

國立臺灣大學工學院化學工程研究所



碩士論文

Department of Chemical Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

藉由調整噴墨參數提升葡萄糖感測器靈敏度

Sensitivity Enhancement of Glucose Biosensors

via Printing Parameter Adjustment

黃佩瑤

Pei-Yu Huang

指導教授：廖英志 博士

Advisor: Ying-Chih Liao, Ph.D.

中華民國 102 年 6 月

June, 2013



誌謝

問起自己在兩年碩士生活中，究竟學到了些什麼？我會回答：我學到了面對失敗的能力！從過去讀書考試總是有正確答案的學生生活中，走上了研究這條需要摸索、找尋結果的研究生活，感謝周圍的人，陪伴我經過那段不適應，而能有所成長，使我學會面對研究上的挫折。在這段日子裡感謝廖英志教授的指導與協助，教導我思考、論證、反省與辯證的能力；謝謝徐振哲教授與游佳欣教授參與學生的碩士班口試，給予學生論文上與研究上的建議與指導。謝謝實驗室中的每一位成員，感謝你們這段時間的陪伴與指導。謝謝振凱學長、仕斌學長、士暉學長、立文學姐，總是教導我做人處事的道理，教導我如何處理情緒以及排解煩悶，在研究上也給予我許多的幫助與支持；謝謝正隆與竣志，感謝你們在這兩年一同奮鬥與包容，一同走過這段碩士班有笑有淚的日子；謝謝已經畢業的學姊韻婷、學長育平、俊宇，感謝你們在我剛踏上研究所生活的時候，給予我許多指導與照顧，謝謝學妹如妍、學弟宇志、泱愷、柏翰的活力，帶給實驗室許多歡笑。

真的很謝謝所有在我研究上、生活上幫助過我的人，指導過我的老師與教授們，陪伴過我度過喜怒哀愁的同學們。感謝我的室友力平、宜頻、佳玲，教育學程的同學們紘玄、凱評等好多夥伴，以及我的好友顛宇、宜均、羿葶，在我研究的過程中，每每遇到困境、失敗時，你們總是願意陪著我、聽我訴說，帶給我歡笑與力量。

最後，感謝我最最重要的家人，爸爸黃文卿、媽媽江淑霞以及哥哥黃煜翔，謝謝您們總是提供我一個避風港，讓我在失落、疲倦的時候，總有靠山可以傾訴，還有生活上陪伴我的陳柏彰，謝謝你一路上的支持與照顧。在此對於所有幫助過我、愛我、陪伴我、指導我的人，獻上最誠摯的感謝與祝福。

摘要



本研究利用多樣化印刷方式，採逐層堆積(Layer-by-layer)的方式，製成生物感測器工作電極，利用網刷技術製作碳膠導電層，接著利用點膠機沉積普魯士藍中介層，隨後在電極表面利用噴墨技術噴塗葡萄糖氧化酶酵素層，最後再利用浸製塗佈在電極表面修飾石蠟層，以便固定葡萄糖氧化酶。應用噴墨技術噴塗各式圖樣便利性，將此技術發展至生物感測器的製造用途上。

研究證實噴墨製程應用在生物感測器的可行性，探討系統最佳的電化學環境，發現若將操作電位越往負電位移動，可得到越大的電流訊號，然而操作電位的設定不僅要考慮電流訊號大小，仍要考慮操作電位過大會驅動其他干擾物質反應；探討電解質酸鹼值 pH 值 6.53 與 7.4 對電流訊號的影響，發現其兩者對於感測器的訊號大小影響不大；最後確認干擾測試中，系統是否能避開干擾物質的反應雜訊。

進一步探討改變噴墨參數、沉積不同葡萄糖氧化酶圖樣與靈敏度的關係，發現噴塗速度需與液滴、表面性質及乾燥情況配合，藉由調整溫度，以便得到完整、均勻沉積的表面；藉由噴墨技術在電極表面沉積快速，且可噴塗多種圖樣修飾的優勢，探討葡萄糖氧化酶圖樣是否會影響工作電極電流訊號，發現在使用同樣量的葡萄糖氧化酶時，若葡萄糖氧化酶與普魯士藍層接觸點越多，則訊號越高。除了改變葡萄糖氧化酶圖樣，增加接觸點外，本研究也藉由改變普魯士藍層的粗糙度，嘗試增加葡萄糖氧化酶與普魯士藍接觸點，以便增加反應生成的過氧化氫與普魯士藍接觸的機會，發現藉由碳紙吸附普魯士藍，增加其粗糙度，可確實增強過氧化氫感測訊號，然而增強葡萄糖感測訊號，則需均勻混合葡萄糖氧化酶與普魯士藍墨水，使其沉積在電極表面時，兩者界面均勻接觸，以期能增強訊號。

關鍵字：噴墨製程、葡萄糖氧化酶、靈敏度提升、噴墨參數、普魯士藍

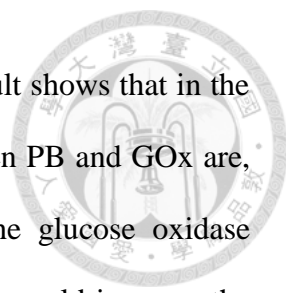
Abstract



By using versatile printing technique and layer-by-layer depositing method, the working electrode of biosensors are manufactured in this research. The manufacturing process is as following: screen-printing carbon paste conductive layer, depositing Prussian blue (PB) mediator layer by fluid dispenser, inkjet printing glucose oxidase (GOx) enzyme layer, and dip coating paraffin wax for enzyme immobilization. This research applies the inkjet printing method on biosensors fabrication for the convenience of printing patterns.

The feasibility of fabricating biosensors by inkjet printing process has been proved. Discussing the best electrochemical environment in this system, the result was found that the more negative applied voltage, the bigger response current. However, the setting of proper applied voltage has to take many factors into consideration not only the bigger amount of current signals but also the less interference reaction that the bigger applied voltage would trigger the interference substance reacts. The results from different pH values of electrolyte at pH 6.53 and pH 7.4 have no difference on current response signals. Furthermore, by the interference test, the research needs to make sure the selectivity of this system.

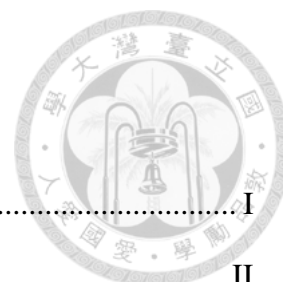
Then, this study discusses the relationship between the printing parameters, the printing patterns of glucose oxidase on the biosensor surface, and sensitivity. The printing velocity is adjusted by droplet and surface properties, and printing temperature is controlled to print uniform deposited surface. Due to the advantage of inkjet printing technique to print various patterns flexibly and fast, this study shows that the



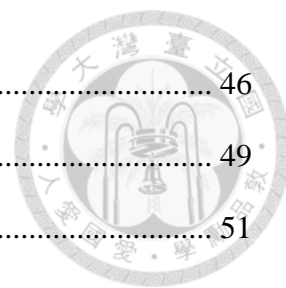
glucose oxidase patterns could effect on current signals, and the result shows that in the same amount of glucose oxidase, the more contacting points between PB and GOx are, the bigger electrochemical signals are. Besides, by changing the glucose oxidase patterns, this study also shows increasing the roughness of PB layer could increase the contacting points between GOx and PB, and the reacting area between PB and hydrogen peroxide which is produced by glucose and GOx. The results show that the biosensor electrochemical performance of hydrogen peroxide detection gets better by depositing PB adsorbed on carbon paper, which increases the roughness of PB surface. Then, it is expected to increase the glucose detection signals by mixing glucose oxidase and Prussian blue ink in order to make the homogeneous connecting surface while depositing on the electrode surface.

Key words: inkjet printing process, glucose oxidase, sensitivity improvement, printing parameters, Prussian blue.

目錄

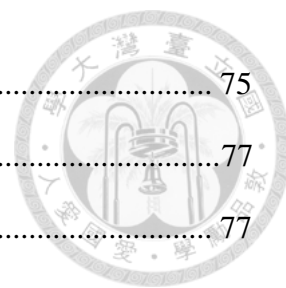


誌謝	I
摘要	II
Abstract.....	III
目錄	V
圖目錄	VIII
表目錄	XIV
第一章 緒論	1
1.1 前言	1
1.2 生物感測器簡介	3
1.3 塗佈技術介紹	8
1.3.1 噴墨技術	9
1.3.2 網印技術	12
1.3.3 針筆繪製技術	14
1.3.4 點膠塗佈技術	16
1.4 葡萄糖簡介	18
1.5 葡萄糖氧化酶概述	20
1.5.1 葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase)簡介	20
1.5.2 酵素動力學	22
1.5.3 固定化酵素	25
1.6 過氧化氫簡介	31
1.7 普魯士藍概述	34
1.8 電化學原理	41
1.8.1 電極界面—電雙層現象	43



