

二、醣類檢測方法回顧

2.1 引言

醣類廣佈於自然界動植物體中，並以各種不同分子形式存在，包括單-(mono-)、寡(oligo-)、聚(poly-)醣等形式，對於生命的維持扮演著非常重要的角色。故對醣類進行定性定量檢測均是臨床檢驗、食品科學、環境檢測等分析領域中相當重要的一環。

2.2 醣類之分離方法

在 1970 年之前的醣類檢測技術主要是以薄層層析(thin-layer chromatography, TLC)為主，到了 70 年代中期發展出氣相層析儀的檢測方式，而 80 年代開始以液相層析的方式來檢測醣類，而目前具有高理論板數的毛細管電泳以及晶片電泳是能達最佳分離效率之檢測方式[82]。

但是利用電泳方式來檢測醣類，亦面臨到分離與偵測上的兩個難題。在分離上：醣類分子大多不具有電性，亦無電泳淌度上的差異，故一般電泳模式並無法簡單地將其分離，再加上醣類分子通常有一系列結構相近的同分異構物，如此更增加了分離上的困難；而在偵測上：醣類分子不具有紫外光/可見光之吸收基團(absorbing chromophore)[80]或是螢光基團(fluorophore)[81]，除了折射法(refractometry)以外，並無法以光學法直接偵測醣類分子，而必須進行相當耗時的衍生步驟以及樣品前處理之後，將醣類分子與標的物(tag)結合才能進行研究。

為克服醣類分子不具電性之問題，目前已有微胞電動層析法(micellar electrokinetic chromatography)[83]、親和性電泳(affinity electrophoresis)[84]以及氫鍵生成電泳(hydrogen bonding formation electrophoresis)[85]等特殊模式來提高分離效率，但是最直接之方式為使用強鹼環境做為分離介質，在此環境下醣類之 OH 基會略為解離而帶負電，此時便可利用不同 pKa 的醣類分子其帶電量之差異而進行分離[86-88]。本研究為達到簡易快速分析的目的，因此選用強鹼環境將不同的醣類帶電，以進行分離。

2.3 醣類之直接偵測方法

醣類分子之偵測方法，除了間接偵測衍生法之外，另有折射法[89,90]與電化學法[86-88]此二種直接偵測方法。

2.3.1 直接偵測法——折射法

折射法主要是利用波長為 670 nm 的二極體雷射束(diode laser beam)做為偵測光源，並使用分光鏡將其光束一分為二，其中探針束(probe beam)直接穿透微晶片流道，而參考束(reference beam)則穿透流道旁的玻璃區域，以做為探針束折射率改變的參考，裝置如圖 2-1 所示。折射法是一種通用(uni-versal)的偵測法，不受限於分析物種類影響，但缺點是溶液折射率穩定性易受到溫度影響，造成雜訊過大之問題，使得其靈敏度較一般光學偵測法為低，故較適合於醣類成份含量較高的檢測樣品。

2.3.2 直接偵測法——電化學法

相較於折射法之偵測極限高達至 mM 之等級[89,90]，一般電化學法檢測醣類之偵測極限多在 μM 等級[86-88]，若能選擇適當的工作電極種類以及偵測模式，電化學偵測法無疑是上述數種偵測方式中最快速且靈敏的方法。

偵測醣類最簡單的模式為安培法，只需先以循環伏安法或是流體動力伏安法來得知醣類分析物之催化電位，即可開始進行電泳分離與檢測。但是仍有其工作電極種類上之限制，目前最常應用偵測醣類之電極為銅電極[86-88]，是因為銅電極在低電位($<0.4\text{ V}$)具有相當良好且靈敏之電催化(electrocatalysis)能力，較貴金屬或是石墨電極需要在高電位($>0.8\text{ V}$)，更適合於電化學活性小之分析物的偵測。此外，有部分文獻亦宣稱醣類經工作電極催化後，其氧化物容易附著於電極表面，隨著實驗之進行，會逐漸減少電極可進行氧化還原之活性面積(active surface)，而造成所謂的電極毒化(poison)，故改為使用脈衝式安培法(pulsed amperometric detection, PAD)來進行其研究[76,91,92]。

