

國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

幾丁聚醣輔助金奈米粒子修飾氧化銦錫電極
之葡萄糖感測器



Glucose sensor based on chitosan assistant gold
nanoparticles modified ITO electrode

研究生：呂志倫

指導教授：謝有容 教授

中華民國九十八年三月

幾丁聚醣輔助金奈米粒子修飾氧化銦錫電極之葡萄糖感測器

Glucose sensor based on chitosan assistant gold
nanoparticles modified ITO electrode

研究生：呂志倫

Student : Chih-Lun Lu

指導教授：謝有容

Advisor : You-Zung Hsieh



Submitted to Department of Applied Chemistry

College of Science

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Science

in

Applied Chemistry

March 2009

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

幾丁聚醣輔助金奈米粒子修飾氧化銦錫電極之葡萄糖感測器

學生：呂志倫

指導教授：謝有容

國立交通大學應用化學系（研究所）碩士班

摘 要

研究以各種無機金屬、金屬氧化物或合金的奈米材料所製作非酵素修飾的葡萄糖感測電極，改善酵素型修飾電極缺點，提昇葡萄糖在電化學偵測上的穩定性，近來備受重視。

本研究利用微影製程與蝕刻方法，固定氧化銦錫 (Indium-tin oxide, ITO) 在玻璃上的面積，可以簡單生產出固定反應面積的 ITO 電極。結合單步驟的電沈積方法，將金奈米粒子修飾在 ITO 電極上，製作出一種可拋棄式的金奈米粒子修飾電極。藉著幾丁聚醣的輔助，將 ITO 電極置於濃度 400 mg/L 四氯金酸與 0.01% 幾丁聚醣的混合溶液中，定電位在 -0.8 V 維持 60 分鐘，ITO 電極的表面隨即生成一層由金奈米粒子所構成的穩定薄膜。經由 SEM 的觀察，可以清楚地得知金奈米粒子在電極表面堆積而成的立體奈米結構。在覆蓋 Nafion[®] 薄膜將常見干擾物訊號排除之後，再針對修飾電極在葡萄糖偵測應用的分析效果做研究。該電極在 0.1 M NaOH 溶液中利用安培法偵測葡萄糖的靈敏度為 $107.7 \mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ ，偵測極限為 1.46 μM ，而線性範圍則在 5 μM 到 2.3 mM 之間 ($R^2 = 0.9991$)。此外，由於電極的基底 ITO 導電玻璃是已在業界量產且品質穩定的材料，因此加工製作成 ITO 電極的成本不高，適合做為可拋棄式修飾電極的基材。

Glucose sensor based on chitosan assistant gold nanoparticles modified ITO electrode

Student: Chih-Lun Lu

Advisor: You-Zung Hsieh

Department of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

Abstract

It has been paid much attention to develop nonenzymatic glucose electrochemical sensor by inorganic metal, metal oxide or alloy nanomaterial, which would eliminate the instability problem of enzymatic glucose sensor.

In this study, A disposable gold nanoparticles (AuNPs) modified ITO electrode, which the effect area was fixed by photolithography and etching technique, has been developed only with single step electrodeposition for glucose sensing. The AuNPs film on the electrode was formed by dipping the ITO electrode into the mixed solution containing 400 mg/L HAuCl_4 and 0.01% chitosan and giving a reduction potential at -0.8 V (vs. Ag/AgCl) for 60 minute. The layer of the stacked AuNPs on the ITO surface was very stable and the nanostructure of this AuNPs modified sensor was performed by field-emission scanning electron microscope (SEM). After eliminating common interferences by Nafion[®] covering, the analytical performance of the electrode for glucose detection was investigated. The sensitivity and the detection limit of the electrode were $107.7 \mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ and $1.46 \mu\text{M}$ respectively in amperometric glucose sensing in 0.1 M NaOH solution. Linear range was from $5 \mu\text{M}$ to 2.3 mM ($R^2 = 0.9991$). Since the ITO glass was obtained by low cost industrial production with stable quality, this substrate can be used as disposable material

of sensor fabrication.



誌 謝

首先要由衷地感謝我的指導教授 謝有容教授，雖然在研究上常常給您添麻煩，但老師總是不厭其煩的給予指導和建議，無論學業或是生活方面，都能從老師的身上學習到許多事情，很高興在研究所這階段能遇到這樣的好教授，在此，獻上學生最深感謝。其次感謝兩位口試委員眭台生教授、余艇教授在百忙之中抽空指導學生論文，給予許多的建議和想法讓學生獲益良多，並使論文內容更加完善，在此也獻上最大感謝。

感謝實驗室裡的每個人：感謝慶昇學長，很喜歡學長來實驗室講古的時候，帶來的開朗笑聲，從音響到攝影，廣泛的興趣和幽默的談吐，讓人看不出學長的年紀，有時候會在研究上給予我一些小建議，也讓人感到相當受用；感謝冠文學長在研究上的指導與鼓勵，和最大的包容，因為自己常在實驗上的我行我素，讓學長添了很多麻煩，真的非常感謝學長讓我有自己的空間發揮也總會在我實驗快要失控的時候出手給我建議，所以在此一定要好好謝謝學長；感謝秀麗學姊，有學姊在，分析課本就可以丟掉了，研究上的問題跟學姊討論都會很有收穫，有時候學姊也會分享好吃的東西，感謝學姊的照顧；感謝承宇學長，在真實樣品的部份給予許多的建議，相當熱心；感謝滄浩學長常分享有趣的事以及耐心教導我實驗的技巧，讓我在剛進來實驗室的時候及早進入狀況；感謝彥愷學長，雖然相處時間不多，但是每天早到晚退認真工作的好男人形象深植人心；感謝亦文學姊，在學姊身上學習到年輕人也是可以每天早睡早起的，且勇於堅持己見身體力行，是個很好的榜樣；感謝蘭英，因為實在是非常賢慧，實驗室有蘭英在就會有好吃的東西出現，下午茶從水果到甜點應有盡有，做的飲料也特別好喝，令人感受到實驗室的溫馨；感謝葉蓁，人很有趣也很勤勞，雖然實驗有許多挫折但還是很努力解決，精神很值得學習，且平時熱心助人，是實驗室

的開心果；也感謝敏慈，和我同時間進來實驗室但是進度比我快，但當我在打混的時候她會不厭其煩地督促我做實驗，還會聯合別間實驗室的人逼我寫論文，實為一個好夥伴；感謝佩潔學妹，學妹很友善好相處，又跟我一樣愛吃，讓我覺得剛來實驗室的時候很自在，但後來常麻煩學妹開車以及讓她擔心我的實驗覺得非常不好意思，也很謝謝這些真誠的關心；感謝豔如學妹，容忍我凌亂的桌面常不自覺地延伸過去，而且有時還會幫我借藥品，親切中帶有憂鬱的形象很好聊天；感謝昱成學弟，學弟是實驗室活力的泉源，也是個不錯的朋友，常會用生動的言語加上複雜的肢體語言和人聊天，總是為實驗室歡樂氣氛；感謝沂珩學妹，很活潑的個性和觀察入微的聰明才智讓人覺得在實驗室單調的生活多了很多有趣的事，也從她身上發現自己有很多缺點需要改進，以及讓我體會到對於將來人生必須要更有規劃和責任心；感謝婉君學妹借我一個抽屜和容忍我有時候東西超線，且學妹善良中帶點搞笑，是個很好相處的鄰居；感謝雪怡學妹，常提醒我早睡早起和遵守交通規則，且總是為我擔心很多事，希望學妹將來一切都能過的很好。

最後感謝家人，辛苦的老爸總是努力賺錢，老媽也是為家裡大小事不斷操心，能一路順利將學業完成到這個階段，真的必須好好感謝你們在背後的支持鼓勵與憂心，雖然剛畢業看起來還是一個無路用的人，但希望將來能夠用自己的雙手成就一番事業好好照顧你們；也很感謝大哥和弟弟的幫忙，總讓我減少許多課業之外的煩惱。

不太會說感性的話，研究所的日子有許多事許多回憶讓我成長和學習了很多，這篇寫很久也是因為這個原因，很想感謝所有在這幾年的日子裡，伴隨在身邊的每一個人，但是這樣真的會寫不完。真心的感謝你們對我在各方面許多缺點的包容和誠心建議，願大家將來一切都能順利，平安快樂。

目錄

中文摘要	i
Abstract	ii
誌謝	iv
目錄	vi
圖目錄	ix
表目錄	xi
一、序論	1
1.1 電化學分析法	1
1.1.1 三電極系統	1
1.1.2 循環伏安法	2
1.1.3 安培法	4
1.2 工作電極	4
1.2.1 工作電極種類	5
1.2.2 化學修飾電極	5
1.3 奈米材料修飾電極	7
1.3.1 奈米碳管修飾電極	7
1.3.2 金屬奈米結構修飾電極	8
1.3.3 金屬奈米粒子修飾電極	9
1.3.4 奈米複合材料修飾電極	10
1.3.4.1 吸附式	11
1.3.4.2 電沈積修飾	11
1.4 奈米材料修飾電極在非酵素葡萄糖感測器上的應用	12

1.4.1	鹼性環境下的葡萄糖偵測	16
1.4.2	中性環境下的葡萄糖偵測	18
1.5	幾丁聚醣在奈米材料修飾電極上的應用	21
1.6	Nafion [®] 簡介	25
二、	實驗	27
2.1	實驗目的	27
2.2	實驗儀器	27
2.3	實驗藥品	29
2.4	電極製作材料	30
2.5	樣品的配製	30
2.6	微影製程與蝕刻結合 ITO 玻璃製做拋棄式電極	32
2.7	定電位電沈積修飾與 Nafion [®] 的添加	37
三、	結果與討論	38
3.1	利用電沈積的方式修飾金奈米粒子於 ITO 電極表面	38
3.1.1	掃描式電子顯微鏡 (SEM) 的觀測結果	38
3.1.2	修飾電極在鹼性下的葡萄糖偵測效果	51
3.2	幾丁聚醣輔助金奈米粒子修飾 ITO 電極製程	55
3.2.1	電沈積電位最佳化	55
3.2.2	電沈積時間最佳化	57
3.3	安培法偵測葡萄糖與干擾物排除	58
3.3.1	修飾電極直接偵測葡萄糖與干擾物	58
3.3.2	離子選擇性薄膜 Nafion [®] 的添加修飾	61
3.3.3	Nafion [®] /金奈米粒子修飾 ITO 電極的分析效果	65
四、	結論與未來展望	70
4.1	結論	70

4.2 未來展望	70
五、參考文獻.....	72



圖目錄

圖 1-1、三電極系統配置圖。	2
圖 1-2、循環伏安法的電位變化示意圖。	3
圖 1-3、典型的可逆氧化還原反應循環伏安圖。	3
圖 1-4、化學修飾電極分類。	6
圖 1-5、修飾葡萄糖氧化酵素電極偵測葡萄糖反應機制圖。	13
圖 1-6、奈米結構的電化學反應示意圖。	15
圖 1-7、幾丁聚醣的化學結構四氯金酸鹽中的光化學反應過程。	22
圖 1-8、利用電化學方法將幾丁聚醣從溶液中電沈積出來。	24
圖 1-9、NAFION [®] 的結構圖。	25
圖 2-1、光罩示意圖。	33
圖 2-2、乾膜光阻的貼附與光罩曝光示意圖	34
圖 2-3、顯影與 ITO 蝕刻示意圖。	35
圖 2-4、蝕刻製作固定面積的 ITO 電極示意圖。	36
圖 3-1、ITO 電極表面的 SEM 圖。	39
圖 3-2、利用電沈積修飾過後的 ITO 電極。	41
圖 3-3、電沈積溶液只含有四氯金酸所修飾 ITO 電極表面的 SEM 圖。	42
圖 3-4、電沈積溶液只含有四氯金酸所修飾 ITO 電極表面的截面 SEM 圖。	43
圖 3-5、添加幾丁聚醣作為輔助金奈米粒子修飾 ITO 電極表面的 SEM 圖。	45
圖 3-6、添加幾丁聚醣作為輔助金奈米粒子修飾 ITO 電極表面的 SEM 圖。	46
圖 3-7、添加幾丁聚醣作為輔助金奈米粒子修飾 ITO 電極截面的 SEM 圖。	

.....	47
圖 3-8、修飾 ITO 電極的 EDS 圖。	48
圖 3-9、SEM 圖的比較。	50
圖 3-10、ITO 電極與金奈米粒子修飾 ITO 電極偵測 1MM 葡萄糖與空白溶液的循環伏安圖。	52
圖 3-11、利用電沈積修飾過後的 ITO 電極，在 0.1 M NaOH 水溶液中偵測葡萄糖。	54
圖 3-12、兩種電沈積修飾過後的 ITO 電極偵測葡萄糖，其循環伏安法所得峰值電流差異。	54
圖 3-13、使用不同的電沈積電位，所得到的不同峰值電流。	56
圖 3-14、不同的電沈積時間，所得到的不同峰值電流。	56
圖 3-15、干擾物與葡萄糖的安培圖。	60
圖 3-16、使用在表面添加了 NAFION [®] 的金奈米粒子修飾 ITO 電極，以循環伏安法偵測干擾物。	64
圖 3-17、以 NAFION [®] /金奈米粒子修飾 ITO 電極，以安培法依序偵測干擾物與葡萄糖。	66
圖 3-18、以 NAFION [®] /金奈米粒子修飾 ITO 電極，偵測連續添加的葡萄糖樣品。	67
圖 3-19、以 NAFION [®] /金奈米粒子修飾 ITO 電極，用安培法偵測不同濃度的葡萄糖。	68
圖 3-20、以 NAFION [®] /金奈米粒子修飾 ITO 電極偵測不同濃度葡萄糖的檢量線。	68

表目錄

表 3-1、非酵素葡萄糖感測電極文獻比較表	69
-----------------------------	----



一、序論

1.1 電化學分析法

電化學是一門研究化學變化和電能之間關係的學問，而應用在分析領域的原理則是在一個電化學反應的系統中，使用產生穩定的氧化還原反應並且電位不變的電極當做參考電極，把電化學系統中的反應簡化歸因於工作電極的反應。控制電極間的電位差變化也就是控制工作電極的能量變化，來製造電子在工作電極和分析物之間傳遞現象的發生。我們可以藉由電流值的變化、氧化還原反應和分析物的電化學特性，推算分析物的含量及性質，達到定量或定性的結果。然而並不是所有想要分析的化合物都會對所使用的電極會產生電化學的反應。但是電化學分析方法所具有的優點，例如：反應快、體積小、經濟效益高及便於操作等，使的利用電化學來做分析的研究，包括加強電極感度、專一性、分析方法的開發，一直是一個值得努力的研究方向。

1.1.1 三電極系統

三電極系統 (three-electrode system) 是目前最常用的電化學系統，包含工作電極 (working electrode)、輔助電極 (counter electrode or auxiliary electrode) 以及參考電極 (reference electrode)。工作電極是利用可以容易改變電位並且能和分析物反應得到電流訊號的材料，而參考電極則是相反。除非電流量太大，參考電極的電位是固定不變的，它必須提供一個穩定的

相對電位值，因此會外加一個輔助電極，讓參考電極的電流量可以忽略，達到固定參考電位的目的，並且和工作電極形成完整的迴路讓工作電極擁有相當的電流量來研究我們所感興趣的電化學反應。參考電極比較常用的是飽和甘汞電極（saturated calomel electrode, SCE）和銀-氯化銀電極（Ag/AgCl），它們可以提供穩定的參考電位；而輔助電極一般選擇較不易發生反應的貴金屬；工作的電極則是依照待測分析物的特性來做選擇。三電極系統的設置圖如下：

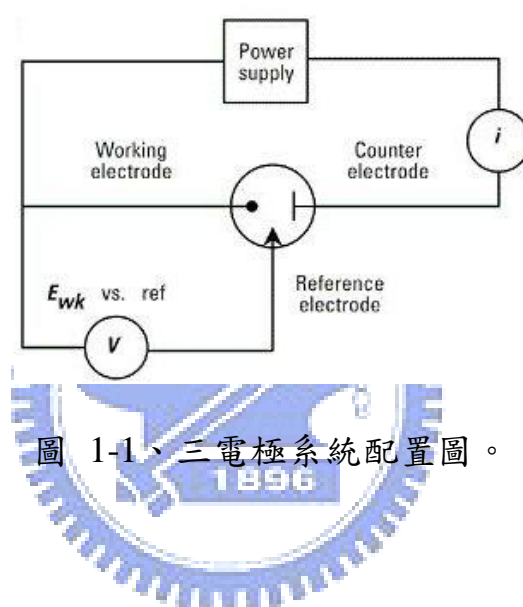


圖 1-1、三電極系統配置圖。

1.1.2 循環伏安法

循環伏安法(cyclic voltammetry, CV)是伏安法(voltammetry)的一種。伏安法本身是一個藉由改變電位差來測量在電化學反應系統的電流值變化的方式，得到電流相對於電位的曲線圖。而循環伏安法即是在某個電位範圍內施予工作電極來回反覆的線性電位變化(圖 1-2 [1])。一次來回的電位變化是為一次循環。當控制電極的電位的變化從低電位到高電位的過程，會得到氧化電流產生，分析物在電極表面進行氧化反應，當電位反向變化，則會得到還原電流，電極表面被氧化的分析物此時被還原。如此反覆進行，

而得到多次循環曲線圖形 (圖 1-3 [1])。從循環伏安法，可以觀察到一個分析物氧化還原的反應電位和可逆性，而擴散極限電流基本上正比於分析物的濃度。

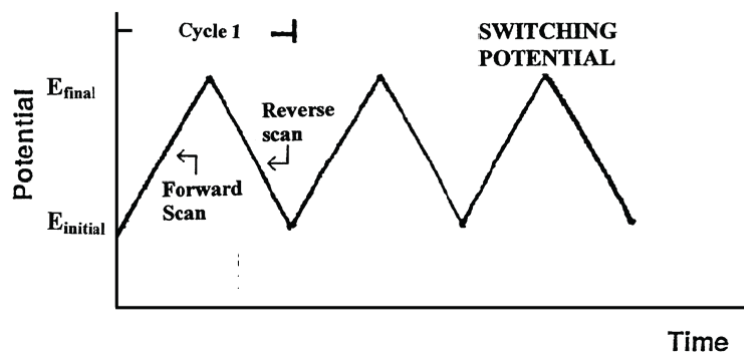


圖 1-2、循環伏安法的電位變化示意圖。[1]

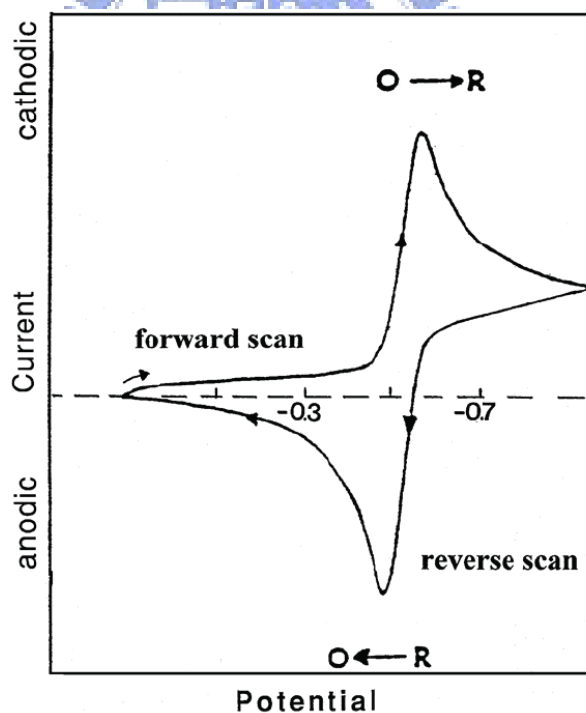


圖 1-3、典型的可逆氧化還原反應循環伏安圖。[1]

1.1.3 安培法

安培法 (amperometry) 的工作原理，是利用法拉第定律 (Faraday's law, eq. 1) 在一個電化學的反應系統內，施予一個可以氧化或還原分析的固定電位一段時間，觀察電流值隨時間的變化趨勢。作法是在一攪拌的反應槽中施加電位，當空白溶液到達穩定的電流值之後，注入含有分析物的溶液，分析物進入溶液後會和所施予的電位起反應，產生反應電流的變化，而電流的變化值正比於反應物濃度，因此可以利用電流值和濃度的關係達到對分析物的偵測效果。這是一般在分析生化分子的時候常用的一種電化學分析方法，並且適用於動態的系統中，所以在晶片電泳的分析和流動注入法結合電化學分析的應用也相當廣泛。

$$i_t = \frac{dQ}{dt} = nF \frac{dN}{dt} \quad (1)$$

i_t ：在時間 t ，電極表面所產生的電流值

Q ：電極表面的電荷量

t ：時間

n ：每莫耳分析物所傳遞的電子莫耳數

N ：反應的分析物莫耳數

F ：法拉第常數 (96485 C/mol)

1.2 工作電極

1.2.1 工作電極種類

以電化學反應做為偵測分析物的方法，其效果與所選擇的工作電極種類有相當大的關係，必須針對不同電極考慮對於不同分析物氧化還原的情形，及背景電流值的影響。此外，所能應用的電位範圍、導電性、機械性、是否能避免表面被毒化以及價錢等因素都是選擇工作電極的材料所必須考慮的因素。而常用的固體電極材質包括碳電極和銅、金、鉑等金屬電極，對於不同分析物有各種應用。例如：有不少的研究在偵測醣類(carbohydrate)及胺基酸(amino acid)的時候，使用銅電極來當工作電極；而金電極也被應用在許多不同種類的分析物像是胺基酸、抗生素(antibiotic)、醣類、神經傳導物質、硝基芳香族(nitroaromatic)等；白金電極則在神經傳導物質和醣類偵測有不少應用；碳電極因為電位的施加範圍較廣、背景電流值小、穩定性高等優點，可以測到不少分析物像是抗壞血酸(ascorbic acid)、兒茶酚(catechol)、胺基酸、尿酸(uric acid)、神經傳導物等。且碳電極有很多形式例如玻璃碳(glassy carbon)、碳纖維(carbon fiber)、摻硼鑽石(boron-doped diamond)、碳膠(carbon paste)和碳墨(carbon ink)等。

