔矽材料孔洞尺寸方面, 自製之 SBA-15-M1-48 的孔徑 9.2 nm, 等電點(pI)為 4.0; 另外亦購置孔徑為 2.5 nm 之中孔矽材料 MCM-41, 其等電點(pI)為 3.8。SBA-15-M1-48 的等電點 4.0 與 MCM-41 的等電點 3.8 相近, 在相同 pH 值溶液下, 與 HRP 酵素的電荷吸引力相似。SBA-15-M1-48 的孔徑 9.2 nm 大於 HRP 酵素的尺寸, MCM-41 的孔徑 2.5 nm 小於 HRP 酵素的尺寸。分別使用相同重量的 SBA-15-M1-48 與 MCM-41 於相同的吸附條件下, 比較其吸附現象的差異。

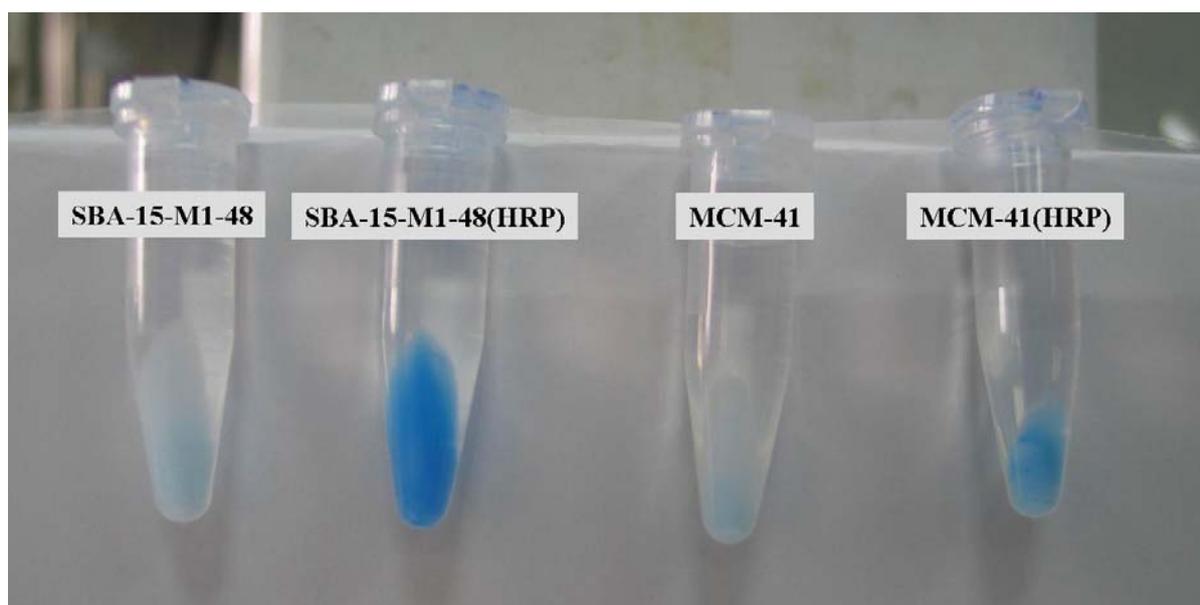
分別取 10 mg 的 SBA-15-M1-48 與 MCM-41 粉末於含有 HRP 酵素的磷酸鹽緩衝溶液(0.1 M, pH 5.6)中吸附 HRP 酵素。另外, 同時取相同重量的 SBA-15-M1-48 及 MCM-41 於不含 HRP 酵素的磷酸鹽緩衝溶液(0.1 M, pH 5.6)進行相同的吸附化程序作為實驗對照組。

待 HRP 酵素吸附程序完成, 使用磷酸鹽緩衝液(0.1M, pH 6.2)經過 5 次清洗後, 於 4 組樣品中分別加入 800 $\mu$ l 磷酸鹽緩衝溶液(0.1M, pH6.2), 混合均勻再加入 200  $\mu$ l Bio-Rad Protein Assay 試劑混合均勻後, 於溫度

25°C 下靜置反應 15 分鐘，此時試劑中之 Coomassie Brilliant Blue R-250 染劑會吸附於 SBA-15-M1-48 與 MCM-41 粉末上，此時 4 組粉末樣品將都由白色轉變為藍色，此時樣品上若有 HRP 酵素在與染劑結合後，將會緊密結合無法分離；反之若粉末上無酵素，染劑只是吸附於粒子上，可輕易使用退染劑去除。隨後，使用 10 % 醋酸與 20 % 甲醇混合溶液為退染液，進行如同 SDS-PAGE 蛋白質電泳中所使用的退染程序，其程序為多次添加退染液於實驗樣品中，再多次以 7000 rpm 離心 5 分鐘並移除上清液，直到上清液完全呈現透明無藍色的狀態為止。

實驗結果如 Fig.8-7 所示，由圖中可觀察到無吸附酵素的 SBA-15-M1-48 與 MCM-41 在退染後皆呈現接近白色的狀態，顯示所使用的退染劑於退染過程中可將絕大部份的染劑去除。於 MCM-41(HRP) 部份，局部呈現淡藍色，推論原因為部份 HRP 酵素吸附於 MCM-41 粉末表面，於部份的粒子與粒子的介面之間較不易於清洗程序將酵素洗去，在與染劑結合後呈現藍色。

由 Fig. 8-7 圖中可看出 SBA-15-M1-48(HRP) 呈現深藍色的結果，顯示酵素不但有如同 MCM-41(HRP) 的結果一樣，部份吸附於粒子表面之外，還有更多的酵素是固定於孔洞中。此部份的實驗結果也可得知，HRP 酵素大部份是固定於 SBA-15-M1-48 孔洞中，並在歷經多次的清洗與退染程序後，還可以穩定的固定於 SBA-15-M1-48 粒子上。



**Fig. 8-7** 以 SBA-15-M1-48 與 MCM-41 固定 HRP 酵素之比較圖

#### 8.4 本研究中自製之過氧化氫感測電極的感測性質並與文獻比較

Table 8-1 為本論文中於不同條件下製備所得的電極感測過氧化氫之感測性質並與文獻比較表。文獻中，Mathebe 等人曾發表過與吾人相似的過氧化氫生物感測器，其電極製備方式為使用電化學聚合法於白金(Pt)片上聚合 PANI，製備為 PANI/Pt 電極，再將 HRP 酵素以電吸附的方式固定於 PANI 膜上，製備成 HRP/PANI/Pt 電極，該電極感測過氧化氫的濃度線性範圍為 0.25 ~ 5 mM。於該篇文中曾提到電極的穩定度不佳，一次感測後電流值明顯衰退，在感測過氧化氫後使用 SEM 觀察電極表面組態，發現所固定的酵素層明顯脫落，且 PANI 膜的結構變的較為鬆散(Mathebe et al. 2004)。