1. 8. 2	循環伏安法	46
1. 8. 3	計時安培法	49
1. 9	研究動機與目的	51
1. 10	論文架構	52
第二章	實驗用品與流程	53
2. 1	實驗藥品	53
2. 2	實驗儀器	55
2. 3	墨水製作	57
2. 3. 1	普魯士藍墨水—噴墨製程(Inkjet Printing)用	57
2. 3. 2	普魯士藍墨水—針筆繪製(Pen-writing)用	57
2. 3. 3	普魯士藍墨水—點膠噴塗製程用	57
2. 3. 4	葡萄糖氧化酶墨水—噴墨製程(Inkjet Printing)用	58
2. 3. 5	石蠟墨水—浸製塗佈(Dip Coating)用	58
2. 4	工作電極製作	59
2. 4. 1	碳膠層	59
2. 4. 2	普魯士藍層	61
2. 4. 3	葡萄糖氧化酶層	63
2. 4. 4	石蠟層	64
2. 4. 5	噴墨技術介紹	66
2. 5	自製工作電極電化學表現測試	73
2. 5. 1	磷酸緩衝水溶液	73
2. 5. 2	葡萄糖水溶液	73
2. 5. 3	過氧化氫水溶液	73
2. 5. 4	尿酸水溶液	74
2. 5. 5	維生素 C 溶液	74

2.5.6	電化學分析	75
第三章	利用噴墨製程之葡萄糖感測器表現	77
3.1	感測器結構介紹	77
3.1.1	感測器表面結構	77
3.1.2	利用明膠與戊二醛的交聯性質固定葡萄糖氧化酶	81
3.1.3	利用石蠟固定葡萄糖氧化酶	85
3.1.4	利用醋酸纖維素固定葡萄糖氧化酶	86
3.2	操作電壓對於葡萄糖氧化酶感測器靈敏度影響探討	87
3.3	電解液酸鹼值對於葡萄糖氧化酶感測器靈敏度影響探討	89
3.4	干擾測試	91
第四章	改變噴墨參數對葡萄糖感測器靈敏度之探討	95
4.1	噴塗參數對於沉積葡萄糖氧化酶於感測器表面之探討	95
4.1.1	噴墨速度對感測器表面樣態之影響	95
4.1.2	噴墨基板溫度對感測器表面樣態與電化學表現之影響	97
4.1.3	材料噴塗層數對感測器電化學表現之影響	99
4.2	塗佈形狀對於葡萄糖感測器靈敏度影響探討	104
4.3	表面粗糙度對葡萄糖感測器靈敏度之影響	111
第五章	結論	121
第六章	未來展望	123
	參考文獻	125



圖目錄



圖 1-1	在 1980 年與 2008 年，世界衛生組織的會員國中，超過二十歲之成年人過胖百分比(過胖定義：身體質量指數(BMI) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$).....	1
圖 1-2	生物感測器組成[3].....	4
圖 1-3	生物感測器感測原理示意圖	4
圖 1-4	生物感測器應用性[1].....	5
圖 1-5	各式噴墨技術噴射機制原理[22]：(a) 加熱式噴墨技術；(b) 壓電式噴墨技術；(c) 靜電式噴墨技術；(d) 聲波式噴墨技術	10
圖 1-6	商業化桌上型噴墨印刷機台：MicroFab Jetlab 4	11
圖 1-7	利用網印技術製成之電極外觀：(a) 雙電極系統；(b) 三電極系統[26]	12
圖 1-8	利用網印技術製作乳酸感測器之外觀示意圖[27].....	12
圖 1-9	網印機	13
圖 1-10	各式規格的針筆	14
圖 1-11	針筆繪製過程	15
圖 1-12	各式點膠系統：(a) 基本時間壓力控制式[Techom Systems Inc.]；(b) 隔膜閥控制式[EFD]；(c) 短管閥控制式[EFD]；(d) 針閥控制式[EFD][28]	16
圖 1-13	點膠設備	17
圖 1-14	葡萄糖結構：(a) 鏈狀結構；(b) 環狀結構	18
圖 1-15	葡萄糖鏈狀與環狀結構轉換反應式	18
圖 1-16	葡萄糖氧化酶催化反應機制示意圖[30].....	20
圖 1-17	酵素固定化方法	25
圖 1-18	酵素固定化方法[34].....	26

圖 1-19	酵素固定化方法：物理吸附法	26
圖 1-20	酵素固定化方法：包陷法	27
圖 1-21	酵素固定化方法：微膠囊包覆法	27
圖 1-22	酵素固定化方法：共價結合法	27
圖 1-23	酵素固定化方法：交聯法	28
圖 1-24	過氧化氫結構：(a) 結構式；(b) 三維立體分子結構	31
圖 1-25	以氧化酶酵素與普魯士藍為基材之感測器反應概述圖[44].....	34
圖 1-26	可溶性普魯士藍之晶體結構[45, 50].....	35
圖 1-27	不可溶性普魯士藍之晶體結構[45, 47].....	36
圖 1-28	普魯士藍修飾電極循環伏安圖，可見普魯士藍氧化與還原峰[44].....	37
圖 1-29	利用普魯士藍與 PEDOT/PSS 修飾電極，偵測待測物質所得之電流對時間干擾測試曲線。修飾電極對過氧化氫(H_2O_2)、尿酸(Uric acid, UA)、維生素 C(Ascorbic acid, AA)之電流訊號：(a) 操作電位設定為 -0.1 V ；(b) 操作電位設定為 $+0.15\text{ V}$ [56].....	39
圖 1-30	修飾電極 PBNPs-PANI/MWNTs/GCE 在不同陽離子電解液中之循環伏安圖[17].....	40
圖 1-31	溶液中氧化還原反應過程示意圖，以物質 A 為例[57].....	42
圖 1-32	帶正電荷表面之電雙層模型示意圖：(a) 亥姆霍茲模型(the Helmholtz model)；(b) 古依－查普曼模型(the Gouy–Chapman model)；(c) 斯特恩模型(the Stern model)，符號 d 表示由亥姆霍茲模型(the Helmholtz model)提出的電雙層距離，符號 ψ_0 與 ψ 各別表示電極表面電位與電極電解液界面電位[58].....	45
圖 1-33	(a) 循環掃描電位；(b) 循環伏安圖[57]	48
圖 2-1	利用軟體中 Jet Setup 頁面，觀察液滴形成並分析其液滴物理性質	68
圖 2-2	利用軟體中 Motion 頁面，決定噴塗位置	69

圖 2-3	利用軟體中 Print 頁面，設定噴塗圖樣	72
圖 2-4	電化學儀器 Gamry 電線接線方法	76
圖 3-1	製作葡萄糖感測器之流程示意圖	79
圖 3-2	製作完成之電極表面電子顯微鏡與光學顯微鏡圖(左上角)：(a) 碳膠電極表面(SPCE)；(b) 普魯士藍修飾電極表面(PB/SPCE)；(c) 葡萄糖氧化酶普魯士藍修飾電極(GOx/PB/SPCE)	79
圖 3-3	修飾電極偵測葡萄糖之反應機制示意圖	80
圖 3-4	明膠與戊二醛化學反應式[59].....	81
圖 3-5	修飾電極之電流對時間曲線，用以判斷葡萄糖氧化酶固定與否：(a) 葡萄糖氧化酶固定；(b) 葡萄糖氧化酶未固定.....	82
圖 3-6	利用明膠固定葡萄糖氧化酶之修飾電極電流對濃度曲線	83
圖 3-7	不同噴塗製程所得電化學結果，上圖為循環伏安圖、下圖為電流對濃度曲線：(a) Gelatin/GOx+GA/PB/SPCE；(b) GOx+GA/Gelatin/PB/SPCE；(c) GA/GOx+Gelatin/PB/SPCE	84
圖 3-8	利用石蠟固定葡萄糖氧化酶之修飾電極電流對濃度曲線	85
圖 3-9	利用醋酸纖維素固定葡萄糖氧化酶之修飾電極電流對時間曲線	86
圖 3-10	修飾電極在不同操作電位下，電流對濃度曲線圖	88
圖 3-11	修飾電極在不同操作電位和不同酸鹼值的電解質下，電流對濃度曲線圖	90
圖 3-12	干擾測試：修飾電極 Wax/GOx/PB/SPCE 在操作電位+0.16 V 時，加入葡萄糖(Glucose)、尿酸(Uric acid)、維生素 C(L-Ascorbic acid)之電流對時間曲線	93
圖 3-13	干擾測試：修飾電極 Wax/GOx/PB/SPCE 在操作電位-0.10 V 時，加入葡萄糖(Glucose)、尿酸(Uric acid)、維生素 C(L-Ascorbic acid)之電流對時間曲線	93