1.2.2 化學修飾電極

以往使用的裸電極(bare electrode)如玻璃碳電極、金電極、銅電極等，在使用電化學偵測時，表面容易發生吸附反應中間產物或是干擾物，造成電極表面毒化現象(poison)，影響電極的靈敏度與再現性，且電極只能偵測對於本身具有電化學活性物質的特性也因此侷限了其應用範圍。1937年，Hubbard與Lane將含不同官能基的烯類化合物，經由化學吸附作用，固定在白金電極上，發現修飾過後的電極，會得到不同的電催化反應，於是

化學修飾電極 (chemical modified electrode, CME) 這個領域開始發展起來 [2]。

化學修飾電極，是一種藉由某種物理性或是化學性的處理方式，將特殊的化合物固定在裸電極表面上，改變電極表面的性質，提昇電極在電化學反應時針對某種分析物的選擇性與靈敏度。修飾的材料多為氧化還原媒介 (redox mediator)，用以增加電子傳遞速度、降低偵測電位、減小背景電流干擾以及最重要的提昇催化反應的電流，依修飾電極的製備方法可歸納為以下四大類：(1) 吸附式[3] (2) 共價鍵結式[4] (3) 勻態多層化學修飾 [5] (4) 混摻多層化學修飾[6, 7]，如圖 1-4 所示[8]。

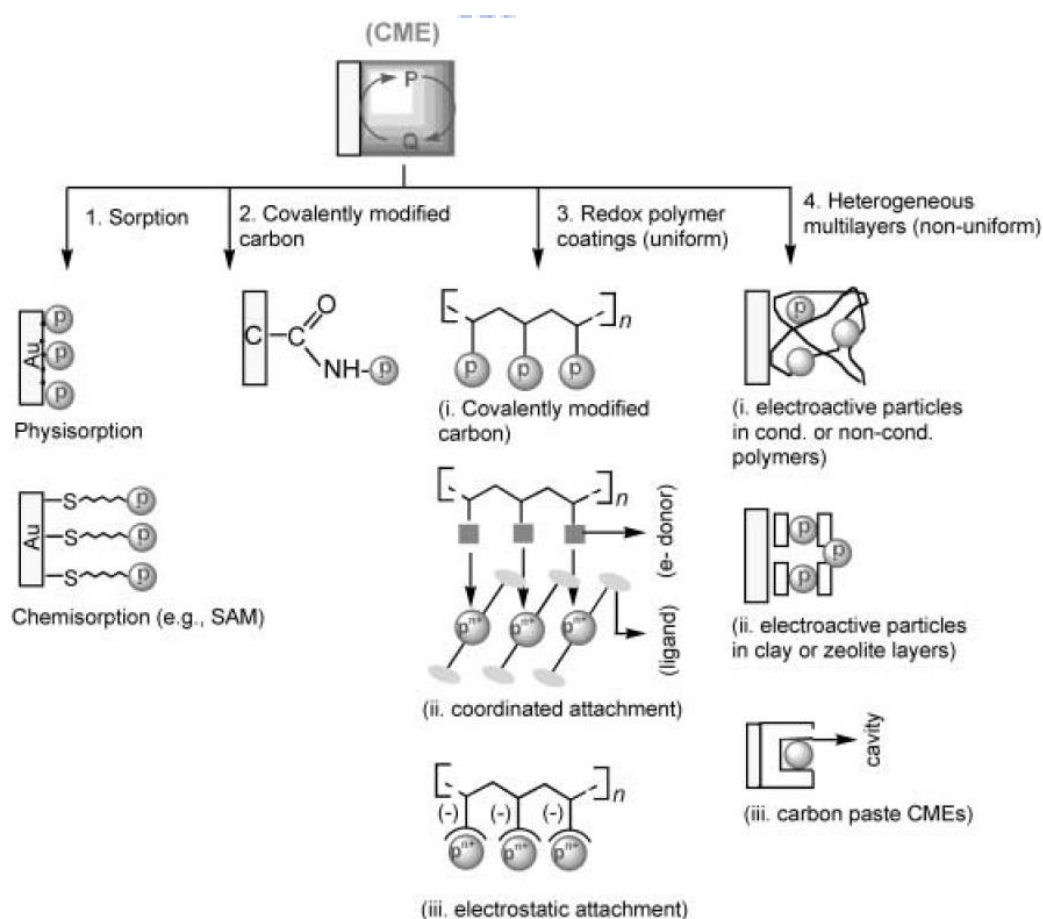



圖 1-4、化學修飾電極分類。[8]

1.3 奈米材料修飾電極

近年來，奈米尺度材料的合成與應用是一個非常令人感興趣的研究方向，因為它具有相當獨特物理、化學的性質，使其在不同的領域可以發揮其不同特殊的功效。奈米材料結合化學修飾電極在電化學分析的應用上，可以利用奈米材料的特性，例如：極小的體積、大的有效表面積以及高孔隙度等優點，改善電極感應時的靈敏度和質傳的效果，甚至提供電化學反應的催化作用而達到偵測特殊分析物的需要，提供化學修飾電極在分析領域研究中的創新與改良方向。

1.3.1 奈米碳管修飾電極



奈米碳管 (carbon nanotubes) 是在 1991 年的時候，首度被 NEC 的研究員飯島澄男 (Sumio Iijima) 在以電弧製備 C60 的時候無意間發現的。奈米碳管因為具有獨特的原子排列結構，使的奈米碳管在電化學的應用上不只具碳電極奈米化的效果，還有類似金屬或半導體的性質[9, 10, 11]並且具有促進電子傳遞的能力。因此利用奈米碳管做為電極修飾材料，製作電化學的生物感測器的研究，也是近年來令人深感興趣的課題。利用奈米碳管這方面的修飾應用，一般都會結合酵素或奈米粒子等具有催化反應能力的修飾物，共同合作以達到預期的效果。例如 Luong 與其研究團隊[12]，將單壁奈米碳管混合白金奈米粒子的 Nafion[®] 溶液滴在玻璃碳電極 (glassy carbon electrode) 上，在空氣中乾燥後完成含有白金奈米粒子的奈米碳管修飾電極，利用白金的催化能力和奈米碳管所具有加強電子傳遞的特性，作為過氧化氫的感測電極可達到很好的偵測效果，線性範圍 25 nM 到 10 μM 以及 100 μM 到 2 mM 之間，此外作者還添加了葡萄糖氧化酵素和固定用

的交聯劑，偵測葡萄糖的線性範圍可以從 0.5 μM 到 5 mM。而 Xu 與其研究團隊[13]，用逐層自組裝 (layer-by-layer self-assembly) 的方式，先在玻璃碳電極的表面塗上一層含有多壁奈米碳管的溶液，乾燥後依序浸入含有幾丁聚醣的溶液、金奈米粒子溶液、L-cysteine 溶液，最後浸入含細胞色素 (cytochrome c, cyt c) 的溶液中，並且以循環伏安法做掃描，直到電流值穩定，如此一來，細胞色素就會被固定電極上，完成 Cyt c/Cys/GNPs/Chits/MWNTs/GC 這樣多層的這種自組裝電極，用來作為過氧化氫的偵測，線性範圍在 1.5 μM 到 0.51 mM 之間，偵測極限為 0.9 μM 。

1.3.2 金屬奈米結構修飾電極

有許多文獻的修飾方法，是在電極表面製造出一個具有奈米結構和特性的修飾，例如金屬奈米球、奈米柱、奈米結構薄膜等各式各樣的表面型態來做奈米結構與電化學感測的研究。Wei Zhao 與其研究團隊[14]，將乾淨的金電極置於磷酸緩衝溶液中，用 10V 的高電壓讓電極表面氧化後，換到含有 $\beta\text{-D-glucose}$ 的還原溶液中靜置一段時間，可以在電極的表面直接製造出具有奈米結構的金薄膜。利用這電極，可以在中性 pH=7.4 的磷酸緩衝溶液中偵測到葡萄糖的訊號，在選擇性較佳的電位做安培偵測法的情況下，偵測極限達到 3.6 μM 。Liu 與其研究團隊[15]，在金電極上利用調整不同的四氯金酸 (HAuCl_4) 濃度和電沈積的電位，製造出奈米金字塔、奈米柱、奈米球等電極表面的奈米結構，用來偵測抗壞血酸 (ascorbic acid, AA) 和尿酸 (uric acid, UA)，用安培法可以得到偵測極限分別是 0.09、0.5、1 μM 及 0.03、0.13、0.35 μM ，線性範圍也很廣。另外，Ramaraj 與其研究團隊[16]，在玻璃碳電極的表面塗上一定體積的 Nafion[®]，在利用循環伏安法在含有 10 mM H_2PtCl_6 的硫酸溶液中做電沈積，可以得到具有奈米白金

結構的修飾電極，用來提昇偵測多巴胺的靈敏度，同時藉由 Nafion[®] 達到排除偵測到干擾物訊號的效果。

1.3.3 金屬奈米粒子修飾電極

將金屬奈米粒子固定到電極的表面上以及電化學的分析應用，這方面也有許多研究在正在進展，這部份可以從不同的修飾技巧來做簡介。

第一種是直接含有金屬離子的溶液中做電沈積，可以在欲修飾的電極表面利用電化學反應生成奈米尺寸的金屬粒子。而電沈積的方法，也有許多種，例如用電位改變後固定一段時間（potential step）的方式來達到電沈積的效果。Xuan Dai 等人的研究即將玻璃碳電極置於四氯金酸溶液中利用此的方法在玻璃碳電極的表面還原出金奈米粒子，並且利用線性掃描伏安法在酸性水溶液中偵測砷離子，最佳化的條件下，偵測極限為 0.0096 ppb [17]。同一個作者在 2006 年再利用這個方法，把金奈米粒子固定在 ITO 電極上，也是在酸性的水溶液中偵測砷離子，偵測極限大約到達 5 ppb [18]。類似改變電位後固定時間的作法，直接固定電位一段時間的電沈積方法也有研究表示可以在電極表面製造奈米粒子。2007 年 Martínez 與其研究團隊，發表了兩篇研究，即是利用這樣的方式，在網版印刷碳電極的表面生成金和銀的奈米粒子，並且應用陽極剝除伏安法偵測水溶液中銻離子 Sb (III)，偵測極限分別可以達到 9.44×10^{-10} M 和 6.79×10^{-10} M [19] [20]。也有許多研究利用循環伏安法（cyclic voltammetry），修飾金屬奈米粒子再電極上，例如 Chen 與其研究團隊[21]，就是利用循環伏安法的方式，把 ITO 電極置於四氯金酸與硫酸混合液中，以 100 mV/s 的速率，在 1.5 V 到 -0.6 V 之間掃描，電極的表面即可生成金的奈米粒子，應用在水溶液中 Cr(VI) 濃度的安培法偵測，線性範圍在 0.5 到 50 μ M，偵測極限為 0.1 μ M。

第二種是利用長晶的方法。2005 年，Oyama 與其研究團隊，利用晶種媒介成長法 (seed-mediated growth method) 在 ITO 電極的表面，修飾上金奈米粒子[22]。作法是先在 ITO 的表面覆蓋一層金奈米粒子的溶液 (種子溶液，seed solution) 這個部分有很多技巧，而在這裡作者是用接觸法 (touch)，是把含有金奈米粒子種子溶液的薄紙，直接接觸在 ITO 上，金奈米粒子種子就會同時轉移到它的表面，清洗乾燥後再放入含有金離子和還原劑的成長溶液 (growth solution) 中一段時間，表面就會生成高密度的金奈米粒子。在 2007 年時，Goyal 與其研究團隊，利用同樣的方法製作這種高密度的金奈米粒子修飾的 ITO 電極，應用方波伏安法偵測多巴胺 (dopamine) 和血清素 (serotonin)，可以得到線性範圍分別是 $9.44 \times 10^{-10} \text{ M}$ 到 $5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ 和 $1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 到 $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ，而偵測極限分別是 0.5 nM 和 3.0 nM [23]。



1.3.4 奈米複合材料修飾電極

第三種是把奈米材料結合其它有機或無機化學修飾物，製作成混合型的修飾，一般稱為奈米複合物 (nanocomposites)。利用奈米材料的特性，例如對於某些酵素的吸附現象、或是直接電子傳遞的能力和高靈敏度等優點結合其他添加修飾物的特性，使整體的修飾能夠提供一個複合的效果，達到相輔相成的目的，這使得奈米粒子或是其它的奈米材料在電化學感測分析上的應用變的更為廣大，扮演的角色也趨於多元，修飾的技巧和方法也隨著研究發展的越來越多，這個部分以修飾的方法來做分類簡介。

1.3.4.1 吸附式

這是利用修飾材料和基材之間的作用力，可以是物理性吸附（physisorption）或是化學吸附（chemisorption），直接把想要修飾的材料固定在基材的表面上。

Liu 與其研究團隊[24]，所製作的電極即是將 Fe_3O_4 的奈米粒子和酪胺酸酶（tyrosinase）及幾丁聚醣（chitosan）溶液混合後，直接滴在玻璃碳電極上，室溫下乾燥後，用來偵測兒茶酚（catechol），線性範圍從 $0.083 \mu\text{M}$ 到 $70 \mu\text{M}$ ，偵測極限 $0.025 \mu\text{M}$ 。Li 與其研究團隊[25]將氧化鋅的奈米線（ZnO nanowire）懸浮液和葡萄糖氧化酵素混合於 pH 7.4 的磷酸溶液中，置於 4°C 冷藏 24 個小時，可以將酵素固定在氧化鋅奈米線上，取這樣的懸浮液滴在金電極上使其乾燥後再滴上 Nafion[®] 作為保護層，製作出這樣的奈米複合材料修飾電極，用以偵測葡萄糖的線性範圍可以從 $1 \mu\text{M}$ 到 0.76mM ，偵測極限為 $0.7 \mu\text{M}$ 。



1.3.4.2 電沈積修飾

這樣的修飾方法基本上是将奈米材料和需要混摻的添加物，混合在具有固定在電極表面能力的材料中，再用電沈積方法把這樣的複合物整體修飾到電極上。

Dondapati 與其研究團隊[26]利用逐層自組裝的方法，在金奈米粒子的表面修飾上帶正電的氧化還原高分子，再修飾一層葡萄糖氧化酵素，依序製作出 Au/ORP/GOX/ORP 奈米粒子，再利用雙電極電沈積的方式，把這種複合型的奈米粒子電沈積到白金電極上，可以對葡萄糖具有良好的偵測效果。

Chen 與其研究團隊[27]，利用幾丁聚醣的特性，混合金奈米粒子和葡萄糖氧化酵素，利用單步驟定電位電沈積的方法，把金奈米粒子和葡萄糖氧化酵素固定在金電極的表面上用來偵測葡萄糖。分析的結果可以得到葡萄糖的定量線性範圍是從 5 μM 到 2.4 mM，偵測極限 2.7 μM 。後來同一個研究團隊[28]，改變之前的作法，混合四氯金酸和幾丁聚醣以及葡萄糖氧化酵素直接混合在一起，以定電位電沈積的方式，在玻璃碳電極上製作金奈米粒子和幾丁聚醣複合層，再浸泡葡萄糖氧化酵素溶液，把酵素修飾上去，製作出金奈米粒子與酵素複合式修飾電極，應用於葡萄糖的偵測有良好的分析效果。關於幾丁聚醣利用電沈積修飾方法的詳細的反應機制會在 1.5 小節中介紹。



1.4 奈米材料修飾電極在非酵素葡萄糖感測器上的應用

葡萄糖的電化學安培法偵測已經發展了一段時間，在這個領域當中，Clark 和 Lyons 在 1962 年最早提出葡萄糖酵素電極的概念[29]，而酵素修飾電極的研究又以葡萄糖氧化酵素(glucose oxidase, GOx)的修飾電極為主，許多研究也著重在利用各種不同修飾方法將酵素有效且穩定地固定在電極表面上，以得到其催化葡萄糖的氧化反應，間接偵測其副產物過氧化氫的訊號 (eq 2)，達成在生理環境下偵測葡萄糖的目的，這是最為普遍使用的一種酵素修飾原理，如圖 1-5 所示。然而，利用酵素作為電極的修飾，最大的問題就是其穩定性不足，因為酵素的活性會受到諸多因素影響，例如溫度、濕度以及 pH 值等外在條件，而另一方面，修飾酵素在電極上的製作方法，一般來說會比較複雜。為了達到良好的偵測效果，這方面的研究發

展了很多方法來穩定酵素修飾電極，例如：吸附（adsorption）[30]、交聯（cross-linking）[31]、包覆(entrainment)[32]及電聚合(electropolymerization) [33, 34]等，目的就是為了要把酵素穩定且有效的固定在固體電極表面上，但是這些方法必然也會對酵素的活性或多或少造成影響。因此非酵素修飾電極研究的目的，就是為了解決這些的問題，改良酵素修飾電極的缺點。

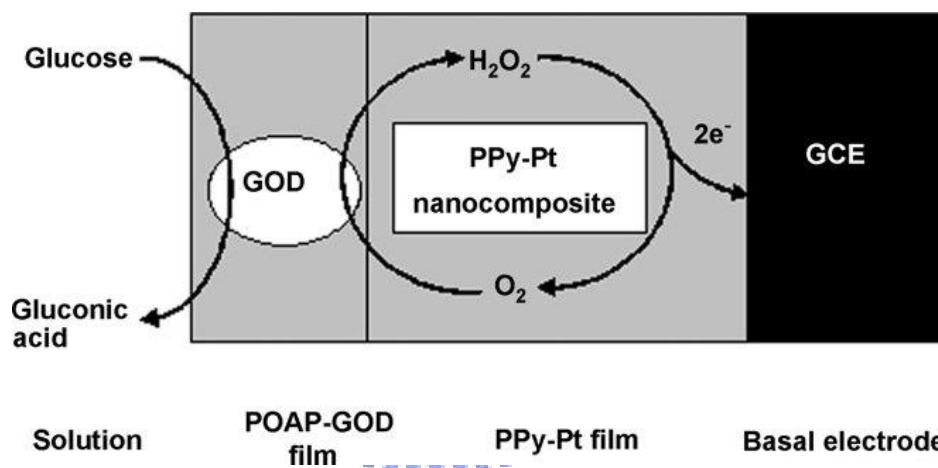
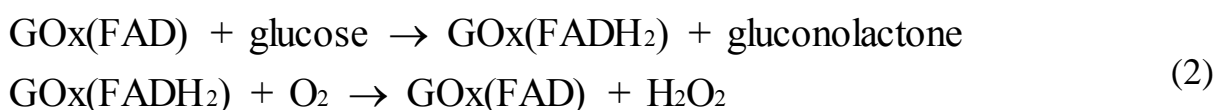
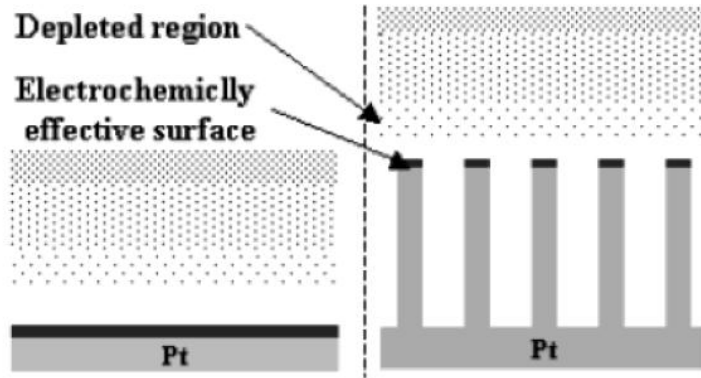


圖 1-5、修飾葡萄糖氧化酵素電極偵測葡萄糖反應機制圖。[34]

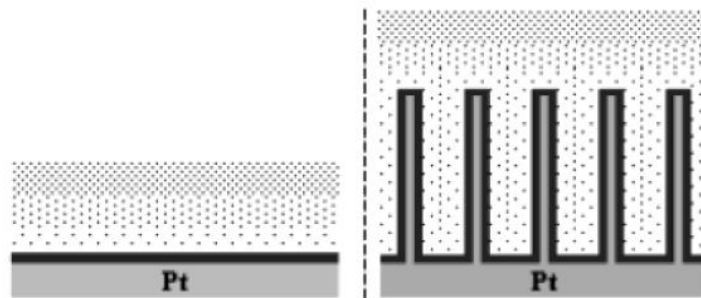
在非酵素修飾電極的研究中，目前最主要研究方向和修飾方法，著重在利用貴金屬的奈米結構或是奈米碳管的特性，在沒有酵素的存在的情況下催化葡萄糖，直接藉由電化學反應，得到葡萄糖的氧化訊號。而之所以利用奈米結構來做為非酵素的葡萄糖感測器的材料，另外一個原因是電極對於分析物的選擇性會因為反應表面是以奈米結構的形式存在，而得以顯著的提升。根據文獻所提及，動力學控制（kinetic-controlled）的電化學反應，其法拉第電流的靈敏度對於電極是奈米尺度或是孔隙的表面形態會比

單純平面的電極表面來的好，當電極在奈米尺度的粗糙等級時，會選擇性的提升惰性反應分析物的法拉第電流值[35, 36]，如圖 1-6 所示，當電化學反應屬於擴散控制 (diffusion- controlled) 的分析物，如維生素 C (AA)，在電化學的氧化還原反應中，本身的電子傳遞速率相當快速，因此在不同粗糙度的電極表面上所能產生的法拉第電流，基本上變化不大，因為反應快，擴散決定了最大的電流值，增加反應表面積不會影響反應速率；而動力學控制的葡萄糖氧化反應電流值，則是相反的現象，因為反應慢，所以當電極表面積增加時造成反應量增加，所得到的增益會直接反應在電流訊號的提昇上。因此，我們可以利用這樣特性，將奈米材料修飾在電極表面上，以改善葡萄糖在電化學偵測上不足的靈敏度與選擇性。