吾人在探討 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的感測特性時亦發現當電極於第二次感測時電流訊號明顯衰退。為了改善此衰退的情形，分別針對兩個方向進行改善：(1)對於 PANI 結構穩定性進行改善，於聚合 PANI 過程中添加 BSA，製備成 PANI(BSA)複合膜型式。將 Table 8-1 中 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極進行比較，發現改善後靈敏度由 29.12 提升至 37.02  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，於 17 天中進行 21 次感測，其電極剩餘活性百分比由 40.8 % 提升至 80.5 %，大幅提高了電極感測的穩定性。(2) 另一個改善方向為提高 HRP 酵素於電極上的穩定性，為此選用了中孔矽材料 SBA-15 為 HRP 酵素固定化的載體，比較 Table 8-1 中

GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 兩電極的感測性能，雖然將 HRP 酵素固定於 SBA-15 中降低了感測靈敏度，由 37.55 下降至 25.05  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，但電極的穩定度大幅提升，於 16 天中經過 15 次的感測，其電極剩餘活性百分比由 40.5 % 提升至 75.2 %。

另外，將 GA/SBA-15/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極進行比較，可發現有固定 HRP 酵素之電極的靈敏度較高，可驗證 HRP 酵素固定於 SBA-15 材料上可發揮其感測作用。由 Table 8-1 中亦可觀察到於此研究中所製備的以 PANI 為基礎的過氧化氫感測電極的感測濃度線性範圍皆比文獻中 Mathebe 等人所製備的大，也比使用 Pt 電極感測的濃度線性範圍廣。由實驗結果顯示，經由 BSA 對 PANI 膜結構的改善與 SBA-15 對於 HRP 的固定，可提升以 PANI 為基礎的過氧化氫感測器感測性能。

**Table 8-1 自製之過氧化氫感測電極之感測性能並與文獻比較表**

感測電極	靈敏度( $\mu\text{A mM}^{-1}$ )	濃度線性範圍(mM)	剩餘活性百分比(%)	參考文獻
Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	22.15	0.196 ~ 2.5	-----	
PANI/Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	29.12(1 <sup>st</sup> day), 9.3 (17 <sup>th</sup> day)	0.01 ~ 23.9	40.8 (17 <sup>th</sup> day)	This work
PANI(BSA)/Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	37.02(1 <sup>st</sup> day), 28.71 (17 <sup>th</sup> day)	0.01 ~ 23.9	80.5 (17 <sup>th</sup> day)	This work
GA-HRP/PANI/Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	37.55	0.01~23.9	40.5 (16 <sup>th</sup> day)	This work
GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	44.31	0.01 ~35.2	-----	This work
GA/SBA-15/PANI/Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	15.32	0.01~23.9	-----	This work
GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	25.05	0.01 ~23.9	75.2 (16 <sup>th</sup> day)	This work
HRP/PANI/Pt	----	0.25 ~ 5	-----	(Mathebe et al. 2004)

Sensing conditions for this work : W.E. : home-made electrode, RE : Ag/AgCl(3M NaCl), CE: Pt, scan rate : 20 mVs<sup>-1</sup>, temp.:25°C

Sensing conditions for Mathebe : W.E. : HRP/PANI/Pt, RE : Ag/AgCl(3M NaCl), CE: Pt, scan rate : 5 mVs<sup>-1</sup>, temp.:25°C

## 第九章 結論與建議

本文以導電性聚苯胺(PANI)膜為基礎，分別製備了 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，探討電極較佳的製備條件與其感測性質分析。並於 PANI 膜中包埋 BSA 製備 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，於此部份探討最佳的 BAS 添加條件及電極的感測性質。另外，研究中亦合成了 SBA-15 作為 HRP 固定化的載體，製備 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，對於 HRP 酵素的吸附條件進行探討與分析電極的感測性質。最後，探討了過氧化氫感測過程中溶氧的影響，並尋求添加除氧劑去除溶氧干擾的可能性。綜合本論文之結果可獲得下結論：

1. 使用循環伏安法聚合 PANI 所製備之 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極，最佳的聚合圈數為 4 圈，GA 使用量為 3  $\mu$ l, 2.5% (v/v)，感測過氧化氫濃度線性範圍為 0.01 ~ 23.9 mM，於 pH 值下有最大感測靈敏度為 37.55  $\mu$ A mM<sup>-1</sup>。
2. 在選擇性的探討部份，以 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極感測濃度為 2.39 mM 過氧化氫時，分別於溶液中加入 0.5 mM 尿酸、尿素與維他命 C，其感測靈敏度分別下降了 3.17 %、5.08 %與 7.6 %，其中以維他命 C 的干擾較大。
3. 添加 BSA 於 PANI 聚合過程中，製備 PANI(BSA)複合膜，BSA 最佳添

加濃度為 0.37 mg/ml，使用此添加量所製備之 GA-HRP/PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極相較於 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極，感測靈敏度由 37.55  $\mu\text{A mM}^{-1}$  提升至靈敏度為 44.31  $\mu\text{A mM}^{-1}$ 。

4. 在穩定度方面測試，比較 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 與 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，歷經 17 天期間感測 2.39 mM 過氧化氫溶液 21 次，於第 17 天的感測剩餘活性百分比由 PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的 40.8 % 提升至 PANI(BSA)/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的 80.5 %，結果顯示添加 BSA 對於 PANI 膜的穩定度有明顯提昇。
5. 於 SBA-15 合成部份，以擴孔劑添加量為界面活性劑(P123)重量的 10%、熟成時間為 48 小時所製備的 SBA-15-M1-48，經氮氣等溫吸/脫儀分析，其主要孔徑 9.2 nm，BET 表面積分別為 708.5  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ，孔洞體積為 0.92  $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ 。使用初濕含浸法於 pH 5.6 下進行含浸吸附 1 小時具有最佳酵素負載量，每克 SBA-15-M1-48 對於 HRP 酵素的負載量高達 4278.45  $\mu\text{g/g}$ 。
6. 以 SBA-15 為 HRP 酵素載體所製備的 GA/SBA-15(HRP)/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極，其感測過氧化氫的靈敏度為 25.05  $\mu\text{A mM}^{-1}$ ，歷經 16 天期間 15 次感測 1.96 mM 過氧化氫，於第 16 天進行感測的剩餘活性百分比為 75.2%，相較於 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極的 40.5 % 高出了 34.7%，其