圖 4-1	修飾電極之光學顯微鏡圖：(a) 葡萄糖氧化酶以 30 mm/s 噴墨速率噴塗在碳膠電極上；(b) 葡萄糖氧化酶以 30 mm/s 噴墨速率噴塗在普魯士藍碳膠電極上；(c) 葡萄糖氧化酶以 8 mm/s 噴墨速率噴塗在普魯士藍碳膠電極上	96
圖 4-2	在不同的基板溫度下，修飾葡萄糖氧化酶於電極表面之光學顯微鏡圖：(a) 室溫下；(b) 於 40 °C 下；(c) 於 50 °C 下；(d) 於 60 °C 下噴塗 ..	97
圖 4-3	在不同基板溫度下，修飾葡萄糖氧化酶之電極其電流對濃度曲線圖 .	98
圖 4-4	沉積不同層數普魯士藍的修飾電極，其感測過氧化氫之電流對濃度曲線圖	100
圖 4-5	沉積不同層數的普魯士藍、相同層數與圖樣的葡萄糖氧化酶修飾電極，其感測葡萄糖之電流對濃度曲線圖	101
圖 4-6	沉積不同層數的葡萄糖氧化酶修飾電極，其感測葡萄糖之電流對葡萄糖濃度曲線圖	103
圖 4-7	沉積不同層數的葡萄糖氧化酶修飾電極，其感測葡萄糖之電流對時間曲線圖：(a) 沉積兩層葡萄糖氧化酶；(b) 沉積十層葡萄糖氧化酶	103
圖 4-8	沉積不同半徑的葡萄糖氧化酶圓形圖樣於電極上，其電流對葡萄糖濃度曲線	105
圖 4-9	沉積不同半徑的葡萄糖氧化酶圓形圖樣於電極上，其電流通量對葡萄糖濃度曲線	105
圖 4-10	沉積相同量、不同圖樣的葡萄糖氧化酶於電極上，其電流對葡萄糖濃度曲線	106
圖 4-11	沉積相同量、不同線狀圖樣的葡萄糖氧化酶於電極上，其電流對葡萄糖濃度曲線	107
圖 4-12	不同線狀圖樣的葡萄糖氧化酶於電極上之光學顯微鏡圖：(a) 線性圖樣 5 mm(共 600 滴 GOx 墨水)；(b) 線性圖樣 5 mm(3600 滴 GOx 墨水)；(c)	

	網格圖樣(3600 滴 GOx 墨水).....	108
圖 4-13	比較沉積不同量與不同葡萄糖氧化酶圖樣對於電流與濃度曲線的影響	108
圖 4-14	不同沉積面積的葡萄糖氧化酶於電極上之光學顯微鏡圖：(a) 矩形狀 5 mm×0.45 mm；(b) 矩形狀 5 mm×0.90 mm；(c) 矩形狀 5 mm×1.80 mm； (d) 正方形狀 1 mm×1 mm 九宮格矩陣	109
圖 4-15	比較沉積相同量但不同葡萄糖氧化酶面積圖樣對於電流與濃度曲線的影響	110
圖 4-16	左圖為 GOx/PB/SPCE 電極之光學顯微鏡圖，以及沉積另一層普魯士藍層於 GOx/PB/SPCE 電極，形成右圖 PB/GOx/PB/SPCE 電極之光學顯微鏡圖	111
圖 4-17	利用 PB/GOx/PB/SPCE 電極感測葡萄糖與過氧化氫水溶液之電流訊號表現.....	112
圖 4-18	電子顯微鏡圖：(a) 網印碳膠層於 A4 紙基材上；(b) 網印碳膠層於濾紙基材上	113
圖 4-19	光學顯微鏡圖：(a) 基本 GOx/PB/SPCE 電極；(b) 左側為刻痕加工的 grooved PB/SPCE 電極，右側為沉積葡萄糖氧化酶為 GOx/grooved PB/SPCE 電極.....	114
圖 4-20	葡萄糖氧化酶修飾電極的電流對濃度曲線：Wax/GOx/PB/SPCE 電極以及 Wax/GOx/grooved PB/SPCE 電極	114
圖 4-21	將碳紙吸附普魯士藍，沉積在碳膠電極上的光學顯微鏡圖(PB-Carbon Paper/SPCE)	115
圖 4-22	電子顯微鏡圖：(a) 碳紙(5000x)，纖維結構；(b) 碳紙(100000x)，其纖維表面型態；(c) 碳紙吸附普魯士藍(5000x)；(d) 碳紙吸附普魯士藍(100000x)，其普魯士藍表面型態；(e)及(f) 碳紙吸附普魯士藍(100000x)，	

	其碳纖維上覆蓋著普魯士藍	116
圖 4-23	電極 GOx/PB carbon paper/SPCE 之電化學結果：(a) 每一百秒加入 500 μL 20 mM 過氧化氫水溶液之電流對時間曲線；(b) 每一百秒加入 500 μL 21.7 mM 葡萄糖水溶液之電流對時間曲線.....	116
圖 4-24	電極 GOx/PB carbon paper/SPCE 在每一百秒加入 500 μL 20 mM $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$ ，其電流對過氧化氫濃度訊號曲線	117
圖 4-25	各式修飾電極的光學顯微鏡圖：(a) 沉積普魯士藍混合磨碎碳紙製成電極(PB-Ground Carbon paper/SPCE)；(b) 沉積普魯士藍混合碳紙膠狀墨水製成電極(PB-Carbon paper paste/SPCE)；(c) 沉積普魯士藍混合碳紙膠狀墨水、噴墨噴塗葡萄糖氧化酶製成電極(GOx/PB-Carbon paper paste/SPCE).....	117
圖 4-26	利用不同方式沉積普魯士藍層製成電極(PB-Carbon paper paste/SPCE, PB/SPCE)，感測過氧化氫之電流與濃度曲線	118
圖 4-27	不同方式沉積普魯士藍層製成電極，沉積葡萄糖氧化酶於電極上 (GOx/PB/SPCE, GOx/PB-Carbon paper paste/SPCE)，感測葡萄糖之電流與濃度曲線	119

表目錄



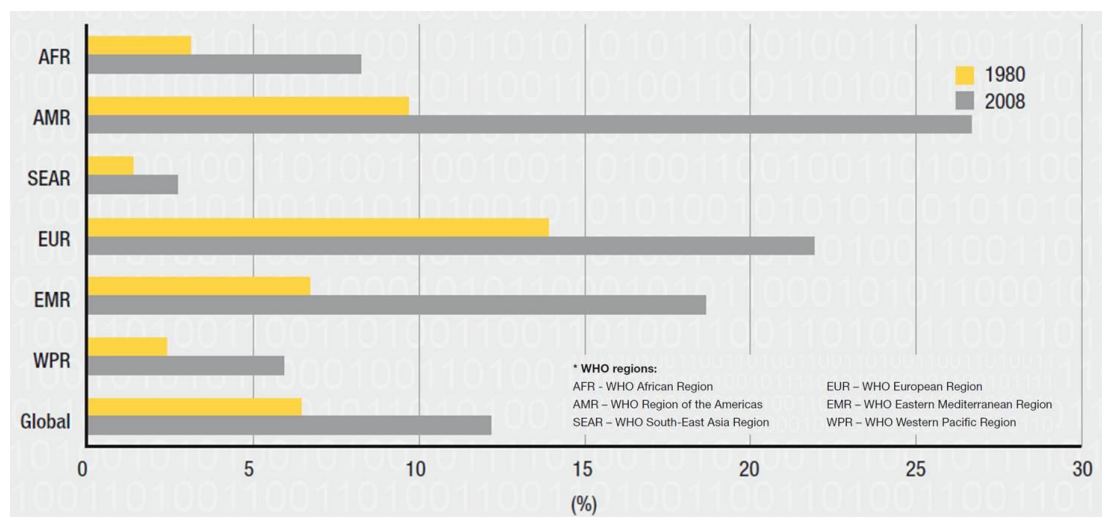
表 1-1 文獻回顧之電化學表現.....	7
表 1-2 各式酵素固定法之比較[35].....	29
表 1-3 文獻回顧各式固定化酵素方法、使用材料與電化學線性表現.....	30
表 2-1 實驗藥品.....	53
表 2-2 實驗儀器.....	55

第一章 緒論




1.1 前言

世界衛生組織(World Health Organization, 簡稱 WHO)在 2012 年, 年度數據報告中顯示, 從 1980 年到 2008 年, 全世界患有過胖疾病的人數倍增(如下圖 1.1), 在 1980 年僅有 5 % 男性與 8 % 女性患有肥胖疾病, 然而在 2008 年肥胖人口的比例已經升至 10 % 男性與 14 % 女性。在報告書中警告若為過重甚至肥胖的人, 會增加其罹患心血管疾病、中風、糖尿病以及某些常見癌症疾病。根據國際糖尿病聯盟(International Diabetes Federation)的報告指出, 全球高達 6 % 的人患有糖尿病, 而且糖尿病患人數在世界各地快速的增加。我國前台灣糖尿病協會理事長林宏達醫師也在台灣糖尿病協會中說明, 糖尿病是二十一世紀罹患率上升最快的慢性疾病, 全球約有一億五千萬病患。估計到西元 2025 年, 全世界糖尿病患者將再增加一倍以上, 超過三億人口。



圖片來源：<http://www.who.int/en/>

圖 1-1 在 1980 年與 2008 年, 世界衛生組織的會員國中, 超過二十歲之成年人過胖百分比(過胖定義: 身體質量指數(BMI) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$)



現今社會，民眾生活習慣轉向吃較高熱量且精緻的食物，運動量減少，肥胖人口越來越多的趨勢下，糖尿病患者也會越來越多。對於眾多糖尿病患者、以及過胖的糖尿病高危險群，開發各種裝置幫助監控生理狀態、自我健康管理，使這些糖尿病患者與高危險群能經常性、立即性地檢測追蹤自己的血糖，達到改善身體健康狀況、改善生活品質。可居家式、攜帶式用的血糖儀因而誕生。然而血糖儀中最重要的部分，便是用來感測血糖濃度的血糖儀試片，試片屬於拋棄型耗材，是血糖測量中，耗資較高的部分。