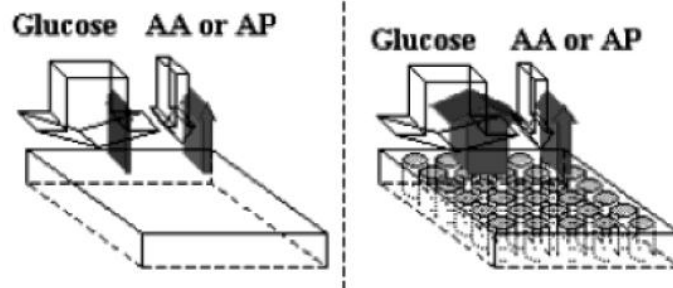
然而，這樣的非酵素修飾電極，在鹼性環境下的反應最為良好，這與葡萄糖在不同的 pH 值環境下的反應機制不同有關，文獻在偵測環境的部份大多以鹼性與中性環境下偵測最為普遍。另外，現階段的非酵素電極基本上還有一些問題需要克服，例如反應的中間產物和真實環境中陰離子的吸附、干擾物的存在等，都必須研究探討解決的方法，克服電極欲提昇選擇性或再現性等問題的阻礙。以下整理現階段各種非酵素修飾的葡萄糖感測電極的種類，依偵測環境分類，再細分所使用的電極修飾的奈米材料以及其偵測葡萄糖所能夠達到的分析效果。



(A) Diffusion controlled electron transfer
(e.g., AA or AP)



(B) Kinetic controlled electron transfer
(e.g., glucose)



(C) Smooth Pt

Mesoporous Pt

圖 1-6、奈米結構的電化學反應示意圖。[35]

1.4.1 鹼性環境下的葡萄糖偵測

白金 (Pt):

Xia 與其研究團隊[37]，利用熱解 (Pyrolysis) 的方式，先在氮氣環境下製作白金和奈米碳管複合物 (Pt-MWCNTs composite) 的粉末，再把粉末均勻分散在 DMF 中，直接滴在玻璃碳電極上，另外在添加一層 Nafion[®] 上去，作為干擾物排除的薄膜，在最佳條件下，在 0.1 M NaOH 溶液中，得到兩個線性範圍，1.5 到 11.7 mM 以及 11.7 到 26.5 mM ($r > 0.999$)。

鎳 (Ni):

Abdollah Salimi 與其研究團隊[38]，利用溶膠凝膠法 (sol-gel) 製作鎳粉末和 Nafion[®] 混合修飾碳陶電極 (carbon ceramic electrode)，這樣的複合材料電極，在最佳條件下葡萄糖在 0.1 M NaOH 中偵測葡萄糖，線性範圍很廣，從 0.5 μ M 到 5mM，而偵測極限為 0.1 μ M，靈敏度 40 μ AmM⁻¹，並且可以應用於血清真實樣品中。

金 (Au):

Hu 與其研究團隊[39]，直接用四氯金酸溶液合成出金奈米粒子，參入介面活性劑 dihexadecyl hydrogen phosphat (DHP) 後，用超音波震盪十六個小時，讓金奈米粒子均勻的分散在溶液中，直接滴在玻璃碳電極的表面後在空氣中乾燥，製作成金奈米粒子修飾電極，而作者在這個地方使用線性掃描伏安法 (linear sweep voltammetry, LSV) 來分析葡萄糖，在 0.1 M 的 NaOH 溶液中，線性範圍在 90 μ M 到 9.9 mM，偵測極限為 40 μ M。而干擾物如維他命 C (ascorbic acid, AA) 和尿酸 (uric acid, UA) 在實驗中是一個嚴重的干擾，並沒有解決，但實驗中對於反應機制的探討頗為詳細。而

類似將金奈米粒子先合成好之後再修飾的方法，C. Retna Raj 與其研究團隊 [40]，把金電極修飾上 (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane (MPTS)，這是一種帶有硫醇官能基的矽酸鹽類，會在金的表面上形成一種三維的網狀結構，在把這樣的電極浸到含有金奈米粒子的溶液中，金奈米粒子就會自組裝到電極的表面上，而為了得到更好的催化電流，電極可以進一步放到含有四氯金酸及羥胺 (hydroxylamine) 的溶液中，使得金奈米粒子增大。用這樣的電極做葡萄糖偵測，在 pH 9.2 的磷酸緩衝溶液中，可以得到濃度線性範圍 0 到 8 mM，偵測極限 50 nM，靈敏度 $179 \mu\text{Acm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ 的分析效果，干擾物的部份作者只提到 AA 不會造成影響。

二氧化錳 (MnO_2):

Ya 與其研究團隊 [41]，在鈮板 (Ta plate) 生成多壁奈米碳管，再用定電位做電沈積的方式，在奈米碳管上修飾二氧化錳的奈米粒子，直接偵測葡萄糖，干擾物 AA, UA 和氯離子都可以有效排除，而濃度的線性範圍在 10 μM 到 28 mM 之間，偵測極限沒有提到，而偵測靈敏度為 $33.19 \mu\text{AmM}^{-1}$ 。

奈米碳管 (CNTs):

Loh 與其研究團隊 [42]，用自製的直流電漿增強化學蒸鍍 (direct current plasma enhanced chemical vapor deposition, DC-PECVD) 系統，直接重新長出不同形式的奈米碳管，根據其成長的結構複雜度分為三種級別，再結合金電極用以在 0.1 M 氫氧化鈉溶液中偵測葡萄糖訊號，實驗中可以發現，第三級結構的碳管形式可以對葡萄糖有最好的催化效果，以及最佳的選擇性，線性範圍在 1 到 11 mM，偵測極限為 $1 \mu\text{M}$ ，靈敏度為 $60 \mu\text{Acm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ ，如果再將這第三級結構的電極施予陽級處理，也就是在 1 M 的硝酸溶液中做循環伏安法，讓奈米碳管的表面帶有羧酸根或是氫氧根的結構，在鹼性

溶液下使電極表面帶負電荷，可以更有效的排除帶負電荷的干擾物如 AA 和 UA 分子的干擾，而靈敏度則可以提昇到 $157 \mu\text{Acm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ 。

鈷(II)四磺酸基酞菁(cobalt(II) phthalocyanine tetrasulfonate, CoPcTS)：

Şahin 與其研究團隊在鉛筆碳棒電極 (pencil graphite electrode) 上電聚合導電性高分子聚吡咯的奈米纖維 (polypyrrole nanofiber)，再將電極浸泡在 CoPcTS 溶液中一段時間可以在聚吡咯的薄膜上吸附修飾 CoPcTS，但是在修飾 CoPcTS 之前，會先做一個表面過氧化的處理，這個處理步驟可以得到降低背景訊號的效果，否則即使修飾上 CoPcTS 也得不到葡萄糖的氧化訊號，處理方法是把聚合好高分子的電極在 0.15 M 氫氧化鈉溶液中做電位掃描，再用差式脈衝伏安法 (Differential pulse voltammetry, DPV) 做活化，在這之後才做 CoPcTS 的修飾。CoPcTS 的修飾確實可以對葡萄糖氧化具有催化效果，這裡的分析方法是使用差式脈衝伏安法來對葡萄糖濃度做定量，在濃度 0.15 M 的 NaOH 溶液中，葡萄糖的線性範圍從 250 μM 到 20 mM，偵測極限為 100 μM ，靈敏度 $5.695 \mu\text{AmM}^{-1}$ ，最後應用血清做真實樣品的分析與醫院所做分析結果來比較[43]。

1.4.2 中性環境下的葡萄糖偵測

白金 (Pt)：

Zen 與其研究團隊[44]，把白金電極置於離子溶液 chloride-1-ethyl-3-methylimidazolium chloride ($\text{ZnCl}_2\text{-EMIC}$) 之中，在攝氏 120 度下做陰極處理和陽極處理，目的是為了讓鋅先和白金形成合金，再強迫鋅脫離，在白金電極的表面得到粗糙的奈米通道，而發現不同的粗糙程度對於電極偵測葡萄糖的選擇性是具有相關性的，基本上愈粗糙的表面，葡萄糖的訊號

就越大，但干擾物的訊號大約持平。利用選擇性最高的電極在最佳條件電位，在 pH 7.4 磷酸緩衝溶液的環境中對葡萄糖做安培法偵測，可以得到線性範圍為 0 到 10 mM，偵測極限部分沒有提及，而靈敏度為 $291 \mu\text{Acm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ ，且氯離子的存在沒有影響。Sheu 與其研究團隊[45]，在鈿板(Ta plate)上合成多壁奈米碳管(MWCNT)，並黏合在玻璃碳電極上，接著在含有白金和鉛離子的溶液中，使用循環電位的方式，在奈米碳管的表面上，生成白金和鉛合金的奈米粒子(PtPbNP/MWCNT)。利用這樣的電極得到兩個電位下的分析結果：在 0.3 V 做定電位安培法偵測，其線性範圍可以到 11 mM，偵測極限 $1.8 \mu\text{M}$ ($S/N = 3$)，靈敏度 $17.8 \mu\text{Acm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ ，但是在此電位下干擾物訊號不能忽略，於是作者另外選擇一電位 -0.15 V，並在修飾的電極表面再多修飾一層 Nafion[®] 和白金與鉛合金的奈米粒子，而 Nafion[®] 的修飾在實驗中可以降低基線雜訊，最後得到的線性範圍是到 5 mM，偵測極限為 $7 \mu\text{M}$ ($S/N = 3$)，靈敏度約 $18 \mu\text{Acm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ 。以白金為主添加鉛做為合金的應用，另外還有 Chen 與其研究團隊[46]，他們在鈿板上，用單步驟的水熱法，生成白金鉛的網狀結構(PtPb networks)，也比較了沒有鉛的添加與添加鉛的比例對葡萄糖的催化的關係，得到最好的催化活性是在添加比例為 50% 時，由這樣的電極材料來做葡萄糖安培法的偵測，作者提到兩個催化電位，在其中一個電位 400 mV 下，可以得到線性範圍為 1 到 16 mM，靈敏度為 $10.8 \mu\text{Acm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ ，但是干擾物影響較為嚴重；另一個電位設定在 -80 mV，這個電位下沒有干擾物訊號，但是對濃度的線性較差，而氯離子的存在則對葡萄糖訊號影響不大，但濃度太高還是會有影響。水熱法融合白金和其他金屬的部份還有 Chen 與其研究團隊[47]，在鈿板上合成白金和鈹合金的奈米孔洞結構，在最佳合金比例下，且含有氯離子的中性緩衝溶液中，得到線性範圍是 0 到 10 mM 之間，靈敏度 $93.7 \mu\text{Acm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ 。

金 (Au) :

Kang 與其研究團隊[48]，把金電極浸入汞溶液中一段時間，經由這樣的處理過程 (amalgamation treatment)，可以讓表面變得非常粗糙，實驗中顯示反應的催化效果，有效提昇電流訊號並降低反應電位，在 0.25 V 的電位下，在 0.1 M, pH 7.0 的磷酸緩衝溶液中，做安培法所得到的線性範圍，為 0 到 10 mM，而偵測極限為 2 μM ，靈敏度為 32 $\mu\text{Acm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ 。雖然這個反應系統是在中性環境下，基本上 AA、UA 和 AP 不會造成干擾，選擇性良好，但是氯離子的出現會阻止葡萄糖氧化，使電極活性降低，這部份作者表示確實需要進一步的研究解決方法。Chen 與其研究團隊[49]，把金電極用高電位氧化一段時間之後，再用葡萄糖溶液，把電極還原回來，會得到一種金奈米結構的膜層在金電極的表面上，利用定電位安培法，選擇沒有干擾物訊號的電位，可以得到線性範圍到 30 mM，而偵測極限則是 3.6 μM 。Xia 與其研究團隊[50]，製作出金奈米粒子結合具有三維孔洞結構基底修飾，可以得到一個在中性環境充滿氯離子的環境下，測到葡萄糖訊號的修飾電極，且作者認為干擾物訊號是可以忽略的，這個實驗的線性範圍在 2 到 10 mM，偵測極限 5 μM ，而靈敏度為 11.8 $\mu\text{Acm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ 。

1.5 幾丁聚醣在奈米材料修飾電極上的應用

幾丁聚醣 (Chitosan) 是一種具有生物可分解性和生物相容性的天然的聚合物，最大的特色在於他的結構中有很多的一級胺官能基，對於過渡金屬有獨特的親和力，因此它會有一種類似對金屬離子螯合的現象，提供穩定金屬奈米粒子之能力，再加上良好的成膜特性，因此相當適合用於製造幾丁聚醣-金屬奈米粒子的複合物的修飾材料[51, 52]。也有許多研究是針對幾丁聚醣在輔助合成奈米粒子的應用[52, 53]，例如 Yang 與其研究團隊[53]，在幾丁聚醣的醋酸溶液中加入四氯金酸溶液，攪拌加熱後可以在溶液的溫和環境中還原出金奈米粒子，利用的即是幾丁聚醣在金奈米粒子形成時發揮的穩定效果。另外還有研究是在幾丁聚醣的表面利用光解的方法合成金奈米粒子[54, 55]。Yonezawa 與其研究團隊[54]，把幾丁聚醣的醋酸溶液塗佈在石英表面乾燥後浸入四氯金酸溶液中，形成幾丁聚醣的四氯金酸鹽，再度乾燥後使用 253.7 nm 的紫外光照射下，可以在表面還原出不同聚集度的金奈米粒子，如圖 1-7 所示。除此之外，幾丁聚醣還有許多優點，例如：化學惰性、無毒、高的機械強度、親水性以及好的成膜能力，因此在電極表面修飾的領域上，利用幾丁聚醣的性質當做媒介，做為合成或是固定奈米粒子的應用上，是一個被相當廣泛應用的材料。

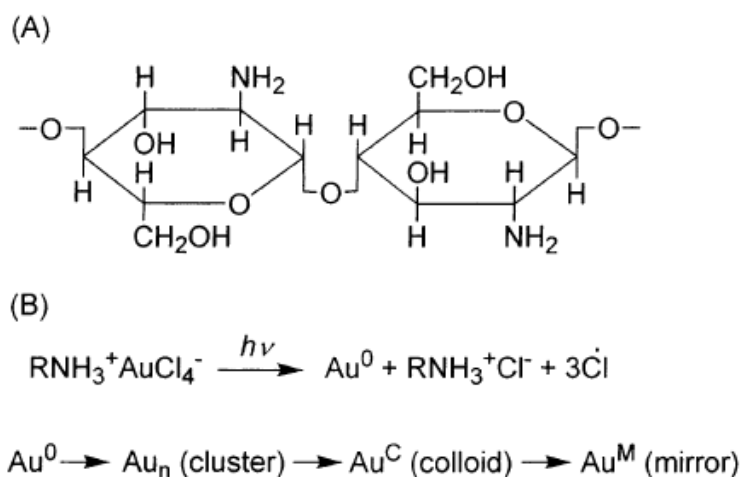


圖 1-7、(A) 幾丁聚醣的化學結構 (B) 幾丁聚醣四氯金酸鹽中的光化學反應過程。[54]

一般來說，幾丁聚醣在金屬奈米粒子修飾電極並結合電分析領域的應用上，可以分為兩種方式：第一種是直接逐層組裝，並且搭配酵素的修飾電極，這樣的修飾方法基本上只是單純利用物質間的吸附原理，將金屬奈米粒子固定在電極表面上。Liu 與其研究團隊[24 如上]所製作的電極即是將 Fe_3O_4 的奈米粒子和酪胺酸酶及幾丁聚醣溶液混合，直接滴在玻璃碳電極上，在室溫下乾燥後，用來偵測兒茶酚 (catechol)。Zhao 與其研究團隊[56]，所製作的金奈米粒子修飾電極，則是在幾丁聚醣溶液中合成金奈米粒子後，混合蒙特納石黏土 (Montmorillonite clay)，滴在玻璃碳電極上作為金奈米粒子的第一層修飾，第二層再滴上 Horseradish Peroxidase (HRP) 酵素溶液，最後覆蓋上一層蒙特納石黏土，在室溫下乾燥完成，不使用時則存放在 4°C 冰箱中。這樣的電極對於過氧化氫的偵測有不錯的線性範圍，從 $39 \mu\text{M}$ 到 3.1 mM ，而偵測極限是 $9 \mu\text{M}$ 。

第二種利用幾丁聚醣的修飾方法，是利用幾丁聚醣在不同 pH 值的水溶液中具有不同溶解度的特性 (文獻中幾丁聚醣的 pKa 值大約在 6 到 7 之

間[57, 58])，來輔助將金屬奈米粒子用電沈積的方式固定在欲修飾的電極表面。原理和作法是將欲修飾的電極置於合成好的金屬奈米粒子和幾丁聚醣的混合溶液中，在工作電極上施予一個固定電位後，因為電極表面會發生氫離子還原成氫氣的反應，所以會造成電極表面和溶液形成一個 pH 值梯度的現象，也就是電極表面的 pH 值高於溶液本身，如此一來，可以讓幾丁聚醣在電極的表面析出沈積，形成一個修飾的膜，而混合在溶液中的奈米粒子，也會因此被攜帶附著於電極表面[59]，如圖 1-7 所示。這種固定奈米粒子的方式有許多文獻使用過。例如，Chen 與其研究團隊[27]，將金奈米粒子合成出來後混合葡萄糖氧化酵素在幾丁聚醣溶液中，使用雙電極固定電位的方式，把金奈米粒子和葡萄糖氧化酵素，同時固定在電極表面上，做為葡萄糖的偵測電極，所使用的就是這種修飾方法，可以得到線性範圍 5 μM 到 2.4 mM，偵測極限 2.7 μM 。此研究團隊，還利用相同的方法把 MnO_2 奈米粒子修飾到金電極的表面上[60]，研究 MnO_2 奈米粒子在抑制抗壞血酸在電化學偵測造成的干擾，並且應用到先前製作的葡萄糖偵測電極，可以得到相似的葡萄糖偵測效果，並且降低抗壞血酸的干擾訊號。Veerasai 與其研究團隊[61]，在幾丁聚醣溶液中混摻金奈米粒子和 HRP 酵素，再利用固定電位吸附幾丁聚醣的同時把金奈米粒子和 HRP 酵素同時固定在網版印刷碳電極的表面上，用安培法做過氧化氫的偵測應用，線性範圍在 0.01 到 11.3 mM 之間，偵測極限達到 0.65 μM 。由於網版印刷碳電極的價格便宜使用方便，因此作者將這樣的電極視為一種拋棄式的生物感測電極。

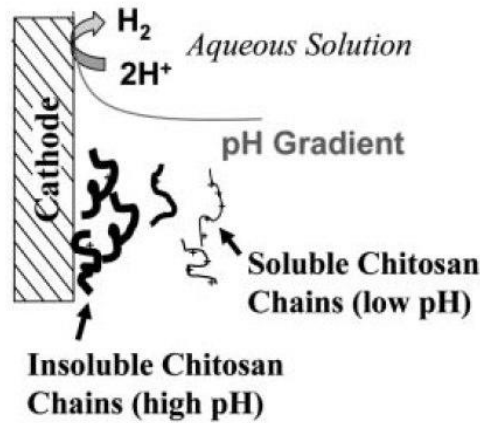


圖 1-8、利用電化學方法造成特定區域的 pH 梯度，將幾丁聚醣從溶液中電沈積出來。[59]

Chen 與其研究團隊其後又提出了一個新的金奈米粒子的修飾方法[28]，在前面小節 1.3.4.2 中有提過，即將四氯金酸和幾丁聚醣直接混合在一起，再以定電位電沈積的方式，把幾丁聚醣的沈積在電極的表面上，同時，也在這樣的電位條件與幾丁聚醣的作用下，在表面還原出金奈米粒子，省略了事先合成好金奈米粒子的步驟，最後再把修飾上金奈米粒子和幾丁聚醣膜的玻璃碳電極，在低溫下浸泡在含有葡萄糖氧化酵素的溶液中十個小時，製作出葡萄糖氧化酵素修飾的電極，這是一個更方便製作的金奈米粒子與酵素複合式修飾電極方法。而用此電極來偵測葡萄糖可以得到偵測的線性範圍從 $50 \mu\text{M}$ 到 1.3mM ，而偵測極限為 $13 \mu\text{M}$ 。

而本實驗是參考許多文獻以及關於幾丁聚醣的研究[51-55]，應用幾丁聚醣的特點，也就是在金還原時所存在的作用力，促使我們在使用電沈積的方式於電極表面將金離子還原出來的同時，形成具有金奈米粒子結構且穩定的修飾表面，用來做為不需要酵素修飾的葡萄糖感測電極，因為金奈米粒子本身就具有催化葡萄糖產生氧化反應的能力，這樣的修飾方法在電化學分析領域的文獻中比較少提到，但我認為此方法在金奈米粒子的快速

生成上，具有非常大的潛力，且在一般的奈米粒子修飾電極的技巧中，這個方法更加簡便，更容易。在葡萄糖偵測的應用上，甚至不需要考慮一般偵測葡萄必須修飾酵素而必須擔心穩定性的問題，發展這樣的修飾方法，可以讓電極修飾的製程快速不複雜，提昇電極製作的再現性，這對於製作可拋棄式的工作電極也是一個重要考量。

1.6 Nafion[®] 簡介

Nafion[®] 是由杜邦公司 (E. I. DuPont) 在 1960 年代研發出來的一種離子型的高分子 (ionomers)。結構上是由全氟乙氧基 (perfluorinated vinyl ether) 與四氟乙烯 (tetrafluoroethylene, TFE) 共聚合而成。其疏水型的骨架與離子型的末端，提供一個化學穩定的環境，使得 Nafion[®] 成為一種大家廣為應用的離子選擇性的薄膜。其結構式如圖 1-7 所示：

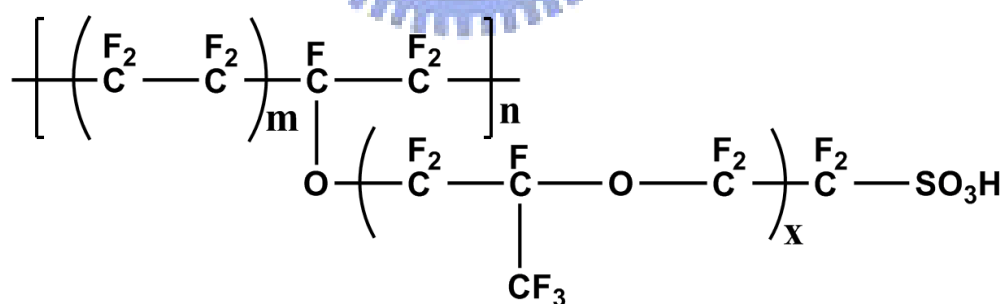


圖 1-9、Nafion[®] 的結構圖。

以低極性的四氟乙烯單體 (tetrafluoroethylene monomer) 所組成的骨架以及帶有氧和末端磺酸根的支鏈所組成的結構，骨架或支鏈的長度間比例， m 、 n 、 x 的值不同，以及乾燥的溫度壓力等變因，都會影響 Nafion[®] 成膜之後的性質。由於 Nafion[®] 的磺酸根會解離帶負電荷，可以在生化感測器的表面，形成一個帶負電荷的薄膜，與陰離子型的干擾物，產生靜電排斥的作用，以提高偵測分析物的選擇性，因此 Nafion[®] 在電化學的生化感測電極中，常被應用來當做阻擋陰離子干擾物的一層保護膜[62, 63, 64]，也可以直接混合修飾成分，直接當做修飾電極的材料[65, 66]。