結果顯示以 SBA-15 為載體固定 HRP 酵素對於穩定度有顯著提昇。

7. 在溶氧影響的探討方面，溶液中的溶氧在電極上的還原電位與過氧化氫的還原電位相近，對於過氧化氫的感測有顯著影響。添加硫代硫酸鈉或維他命 C 皆可有效去除溶液中的溶氧。當硫代硫酸鈉添加量小於 1 mM 時可在不影響過氧化氫的感測下有效減少溶氧的干擾。

總結本研究，仍有某些待改進或需要進一步探討之處，以下為幾點建議：

1. 在本研究中所製備的電極尚未能有效感測尿液樣品中的過氧化氫，其原因在於尿液中的成份過於複雜(主要成份包括：尿素、鈉離子、氯離子、醣類、脂肪酸、肌酸酐、胺基酸、維生素、膽色素等)，在未來的研究中若能事先以具選擇性滲透膜將尿液過濾，複雜成份所造成的干擾。另一方面在感測方式可改用方波伏安法或定電位法進行感測，減少循環伏安法於非穩定狀態下感測所產生的干擾因素，將可增加感測尿液中過氧化氫的可能性。
2. 在本研究中製備之 GA-HRP/PANI/Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 酵素電極，在未來的研究中若能再結合其他種類的酵素進行固定化，將可應用於其他生化物質的感測。

## 參考文獻

- 周筱惇 (2007), 探討影響 HRP 於聚苯胺電極固定化之因素, 東海大學化學工程研究所碩士論文
- Aburto, J., Ayala, M., Bustos-Jaimes, I., Montiel, C., Terres, E., Dominguez, J. M., and Torres, E. (2005). "Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials." *Microporous and Mesoporous Materials*, 83(1-3), 193-200.
- Ahuja, T., Mir, I. A., Kumar, D., and Rajesh. (2007). "Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications." *Biomaterials*, 28(5), 791-805.
- Aizawa, M., Ikariyama, Y., and Kuno, H. (1984). "Photovoltaic Determination of Hydrogen-Peroxide with a Biophotodiode." *Analytical Letters Part B-Clinical and Biochemical Analysis*, 17(7), 555-564.
- Arora, K., Sumana, G., Saxena, V., Gupta, R. K., Gupta, S. K., Yakhmi, J. V., Pandey, M. K., Chand, S., and Malhotra, B. D. (2007). "Improved performance of polyaniline-uricase biosensor." *Analytica Chimica Acta*, 594(1), 17-23.
- Bai, Y., Yang, H., Yang, W. W., Li, Y. C., and Sun, C. Q. (2007). "Gold nanoparticles-mesoporous silica composite used as an enzyme immobilization matrix for amperometric glucose biosensor construction." *Sensors and Actuators B-Chemical*, 124(1), 179-186.
- Beck, J. S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., Chu, C. T. W., Olson, D. H., Sheppard, E. W., McCullen, S. B., Higgins, J. B., and Schlenker, J. L. (1992). "A New Family of Mesoporous Molecular-Sieves Prepared with Liquid-Crystal Templates." *Journal of the American Chemical Society*, 114(27), 10834-10843.
- Bergveld, P. (1970). "Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements." *Ieee Transactions on Biomedical Engineering*, BM17(1), 70-&.
- Breen, A. P., and Murphy, J. A. (1995). "Reactions of Oxyl Radicals with DNA." *Free Radical Biology and Medicine*, 18(6), 1033-1077.
- Budny, A., Novak, F., Plumere, N., Schetter, B., Speiser, B., Straub, D., Mayer, H. A., and Reginek, M. (2006). "Redox-active silica nanoparticles. Part 1. Electrochemistry and catalytic activity of spherical, nonporous silica particles with nanometric diameters and covalently bound redox-active modifications." *Langmuir*, 22(25), 10605-10611.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., and Ravanat, J. L. (2003). "Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features." *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1-2), 5-23.
- Castilho, T. J., Sotomayor, M. D. T., and Kubota, L. T. (2005). "Amperometric biosensor

- based on horseradish peroxidase for biogenic amine determinations in biological samples." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(4), 785-791.
- Castillo-Ortega, M. M., Rodriguez, D. E., Encinas, J. C., Plascencia, M., Mendez-Velarde, F. A., and Olayo, R. (2002). "Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(n-butyl methacrylate) composites." *Sensors and Actuators B-Chemical*, 85(1-2), 19-25.
- Chan, H. S. O., Teo, M. Y. B., Khor, E., and Lim, C. N. (1989). "Thermal-Analysis of Conducting Polymers .1. Thermogravimetry of Acid-Doped Polyanilines." *Journal of Thermal Analysis*, 35(3), 765-774.
- Chang, B. S., and Mahoney, R. R. (1995). "Enzyme Thermostabilization by Bovine Serum-Albumin and Other Proteins - Evidence for Hydrophobic Interactions." *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 22, 203-214.
- Chen, C. C., and Gu, Y. S. (2008). "Enhancing the sensitivity and stability of HRP/PANI/Pt electrode by implanted bovine serum albumin." *Biosensors & Bioelectronics*, 23(6), 765-770.
- Chen, J., Yan, F., Dai, Z., and Ju, H. X. (2005). "Reagentless amperometric immunosensor for human chorionic gonadotrophin based on direct electrochemistry of horseradish peroxidase." *Biosensors & Bioelectronics*, 21(2), 330-336.
- Cho, W. J., and Huang, H. J. (1998). "An amperometric urea biosensor based on a polyaniline-perfluorosulfonated ionomer composite electrode." *Analytical Chemistry*, 70(18), 3946-3951.
- Corma, A. (1997). "From microporous to mesoporous molecular sieve materials and their use in catalysis." *Chemical Reviews*, 97(6), 2373-2419.
- Cosnier, S. (1999). "Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review." *Biosensors & Bioelectronics*, 14(5), 443-456.
- Cosnier, S., and Popescu, I. C. (1996). "Poly(amphiphilic pyrrole)-tyrosinase-peroxidase electrode for amplified flow injection-amperometric detection of phenol." *Analytica Chimica Acta*, 319(1-2), 145-151.
- Croissant, M. J., Napporn, T., Leger, J. M., and Lamy, C. (1998). "Electrocatalytic oxidation of hydrogen at platinum-modified polyaniline electrodes." *Electrochimica Acta*, 43(16-17), 2447-2457.
- Dai, Z. H., Bao, H. C., Yang, X. D., and Ju, H. X. (2008). "A bienzyme channeling glucose sensor with a wide concentration range based on co-entrapment of enzymes in SBA-15 mesopores." *Biosensors & Bioelectronics*, 23(7), 1070-1076.
- Dai, Z. H., Liu, S. Q., Ju, H. X., and Chen, H. Y. (2004). "Direct electron transfer and enzymatic activity of hemoglobin in a hexagonal mesoporous silica matrix." *Biosensors & Bioelectronics*, 19(8), 861-867.