由於世界各地的糖尿病患者越來越多，在經濟發展較落後的國家，因而無法負荷血糖儀與試片耗材的開銷，因此如何改善試片的製作成本，使其可流通到世界各地，改善大家的生活品質，並且改善其感測的表現，使其測量精準度得以提升，便是一個值得研究的議題。

本篇論文將會以葡萄糖感測器為主，以此為例探討噴墨製程的應用性，並利用噴墨製程的特性，藉由改變噴墨參數，達到生物感測器靈敏度的提升。接下來將會論及生物感測器的定義以及各式塗佈方式，介紹本研究主要材料：葡萄糖、葡萄糖氧化酶、過氧化氫以及普魯士藍，並說明本研究使用的電化學方法原理。接著詳述本研究實驗步驟後，進行研究結果的討論與分析，總結後，期許這篇論文能對未來研究相關領域的人有所助益。



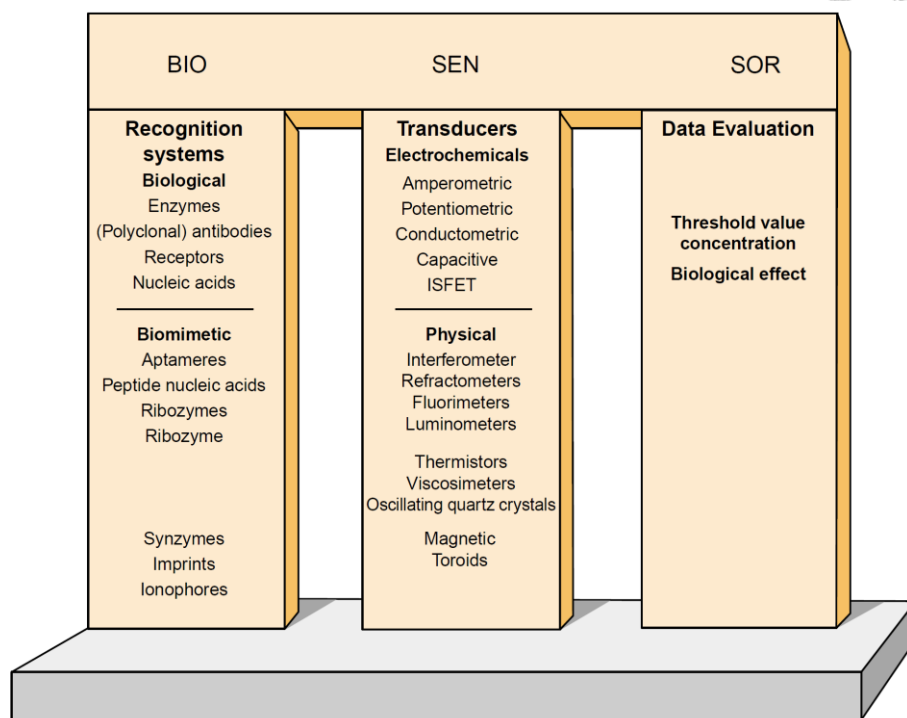
1.2 生物感測器簡介

在介紹生物感測器之前，我們要先定義何謂生物感測器，目前生物感測器定義尚未統一，可略分為以下三種：(1)感測器用於生物體上，(2)使用生物材料製成的感測器，以及(3)融合上述兩種定義之感測器。「生物感測器」一詞在不同的應用領域上，通常有著不同的定義，目前最常見的兩種定義，由 S.P.J. Higson 與 D.M. Frazer 所提出[1]，S.P.J. Higson 認為生物感測器是一種化學感應裝置，此裝置中有換能器(Transducer)，以及可辨識生物性物質的材料(Biologically derived recognition entity)，藉由此一裝置對於複雜的生物反應參數進行定量研究；另一定義由 D.M. Frazer 所提出，生物感測器是一個分析的儀器，將化學單元(用來辨識物質)與物理單元(將辨識出的訊息轉換為訊號)謹慎且緊密的結合。然而在 1999 年國際純粹與應用化學聯合會(International Union of Pure and Applied Chemistry, 縮寫為 IUPAC)，定義生物感測器(Biosensors)為[2, 3]：

A biosensor is a self-contained integrated device which is capable of providing specific quantitative or semi-quantitative analytical information using a biological recognition element (biochemical receptor) which is in direct spatial contact with a transducer element.

此一定義也說明了生物感測器包含了辨識元件與訊號轉換元件。

下一頁的圖 1-2 為文獻對 BIOSENSOR 一字拆解之後，所定義的生物感測器各部分組成：



Current Opinion in Biotechnology

圖 1-2 生物感測器組成[3]

生物感測器常用於醫療系統中，或個人自行健康檢驗等。在生物感測器的研究中，我們會探討靈敏度(Sensitivity)、偵測待測物質濃度的線性範圍(Linear range)、最小偵測極限(Limit of detection)、再現性(Repeatability)、選擇性(Selectivity)等特性。到目前為止也有許多研究針對不同的感測器特性進行研究，藉由材料的選取、製程的設計，期望能提升訊號各項特性，使得其感測器的偵測更為精準，也更能廣泛應用。以下為生物感測器其感測原理示意圖：

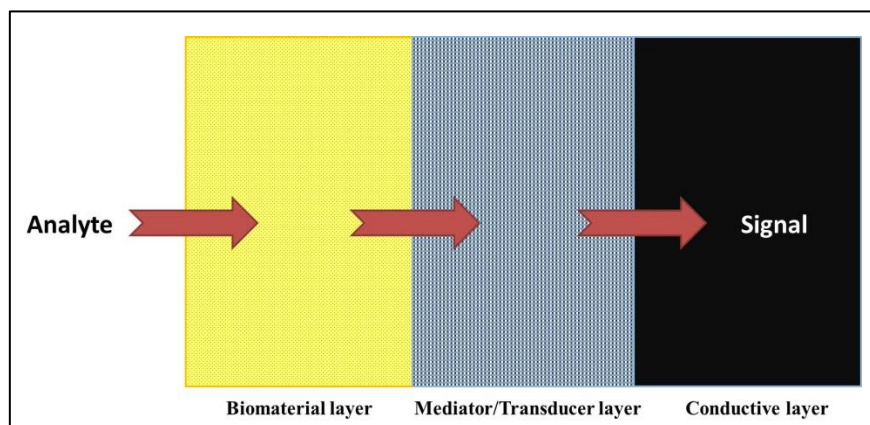


圖 1-3 生物感測器感測原理示意圖

選定特殊生物材料(Biomaterial)，應用其特異性與選擇性，使待測物與生物材料反應後，生成另一種新物質，作為接下來電訊號傳導使用，在生物材料層(Biomaterial layer)上，發生的是一般可自發性反應的化學／生物化學反應。接著所產生的新物質將會經由外加電壓的驅動，與中介層／換能層(Mediator/Transducer layer)產生電化學反應，藉此將化學能轉換為電能。最後，電能傳遞到導電層(Conductive layer)，流入電路，經訊號感測器偵測電流訊號。憑藉著圖 1-2 與圖 1-3 所提出的架構，選用適合的材料製作生物材料層與換能層，嘗試各種應用，因此生物感測器的應用範圍十分廣泛，將文獻所提出的應用性列於圖 1-4：

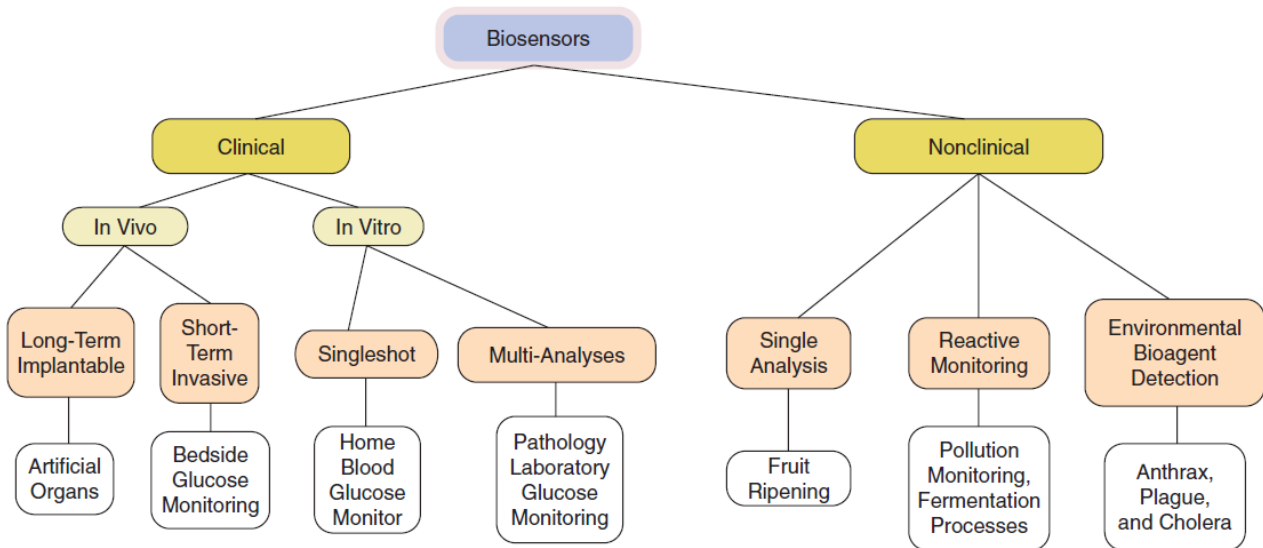
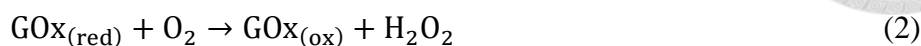
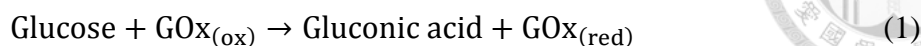