二、實驗

2.1 實驗目的

本實驗的研究目的，是預期發展出一種對於葡萄糖具有獨特催化反應能力，且能夠準確靈敏地做定量分析使用的葡萄糖電化學感測工作電極。而利用非酵素修飾電極偵測葡萄糖的概念，以奈米材料取代目前較為常用的酵素修飾電極，可以增加穩定性且減小誤差。考量一般在實用上的方便性，我們將使用的電極基材，設定在可以一次使用後即可拋棄更換新電極使用的材料，ITO 玻璃，排除電極在重複使用後，受到反應中間物毒化電極表面的影響所造成的誤差。所以本實驗利用微影蝕刻的方法來固定 ITO 的表面積，控制修飾電極基材的製程，製作拋棄式的葡萄糖感測電極試片。



2.2 實驗儀器

(1) 電化學偵測器

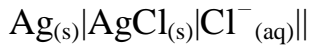
CH Instrument, Inc. (Austin, TX, USA) 所生產的 Model 8021B Electrochemical Detector。使用其中的循環伏安法，和定電位安培法來做電沈積的電化學修飾以及樣品的電化學分析偵測。

(2) 電極

本實驗所使用的工作電極，是以氧化銦錫導電玻璃 (Indium tin oxide coated glass, ITO glass) ，簡稱 ITO 玻璃，做為電極的基底材料，進一步

做電極修飾研究。

參考電極為 CH Instrument, Inc. (Austin, TX, USA) 所生產的銀/氯化銀電極 (Ag/AgCl, 3 M KCl)，以下列方法表示：



電極的半反應：



在 25°C 時，可以得到相對於標準氫電極 +0.197 V 的穩定電壓。

輔助電極則是使用純度 99.99% 的鉑線 (Pt wire)。

(3) 場發射掃描式電子顯微鏡 (Field Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM)



由 JEOL 公司所生產的 SEM，型號為 JSM-7401F，操作電壓為 0.1 kV~30 kV，而解析度為 1.0 nm (V=15 kV) 或 1.5 nm (V=1 kV)，應用於一般金屬、陶瓷、半導體、高分子等材料領域之微觀組織、成份探討；以及奈米材料、奈米元件之形貌、結構分析；IC 半導體、封裝、光碟、LED 等光電相關產業之破壞、故障分析等。主要附件為能量散佈光譜儀系統 (energy dispersive spectrometer, EDS)，可以輔助 SEM 做定性分析，由於試片受電子束撞擊後會產生二次離子，並在內層軌域留下電洞，當外層電子躍遷進去後，多出的能量會以 X 光的形式放出，其能量因元素不同而有所差異，而得到表面元素定性的結果。

2.3 實驗藥品

(1) 分析物標準品

葡萄糖 (D- (+) -glucose)、果糖 (D- (-) -Fructose) 以及尿酸 (Uric acid, >99%) 皆購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。氯化鈉 (Sodium chloride) 購自 Fluka 公司 (Buchs, Switzerland)。維生素 C (L-(+)-ascorbic acid, 99+%) 購自 Lancaster synthesis 公司 (Morecambe, England)。

(2) 緩衝溶液及溶劑

氫氧化鈉 (Sodium hydroxide, NaOH)、鹽酸 (Hydrochloric acid, HCl, 37%) 購自 Riedel-deHaën 公司 (Seelze, Germany)。磷酸氫二鈉 (di-sodium hydrogen phosphate anhydrous, Na_2HPO_4) 購自 Scharlau 公司 (Barcelona, Spain)、磷酸二氫鈉 (Sodium dihydrogen phosphate anhydrous, 99%, NaH_2PO_4) 購自 Fluka 公司 (Buchs, Switzerland)、氯化鉀 (Potassium chloride) 購自 J.T. Baker 公司 (Phillipsburgh, Nj, USA)、實驗室所使用的去離子水為 Milli-Q 純水系統 (Millipore, Bedford, MA, USA) 提供，電阻係數值為 $18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ 。


(3) 其他藥品

四氯金酸 (Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate 99.9%) 購自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。幾丁聚醣 (Chitosan, >85% deacetylated) 購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。碳酸鈉 (Sodium carbonate, anhydrous) 購自 Union chemical work Ltd. (Hsinchu, Taiwan)。

2.4 電極製作材料

本實驗所使用的工作電極為 ITO 玻璃(225801XE)，厚度 $125\pm 25\text{nm}$ ，電阻值為 $15\ \Omega/\text{square}$ ，購自 Merck Display Technologies Ltd. (Taoyuan, Taiwan)。負型乾膜光阻 (AF-5075) 購自 Chang Chun Plastic Co., LTD (Hsinchu, Taiwan)。微影製程使用 Tah-Hsin TCC 6000 護貝機 (Taipei, Taiwan) 壓上光阻。光罩對準曝光機使用 EMA-400 UV aligner (Tokyo, Japan)。隱形膠帶 (Scotch[®] MagicTM Tape) 型號為 810L-3PK (3M St. Paul, MN, USA)，其主要材質是醋酸酯類 (acetate)。Nafion[®] 購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

2.5 樣品的配製



氫氧化鈉溶液用去離子水配製 0.1 M 使用。濃度 0.1 M pH 7.0 的磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer solution) 為混合磷酸氫二鈉及磷酸二氫鈉溶液配製而成。葡萄糖以及果糖、維生素 C、尿酸、對乙醯氨基酚等干擾物的配製為直接使用磷酸緩衝溶液當天配製，所需濃度也是用磷酸緩衝溶液做稀釋。

電沈積使用的四氯金酸溶液，先用去離子水配製儲備溶液濃度 1%，使用前再用去離子水稀釋到所需要的濃度。幾丁聚醣的儲備溶液是先將 0.1 g 的幾丁聚醣固體加入約 60 mL 的去離子水中，再加入 2 M 的鹽酸溶液 0.5 mL，用超音波震盪使之溶解於酸性水溶液中，最後用濾紙過濾雜質，將澄清水溶液用去離子水將溶液體積加到 100 mL，得到濃度 0.1% 的基丁聚醣溶液。

然而電化學分析實驗中，循環伏安法的實驗在 20 mL 的樣品瓶中進行，配製 10 mL 的溶液，架設三電極系統以 0.1 V/s 的掃描速率在某個電位範圍內做掃描；而定電位安培法為方便分析物的滴入測量，於是選定使用體積和開口較大的燒杯中進行，在設定某個電位後，以磁石固定相同的轉速攪拌測量電流值，先測量空白溶液中的電流值，當電流平衡時滴入分析物觀察電流訊號變化，取其平衡電流值。



2.6 微影製程與蝕刻結合 ITO 玻璃製做拋棄式電極

由於工作電極除了必須能夠催化分析物的電化學反應之外，不同電極在分析物的定量上，也必須具有一定的再現性才能得到可靠的數據，因此在製做電極表面的修飾處理之前，電極表面幾何面積的固定和量產，對於製做拋棄式的電極來說，是一個重要的環節，而本實驗在這個部分的處理方法是利用產業界已經相當普遍使用的微影製程（Photolithography）以及蝕刻（etch）方法來達到這個目的。微影製程的部分，首先必須先設計光罩（mask）上所印製的電極圖案（pattern），如圖 2-1 所示，黑色是不透光的區域，之所以設計電極形狀為透光區域，是因為選用的光阻是負型光阻（negative photoresist），這部分在接下來的文章段落會說明。接著在玻璃上的 ITO 部份熱壓上光阻之後，透過光罩以及 UV 曝光後會在光阻上得到需要的電極圖案，再經由顯影以及蝕刻的方法，即可得到固定面積的 ITO 玻璃電極。詳細的步驟如下：

（1）乾膜光阻

將乾膜裁成適當大小後撕去其中一面的保護膜，輕輕覆蓋在 ITO 的表面，再推入溫度大約 90℃ 的護貝機中，乾膜就會緊緊地黏附在 ITO 上，如圖 2-2 所示，而過程中盡量保持不被陽光照射到，光阻在長時間不使用的情況下，必須放置在 4℃ 的冰箱中保存。

（2）曝光顯影

本實驗所使用的光阻是負型光阻，也就是光阻本身在接收到紫外光的能

量之後，會發生感光鏈結（cross linkage）形成耐酸性和弱鹼的高分子，在用強酸做蝕刻的時候，可以用來保護欲留下的部分，因此光罩設計透光的部份，即是將來蝕刻過後留下電極的形狀。將印製好的光罩置於貼上光阻的 ITO 上，放到曝光機的紫外光投射位置，曝光十二秒鐘，光罩中設計成透光的部份（如圖 2-1 所示，白色為透光區域），會讓被照射到的光阻轉變性質，且顏色也會有變深的情況，可以在曝光後可以看出所設計的電極形狀顯現在光阻上面。而顯影的部份，如圖 2-3 所示，電極形狀以外的部份，也就是沒有曝到光的光阻，可以被弱鹼溶掉。因此，顯影的步驟是先將經 ITO 玻璃上光阻的透明保護膜撕掉，浸泡在濃度 1% 的碳酸鈉溶液中大約十五分鐘後即可清除被光照罩遮住無曝光部分的光阻，最後取出來用清水清洗乾燥，留下附著在 ITO 上所需電極形狀的光阻。

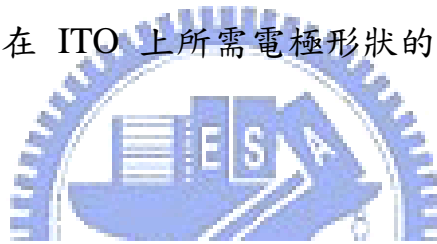


圖 2-1、光罩示意圖。

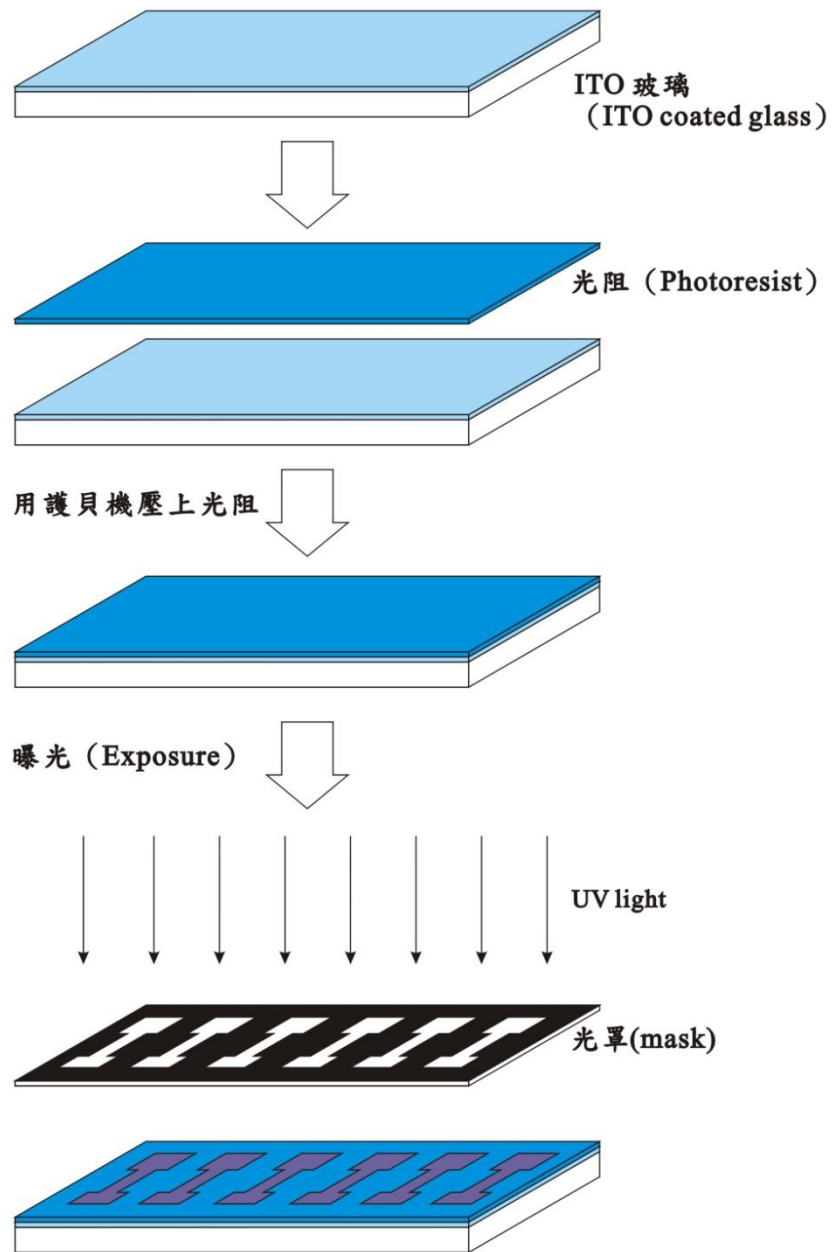


圖 2-2、乾膜光阻的貼附與光罩曝光示意圖

(3) 蝕刻

由於經過顯影後留下的光阻是經過曝光反應的部份，對酸有很好的抵抗力，因此把顯影過後 ITO 玻璃，置於加熱到 50~55°C 的濃鹽酸（37%）中，輕微攪拌大約 1.5 分鐘，ITO 層沒有光阻保護的部分，會被熱的濃鹽

酸蝕刻清除掉，如圖 2-3 所示，而有光阻保護的部份會留下來。蝕刻過後的 ITO 玻璃用清水沖洗一下，置於氫氧化鈉溶液中並施予超音波震盪，可以把蝕刻用來抗酸保護的光阻剝除掉，完成在 ITO 玻璃上蝕刻出設計的 ITO 電極形狀，一片 3 cm × 9 cm 的 ITO 玻璃，可以大約製作十一支電極使用。

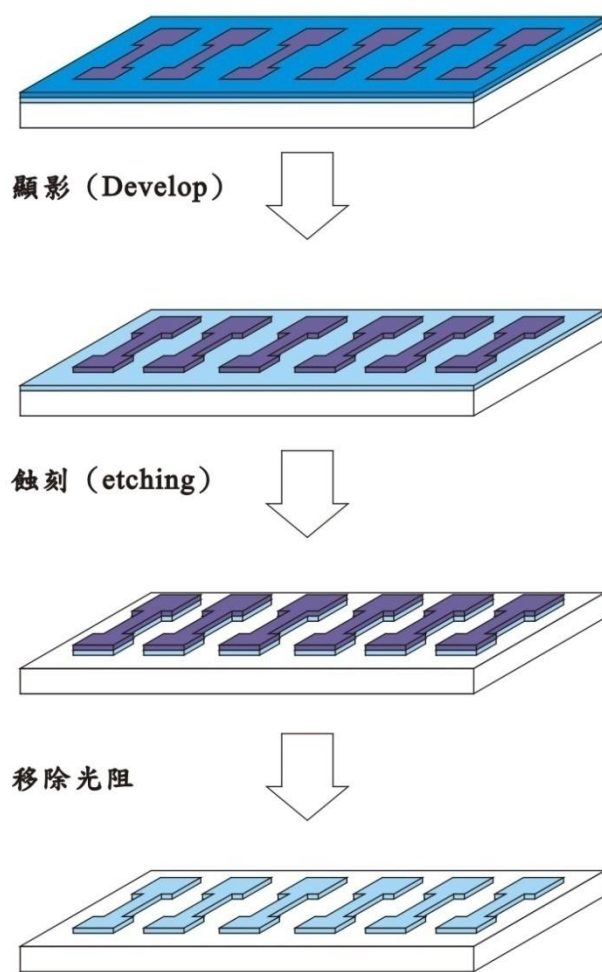


圖 2-3、顯影與 ITO 蝕刻示意圖。

(4) 絕緣層覆蓋

為了要固定 ITO 電極在做電化學反應的幾何面積，蝕刻過後的 ITO 電極，必須在接通電線區的下緣和電極的反應區上緣之間，塗佈上一層絕緣的環氧樹脂，如圖 2-4 所示，而露出的 ITO 部分則是將來用以導電接上電化學分析器和發生電化學反應的部份。這部分的製程是用人工的方式，將必須裸露出 ITO 的部分用隱形膠帶貼起來，其他部分直接用環氧樹脂覆蓋，乾燥之後撕去膠帶，即完成固定面積的 ITO 電極製做，最後用玻璃刀切下電極使用。

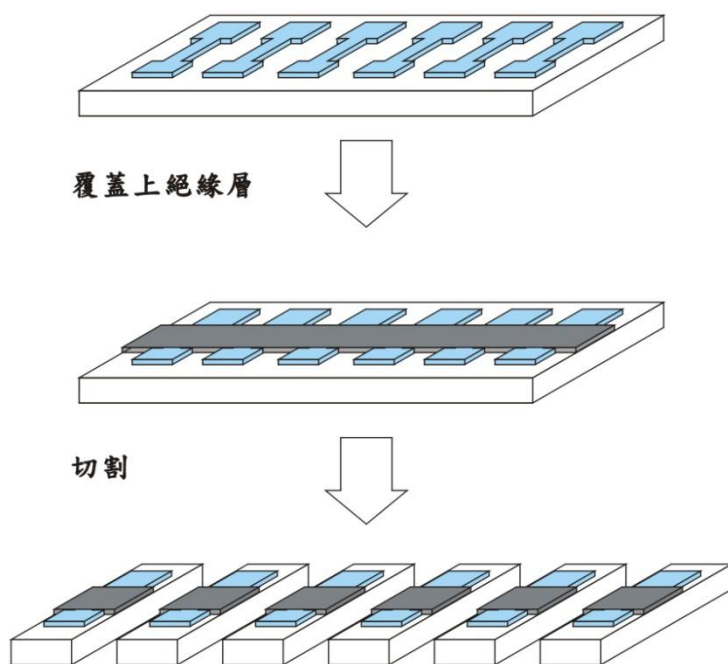


圖 2-4、蝕刻製作固定面積的 ITO 電極示意圖。

2.7 定電位電沈積修飾與 Nafion[®] 的添加

為了採用電化學的方式偵測葡萄糖分子的訊號，必須使之在電極表面反應產生電流變化，但是並非所有電極材料都能引發葡萄糖分子產生氧化還原的反應，因此，電極材料的選擇或研發是實驗的一個重點。

本實驗的電沈積步驟是利用三電極系統在工作電極做定電位的方式進行，分別使用銀/氯化銀電極和白金線作為參考電極和輔助電極，而 ITO 電極當工作電極，置於單純只有濃度 400 mg/L 的四氯金酸水溶液，或含有濃度 0.01% 的幾丁聚醣以及濃度 400 mg/L 的四氯金酸水溶液 5 mL。固定電位維持一段時間後，在 ITO 的表面發生電沈積反應，生成金的奈米顆粒。利用這一層金奈米顆粒堆積的修飾面，可以讓原本對葡萄糖分子沒有反應的 ITO 電極，得到藉由金奈米顆粒的催化，使之在電極表面發生電化學反應，而偵測到葡萄糖訊號。

Nafion[®] 所需濃度的配製，皆以乙醇與水的比例為三比一的混合液當做溶劑，稀釋到所需要的濃度。在修飾電極的表面覆蓋方式，是使用微量吸管(micropipette)取 5 μ L 濃度 0.5% 的 Nafion[®] 滴到修飾電極的表面上。滴上去之後，液體會自然均勻分散開，平放於室溫下溶劑會漸漸揮發，大約兩小時後即可使用。

三、結果與討論

3.1 利用電沈積的方式修飾金奈米粒子於 ITO 電極表面

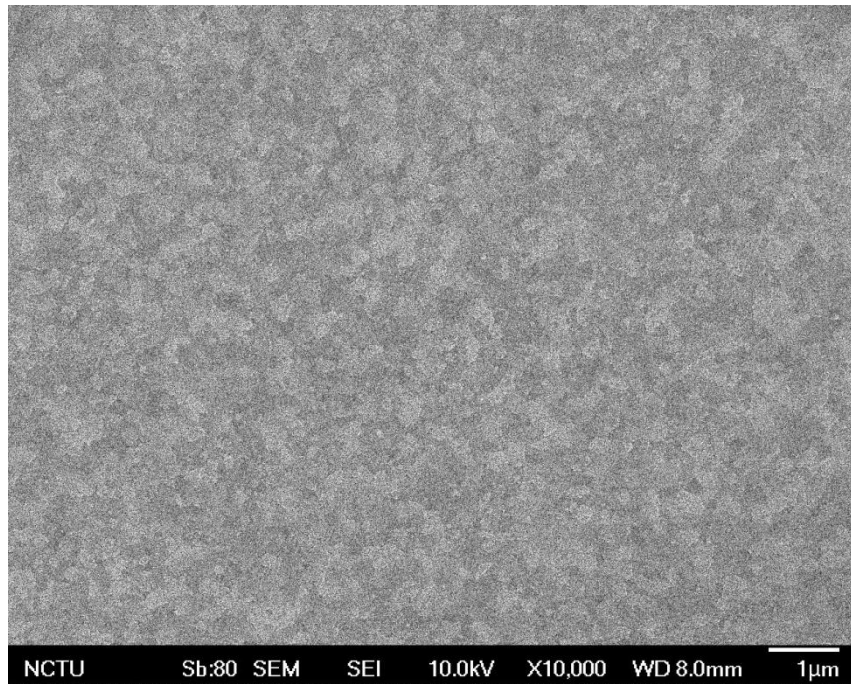
3.1.1 掃描式電子顯微鏡 (SEM) 的觀測結果

本實驗所使用的電沈積修飾，是利用定電位的電化學方法把金還原到 ITO 電極表面，而利用掃描式電子顯微鏡可以直接觀察到還原上去的金在微觀下是以什麼樣的結構型態附著在 ITO 的表面上。在這部份，掃描式電子顯微鏡分別拍攝三個條件作為比較：(1) 未修飾的 ITO 電極表面、(2) 電沈積溶液只含四氯金酸 (HAuCl_4) 所修飾的 ITO 電極表面、(3) 添加了幾丁聚醣 ($\text{HAuCl}_4/\text{chitosan}$) 作為輔助金奈米修飾的 ITO 電極表面。