- Dai, Z. H., Ni, J., Huang, X. H., Lu, G. F., and Bao, J. C. (2007). "Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on a hexagonal mesoporous silica-MCM-41 matrix." *Bioelectrochemistry*, 70(2), 250-256.
- Dalas, E., Sakkopoulos, S., and Vitoratos, E. (2000). "Thermal degradation of the electrical conductivity in polyaniline and polypyrrole composites." *Synthetic Metals*, 114(3), 365-368.
- Demmano, G., Selegny, E., and Vincent, J. C. (1996). "Experimental procedure for a hydrogen peroxide assay based on the peroxidase-oxidase reaction." *European Journal of Biochemistry*, 238(3), 785-789.
- Diaz, A. F., and Logan, J. A. (1980). "Electroactive Polyaniline Films." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 111(1), 111-114.
- Diazdeleon, F., Klotz, K. L., and Lagrimini, L. M. (1993). "Nucleotide-Sequence of the Tobacco (*Nicotiana-Tabacum*) Anionic Peroxidase Gene." *Plant Physiology*, 101(3), 1117-1118.
- Dong, S., and Kuwana, T. (1991). "Cobalt Porphyrin Nafion Film on Carbon Microarray Electrode to Monitor Oxygen for Enzyme Analysis of Glucose." *Electroanalysis*, 3(6), 485-491.
- Eggenstein, C., Borchardt, M., Diekmann, C., Grundig, B., Dumschat, C., Cammann, K., Knoll, M., and Spener, F. (1999). "A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium-sensitive transducer." *Biosensors & Bioelectronics*, 14(1), 33-41.
- Essa, H., Magner, E., Cooney, J., and Hodnett, B. K. (2007). "Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 49, 61-68.
- Fan, C. H., Zhuang, Y., Li, G. X., Zhu, J. Q., and Zhu, D. X. (2000). "Direct electrochemistry and enhanced catalytic activity for hemoglobin in a sodium montmorillonite film." *Electroanalysis*, 12(14), 1156-1158.
- Farr, S. B., and Kogoma, T. (1991). "Oxidative Stress Responses in *Escherichia-Coli* and *Salmonella-Typhimurium*." *Microbiological Reviews*, 55(4), 561-585.
- Fattakhova-Rohlfing, D., Rathousky, J., Rohlfing, Y., Bartels, O., and Wark, M. (2005). "Functionalized mesoporous silica films as a matrix for anchoring electrochemically active guests." *Langmuir*, 21, 11320-11329.
- Felix, F. S., Yamashita, M., and Angnes, L. (2006). "Epinephrine quantification in pharmaceutical formulations utilizing plant tissue biosensors." *Biosensors & Bioelectronics*, 21(12), 2283-2289.
- Feng, J. J., Xu, J. J., and Chen, H. Y. (2007). "Direct electron transfer and electrocatalysis of hemoglobin adsorbed on mesoporous carbon through layer-by-layer assembly."

- Biosensors & Bioelectronics*, 22(8), 1618-1624.
- Fernandes, K. F., Lima, C. S., Lopes, F. M., and Collins, C. H. (2005). "Hydrogen peroxide detection system consisting of chemically immobilised peroxidase and spectrometer." *Process Biochemistry*, 40(11), 3441-3445.
- Fischer, P., and Heitbaum, J. (1980). "Mechanistic Aspects of Cathodic Oxygen Reduction." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 112(2), 231-238.
- Fraga, C. G., Shigenaga, M. K., Park, J. W., Degan, P., and Ames, B. N. (1990). "Oxidative Damage to DNA During Aging - 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in Rat Organ DNA and Urine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4533-4537.
- Garcia, M. A. V., Blanco, P. T., and Ivaska, A. (1998). "A poly(o-aminophenol) modified electrode as an amperometric hydrogen peroxide biosensor." *Electrochimica Acta*, 43(23), 3533-3539.
- Genies, E. M., and Lapkowski, M. (1987). "Spectroelectrochemical Study of Polyaniline Versus Potential in the Equilibrium State." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 220(1), 67-82.
- Gerard, M., Chaubey, A., and Malhotra, B. D. (2002). "Application of conducting polymers to biosensors." *Biosensors & Bioelectronics*, 17(5), PII S0956-5663(01)00312-8.
- Grases, F., Villacampa, A. I., Costa-Bauza, A., and Sohnel, O. (2000). "Uric acid calculi: types, etiology and mechanisms of formation." *Clinica Chimica Acta*, 302(1-2), 89-104.
- Guimard, N. K., Gomez, N., and Schmidt, C. E. (2007). "Conducting polymers in biomedical engineering." *Progress in Polymer Science*, 32, 876-921.
- Guo, S. J., Wen, D., Dong, S. J., and Wang, E. K. (2009). "Gold nanowire assembling architecture for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electrochemical sensor." *Talanta*, 77(4), 1510-1517.
- Guo, Z. X., Li, L., and Shen, H. X. (1999). "Study and analytical application of bromopyrogallol red as a hydrogen donor substrate for peroxidase." *Analytica Chimica Acta*, 379(1-2), 63-68.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1992). "Biologically Relevant Metal Ion-Dependent Hydroxyl Radical Generation - an Update." *Febs Letters*, 307(1), 108-112.
- Han, Y. J., Watson, J. T., Stucky, G. D., and Butler, A. (2002). "Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 17(1), 1-8.
- Heeger, A. J. (2001). "Semiconducting and metallic polymers: The fourth generation of polymeric materials." *Journal of Physical Chemistry B*, 105(36), 8475-8491.
- Hudson, P. J. (1998). "Recombinant antibody fragments." *Current Opinion in Biotechnology*, 9(4), 395-402.
- Hudson, S., Magner, E., Cooney, J., and Hodnett, B. K. (2005). "Methodology for the