圖 1-4 生物感測器應用性[1]

本研究使用的生物材料為葡萄糖氧化酶，作為生物材料層(在此稱之為酵素層)，葡萄糖氧化酶會與偵測到的葡萄糖反應，生成新物質—過氧化氫。藉由普魯士藍，作為中介層，因外加電場驅動產生電化學反應，感測過氧化氫。最後，電化學反應轉換為電流訊號，經由碳膠層(即上述的導電層)傳遞，憑藉著這一系列的反應傳遞訊號，預期利用噴墨製程進一步製成葡萄糖感測器，用於感測人體血糖濃度。以下為本研究所採用的葡萄糖感測器反應機制[1, 4-7]。



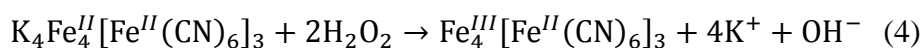
下列 Eq. (1)與 Eq. (2)表示葡萄糖與葡萄糖氧化酶反應時，生成葡萄糖酸，當酵素反應後，欲回原本的狀態，則需要耗氧氣：



合併上述兩化學反應方程式後，可得 Eq. (3)：

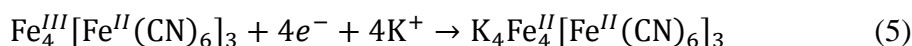


經由酵素反應後，生成的過氧化氫，會進一步與中介層普魯士藍層進行電化學反應，如 Eq. (4)及 Eq. (5)所示[6]：



Prussian White

Prussian Blue



Prussian Blue

Prussian White

上述反應，經過生物化學催化反應、氧化還原反應後，產生電流，經由電路感測而得訊號，利用此一化學系列反應，製作出葡萄糖感測器電極。

下一頁列出表 1-1，表中為回顧過去文獻中，與本實驗使用材料相仿的研究結果統整，特別列出該感測器靈敏度(Sensitivity)、其訊號線性範圍(Linear range)以及該電極的修飾方式(Electrode modifier)。

表 1-1 文獻回顧之電化學表現

Sensitivity (mA/cm ² /M)	Diameter of sensors (mm)	Working pH value	Linear range (mM)	Base electrode	Electrode modifier	Reference
180	1.5	6.0	1 – 10 ³	Glassy carbon disk electrodes	GCE/PB/Nafion- GOD	Arkady A. Kayakin, et al. Anal. Chem.(1995)[8]
130	—	7.4	0 – 3.8×10 ³	Modified-carbon base electrodes	—	S.A Jaffari, J.C Pickup. Biosensors and Bioelectronics(1996)[9]
111.6	3.0	6.98	0.05 – 0.3	Glassy carbon electrode	GCE/BCNTs/ GOD	Chunyan Deng, et al. Biosensors and Bioelectronics(2008)[10]
80	N/A	6.5	0.01 – 1.00	Platinum electrodes	Pt/PB/GA-GOD	Yu Liu, et al. Electrochimica Acta(2009)[11]
69.3	3.0	7.0	10 ⁻³ – 1.6	Glassy carbon electrodes	GCE/PB/AuNPs- CS-GOD	Min-Hua Xue, et al. electrochemistry communications(2006)[12]
63	3.0	7.4	2.0 – 100	Screen-printed electrodes	SPEs/PB/GA- Nafion-GOD	F. Ricci, et al. Biosensors and Bioelectronics(2003a)[13]
50	1.5	6.0	0.1 – 100	Glassy carbon disk electrodes	GCE/PB/ GOx-Nafion	Arkady A. Kayakin, et al. Anal. Chem.(2002)[14]
20.5	—	—	0.59-1.44	ITO-coated PET film	ITO-coated PET/PEDOT-PSS/ GOD/HRP	Yeon Hee Yun, et al. Analytical Science(2011)[15]



1.3 塗佈技術介紹

如何製作章節 1.2 所介紹的生物感測器電極呢？有文獻指出使用電聚合沉積 (Electropolymerization)[16-18]、電沉積(Electrodeposition)[17, 19-21]等製作方式，使中介層材料沉積在金屬導電層上，此一方法可控制厚度、且可均勻沉積在金屬表面上；然而配合材料特性不同，在不同層會使用不同的製作方式，如浸製塗佈 (Dip-coating)的方式[18]，將電極浸沒入欲沉積的材料中，藉由吸附的方法使物質附著在電極表面上。

文獻上，有許多不同的製作方式，如上述電沉積、浸製塗佈等；也有利用材料特性，使用自組裝(Self-assembled method)的方法修飾表面。在 2010 年，文獻研究中提到更多目前研究使用的製作方式[22]，如噴墨印刷(Inkjet printing)、網版印刷(Screen-printing)、微觸印刷(Microcontact)、凹版印刷(Gravure printing), and 膠版輪轉式印刷(Flexographic printings)以及微影製程(Lithography)等。

本研究主要以印刷技術為主，因此接下來我們著重印刷技術，逐一介紹。印刷技術可區分為兩種，直接印刷方法(Direct writing)、間接印刷方法(Indirect writing)，其中的噴墨技術、網印技術、點膠塗佈技術、針筆繪製技術(Pen-writing)、旋轉塗佈技術(Spin coating)等，屬於直接印刷方法；然而，熱轉印等則屬於間接印刷方法。在本論文中，所使用的塗佈技術皆為直接印刷方法。以下做各項介紹。



1.3.1 噴墨技術

噴墨技術是一種可廣泛應用的直接印刷技術，目前二維噴塗方式已發展完整，然而三維噴塗方式目前也正蓬勃發展[23]。本技術最主要的特色是能將定量的墨水經由噴嘴噴出，並且使液滴落在我們想要的位置上，因此噴墨技術屬於較節省材料的沉積技術，適用於液相材料、或者可溶於溶劑、可分散於分散媒的物質。噴墨技術利用各種驅動力與機制，使墨水從噴嘴中噴出，如下一頁圖 1-5 所示[22]。圖 1-5(a)中，為加熱式噴墨技術，利用噴頭中裝設的電阻元件，在電阻加熱過程中，達到特定溫度(Threshold temperature)，形成蒸氣氣泡，當氣泡變大的過程中，噴嘴內壓力增大，使噴嘴內墨水噴射出，同一時間泡泡瓦解，墨水便補充入噴嘴；圖 1-5(b)則為壓電式噴墨技術，為本研究所使用的噴墨方法，會在下一段詳細介紹其機制，加熱式與壓電式噴墨技術為兩種常見的噴墨技術機制，然而圖中也介紹了多種噴墨技術，如圖 1-5(c)，利用電場誘導，使墨水噴出，藉由外加兩帶電板，控制噴墨方向；可見圖 1-5(d)，藉由高頻率的變頻器連接聲學透鏡，變頻器發射聲波，經由透鏡可將聲波能量聚焦，在透鏡正上方產生一壓力波克服液體表面張力，該液體因而脫離形成液滴。