(1) 未修飾的 ITO 電極表面

如圖 3-1 所示，這是原始的 ITO 電極表面在 SEM 下的觀測結果。在沒有做修飾之前的 ITO 電極的表面是一個起伏非常小的狀態，只有在微觀下的表面皺摺，且電化學活性也很低，但是因為具有良好的導電性，所以本實驗將這樣的材料做為基底，接下來再試著在這樣的表面，修飾上能產生電化學活性的材料。

(A)



(B)

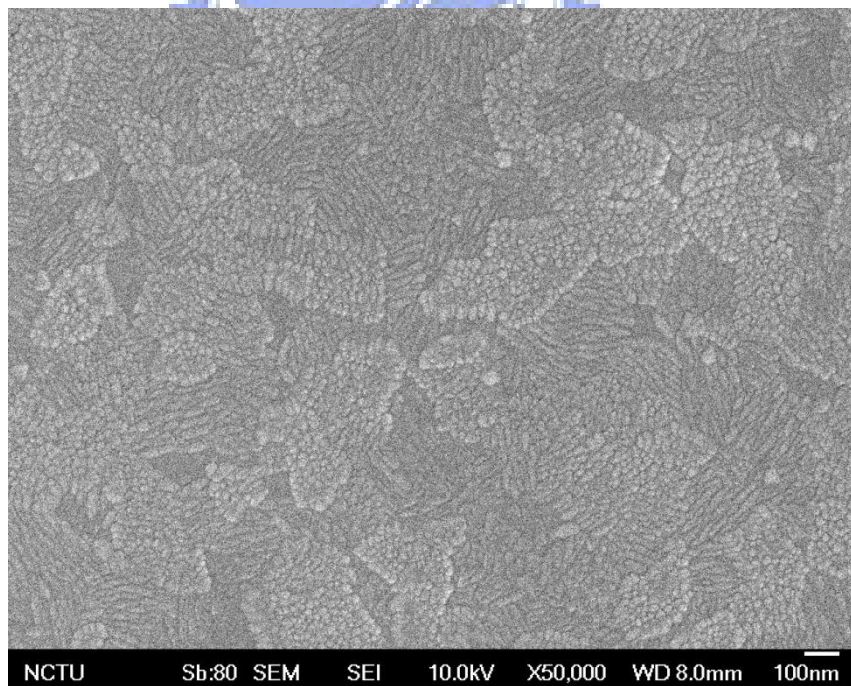


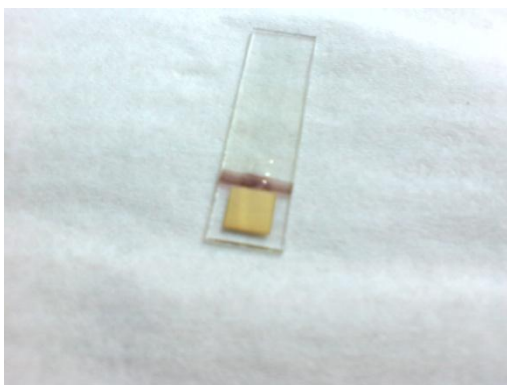
圖 3-1、ITO 電極表面的 SEM 圖。(A)放大倍率為一萬倍；(B)放大倍率為五萬倍。

(2) 電沈積溶液只含四氯金酸所修飾的 ITO 電極表面

實驗條件為先配製濃度 400 mg/L 四氯金酸的水溶液作為電沈積溶液，將 ITO 電極置於溶液中，施予 -0.8 V (vs. Ag/AgCl) 的電位，維持六十分鐘後，取出用去離子水潤洗後放置室溫下乾燥。完成後的電極在巨觀下，如圖 3-2 (A) 所示，原本透明的 ITO 電極表面，被覆蓋上了一層被還原上去的金薄膜，表面呈現金色且具有光澤。藉由 SEM 的觀察，如圖 3-3 所示，我們可以發現，從溶液中還原上去的金是以顆粒狀密集方式生成且堆積在 ITO 電極的表面，其中還可以看到比較亮的顆粒。由於在堆積的時候這些點堆的比較高，所以會造成在 SEM 圖上看到這樣明顯的亮點，其他部分則是金還原上去的粗糙顆粒，只是堆的比較平整。整體來說，這是含有較大顆堆疊分佈和其他緻密堆積所呈現的均勻修飾表面。例外，還可以從電極的截面圖 (cross section) 做觀察，如圖 3-4 所示，最上層顆粒狀的堆積就是電沈積上去的金粒子，顆粒大且形狀不太規則，直徑大約接近 100 nm；第二層是 ITO 層；最下層是玻璃。

至於表面修飾上去的元素是否為金，可以藉由 SEM 的附加功能：能量散佈光譜儀 (energy dispersive spectrometer, EDS)，來做表面元素的分析定性，如圖 3-8 (A) 所示，由圖譜上強烈的金元素的訊號可以證實，表面修飾上去的粒子堆積，確實是由金所構成。

(A)



(B)

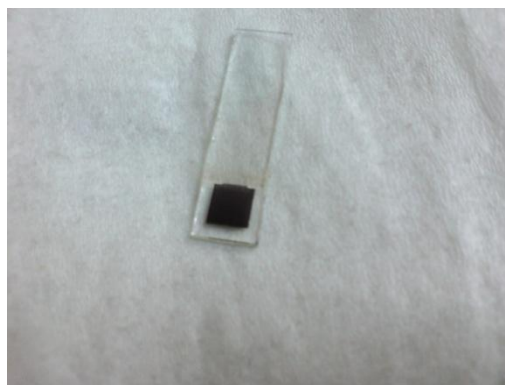
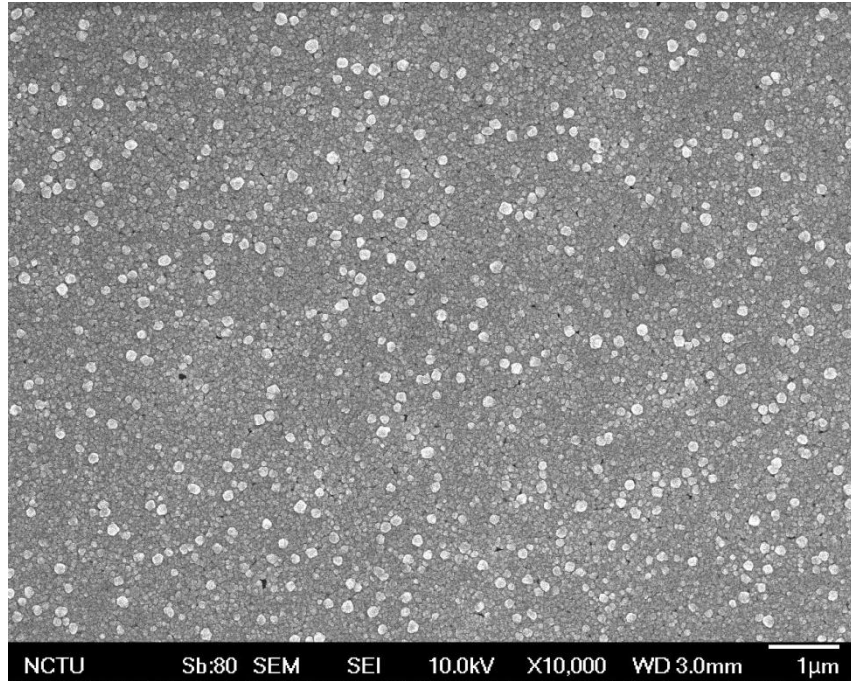


圖 3-2、利用電沈積修飾過後的 ITO 電極。(A) 電沈積溶液為四氯金酸水溶液，定電位 -0.8 V 維持 60 分鐘；(B) 電沈積溶液為四氯金酸水溶液添加幾丁聚醣，定電位 -0.8 V 維持 60 分鐘。



(A)



(B)

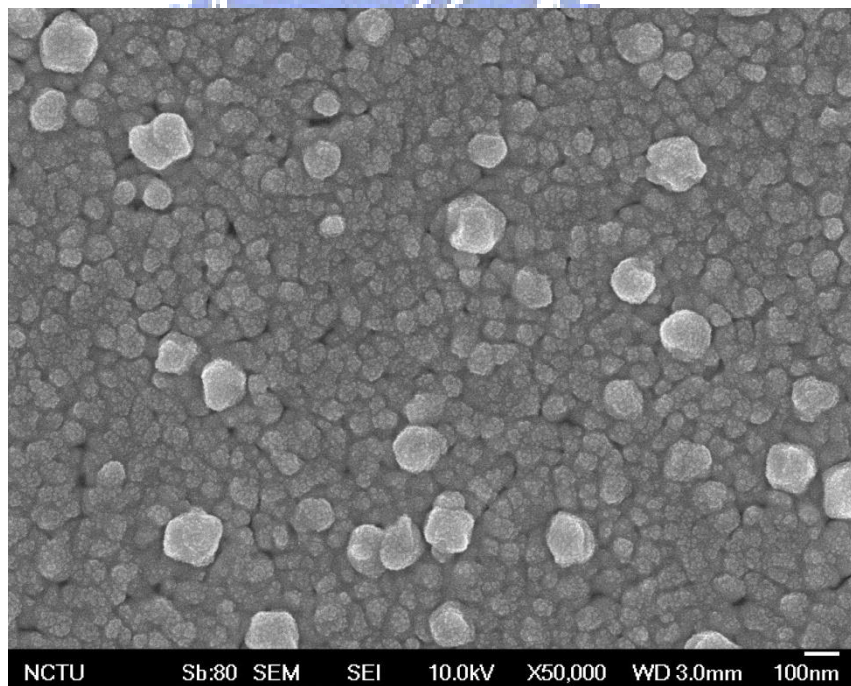
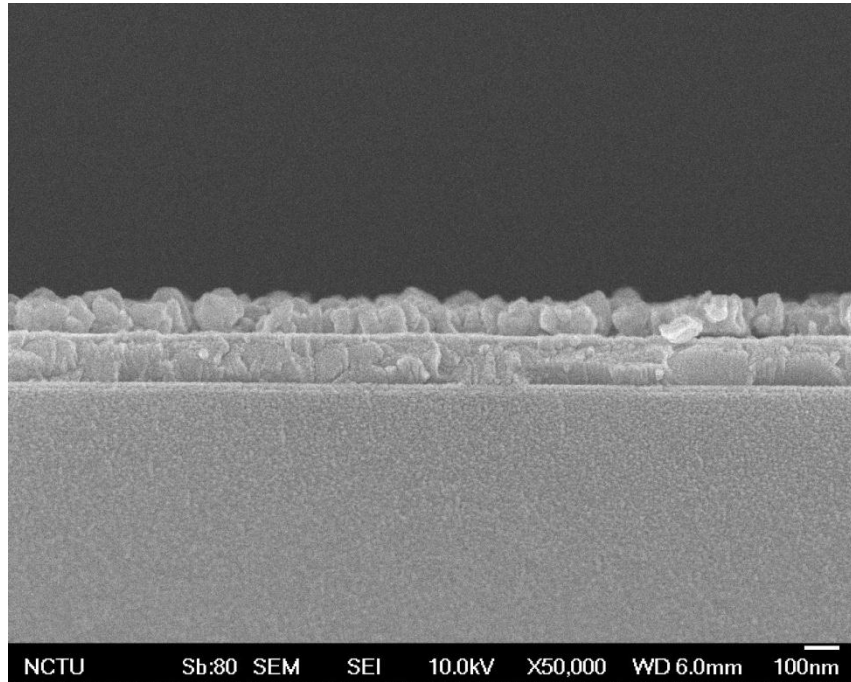


圖 3-3、電沈積溶液只含有四氯金酸所修飾 ITO 電極表面的 SEM 圖。(A) 放大倍率為一萬倍；(B) 放大倍率為五萬倍。

(A)



(B)

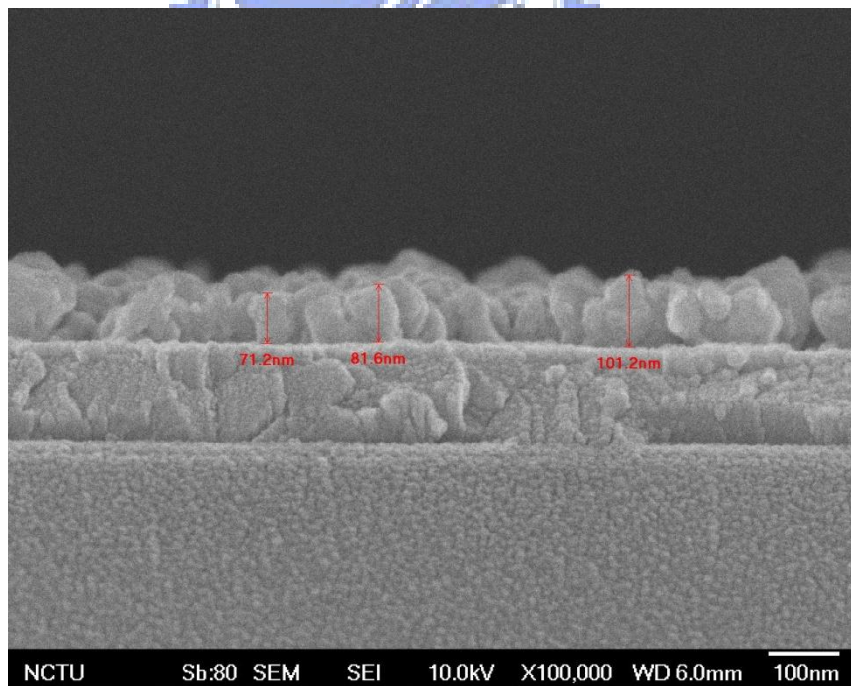


圖 3-4、電沈積溶液只含有四氯金酸所修飾 ITO 電極表面的截面 SEM 圖。(A) 放大倍率為五萬倍；(B) 放大倍率為十萬倍。

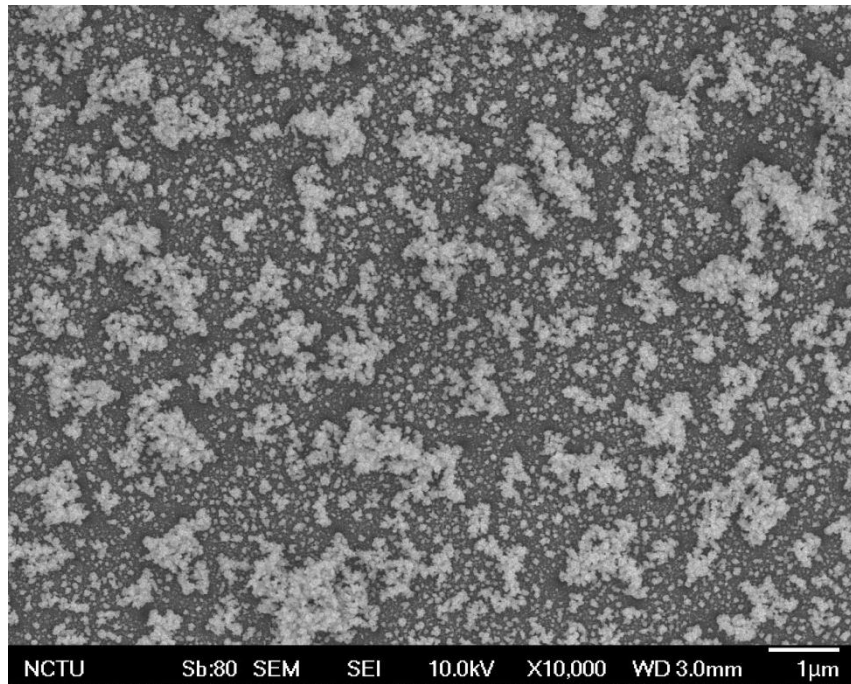
(3) 添加幾丁聚醣作為輔助之金奈米修飾的 ITO 電極表面。

實驗條件為先配置含有濃度 0.01% 幾丁聚醣以及濃度 400 mg/L 四氯金酸的水溶液作為電沈積溶液，再將 ITO 電極置於溶液中施予 -0.8 V (vs. Ag/AgCl) 的電位，維持六十分鐘後，取出用去離子水潤洗後放置在室溫下乾燥。完成後的電極表面，如圖 3-2 (B) 所示，表面會覆蓋上一層深藍色沒有光澤的薄膜。觀察 SEM 圖，如圖 3-5 所示，其電沈積的條件，與圖 3-3 的實驗條件差別只在於電沈積溶液中另外添加了幾丁聚醣，我們從圖片上可以觀察到兩個現象。第一，從圖 3-5 (A) 較小的倍率來看，ITO 的表面不但附上了一層金粒子層，其上又有金粒子另外以不規則的形式向上發展，而向上發展的堆積有些也會和鄰近的堆積結合在一起變成更大的堆積，在表面上形成了有很多空間的立體結構；第二，從圖 3-5 (B) 這個倍率來看，與圖 3-3 (B) 相較之下可以觀察到，形成堆積向上立體結構的是由粒粒分明的金奈米的顆粒所組成，尺寸上從放更大的倍率來看，如圖 3-6 所示，可以觀察到這些顆粒的直徑大約 30 nm 上下。

然而這些朝上的立體結構從上方觀測，無法得知其堆積的高度，這部份可以藉由側面觀察達成，如圖 3-7 (A) 所示，修飾在 ITO 上的金粒子會先在 ITO 上形成粒子覆蓋的薄層，薄層之上是許多粒子堆積成柱狀的結構，鄰近的柱狀結構如果很多就會形成如圖 3-6 上，較大的白色堆積；從圖 3-7 (B) 更大的倍率，可以清楚地看到金以直徑大約 30 到 40 nm 的粒子，堆疊的情形。

表面元素的定性，同樣使用 EDS，如圖 3-8 (B) (C) 所示，圖譜上白色和深色的區域，皆有強烈的金元素訊號，電極的表面確實是由金的奈米粒子所堆疊形成的立體修飾所構成。

(A)



(B)

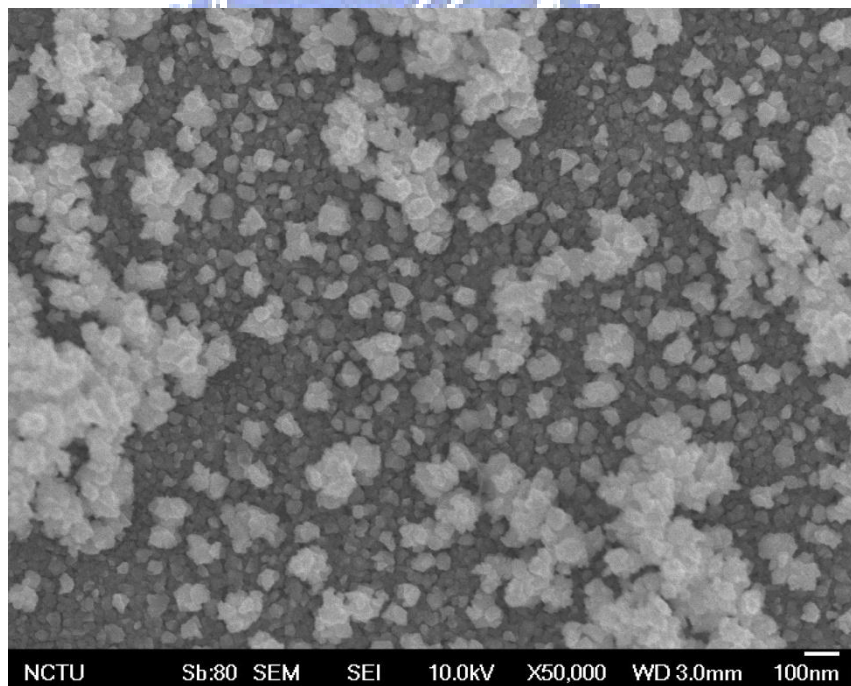


圖 3-5、添加幾丁聚醣作為輔助金奈米粒子修飾 ITO 電極表面的 SEM 圖。(A) 放大倍率為一萬倍；(B) 放大倍率為五萬倍。

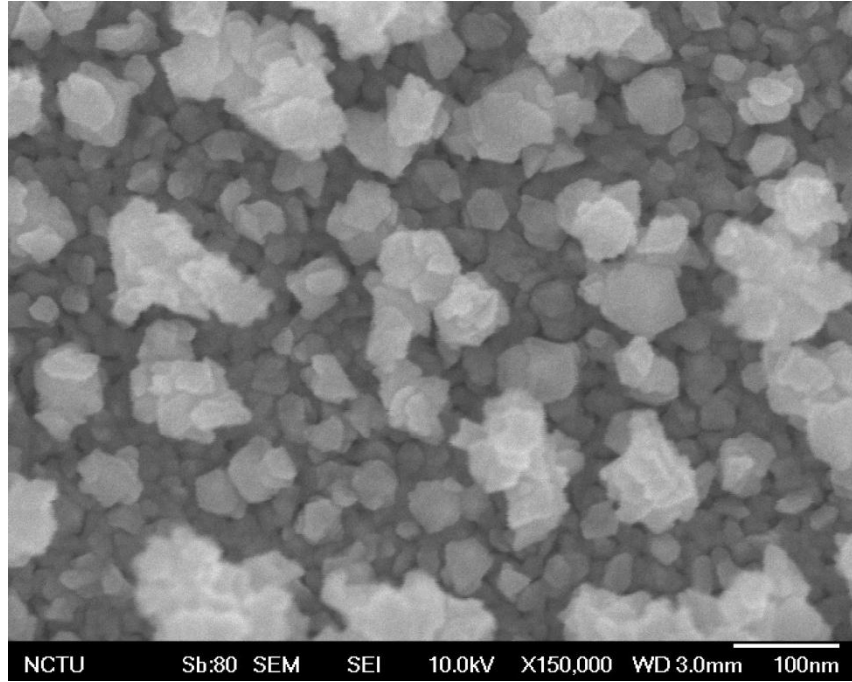
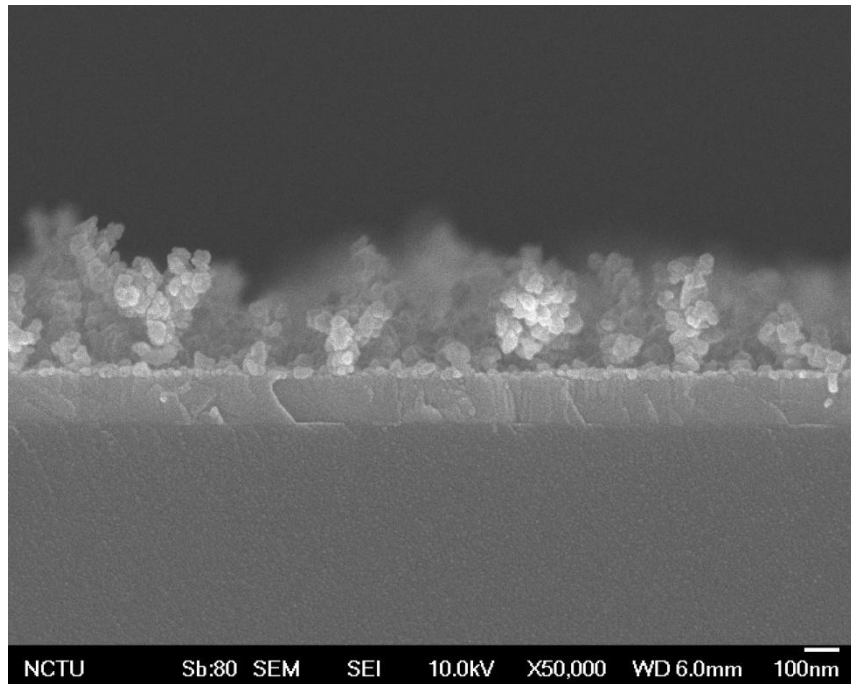