- immobilization of enzymes onto mesoporous materials." *Journal of Physical Chemistry B*, 109(41), 19496-19506.
- Ikeda, O., Ohtani, M., Yamaguchi, T., and Komura, A. (1998). "Direct electrochemistry of cytochrome c at a glassy carbon electrode covered with a microporous alumina membrane." *Electrochimica Acta*, 43(8), 833-839.
- Jin, Z., Su, Y. X., and Duan, Y. X. (2001). "A novel method for polyaniline synthesis with the immobilized horseradish peroxidase enzyme." *Synthetic Metals*, 122(2), 237-242.
- Kadnikova, E. N., and Kostic, N. M. (2002). "Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass. Effects of glass matrix on reactivity." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 18(1-3), 39-48.
- Kafi, A. K. M., Wu, G., and Chen, A. (2008). "A novel hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto Au-modified titanium dioxide nanotube arrays." *Biosensors & Bioelectronics*, 24(4), 566-571.
- Kalous, J., Brazdova, D., and Vytras, K. (1993). "Microdetermination of Sulfate and Organic Sulfur - Potentiometric Back-Titration Using Simple Coated-Wire Electrodes." *Analytica Chimica Acta*, 283(1), 645-649.
- Kasprzak, K. S. (1991). "The Role of Oxidative Damage in Metal Carcinogenicity." *Chemical Research in Toxicology*, 4(6), 604-615.
- Khudaish, E. A., and Al-Farsi, W. R. (2008). "A study of the electrochemical oxidation of hydrogen peroxide on a platinum rotating disk electrode in the presence of calcium ions using Michaelis-Menten kinetics and binding isotherm analysis." *Electrochimica Acta*, 53(12), 4302-4308.
- Kim, J., Grate, J. W., and Wang, P. (2006). "Nanostructures for enzyme stabilization." *Chemical Engineering Science*, 61(3), 1017-1026.
- Kobayashi, T., Yoneyama, H., and Tamura, H. (1984). "Polyaniline Film-Coated Electrodes as Electrochromic Display Devices." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 161(2), 419-423.
- Kong, Q., Beel, J. A., and Lillehei, K. O. (2000). "A threshold concept for cancer therapy." *Medical Hypotheses*, 55(1), 29-35.
- Kong, Y. T., Boopathi, M., and Shim, Y. B. (2003). "Direct electrochemistry of horseradish peroxidase bonded on a conducting polymer modified glassy carbon electrode." *Biosensors & Bioelectronics*, 19(3), 227-232.
- Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., and Beck, J. S. (1992). "Ordered Mesoporous Molecular-Sieves Synthesized by a Liquid-Crystal Template Mechanism." *Nature*, 359(6397), 710-712.
- Kuge, N., Kohzuki, M., and Sato, T. (1999). "Relation between natriuresis and urinary excretion of hydrogen peroxide." *Free Radical Research*, 30(2), 119-123.

- Laurinavicius, V., Kurtinaitiene, B., and Stankeviciute, R. (2008). "Behavior of PQQ glucose dehydrogenase on Prussian blue-modified carbon electrode." *Electroanalysis*, 20(13), 1391-1395.
- Lee, C. H., Lang, J., Yen, C. W., Shih, P. C., Lin, T. S., and Mou, C. Y. (2005). "Enhancing stability and oxidation activity of cytochrome c by immobilization in the nanochannels of mesoporous aluminosilicates." *Journal of Physical Chemistry B*, 109(25), 12277-12286.
- Lee, D., and Char, K. (2002). "Thermal degradation behavior of polyaniline in polyaniline/Na<sup>+</sup>-montmorillonite nanocomposites." *Polymer Degradation and Stability*, 75(3), 555-560.
- Lei, C. H., and Deng, J. Q. (1996). "Hydrogen peroxide sensor based on coimmobilized methylene green and horseradish peroxidase in the same montmorillonite-modified bovine serum albumin-glutaraldehyde matrix on a glassy carbon electrode surface." *Analytical Chemistry*, 68(19), 3344-3349.
- Lei, C. H., Lisdar, F., Wollenberger, U., and Scheller, F. W. (1999). "Cytochrome c/clay-modified electrode." *Electroanalysis*, 11(4), 274-276.
- Lei, C. X., Hu, S. Q., Gao, N., Shen, G. L., and Yu, R. Q. (2004). "An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilizing horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer supported by sol-gel derived carbon ceramic electrode." *Bioelectrochemistry*, 65(1), 33-39.
- Lettow, J. S., Han, Y. J., Schmidt-Winkel, P., Yang, P. D., Zhao, D. Y., Stucky, G. D., and Ying, J. Y. (2000). "Hexagonal to mesocellular foam phase transition in polymer-templated mesoporous silicas." *Langmuir*, 16(22), 8291-8295.
- Li, G., Wang, Y., and Xu, H. (2007). "A hydrogen peroxide sensor prepared by electropolymerization of pyrrole based on screen-printed carbon paste electrodes." *Sensors*, 7(3), 239-250.
- Liu, Y., Hu, L. M., and Yang, S. Q. (2008). "Amplification of bioelectrocatalytic signalling based on silver nanoparticles and DNA-derived horseradish peroxidase biosensors." *Microchimica Acta*, 160(3), 357-365.
- Liu, Y., Jiang, Q. Y., Lu, S. Y., Zhang, Y., and Gu, H. Y. (2009). "Immobilization of Hemoglobin on the Gold Colloid Modified Pretreated Glassy Carbon Electrode for Preparing a Novel Hydrogen Peroxide Biosensor." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(3), 418-427.
- Long, L. H., Evans, P. J., and Halliwell, B. (1999). "Hydrogen peroxide in human urine: Implications for antioxidant defense and redox regulation." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262(3), 605-609.
- Luo, Y. C., and Do, J. S. (2004). "Urea biosensor based on PANi(urease)-Nation (R)/Au composite electrode." *Biosensors & Bioelectronics*, 20(1), 15-23.