脈衝式安培法於 1990 年由 Johnson 與 LaCouse 兩位學者所提出，是屬於安培法的一種衍生偵測方式，發展之目的是為了改善安培法在偵測一些比較容易吸附至電極表面的分析物，如碳水化合物、胺基酸或是醇類等化合物，所出現電極毒化之情形。其主要原理是對工作電極施加三種不同電位，並以高頻率方式依序切換此三種電位。此三種電位分別為：再活化(reactivation)之還原電位、偵測分析物用之催化電位、清潔電極表面之高氧化電位。文獻[93]以極易造成電極毒化之血清素(serotonin)與組織胺(histamine)做為標準品，發現在 30 回重複注射實驗中，血清素之訊號下降至只有原訊號值之 1.1 %，而經過清潔與再活化工作電極之步驟後，成功使訊號回復至原訊號值之 99 %，亦為脈衝式安培法之功能提出一有力佐證。脈衝式安培法電壓轉換圖由圖 2-2 所示。雖然脈衝式安培法在近年來的電化學研究上顯示出其優點，但由於偵測儀器上的複雜設計與參數調整，使得目前應用於微晶片的電化學偵測法，仍以設計簡單、操作方便的安培法為主要偵測方式。



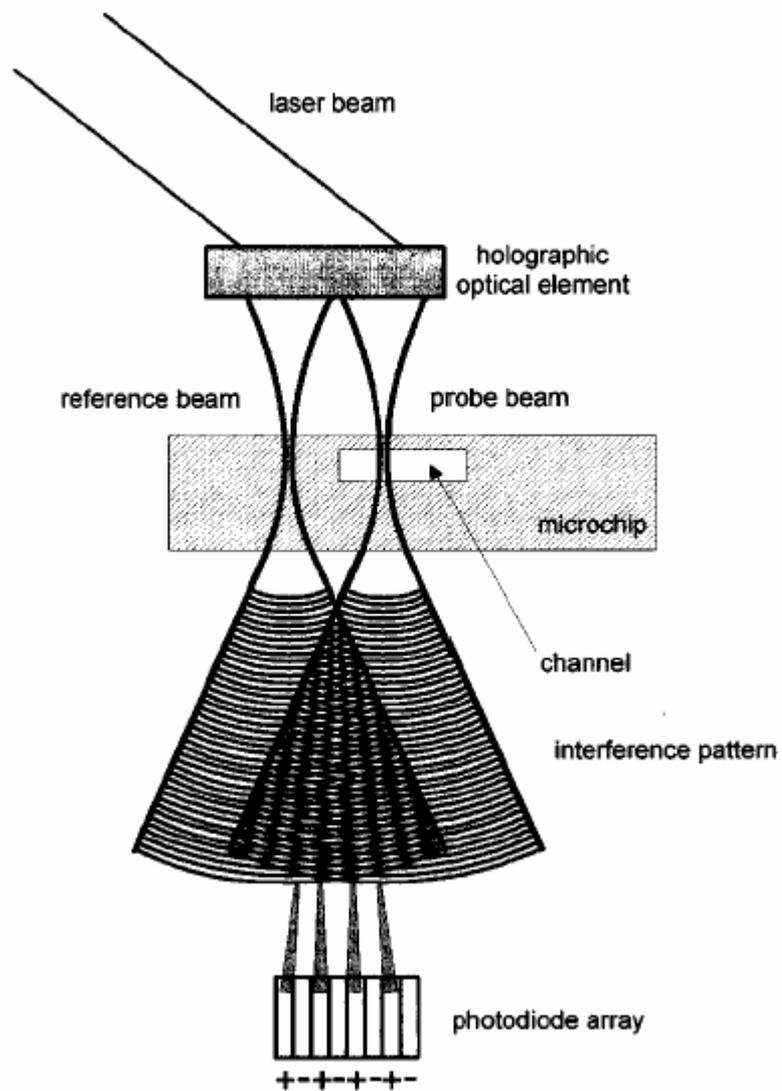


圖 2-1、折射法二雷射束折射率差異所造成干涉圖譜之示意圖。[89]