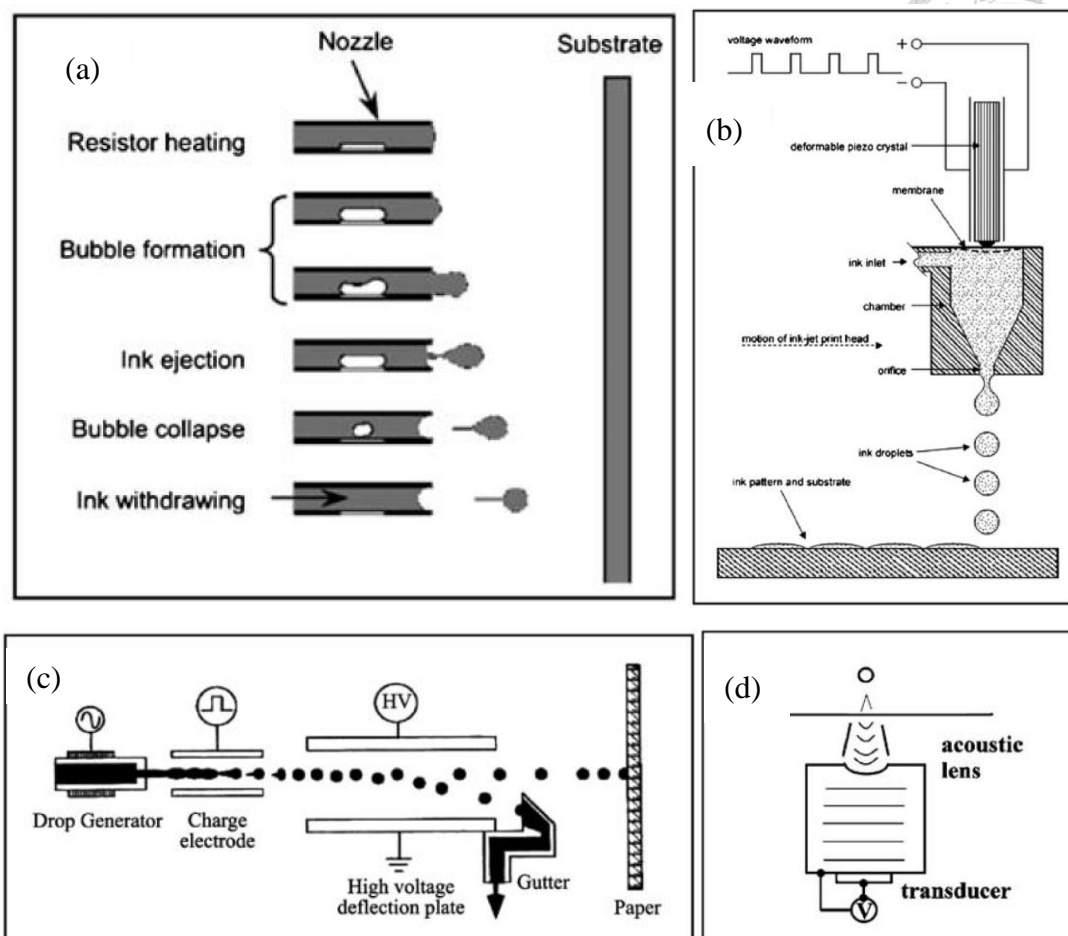


圖 1-5 各式噴墨技術噴射機制原理[22]：(a) 加熱式噴墨技術；(b) 壓電式噴墨技術；(c) 靜電式噴墨技術；(d) 聲波式噴墨技術

本研究所使用的噴墨技術機制如同圖 1-5(b)，為壓電式噴墨技術，藉由外加電壓使充滿墨水的腔體快速地收縮，此一收縮便能隨著適當的外加電壓波形，形成穩定液滴，此液滴降落到基材之前，受重力與空氣阻力的影響，接著撞擊至基材表面、散開至基材表面上[24]，此時與墨水的表面張力、接觸角、黏度有關，經由噴墨技術準確的噴塗圖樣在特定位置後，最後乾燥成形的圖樣，與墨水的乾燥行為非常有關，在本研究中期望噴墨出的圖樣，能與乾燥後的圖樣一致，因此希望能降低墨水乾燥過程中圖樣的移動。本研究使用 MicroFab JetLab4 系統，放入自行配置的墨水，藉由系統中的電腦軟體控制噴塗圖樣。儀器如下一頁圖 1-6 所示：



圖片來源：<http://www.microfab.com/>

圖 1-6 商業化桌上型噴墨印刷機台：MicroFab Jetlab 4

前一段落有提到，墨水的特性與噴墨所成形的圖樣有非常重要的關係，有文獻研究指出了墨水特性與基材乾燥後的點形狀大小之間關係，如下方公式所示：

$$\frac{b_o}{D} = \left(\frac{4\sin^3\theta}{(1-\cos\theta)^2(2+\cos\theta)} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (6)$$

這裡的 b_o 表示液滴在基材上形成的橫截面直徑， D 表示從噴嘴形成的液滴直徑， θ 表示液滴與基材的接觸角[25]。屆時在進行噴塗時，將會以此文獻所提出的公式，預設噴塗的形狀、線寬等性質。

本研究在噴塗酵素層時，使用噴墨技術，稍後在第三、四章會討論噴塗的形狀。其噴塗液滴與噴塗出直線線寬的限制，以 Eq. (6) 預估，葡萄糖氧化酶墨水對普魯士藍層的接觸角度小於 10° ，噴塗出的液滴在飛行時候的液滴直徑約 $50 \mu\text{m}$ ，將參數帶入 Eq. (6)，可得到一預測的 b_o 值，基材上形成的截面直徑約為 $150 \mu\text{m}$ ，因此本研究液滴可形成的圖樣最小直徑寬度約為 $150 \mu\text{m}$ 。



1.3.2 網印技術

網印技術是一項已經發展許久的印刷科技，這項技術可追溯至約西元一千年的中國，傳入了英國、美國，經過了多年的發展，成了我們現在耳熟能詳的網印技術。自西元 1990 年代起，網印技術便開始應用在微電路工業，此技術所擁有的優點：可大規模生產、成本較低，可製造再現性(Reproducible)高、品質可靠的拋棄型感測器[7]。文獻中有提到全網印技術製成的生物感測器，如圖 1-7，分別可製作出雙電極系統與三電極系統[26]；也有依據材料特性，各層使用不同印刷技術的生物感測器，如圖 1-8[27]。本研究中各層的印刷方式亦不相同，根據實驗嘗試後，選擇較適合該材料的製程進行層層塗佈。

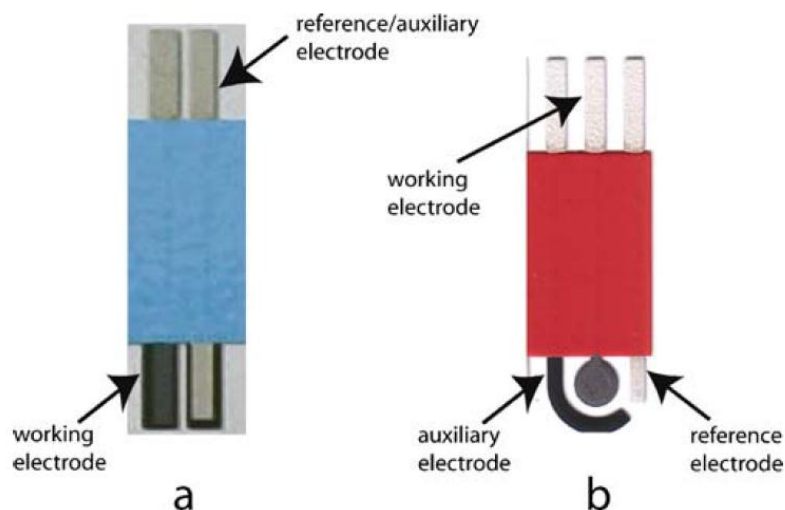


圖 1-7 利用網印技術製成之電極外觀：(a) 雙電極系統；(b) 三電極系統[26]

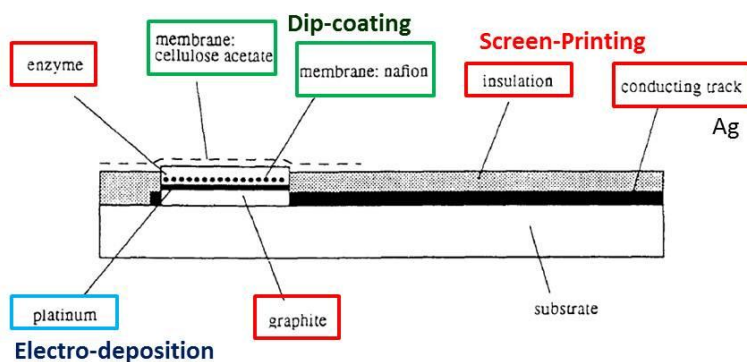


圖 1-8 利用網印技術製作乳酸感測器之外觀示意圖[27]

本研究中，基層導電層使用碳膠進行網印。下方圖 1-9 為本研究所使用的網印機與其細部照片，使用 150 目絹版製作所需圖樣的網版後，進行網印。

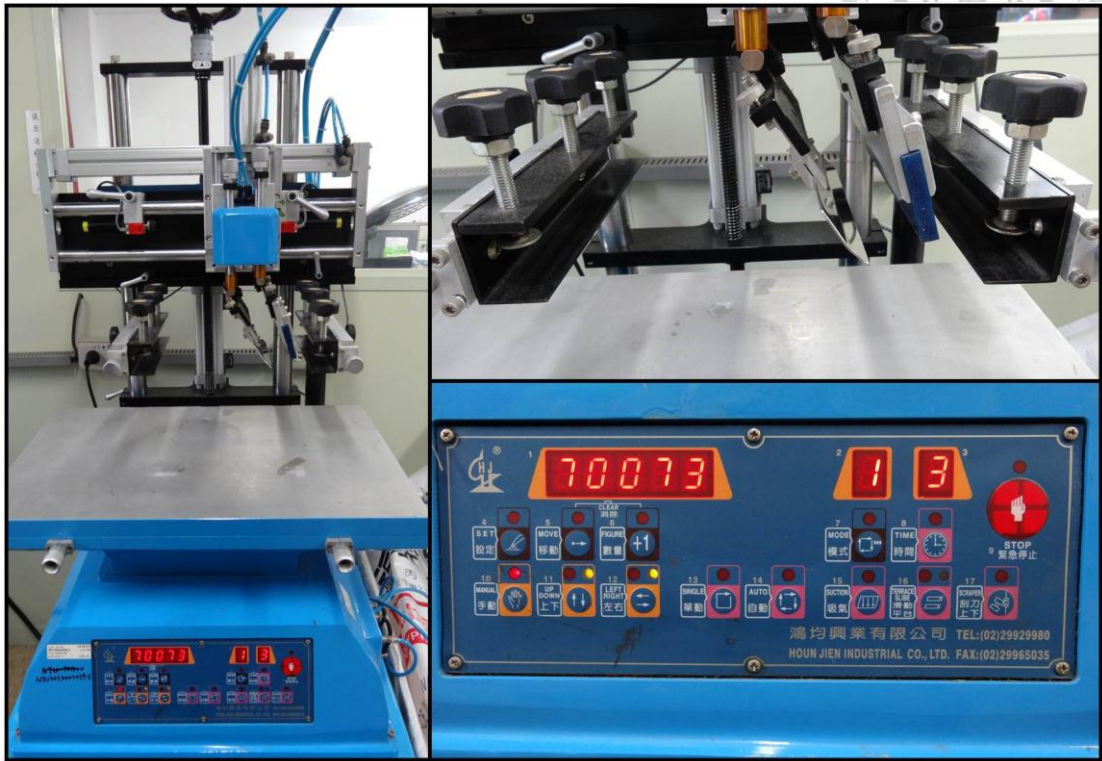


圖 1-9 網印機



1.3.3 針筆繪製技術

早期針筆是用來畫工程圖使用，現今則逐漸演變成漫畫專業工具，針筆的筆頭規格有很多種，目前施德樓網路上所販售的規格中，最細可到 0.1 mm、最粗可到 1.2 mm，如圖 1-10 所見。針筆是種管狀的鋼筆，其出水原理是利用管內的細鋼針上下滑動，帶動墨水沿著管與針的間隙均勻的流出。使用針筆可使出墨墨線均勻，適合製圖、線條描繪，及精細點描繪。