- Macdiarmid, A. G., Chiang, J. C., Halpern, M., Huang, W. S., Mu, S. L., Somasiri, N. L. D., Wu, W. Q., and Yaniger, S. I. (1985). "Polyaniline - Interconversion of Metallic and Insulating Forms." *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 121(1-4), 173-180.
- Makowski, W., and Kustrowski, P. (2007). "Probing pore structure of microporous and mesoporous molecular sieves by quasi-equilibrated temperature programmed desorption and adsorption of n-nonane." *Microporous and Mesoporous Materials*, 102(1-3), 283-289.
- Malinauskas, A., Garjonyte, R., Mazeikiene, R., and Jureviciute, I. (2004). "Electrochemical response of ascorbic acid at conducting and electrogenerated polymer modified electrodes for electroanalytical applications: a review." *Talanta*, 64(1), 121-129.
- Mathebe, N. G. R., Morrin, A., and Iwuoha, E. I. (2004). "Electrochemistry and scanning electron microscopy of polyaniline/peroxidase-based biosensor." *Talanta*, 64(1), 115-120.
- Miao, X. M., Yuan, R., Chai, Y. Q., Shi, Y. T., and Yuan, Y. Y. (2008). "Direct electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide based on Nafion and copper oxide nanoparticles modified Pt electrode." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 612(2), 157-163.
- Mogharrab, N., and Ghourchian, H. (2005). "Anthraquinone 2-carboxylic acid as an electron shuttling mediator and attached electron relay for horseradish peroxidase." *Electrochemistry Communications*, 7(5), 466-471.
- Morgan, C. L., Newman, D. J., and Price, C. P. (1996). "Immunosensors: Technology and opportunities in laboratory medicine." *Clinical Chemistry*, 42(2), 193-209.
- Morrin, A., Guzman, A., Killard, A. J., Pingarron, J. M., and Smyth, M. R. (2003). "Characterisation of horseradish peroxidase immobilisation on an electrochemical biosensor by colorimetric and amperometric techniques." *Biosensors & Bioelectronics*, 18(5-6), 715-720.
- Murray, R. W., Ewing, A. G., and Durst, R. A. (1987). "Chemically Modified Electrodes - Molecular Design for Electroanalysis." *Analytical Chemistry*, 59(5), A379-&.
- Nakashima, K., Maki, K., Kawaguchi, S., Akiyama, S., Tsukamoto, Y., and Imai, K. (1991). "Peroxyoxalate Chemiluminescence Assay of Hydrogen-Peroxide and Glucose Using 2,4,6,8-Tetrathiomorpholinopyrimido[5,4-D]-Pyrimidine as a Fluorescent Component." *Analytical Sciences*, 7(5), 709-713.
- Neoh, K. G., Kang, E. T., and Tan, K. L. (1990). "Pyrolysis and Thermal-Oxidation of Doped and Undoped Poly((Ortho-(Trimethylsilyl)Phenyl)Acetylene)." *Polymer Degradation and Stability*, 29(3), 279-290.
- Newcombe, A. R., Cresswell, C., Davies, S., Pearce, F., O'Donovan, K., and Francis, R. (2006). "Evaluation of a biosensor assay to quantify polyclonal IgG in ovine serum

- used for the production of biotherapeutic antibody fragments." *Process Biochemistry*, 41(4), 842-847.
- Oh, S. Y., Koh, H. C., Choi, J. W., Rhee, H. W., and Kim, H. S. (1997). "Preparation and properties of electrically conductive polyaniline-polystyrene composites by in-situ polymerization and blending." *Polymer Journal*, 29(5), 404-409.
- Pemberton, R. M., Xu, J., Pittson, R., Biddle, N., Drago, G. A., Jackson, S. K., and Hart, J. P. (2009). "Application of screen-printed microband biosensors to end-point measurements of glucose and cell numbers in HepG2 cell culture." *Analytical Biochemistry*, 385(2), 334-341.
- Pielichowski, K. (1997). "Kinetic analysis of the thermal decomposition of polyaniline." *Solid State Ionics*, 104(1-2), 123-132.
- Rahman, A., Park, D. S., and Shim, Y. B. (2004). "A performance comparison of choline biosensors: anodic or cathodic detections of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated by enzyme immobilized on a conducting polymer." *Biosensors & Bioelectronics*, 19(12), 1565-1571.
- Ravikovitch, P. I., and Neimark, A. V. (2001). "Characterization of nanoporous materials from adsorption and desorption isotherms." *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 187, 11-21.
- Razola, S. S., Ruiz, B. L., Diez, N. M., Mark, H. B., and Kauffmann, J. M. (2002). "Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode." *Biosensors & Bioelectronics*, 17(11-12), 921-928.
- Rezaei-Zarchi, S., Saboury, A. A., and Javed, A. (2008). "Electrochemical study of Horseradish peroxidase using the nanosilver-modified graphite electrode and its application to hydrogen peroxide biosensor." *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*, 11(3), 199-203.
- Ruan, C. M., and Li, Y. B. (2001). "Detection of zeptomolar concentrations of alkaline phosphatase based on a tyrosinase and horse-radish peroxidase bienzyme biosensor." *Talanta*, 54(6), 1095-1103.
- Ruzgas, T., Csoregi, E., Emneus, J., Gorton, L., and MarkoVarga, G. (1996). "Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application." *Analytica Chimica Acta*, 330(2-3), 123-138.
- Ryan, B. J., Carolan, N., and O'Fagain, C. (2006). "Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches?" *Trends in Biotechnology*, 24(8), 355-363.
- Sallez, Y., Bianco, P., and Lojou, E. (2000). "Electrochemical behavior of c-type cytochromes at clay-modified carbon electrodes: a model for the interaction between proteins and soils." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 493(1-2), 37-49.
- Saxena, V., and Malhotra, B. D. (2003). "Prospects of conducting polymers in molecular