圖 3-6、添加幾丁聚醣作為輔助金奈米粒子修飾 ITO 電極表面的 SEM 圖。放大倍率為十五萬倍。



(A)



(B)

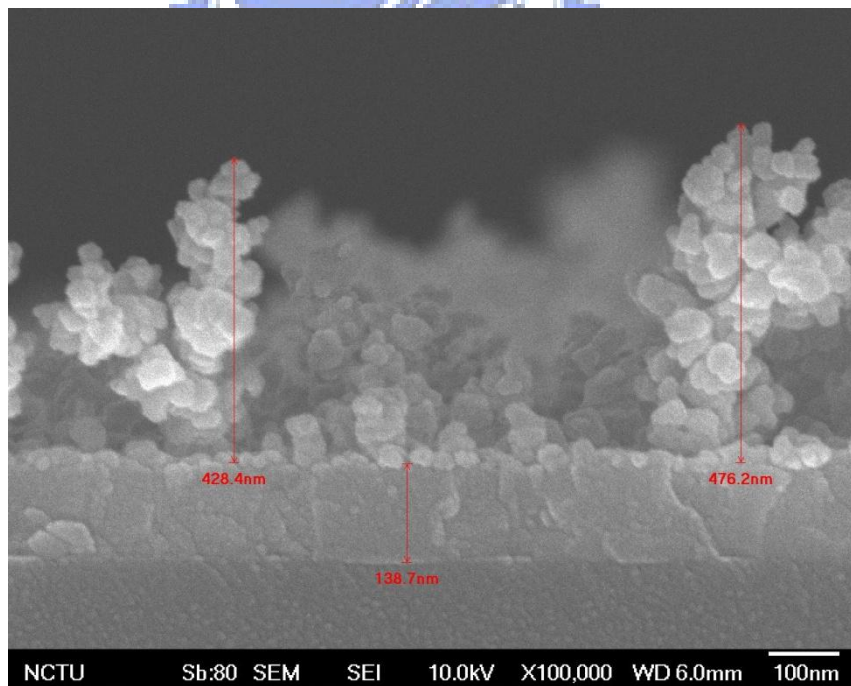
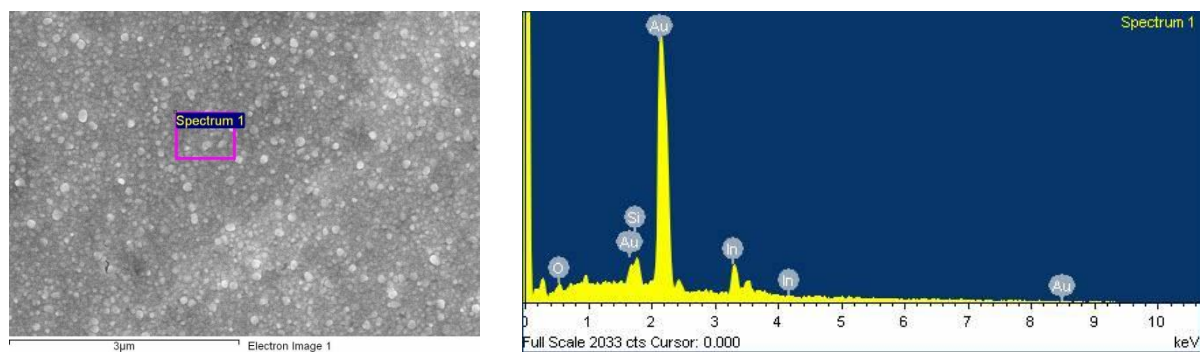
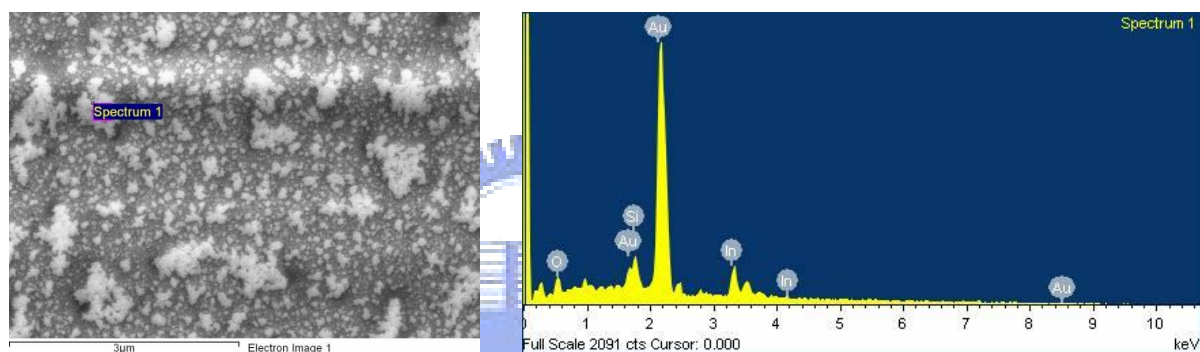


圖 3-7、添加幾丁聚醣作為輔助金奈米粒子修飾 ITO 電極截面的 SEM 圖。(A) 放大倍率為五萬倍；(B) 放大倍率為十萬倍。

(A)



(B)



(C)

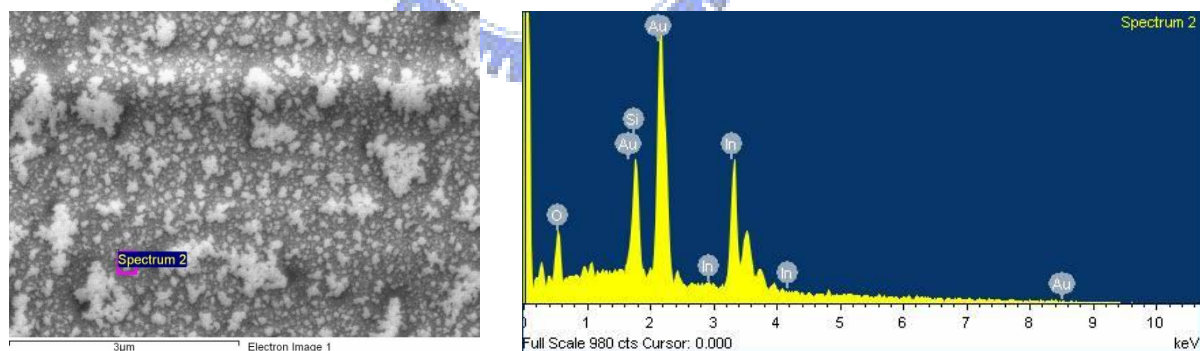


圖 3-8、修飾 ITO 電極的 EDS 圖。(A)直接四氯金酸修飾 ITO 電極；(B) (C) 使用幾丁聚醣作為輔助金奈米粒子修飾 ITO 電極。

最後將各種電極的 SEM 圖，整理為圖 3-9 作為比較，(A)(D) 表示空白的 ITO 電極的正面與截面圖；(B)(E) 表示只用四氯金酸電沈積修飾 ITO 的正面與截面圖；(C)(F) 表示添加幾丁聚醣於四氯金酸溶液中輔助金奈米粒子電沈積修飾 ITO 電極。比較 SEM 圖可以清楚地得知修飾前後的變化與修飾方法不同所造成的差異。



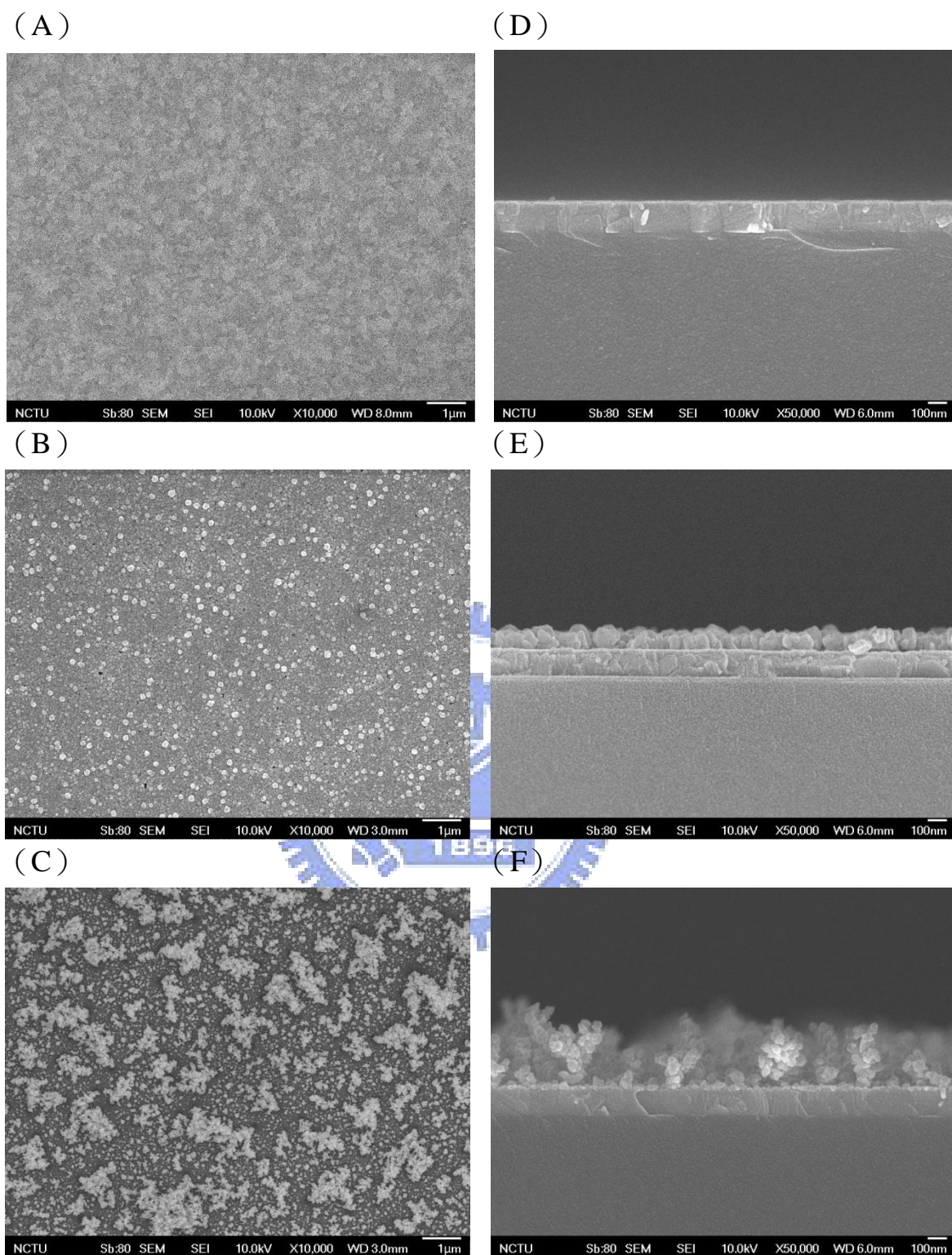


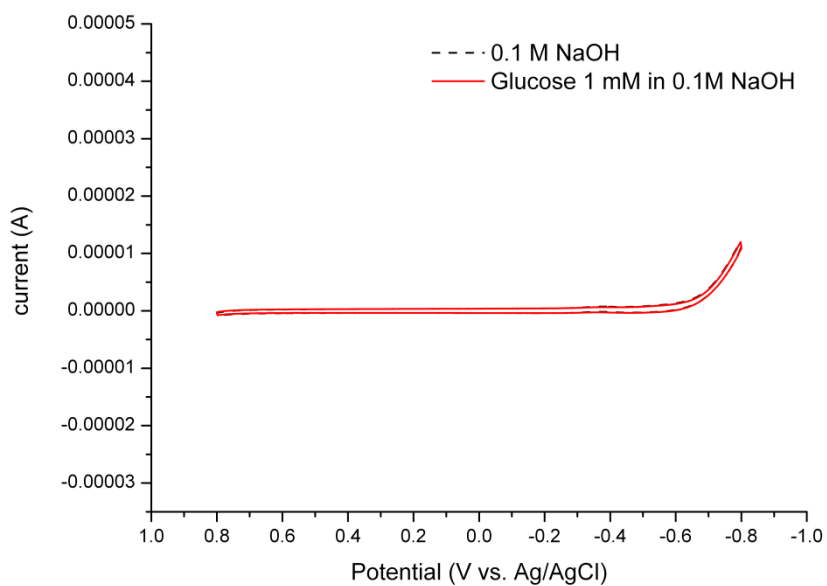
圖 3-9、SEM 圖的比較。Top view : (A) ITO 電極 (B) 直接四氯金酸電沈積修飾 ITO 電極 (C) 幾丁聚醣輔助金奈米粒子修飾 ITO 電極。Cross section : (D) ITO 電極 (E) 直接四氯金酸電沈積修飾 ITO 電極 (F) 幾丁聚醣輔助金奈米粒子修飾 ITO 電極。

3.1.2 修飾電極在鹼性下的葡萄糖偵測效果

上一節本研究介紹只要在三電極系統中，將 ITO 電極置於含有四氯金酸的水溶液，無論添加幾丁聚醣與否，固定電位在 -0.8 V 下一段時間就可以直接達到將金以某種形態還原修飾到 ITO 電極上的效果。除此之外，金本身對於葡萄糖具有電化學的催化反應能力，因此接下來將金奈米粒子所修飾的電極，應用於葡萄糖的分析感測。

如圖 3-10 所示，利用循環伏安法設定掃描電位範圍從 -0.8 V 到 0.8 V (vs. Ag/AgCl)，可以很明顯的看到電極在修飾前後，對於葡萄糖感測效果有很大的差異性，圖 3-10 (A) 表示使用未修飾的空白 ITO 電極，在 0.1 M NaOH 溶液的背景電流訊號以及在其中添加 1 mM 葡萄糖所測得電流訊號的相疊圖，從中可以發現，ITO 電極對於葡萄糖在這個電位範圍中並沒有使之產生氧化還原反應的能力；而相較於圖 3-10 (B)，利用奈米金修飾的 ITO 電極（電沈積溶液為 400 mg/L 四氯金酸與 0.01% 幾丁聚醣的混合溶液，電沈積電位 -0.8 V ，維持 60 分鐘）同樣偵測 0.1 M NaOH 溶液與 1 mM 葡萄糖溶液之相疊循環伏安圖，可以發現含有葡萄糖時的電流值相較於背景電流值，在大約 0.2 V 附近會得到一個氧化電流的訊號，這表示以定電位電沈積修飾金奈米顆粒在 ITO 電極上，確實可以在葡萄糖的電化學反應能力上得到顯著提昇。

(A)



(B)

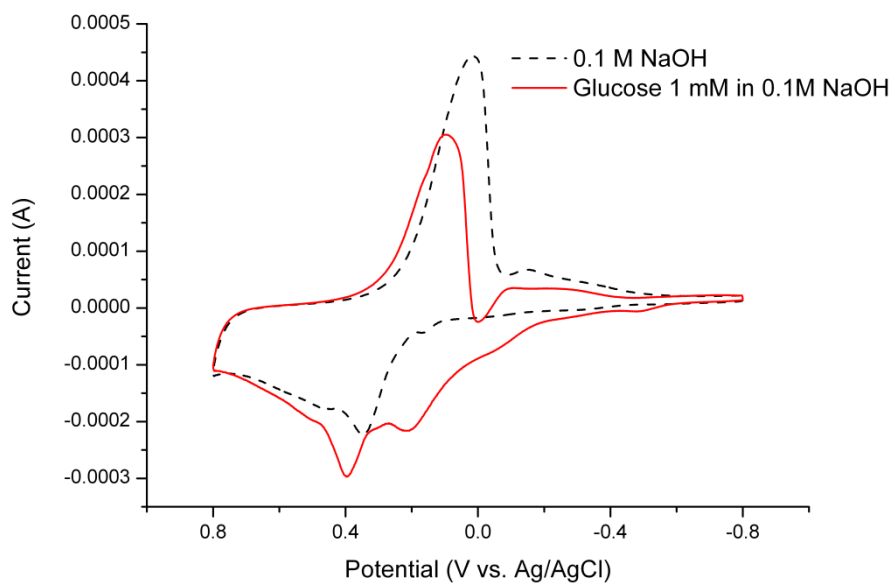


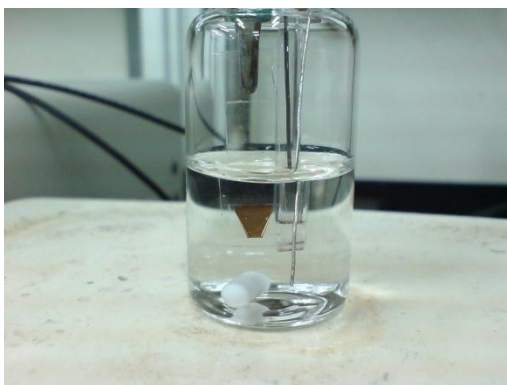
圖 3-10、(A) ITO 電極和 (B) 金奈米粒子修飾 ITO 電極偵測 1mM 葡萄糖與空白溶液的循環伏安圖。(掃描速率為 0.1 V/s。)

圖 3-10 的葡萄糖偵測，是以電沈積溶液中有添加幾丁聚醣所製作的電極測得，如果沒有添加幾丁聚醣直接在四氯金酸溶液中電沈積得到的修飾電極，也可以利用循環伏安法，測得一樣的葡萄糖訊號。然而從 SEM 圖來看，如果在四氯金酸溶液中額外添加幾丁聚醣，在結構上會把還原上去的金以奈米粒子的形態堆積形成更立體的形狀，此外，還必須瞭解對於葡萄糖在 0.1 M NaOH 溶液中偵測會有什麼樣的差異。

如圖 3-11 (A) 所示，使用四氯金酸水溶液定電位電沈積所修飾的電極，以循環伏安法在濃度 0.1 M 的 NaOH 水溶液中偵測濃度 1 mM 的葡萄糖時，很明顯的可以發現 ITO 上的奈米金修飾薄膜非常不穩定，只要將電極放入溶液中一小段時間，修飾層就會慢慢剝離 ITO 的表面；而如果使用四氯金酸與幾丁聚醣混合溶液做電沈積修飾的 ITO 電極，如圖 3-11(B)，電極在偵測溶液中不會有脫離的現象。

使用循環伏安法，偵測 1 mM 葡萄糖於 0.1 M NaOH 溶液，整理兩種修飾電極所得到的氧化峰值電流，如圖 3-12 所示，添加幾丁聚醣(chitosan)與未添加幾丁聚醣所製作的電極，各偵測五支電極，圖中顯示添加幾丁聚醣來輔助金奈米粒子電沈積修飾，所製作出來的每支電極之間，會具有良好的再現性，RSD 值為 1.5%，而無添加幾丁聚醣所製作的電極，由於表面會有修飾物脫落的現象，所以再現性會較差，RSD 值為 10.6%。因此接下來的實驗所使用的電極，將會利用以幾丁聚醣輔助金奈米粒子電沈積於 ITO 上的修飾電極為主，並針對葡萄糖的偵測做進一步的研究。

(A)



(B)

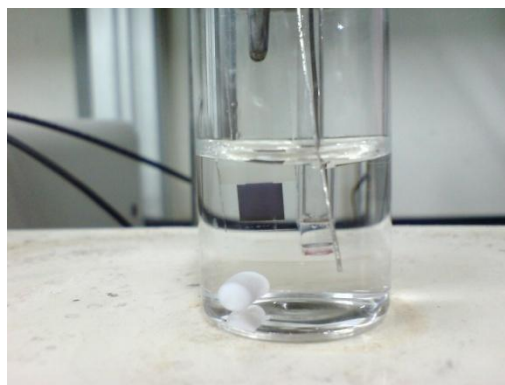


圖 3-11、利用電沈積修飾過後的 ITO 電極，在 0.1 M NaOH 水溶液中偵測葡萄糖。(A) 電沈積溶液為濃度 400 mg/L 四氯金酸水溶液，定電位 -0.8 V 維持 60 分鐘所製作的電極；(B) 電沈積溶液為濃度 400 mg/L 四氯金酸水溶液含濃度 0.01 % 幾丁聚醣，定電位 -0.8 V 維持 60 分鐘所製作的電極。