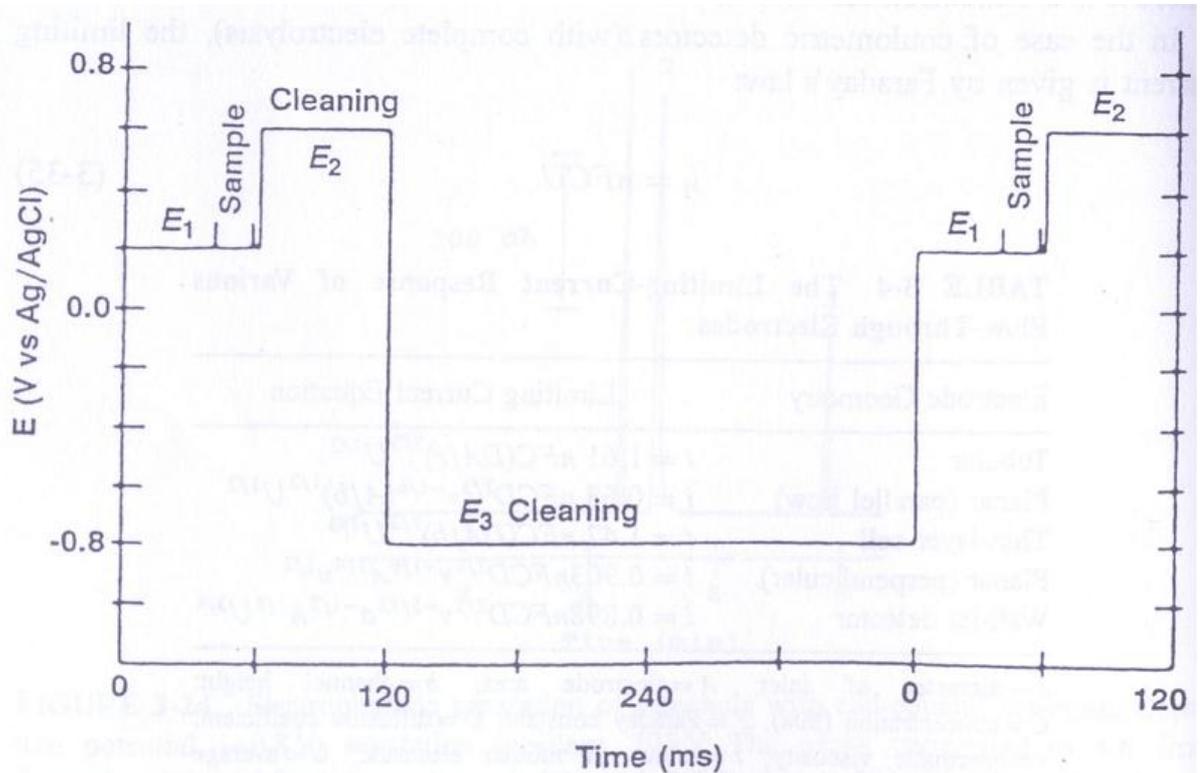


圖 2-2、脈衝式安培法電位隨時間轉換之示意圖。E1：施加 0.2 V 於工作電極上做為偵測電位；E2：施加 0.6 V 之高氧化電位以清除工作電極表面之附著物；E3：施加 -0.8 V 之還原電位以活化工作電極表面之金屬氧化膜。[76]