- electronics." *Current Applied Physics*, 3(2-3), 293-305.
- Schreck, R., Albermann, K., and Baeuerle, P. A. (1992). "Nuclear Factor Kappa-B - an Oxidative Stress-Responsive Transcription Factor of Eukaryotic Cells (a Review)." *Free Radical Research Communications*, 17(4), 221-237.
- Scouten, W. H., Luong, J. H. T., and Brown, R. S. (1995). "Enzyme or Protein Immobilization Techniques for Applications in Biosensor Design." *Trends in Biotechnology*, 13(5), 178-185.
- Shiomori, K., Ebuchi, N., Kawano, Y., Kuboi, R., and Komasaawa, I. (1998). "Extraction characteristic of bovine serum albumin using sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate reverse micelles." *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(6), 581-587.
- Shirakawa, H., Louis, E. J., Macdiarmid, A. G., Chiang, C. K., and Heeger, A. J. (1977). "Synthesis of Electrically Conducting Organic Polymers - Halogen Derivatives of Polyacetylene, (Ch)X." *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*(16), 578-580.
- Shu, H. C., and Wu, N. P. (2001). "A chemically modified carbon paste electrode with D-lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase enzyme sequences for D-lactic acid analysis." *Talanta*, 54(2), 361-368.
- Singh, S., Solanki, P. R., Pandey, M. K., and Malhotra, B. D. (2006). "Cholesterol biosensor based on cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase immobilized onto conducting polyaniline films." *Sensors and Actuators B-Chemical*, 115(1), 534-541.
- Smith, A. T., and Veitch, N. C. (1998). "Substrate binding and catalysis in heme peroxidases." *Current Opinion in Chemical Biology*, 2(2), 269-278.
- Sonezaki, S., Yagi, S., Ogawa, E., and Kondo, A. (2000). "Analysis of the interaction between monoclonal antibodies and human hemoglobin (native and cross-linked) using a surface plasmon resonance (SPR) biosensor." *Journal of Immunological Methods*, 238(1-2), 99-106.
- Song, Y. H., Cui, K., Wang, L., and Chen, S. H. (2009). "The electrodeposition of Ag nanoparticles on a type I collagen-modified glassy carbon electrode and their applications as a hydrogen peroxide sensor." *Nanotechnology*, 20(10).
- Sun, Y. X., Zhang, H. T., Huang, S. W., and Wang, S. F. (2007). "Hydrogen peroxide biosensor based on the bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase incorporated in a new hydrogel film." *Sensors and Actuators B-Chemical*, 124(2), 494-500.
- Sung, J. H., Ko, H. J., and Park, T. H. (2006). "Piezoelectric biosensor using olfactory receptor protein expressed in Escherichia coli." *Biosensors & Bioelectronics*, 21(10), 1981-1986.
- Sunil, K., and Narayana, B. (2008). "Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water and cream samples." *Bulletin of Environmental Contamination*

- and Toxicology*, 81(4), 422-426.
- Takahashi, H., Li, B., Sasaki, T., Miyazaki, C., Kajino, T., and Inagaki, S. (2001). "Immobilized enzymes in ordered mesoporous silica materials and improvement of their stability and catalytic activity in an organic solvent." *Microporous and Mesoporous Materials*, 44, 755-762.
- Tang, J. S., Jing, X. B., Wang, B. C., and Wang, F. S. (1988). "Infrared-Spectra of Soluble Polyaniline." *Synthetic Metals*, 24(3), 231-238.
- Tian, F. M., and Zhu, G. Y. (2002). "BENZYMATIC AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR GLUCOSE BASED ON POLYPYRROLE/CERAMIC CARBON AS ELECTRODE MATERIAL." *Analytica Chimica Acta*, 451(2), 251-258.
- Trchova, M., Sedenkova, I., and Stejskal, J. (2005). "In-situ polymerized polyaniline films 6. FTIR spectroscopic study of aniline polymerization." *Synthetic Metals*, 154(1-3), 1-4.
- Trchova, M., Sedenkova, I., Tobolkova, E., and Stejskal, J. (2004). "FTIR spectroscopic and conductivity study of the thermal degradation of polyaniline films." *Polymer Degradation and Stability*, 86(1), 179-185.
- Tsaprailis, G., Chan, D. W. S., and English, A. M. (1998). "Conformational states in denaturants of cytochrome c and horseradish peroxidases examined by fluorescence and circular dichroism." *Biochemistry*, 37(7), 2004-2016.
- Tunc, S., Angellier, H., Cahyana, Y., Chalier, P., Gontard, N., and Gastaldi, E. (2007). "Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting." *Journal of Membrane Science*, 289(1-2), 159-168.
- Vamvakaki, V., and Chaniotakis, N. A. (2007). "Immobilization of enzymes into nanocavities for the improvement of biosensor stability." *Biosensors & Bioelectronics*, 22(11), 2650-2655.
- Varma, S. D. (1989). "Radioisotopic Determination of Subnanomolar Amounts of Peroxide." *Free Radical Research Communications*, 5(6), 359-368.
- Varma, S. D., and Devamanoharan, P. S. (1991). "Hydrogen-Peroxide in Human Blood." *Free Radical Research Communications*, 14(2), 125-131.
- Veitch, N. C. (2004). "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme." *Phytochemistry*, 65(3), 249-259.
- Viswanathan, S., and Ho, J. A. A. (2007). "Dual electrochemical determination of glucose and insulin using enzyme and ferrocene microcapsules." *Biosensors & Bioelectronics*, 22(6), 1147-1153.
- Vitoratos, E., Sakkopoulos, S., Dalas, E., Malkaj, P., and Anestis, C. (2007). "DC conductivity and thermal aging of conducting zeolite/polyaniline and zeolite/polypyrrole blends." *Current Applied Physics*, 7(5), 578-581.
- Walcarius, A. (2005). "Impact of mesoporous silica-based materials on electrochemistry