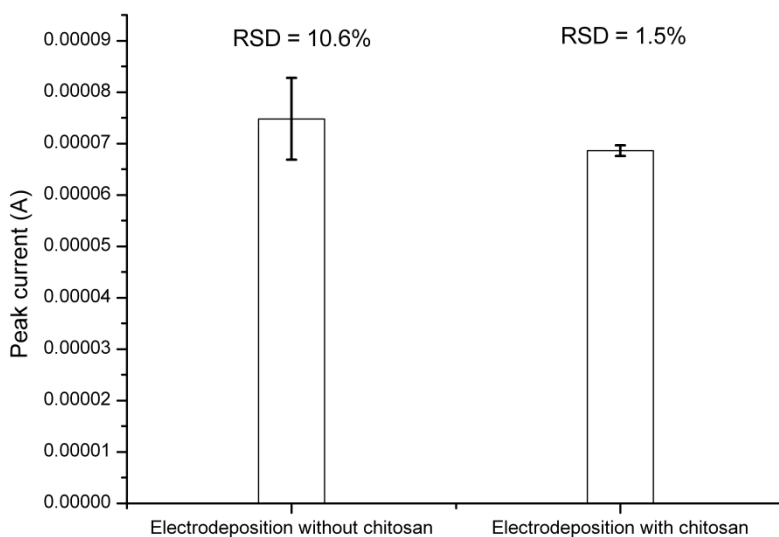



圖 3-12、兩種電沈積修飾過後的 ITO 電極，在 0.1 M NaOH 水溶液中偵測 1 mM 葡萄糖，其循環伏安法所得峰值電流差異。

(n = 5)

3.2 幾丁聚醣輔助金奈米粒子修飾 ITO 電極製程

利用幾丁聚醣輔助金奈米粒子還原電沈積到 ITO 的表面上，可以製作出一個對葡萄糖有良好感測能力的穩定修飾電極。然而以這樣的電化學反應改變表面材料性質，表面修飾上金的反應能力或沈積量的多寡，必然取決於電沈積反應時的參數條件，本節實驗目的是針對電沈積反應所施加的電位和時間，調整出一個對葡萄糖的電化學反應，可以得到最大氧化峰值電流的電極製程。

3.2.1 電沈積電位最佳化



如圖 3-13 所示，不同的電沈積電位所製作出來的電極，對於葡萄糖的偵測會有不同的效果。以不同的電沈積電位，時間三十分鐘所修飾的 ITO 電極，用循環伏安法偵測 1 mM 的葡萄糖，最後再把不同電沈積電位下，所測得的氧化峰值電流值作圖比較，從圖中可以發現葡萄糖的催化效果會隨著電位的降低而增加，在 -0.8 V 電沈積所得的電極最為靈敏，但是當電位再往下降到 -1.2 V 時，電極的表面會另外生成不透明的薄膜和氣泡，這個現象基本上可以推測是因為溶液中含幾丁聚醣，它在這個電位下，發生了幾丁聚醣的電沈積反應 [59]，也就是電極表面在這個電位下，因為氫離子 (H^+) 還原成氫氣 (H_2)，使得表面的 pH 值升高，幾丁聚醣在電極表面析出。如此一來，造成了修飾電極導電度的下降，金奈米粒子的修飾也受到干擾，因此在 -1.2 V 所修飾的電極，對葡萄糖的偵測靈敏度不但相對較低，且不同電極之間的差異性也較大。因此接下來的電沈積所使用電位，將會使用 -0.8 V 作為條件。

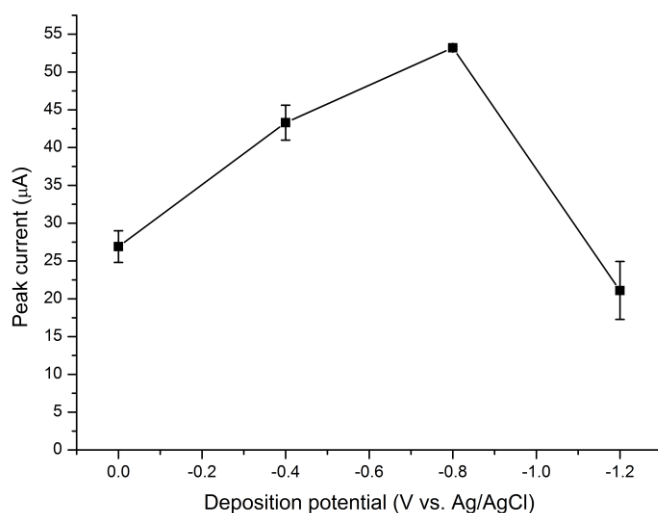


圖 3-13、使用不同的電沈積電位，所得到的不同峰值電流。（電沈積溶：400 mg/L 四氯金酸及 0.01% 幾丁聚醣；電沈積時間: 30 分鐘；峰值電流為循環伏安法偵測 1 mM 葡萄糖 / 0.1 M NaOH 的氧化峰值電流；掃描速率為 0.1 V/s。）

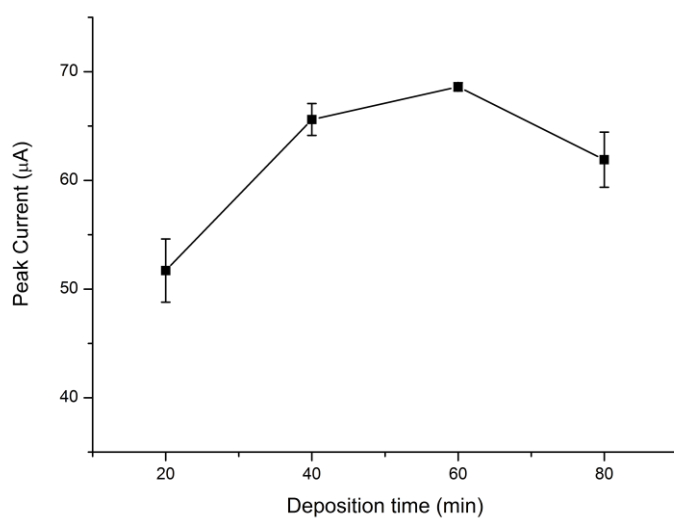


圖 3-14、不同的電沈積時間，所得到的不同峰值電流。（電沈積電位設定在 -0.8 V，其他條件同圖 3-13）

3.2.2 電沈積時間最佳化

如圖 3-14 所示，將電位設定在最佳化電位 -0.8 V ，製作不同電沈積時間的電極，用循環伏安法偵測 1 mM 的葡萄糖，將不同電沈積時間，所測得的氧化峰值電流作圖比較。由圖中可以發現，由於修飾上去金奈米粒子的量會隨時間增加，因此 20 到 60 分鐘條件下所偵測的葡萄糖訊號會隨時間增加而變大，但時間超過 60 分鐘後，修飾電極對葡萄糖的感測能力就會降低，造成這個現象可能是因為金奈米粒子的堆積量隨著時間增加聚集，當聚集的量多到導致表面原來立體結構所造成的孔隙被覆蓋掉，反而會讓反應表面積下降，於是訊號不再更高。

根據以上實驗，將製作幾丁聚醣輔助金奈米粒子修飾電極所使用的電沈積修飾條件，針對沈積電位和時間，用循環伏安法偵測葡萄糖的訊號大小，得到一個對葡萄糖偵測最為靈敏的電極製作條件：在含 0.01% 幾丁聚醣的 400 mg/L 四氯金酸溶液做定電位電沈積，設定電位在 -0.8 V 維持 60 分鐘。接下來的實驗所使用的修飾電極，將以上述條件的最佳化製程製作。

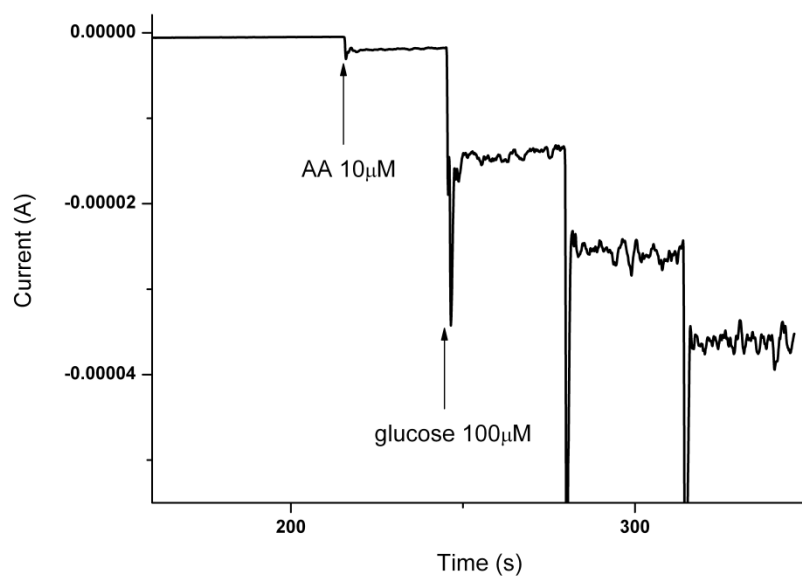
3.3 安培法偵測葡萄糖與干擾物排除

利用安培法偵測葡萄糖訊號，大部分的文獻研究是朝向偵測人體血清樣品中的葡萄糖，但其中存在有許多導致葡萄糖偵測量效果不準確的干擾物。因此如何以不在電極上添加酵素的方式製作具有高選擇性的葡萄糖感測電極，是電極在應用層面上的一個重要課題，因此本實驗接下來以文獻中常見干擾物標準品作為電極在模擬實驗中的性質測試樣品。

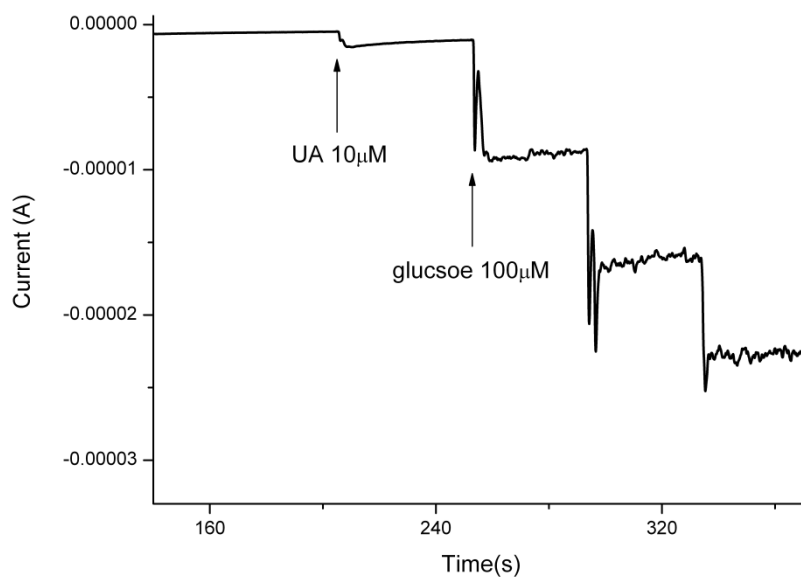
3.3.1 修飾電極直接偵測葡萄糖與干擾物

如圖 3-15 所示，實驗選擇三種常見的干擾物作為電極對於干擾物反應的測試：維生素 C (ascorbic acid, AA)、尿酸 (uric acid, UA) 以及對乙酰氨基酚 (p-Acetaminophen, AP)。圖 3-15 (A) 到 (C) 即為使用安培法在電位 0.1 V (vs. Ag/AgCl) 下，分別偵測以上三種干擾物的電流訊號，其濃度設定為 10 μM 。葡萄糖的濃度在血液中的含量相對於干擾物大約是 10 倍，因此葡萄糖的濃度則是設定為 100 μM 作為干擾物訊號測試的比較。從電流圖上可以發現三種干擾物的訊號，相對於葡萄糖的訊號都相當明顯，這表示如果應用修飾電極在血糖偵測時存在有干擾物，則干擾物必然會對於葡萄糖定量的準確度造成影響。因此我們必須改善這樣的問題，才能夠進一步探討電極在定量應用方面的能力。

(A)



(B)



(C)

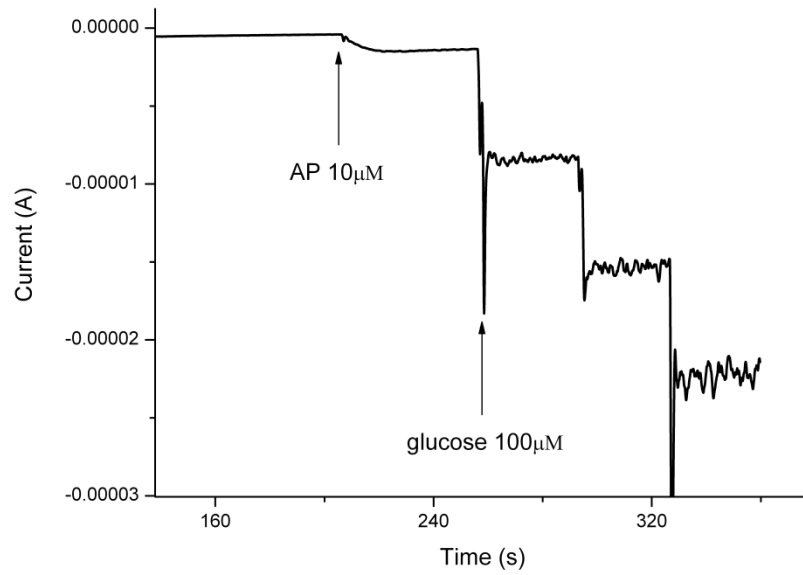


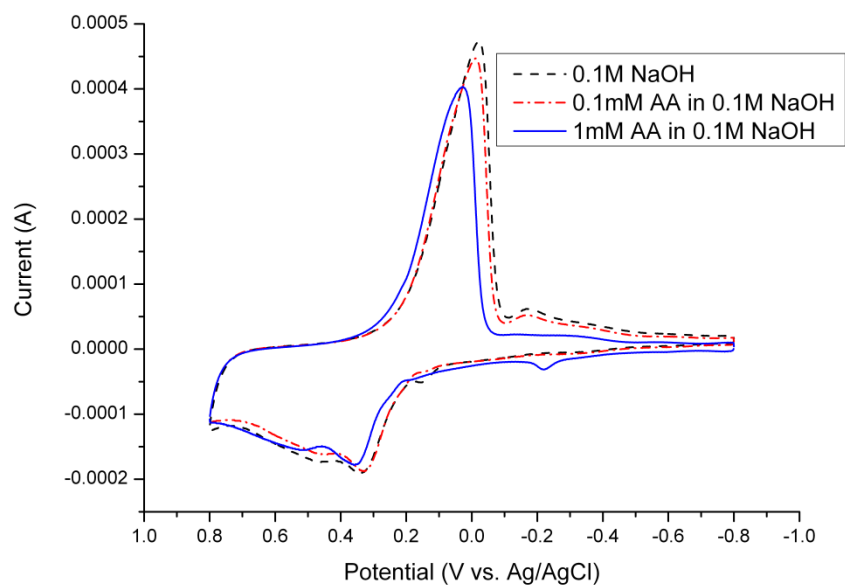
圖 3-15、干擾物與葡萄糖的安培圖。三種干擾物的濃度皆為 $10 \mu\text{M}$ ，而葡萄糖濃度為 $100 \mu\text{M}$ 。干擾物分別為 $10 \mu\text{M}$ 的 (A) 維生素 C (AA)、(B) 尿酸 (UA) 以及 (C) 乙醯氨基酚 (AP)。

3.3.2 離子選擇性薄膜 Nafion[®] 的添加修飾

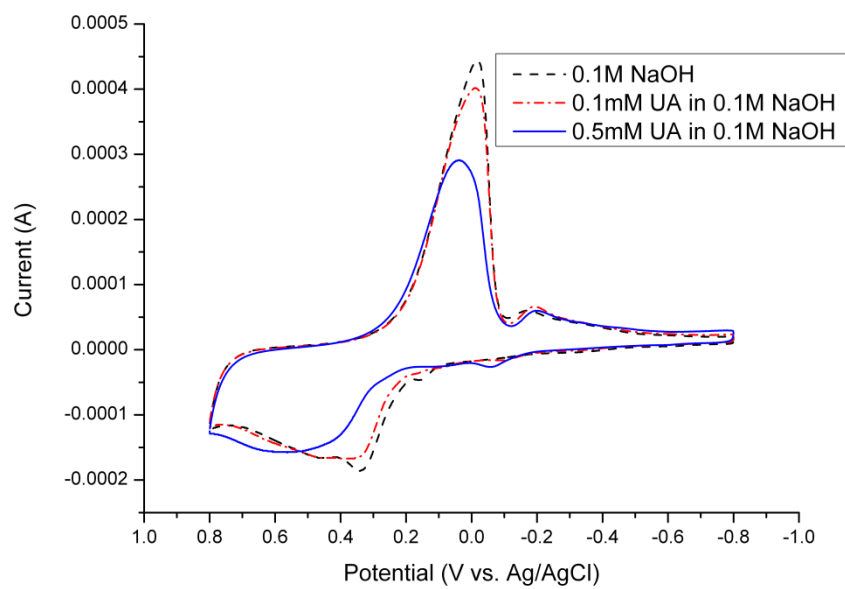
為了改善干擾物的問題，並且將改良方式集中在電極本身，實驗企圖設法避免干擾物靠近電極表面產生反應，因此直接在電極表面做額外的修飾，也就是添加離子選擇性薄膜，以增加電極對於分析物的選擇性。陰離子型的高分子 Nafion[®]，即是一種常用的離子選擇性薄膜。當 Nafion[®] 以薄膜的形式，覆蓋在電極的感測表面上，理論上可以藉由靜電排斥的效應，阻擋大部分血液中帶負電荷的干擾物，如維生素 C 和尿酸。

為了研究 Nafion[®] 的效果，實驗直接在金奈米粒子修飾的 ITO 電極表面，滴上 5 μ L 濃度 0.5% 的 Nafion[®]，先測試各種干擾物在濃度 0.1 M NaOH 溶液中的循環伏安法的訊號，如圖 3-16 所示，(A) 至 (D) 為四種干擾物循環伏安圖：AA、UA、AP、氯離子；而 3-16 (E) 則是分析物葡萄糖。圖中的干擾物、分析物訊號，皆與 0.1 M NaOH 背景溶液之訊號疊圖。以血液中葡萄糖濃度大約為干擾物濃度十倍的比率來看（氯離子在人體血液中含量約為 100 mM 上下），當圖 3-16 (E) 的葡萄糖濃度為 1 mM 時，氧化電流明顯地從 -0.4 V 的位置出現且慢慢增加到 0.2 V。比較干擾物在濃度 0.1 mM（氯離子 100 mM）的循環伏安圖，可以發現，在電位 0.1 V 的地方，干擾物幾乎沒有明顯的氧化電流，而葡萄糖的氧化電流則相當明顯。因此，接下來安培法偵測葡萄糖實驗，分析電位將設定在 0.1 V，以避免干擾物影響葡萄糖的偵測。

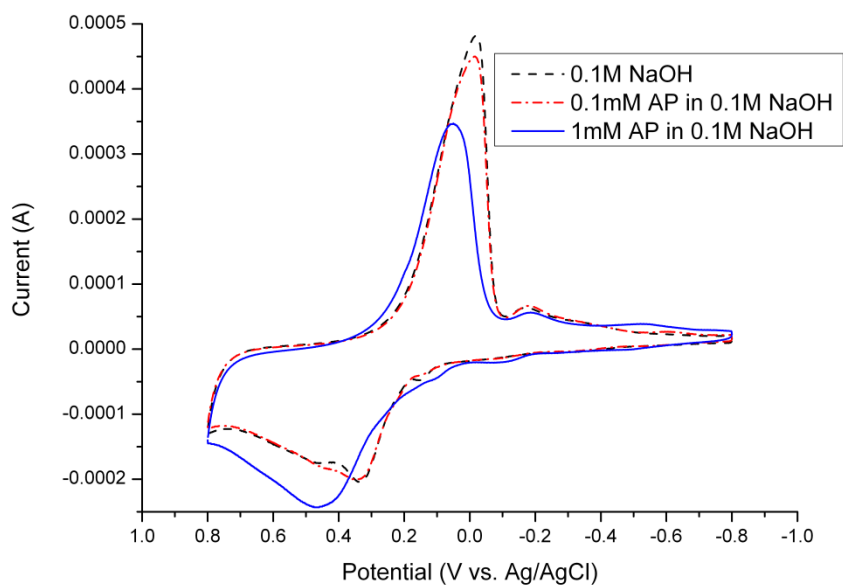
(A)



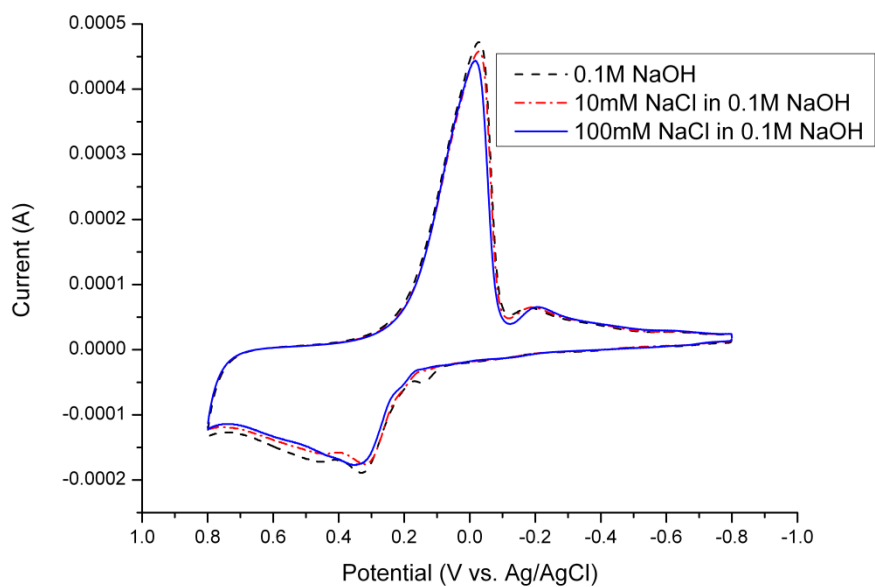
(B)