圖片來源：<http://www.lafa.net.tw/html/about-staedtler.html>

圖 1-10 各式規格的針筆

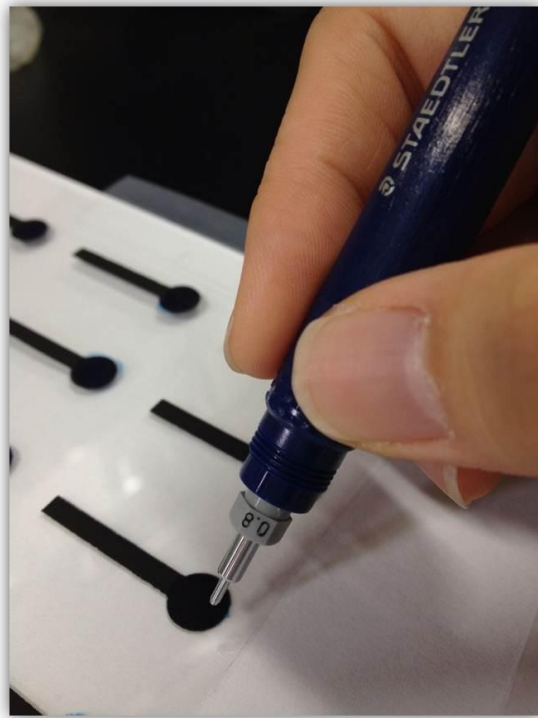


圖 1-11 針筆繪製過程



1.3.4 點膠塗佈技術

膠流量的控制是點膠設備的重點之一，如下圖 1-12 為多種點膠機的噴嘴示意圖。本研究所使用的系統，為圖 1-12(a)基本 Time pressure system[28]，利用針筒接上針頭，搭配點膠機的活塞，外接壓力鋼瓶，提供穩定一致的壓力，在設定的出墨時間中，提供固定時間的壓力，將物質壓入針筒中，物質便由針頭擠出。可以利用控制器，連續性、循環性或一次性的提供大氣壓力脈衝訊號，將墨水塗佈沉積在基材上。

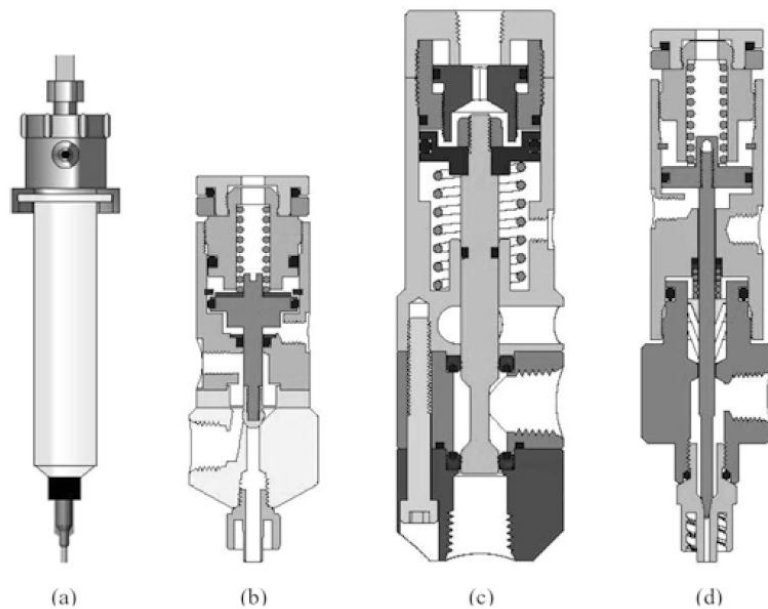


圖 1-12 各式點膠系統：(a) 基本時間壓力控制式[Techom Systems Inc.]；(b) 隔膜閥控制式[EFD]；(c) 短管閥控制式[EFD]；(d) 針閥控制式[EFD][28]

此一噴塗技術，若使用不同的點膠機設計則有不同的優點與其限制，有些具有微米等級的精準度，但因此得犧牲噴塗速率與應用性；另一種設計則是具有噴塗快速且應用性高的特性，但相反地犧牲了精準度[28]。本研究所使用的點膠機設計，是利用壓力驅動，為氣壓式點膠機，屬於後者，快速且應用性極高的設計。如圖 1-13 所示。

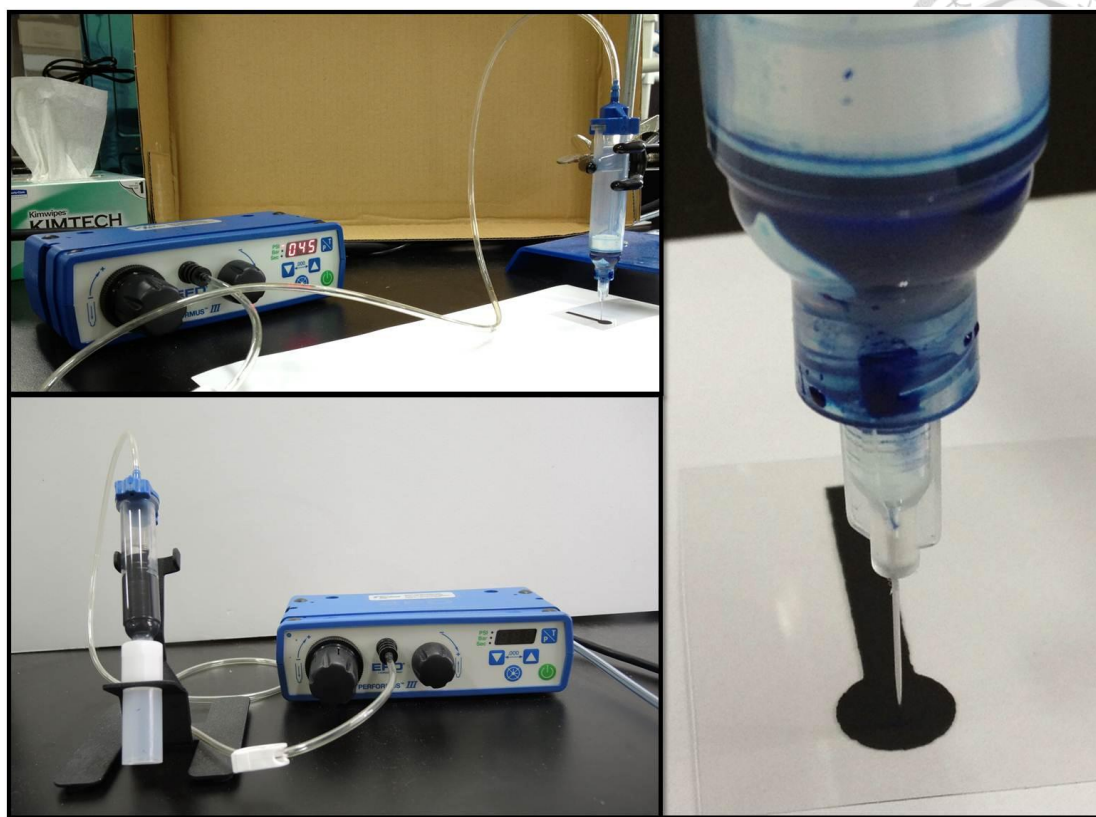


圖 1-13 點膠設備



1.4 葡萄糖簡介

醣類(Saccharides)是由碳、氫、氧三種元素所組成，由於早期醣類的化學式寫為 $C_m(H_2O)_n$ ，加濃硫酸脫水(Dehydrate)即成焦炭，故稱為碳水化合物(Carbohydrate)。依其能否水解以及水解的產物數目分為單醣、雙醣、多醣三大類。其中常見的單醣有葡萄糖(Glucose)、果糖(Fructose)、半乳糖(Galactose)，存在於血液中的為葡萄糖，因此葡萄糖又稱血糖，分子量 180.16，其特性可溶於水、有甜味，一般來說，葡萄糖有直鏈狀與環狀兩種結構：1%直鏈、99%環狀結構。如圖 1-14 中為葡萄糖鏈狀及環狀結構，圖 1-15 則為葡萄糖鏈狀轉化為環狀的反應式示意圖。因其官能基結構，本身可氧化，做還原醣，經氧化生成 D-葡萄糖酸，還原則生成 D-花楸醇(D-sorbitol)。葡萄糖在生物界中佔有極重要的地位，是細胞能量來源、新陳代謝中間產物。