- and feedback from electrochemical science to the characterization of these ordered materials." *Comptes Rendus Chimie*, 8(3-4), 693-712.
- Wang, J. W., Wang, L. P., Di, J. W., and Tu, Y. F. (2009). "Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor." *Talanta*, 77(4), 1454-1459.
- Wanka, G., Hoffmann, H., and Ulbricht, W. (1994). "Phase-Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(Oxyethylene)-Poly(Oxypropylene)-Poly(Oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous-Solutions." *Macromolecules*, 27(15), 4145-4159.
- Wei, Y., and Hsueh, K. F. (1989). "Thermal-Analysis of Chemically Synthesized Polyaniline and Effects of Thermal Aging on Conductivity." *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 27(13), 4351-4363.
- Wu, Y. C., Thangamuthu, R., and Chen, S. M. (2009). "A Highly Selective Amperometric Hydrogen Peroxide Sensor Based on Silicomolybdate-Doped-Glutaraldehyde-Cross-Linked Poly-L-Lysine Film Modified Glassy Carbon Electrode." *Electroanalysis*, 21(2), 210-214.
- Xian, Y. Z., Hu, Y., Liu, F., Xian, Y., Wang, H. T., and Jin, L. T. (2006). "Glucose biosensor based on Au nanoparticles-conductive polyaniline nanocomposite." *Biosensors & Bioelectronics*, 21(10), 1996-2000.
- Xiang, C., Zou, Y., Sun, L. X., and Xu, F. (2009). "Direct electrochemistry and enhanced electrocatalysis of horseradish peroxidase based on flowerlike ZnO-gold nanoparticle-Nafion nanocomposite." *Sensors and Actuators B-Chemical*, 136(1), 158-162.
- Xiao, Y., Ju, H. X., and Chen, H. Y. (1999). "Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer." *Analytica Chimica Acta*, 391(1), 73-82.
- Xiao, Y., Ju, H. X., and Chen, H. Y. (2000). "Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on a colloid/cysteamine-modified gold electrode." *Analytical Biochemistry*, 278(1), 22-28.
- Xiao, Y., Patolsky, F., Katz, E., Hainfeld, J. F., and Willner, I. (2003). "'Plugging into enzymes": Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle." *Science*, 299(5614), 1877-1881.
- Yabuki, S., and Fujii, S. (2009). "Hydrogen peroxide biosensor based on a polyion complex membrane containing peroxidase and toluidine blue, and its application to the fabrication of a glucose sensor." *Microchimica Acta*, 164(1-2), 173-176.
- Yang, J. M., Bell, J., Huang, Y., Tirado, M., Thomas, D., Forster, A. H., Haigis, R. W., Swanson, P. D., Wallace, R. B., Martinsons, B., and Krihak, M. (2002). "An integrated, stacked microlaboratory for biological agent detection with DNA and immunoassays." *Biosensors & Bioelectronics*, 17(6-7), PII S0956-5663(02)00023-4.

- Yang, Y. F., and Mu, S. L. (1997). "Bioelectrochemical responses of the polyaniline horseradish peroxidase electrodes." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 432(1-2), 71-78.
- Yiu, H. H. P., Wright, P. A., and Botting, N. P. (2001a). "Enzyme immobilisation using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 15(1-3), 81-92.
- Yiu, H. H. P., Wright, P. A., and Botting, N. P. (2001b). "Enzyme immobilisation using siliceous mesoporous molecular sieves." *Microporous and Mesoporous Materials*, 44, 763-768.
- Yoon, H., Jung, B. S., and Lee, H. (1991). "Correlation between Electrical-Conductivity, Thermal-Conductivity, and ESR Intensity of Polyaniline." *Synthetic Metals*, 41(1-2), 699-702.
- Yu, J. J., Ma, J. R., Zhao, F. Q., and Zeng, B. Z. (2007). "Direct electron-transfer and electrochemical catalysis of hemoglobin immobilized on mesoporous Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>." *Electrochimica Acta*, 53(4), 1995-2001.
- Zhang, J. D., Chi, Q. J., Dong, S. J., and Wang, E. K. (1996). "In situ electrochemical scanning tunnelling microscopy investigation of structure for horseradish peroxidase and its electrocatalytic property." *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 39(2), 267-274.
- Zhao, D. Y., Feng, J. L., Huo, Q. S., Melosh, N., Fredrickson, G. H., Chmelka, B. F., and Stucky, G. D. (1998). "Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores." *Science*, 279(5350), 548-552.

## 個人簡歷

姓名：陳建中 (Chien-Chung Chen)

籍貫：台灣省彰化縣

出生年月日：民國 66 年 3 月 27 日

學經歷：

淡江大學化學工程與材料工程學系

東海大學化學工程與材料工程研究所碩士班

東海大學化學工程與材料工程研究所博士班

東海大學化學工程與材料工程學系兼任助教

期刊論文：

1. Chien-Chung Chen, Yesong Gu, “Enhancing the sensitivity and stability of HRP/PANI/Pt electrode by implanted bovine serum albumin, *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 765–770 (2008). [SCI, Impact Factor : 5.143]
2. Yesong Gu and Chien-Chung Chen, Eliminating the Interference of Oxygen for Sensing Hydrogen Peroxide with the Polyaniline Modified Electrode, *Sensors*, 8(12), 8237-8247 (2008). [SCI, Impact Factor : 1.870]
3. Chien-Chung Chen, Jing-Shan Do and Yesong Gu, Immobilization of HRP in Mesoporous Silica and Its Application for the Construction of Polyaniline Modified Hydrogen Peroxide Biosensor, *Sensors*, 9(6), 4635-4648 (2009). [SCI, Impact Factor : 1.870]

研討會論文：

1. Chien-Chung Chen, Jing-Shan Do and Jason Y. Gu, “Construction of a hydrogen peroxide biosensor with horseradish peroxidase cross-linked to a polyaniline electrode”, YABEC 2003 Symposium, Jeju Island, Korea. (2003.11)
2. Chien-Chung Chen, Jing-Shan Do and Jason Y. Gu, An Amperometric H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Biosensor, 9<sup>th</sup> Biochemical Engineering Conference, Changhua, Taiwan. (2004.06)
3. Chien-Chung Chen, Chen-Li Cheng, Jing-Shan Do, Jason Y. Gu, “Characterizations of a Modified Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor”, The 6<sup>th</sup> East Asian Conference on

Chemical Sensors, Guilin, China. (2005.11)

4. Chien-Chung Chen, Jing-Shan Do, Jason Y. Gu, “An amperometric biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase on a conductivity polymer film for hydrogen peroxide detection”, The 2nd International Meeting on Microsensors and Microsystems, Tainan, Taiwan. (2006.01)
5. Chien-Chung Chen, Jason Y. Gu, Enhancing the electrochemical property of PANI film by BSA in biosensor fabrication, 11<sup>th</sup> Biochemical Engineering Conference, Hsinchu, Taiwan. (2006.06)
6. Chien-Chung Chen, Jason Y. Gu, “Enhancing the electrochemical property of PANI film by BSA in biosensor fabrication”, YABEC 2006 Symposium, Kaohsiung, Taiwan. (2006.11)
7. Chien-Chung Chen, Jing-Shan Do, Jason Y. Gu, “Immobilization of HRP in SBA-15 and its application for the construction of polyaniline modified hydrogen peroxide biosensor”, 10<sup>th</sup> World Congress on Biosensors, Shanghai, China. (2008.05)