(C)



(D)



(E)

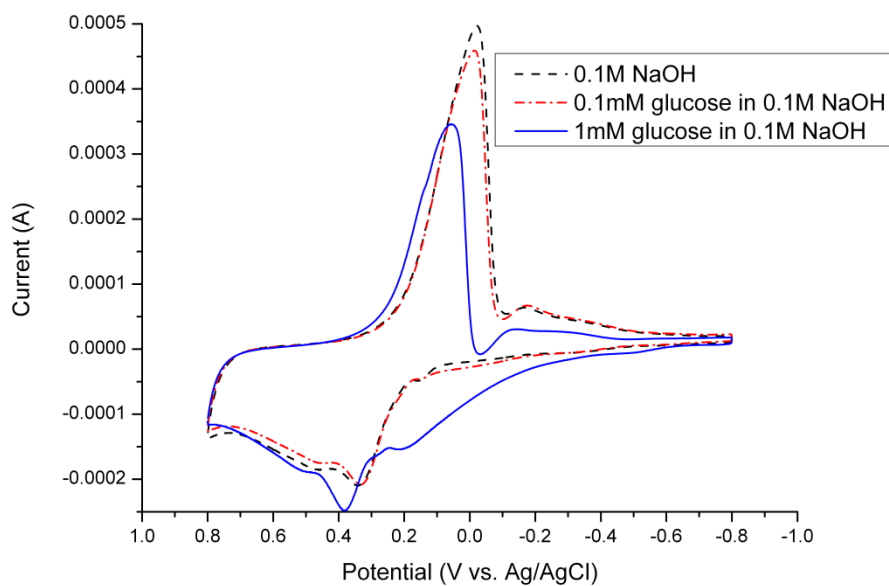


圖 3-16、使用在表面添加了 Nafion[®] (濃度 0.5% 體積 5 μ L) 的金奈米粒子修飾 ITO 電極，以循環伏安法偵測干擾物：(A) 維生素 C (AA)、(B) 尿酸 (UA)、(C) 乙醯氨基酚 (AP)、(D) 氯離子以及分析物：(E) 葡萄糖。(掃描速為 0.1 V/s。)

3.3.3 Nafion[®]/金奈米粒子修飾 ITO 電極的分析效果

首先測試 Nafion[®] 對於干擾物的排除效果，如圖 3-17 所示，根據上一節電極在循環伏安法的偵測結果，使用安培法固定偵測電位 0.1 V，以達到最佳的選擇性。選擇濃度 100 μM 的葡萄糖測試，干擾物濃度大約以人體血液的比例注入攪拌中的 0.1 M NaOH 溶液中，從圖上的結果來看，干擾物在安培法偵測葡萄糖的實驗中，其電流訊號相對於葡萄糖來說非常小，干擾的問題降低了許多，甚至高濃度氯離子的存在也沒有顯著的影響。

電極連續偵測的穩定性測試也很重要，表示電極在一個實驗中的每次樣品分析不會因為電極不穩定而失去可信度。如圖 3-18 所示，連續添加 12 次濃度 100 μM 葡萄糖，以安培法測其電流值的訊號。圖中可以觀察到電流會隨著添加量增加而等比例的增加，取每次添加樣品後平衡電流相對於空白溶液的電流值，計算靈敏度 ($\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$) 作圖 (圖 3-18 插圖)，可以觀察到，基本上電極的靈敏度相當穩定，計算 12 次樣品添加靈敏度的 RSD 值為 1.21，顯示電極在連續偵測上具有良好的再現性。

葡萄糖偵測的濃度線性範圍 (Linear range)，如圖 3-19、3-20，為 5 μM - 2.3 mM， R^2 值為 0.9991，線性關係良好。偵測極限 (LOD) 為 1.46 μM ($S/N = 3$)，且靈敏度可以達到 107.7 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ 。實驗的分析結果與文獻中非酵素修飾的葡萄糖感測電極在鹼性環境下的分析結果比較，列於表 3-1，從中我們可以比較出本實驗可以利用非常簡便的製備方式，製作出拋棄式的金奈米粒子修飾 ITO 電極，並且具備有相當程度的葡萄糖分析能力。

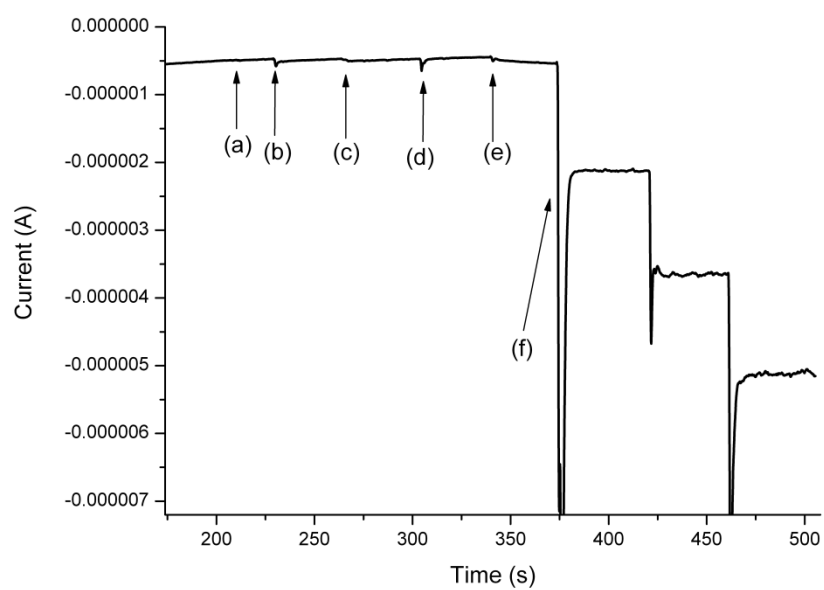


圖 3-17、以 Nafion[®]/金奈米粒子修飾 ITO 電極，在 0.1 M NaOH 溶液中，固定偵測電位 0.1 V，以安培法依序偵測 (a) 10 μ M UA (b) 10 μ M AP (c) 10 μ M fructose (d) 10 mM NaCl (e) 10 μ M AA (f) 100 μ M 葡萄糖。

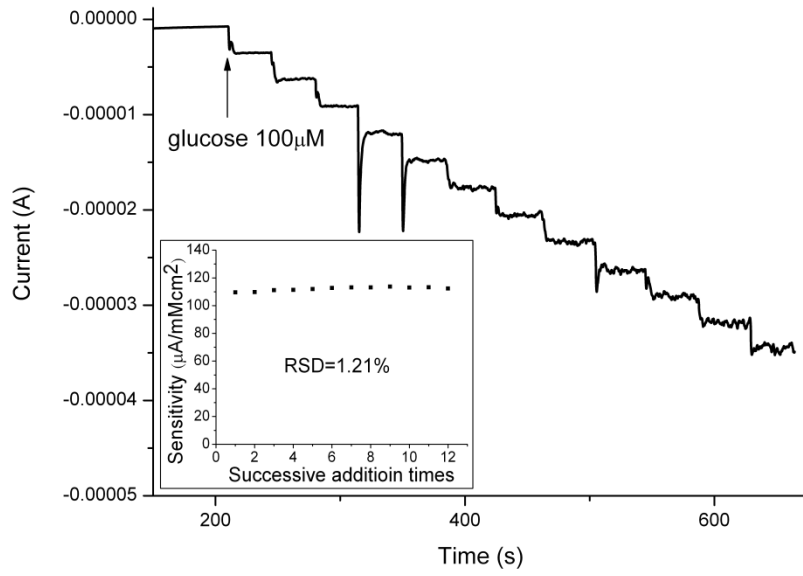


圖 3-18、以 Nafion[®]/金奈米粒子修飾 ITO 電極，在 0.1 M NaOH 溶液中，固定偵測電位 0.1 V，偵測連續添加的 100 μM 葡萄糖樣品。插入圖表示每次樣品添加時電極對葡萄糖的靈敏度。

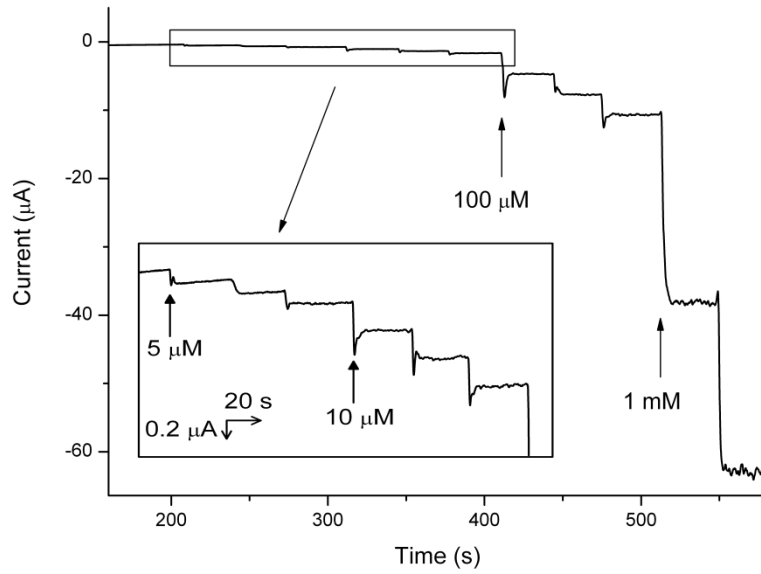


圖 3-19、以 Nafion[®]/金奈米粒子修飾 ITO 電極，在 0.1 M NaOH 溶液中，固定偵測電位 0.1 V，用安培法偵測不同濃度的葡萄糖。

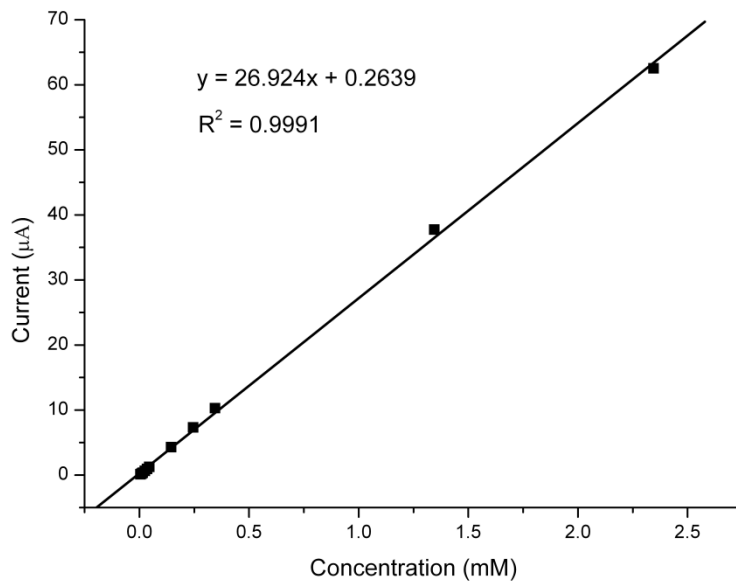


圖 3-20、以 Nafion[®]/金奈米粒子修飾 ITO 電極偵測不同濃度葡萄糖的檢量線。

表 3-1、非酵素葡萄糖感測電極文獻比較表

Glucose sensor	Linear range	LOD	Surface fouling	Sensitivity ($\mu\text{AmM}^{-1}\text{cm}^{-2}$)	Real sample	Reference
Nafion [®] /AuNPs/ITO	5 μM -2.3 mM	1.46 μM	No	107.7		This study
AuNPs-DHP/GCE	90 μM -9.9 mM	40 μM	Yes			Hu et al. (2006)[39]
AuNPs/MPTS electrode	0-8 mM	50 nM	No	179		Raj et al. (2006)[40]
Copper nanocluster /MWCNTs/GCE	0.7-3.5 mM	0.21 μM		17.76 μAmM^{-1}		Mo et al. (2007)[67]
PtNPs/MWCNTs	1.5-11.7 mM 11.7-26.5 mM					Xia et al. (2007)[37]
MnO ₂ /MWNTs nanocomposite	10 μM -28 mM		No	33.19		Ye et al. (2008) [41]
multiple-branching carbon nanotube forest	1-11 mM	1 μM	Yes	60		Loh et al. (2008)[42]
Overoxidized polypyrrole nanofiber electrode modified with cobalt(II) phthalocyanine tetrasulfonate	250 μM -20 mM	100 μM		25.31	Blood serum	Şahin et al. (2008)[43]
PtRu/MWNTs Nanocomposite	1-15 mM	25 μM		28.26		Zhang. et al. 2008[68]

四、結論與未來展望

4.1 結論

本實驗成功的製作出簡單且方便的拋棄式金奈米粒子修飾 ITO 電極。利用微影蝕刻技巧與定電位電沈積的方式，在幾丁聚糖的輔助下，以單一步驟將金以奈米粒子的形式還原出來，並且穩定地修飾在 ITO 玻璃基材上。利用金對於葡萄糖具有催化效果的能力，加上以 Nafion[®] 作為干擾物排除，進行葡萄糖的分析研究。研究結果顯示，修飾電極在 0.1 M 的氫氧化鈉溶液中，具有良好的靈敏度和選擇性。由於此方法不需要利用酵素來輔助偵測，使得這樣的一個非酵素葡萄糖感測器的穩定性也相當良好。此外，在定量分析的評估上，此拋棄式金奈米粒子修飾 ITO 電極使用的線性範圍為 5 μM - 2.3 mM，線性關係良好 ($R^2 = 0.9991$)，而偵測極限可達 1.46 μM ($S/N=3$)，且其靈敏度為 107.7 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^2$ 。因此，以本研究的結果相較於以往的文獻，確實只要以不複雜的單步驟修飾製程，即可達到一定程度的分析效果，將來必然具有相當大的發展潛力。

4.2 未來展望

本研究所製作的金奈米粒子修飾 ITO 電極，本身對於葡萄糖具有相當良好的感測能力，修飾的方法也非常簡單，電極製作成本低且可以拋棄使用，基於以上優點，如果能將具有良好偵測能力的修飾電極深入研究，對於將來發展嶄新且便宜方便又準確的偵測試片具有相當大的潛力。而人體血糖偵測是葡萄糖感測電極的重要應用，現階段的研究成果，可以作為未

來血糖感測研發的一個參考，進一步朝向中性環境下干擾物排除研究，或許將來可以藉此發展為在全血環境下作為拋棄式的人體血糖感測電極。



五、參考文獻

1. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
2. R.F. Lane, A.T. Hubbard, *J. Phys. Chem.* **1973**, 77, 1401-1410.
3. N. Pereira-Rodrigues, R. Cofre, J.H. Zagal, F. Bedioui, *bioelectrochemistry* **2007**, 70, 147-154.
4. H.M. Nassef, A.-E. Radi, C. O'Sullivan, *Anal. Chim. Acta.* **2007**, 583, 182-189.
5. P.F. Huang, L. Wang, J.Y. Bai, H.J. Wang, Y.Q. Zhao, S.D. Fan, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 157, 41-47.
6. Q. Fan, D. Shan, H. Xue, Y. He, S. Cosnier, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 816-821.
7. M. Yang, J. Jiang, Y. Yang, X. Chen, G. Shen, R. Yu, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 1791-1797.
8. J.-M. Zen, A.S. Kumar, D.-M. Tsai, *Electroanalysis* **2003**, 15, 1073-1087.
9. R. Saito, M. Fujita, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, *Appl. Phys. Lett.* **1992**, 60, 2204-2206.
10. J. W. G. Wildoer, L. C. Venema, A. G. Rinzler, R. E. Smalley, C. Dekker, *Nature (London)* **1998**, 391, 59-62.
11. T. W. Odom, J.-L. Huang, P. Kim, C. M. Lieber, *Nature (London)* **1998**, 391, 62-64.
12. S. Hrapovic, Y. Liu, K. B. Male, J. H. T. Luong, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1083-10882.
13. C. Xiang, Y. Zou, L. Sun, F. Xu, *Talanta* **2007**, 74, 206-211.
14. W. Zhao, J. Xu, C. Shi, H. Chen, *Electrochem. Commun.* **2006**, 8, 773-778.
15. H. Liu, Y. Tian, *Electroanalysis* **2008**, 20, 1227-1233.

16. T Selvaraju, R Ramaraj, *J. Electroanal. Chem.* **2005**, 585, 290-300.
17. X. Dai, O. Nekrassova, M. E. Hyde, R. G. Compton, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5924-5929.
18. X Dai, R. G. Compton, *Anal. Sci.* **2006**, 22, 567-570.
19. O.D. Renedo, M.J.A. Martínez, *Anal. Chim. Acta* **2007**, 589, 255-260.
20. O.D. Renedo, M.J.A. Martínez, *Electrochem. Commun.* **2007**, 9, 820-826.
21. M.-C. Tsai, P.-Y. Chen, *Talanta* **2008**, 76, 533-539.
22. A.A. Umar, M. Oyama, *Cryst. Growth Des.* **2005**, 2, 590-607.
23. R.N. Goyal, V.K. Gupta, M. Oyama, N. Bachheti, *Talanta* **2007**, 72, 976-983.
24. S. Wang, Y. Tan, D. Zhao, G. Liu, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23, 1781-1787.
25. J. Zang, C.M. Li, X. Cui, J. Wang, X. Sun, H. Dong, C. Q. Sun, *Electroanalysis* **2007**, 19, 1008-1014
26. S.K. Dondapati¹, P. Lozano-Sanchez, I. Katakis, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 24, 55-59
27. X.-L. Luo, J.-J. Xu, Y. Du, H.-Y. Chen, *Anal. Biochem.* **2004**, 334, 284-289.
28. Y. Du, X.-L. Luo, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Bioelectrochemistry* **2007**, 70, 342-347.
29. Clark, L., Jr., Lyons, C. *Ann. NY Acad. Sci.* **1962**, 102, 29.
30. H. Tang, J. Chen, S. Yao, L. Nie, G. Deng, Y. Kuang, *Anal. Biochem.* **2004**, 331, 89-97.
31. X Kang, Z Mai, X Zou, P Cai, J Mo, *Anal. Biochem.* **2007**, 369, 71-79.
32. S Bharathi, M Nogami, *Analyst* **2001**, 126, 1919-1922.
33. L. Bahshi, M. Frasconi, R. Tel-Vered, O. Yehezkeli, I. Willner, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 8253-8259.
34. J. Li, X. Lin, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2898-2905.

35. S. Park, T.D. Chung, H.C.Kim, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3046-3049.
36. Y. Bai, Y. Sun, C. Sun, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 24, 579-585.
37. L.Q. Rong, C. Yang, Q.Y. Qian and X.H. Xia, *Talanta* **2007**, 72, 819-824.
38. A. Salimi, M. Roushani, *Electrochem. Commun.* **2005**, 7, 879-887.
39. J. Zhao, J. Yu, F. Wang, S. Hu, *Microchim. Acta* **2006**, 156, 277-282.
40. B.K. Jena, C.R. Raj, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 2702-2708.
41. J. Chen, W.-D. Zhang, J.-S. Ye, *Electrochem. Commun.* **2008**, 10, 1268-1271.
42. C.K. Tan, K.P. Loh, T.T.L. John, *Analyst* **2008**, 133, 448-451.
43. L Özcan, Y Şahin, H Türk, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 24, 512-517.
44. C.-H. Chou, J.-C. Chen, C.-C. Tai, I.-W. Sun, J.-M. Zen, *Electroanalysis* **2008**, 20, 771-775.
45. H.F. Cui, J.S. Ye, W.D. Zhang, C.M. Li, J.H.T. Luong and F.S. Sheu, *Anal. Chim. Acta* **2007**, 594, 175-183.
46. J. Wang, D.F. Thomas, A. Chen, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 997-1004.
47. P. Holthindle, S. Nigro, M. Asmussen, A. Chen, *Electrochem. Commun.* **2008**, 10, 1438-1441.
48. S. Cho, C. Kang, *Electroanalysis* **2007**, 19, 2315-2320.
49. W. Zhao, J. Xu, C. Shi, H. Chen, *Electrochem. Commun.* **2006**, 8, 773-778.
50. Y. Li, Y.-Y. Song, C. Yang, X.-H. Xia, *Electrochem. Commun.* **2007**, 9, 981-988.
51. E. Guibal, *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30, 71-109.
52. D.S. dos Santos, Jr., P.J.G. Goulet, N.P.W. Pieczonka, O.N. Oliveira, Jr., R.F. Aroca, *Langmuir* **2004**, 20, 10273-10277.
53. H. Huang, X. Yang, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 2340-2346.
54. T. Miyama, Y. Yonezawa, *Langmuir* **2004**, 20, 5918-5923.
55. Y. Yonezawa, T. Sato, I. Kawabata, *Chem. Lett.* **1994**, 355-358.
56. X. Zhao, Z. Mai, X. Kang, X. Zou, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23,

- 1032-1038.
57. M. Rinaudo, G. Pavlov¹, J. Desbrières, *Polymer* **1999**, 40, 7029-7032.
58. S. P. Strand, K.M. Vårum and K. Østgaard, *Biomacromolecules* **2001**, 2, 1310-1314.
59. G.F. Payne, S.R. Raghavan, *Soft Matter* **2007**, 3, 521-527.
60. J.-J. Xu, X.-L. Luo, Y. Du, H.-Y. Chen, *Electrochem. Commun.* **2004**, 6, 1169-1173.
61. T. Tangkuaram, C. Ponchio, T. Kangkasomboon, P. Katikawong, W. Veerasai, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2071-2078.
62. Y. Liu, M. Wang, F. Zhao, Z. Xu, S. Dong, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 984-988.
63. T.-H. Yang, C.-L. Hung, J.-H. Ke, J.-M. Zen, *Electrochem. Commun.* **2008**, 1094-1097.
64. Z.-L. Zhou, T.-F. Kang, Y. Zhang, S.-Y. Cheng, *Microchim. Acta* **2009**, 164, 133-138.
65. A. Salimi, M. Roushani, *Electrochem. Commun.* **2005**, 7, 879-887.
66. J. Wang, M. Musameh, Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2408-2409.
67. X. Kang, Z. Mai, X. Zou, P. Cai, J. Mo, *Anal. Biochem.* **2007**, 363, 143-150.
68. L.-H. Li, W.-D. Zhang, J.-S. Ye, *Electroanalysis* **2008**, 20, 2212-2216.