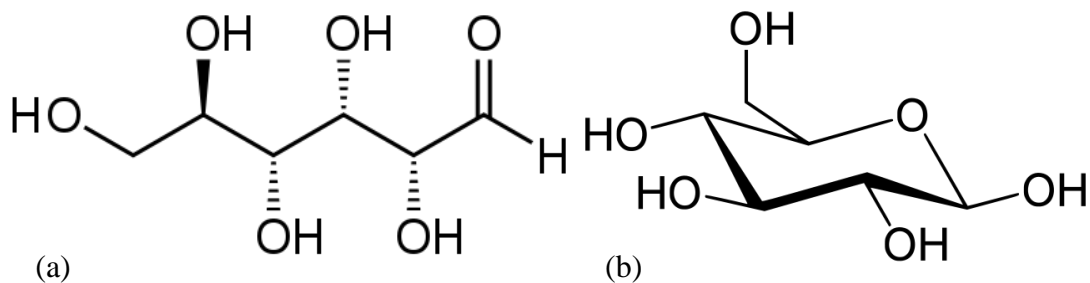


圖 1-14 葡萄糖結構：(a) 鏈狀結構；(b) 環狀結構

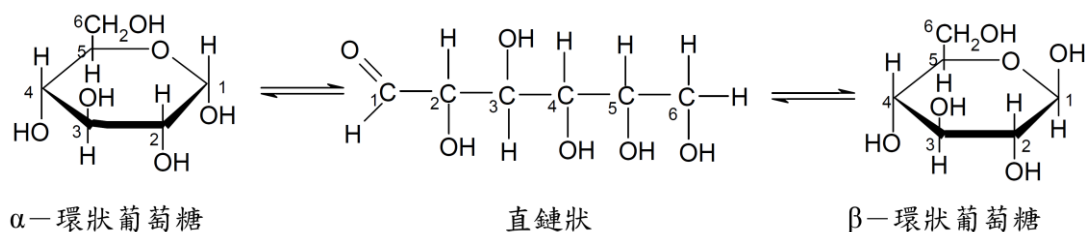
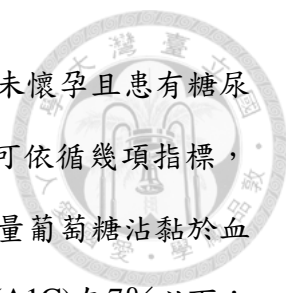


圖 1-15 葡萄糖鏈狀與環狀結構轉換反應式



美國糖尿病協會(American Diabetes Association, ADA)建議未懷孕且患有糖尿病的成年人，若是想自行居家健康檢查，控制糖尿病的病況，可依循幾項指標，確認自己的身體健康：A1C 是糖化血色素(HbA1c)的縮寫，指評量葡萄糖沾黏於血色素的程度。美國糖尿病學會建議糖尿病患應控制糖化血紅蛋白(A1C)在7%以下；然而餐前血糖應控制在 70-130 mg/mL，即 3.9 mM-7.2 mM；餐後血糖則需低於 180 mg/mL(即 10 mM)[29]。



1.5 葡萄糖氧化酶概述

1.5.1 葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase)簡介

為了能夠準確地偵測到血液中的葡萄糖含量，我們使用葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase, GOx)，利用葡萄糖氧化酶在有氧條件下，對於 β -D-葡萄糖能有專一性的催化，生成葡萄糖酸與過氧化氫。下圖為葡萄糖氧化酶催化反應圖[30]。

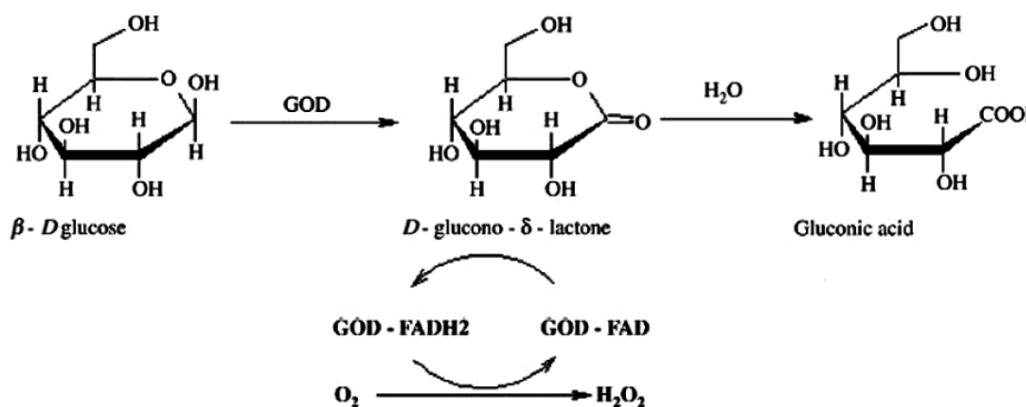


圖 1-16 葡萄糖氧化酶催化反應機制示意圖[30]

葡萄糖氧化酶屬於一種需氧脫氫酶，對人體無毒、無副作用，高純度的葡萄糖氧化酶為淡黃色晶體，易溶於水，完全不溶於乙醚、氯仿、丁醇、甘油、乙二醇等有機溶劑，每一批次產生的葡萄糖氧化酶活性不一，相對分子質量一般約在 1.5×10^5 ，葡萄糖氧化酶為同型二聚體分子，每分子酶含有兩分子FAD。葡萄糖氧化酶為蛋白質的一種，有其限制的pH值環境與溫度，其pH值適當的作用範圍為3.5至6.5，最適合的酸鹼值環境約pH 5.0，在沒有保護劑的存在下，在過鹼(pH>8.0)、過酸(pH<3.0)時，會立即失去活性[30]；然而其適合的溫度範圍一般約為30至60 $^{\circ}\text{C}$ ，有文獻指出，來自黑曲霉(*Aspergillus niger*)的葡萄糖氧化酶，其熱轉變溫度(Apparent Transition Temperature)為 $55.8 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，且此一失去活性的轉變為不可逆反

應[31]。

利用葡萄糖氧化酶對於葡萄糖專一性(Selectivity)，僅與 D-葡萄糖反應，將 D-葡萄糖氧化成葡萄糖酸，然而葡萄糖氧化酶對於 L-葡萄糖與 2-O-甲基-D-葡萄糖則完全無活性表現。

從 Eq. (3)中可知，葡萄糖氧化酶反應過程中需要另一反應物氧氣的配合，才能進行催化反應，因此需要了解水溶液中的溶氧量，是否會限制本反應的進行程度。在 20 °C、1 大氣壓下，氧氣的溶氧量約是 9 ppm，換算為本系統環境，20 mL 水溶液中，含有約 5.6×10^{-6} 莫耳，然而與本反應耗氧量相比，經計算本反應耗氧莫耳量最高僅可達 5.18×10^{-8} 莫耳，比水中含氧量低了許多，僅消耗水中含氧量的百分之一，因此氧氣可視為過量反應物，其氧氣的濃度視為定值，不影響反應進行程度。





1.5.2 酵素動力學

介紹完本研究中使用的酵素後，接著要介紹酵素在與反應物產生催化反應時，其酵素動力學(Enzyme kinetics)為何。在接下來公式的呈現上，我們以 E 代表酵素(Enzyme)，也就是葡萄糖氧化酶的角色；以 S 代表待測物質(Substrate)葡萄糖；ES 表示酵素與待測物質形成的錯合物(Enzyme-substrate complex)，即葡萄糖氧化酶與葡萄糖的錯合物；P 表示產物(Product)，在這裡為過氧化氫。

本研究中的系統為兩個反應的串連反應，如 Eq. (7)。



此兩串連反應，各設定其正逆反應速率常數為 k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2} ，然而為了簡化整個系統的反應，做了下列幾個假設：

A. 系統中總酵素濃度為未接合的酵素以及酵素與待測物質形成的錯合物之濃度總和，而待測物濃度遠大於總酵素的濃度，因此我們用 Eq. (8) 表示；

$$[S] \gg [E_t] = [E] + [ES] \quad (8)$$

B. 假設串聯反應中的第一條反應式，待測物與酵素反應極快，其正逆平衡常數 k_1, k_{-1} 數值較大，第二條反應式為酵素與待測物質形成的錯合物要反應分解為酵素與產物，對於逆反應而言，因酵素具有極高的選擇性，僅與待測物質產生反應，不與產物發生逆反應， k_{-2} 數值極小，因此其反應速率常數的數值大小可用 Eq. (9) 表示，

$$k_1, k_{-1}, k_2 \gg k_{-2} \quad (9)$$

整個系統因而忽略第二條反應式的逆反應，變為：





C. 串聯反應中，不論是 Quasi-steady-state Approximation 或 Rapid Equilibrium Assumption，反應速率的表示式可如 Eq. (11)所示：

$$R = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (11)$$

D. 假設酵素與待測物質形成的錯合物，一旦經由第一條反應式反應生成後，便立即進行第二步反應，因此經第一條反應生成的錯合物，會立即分解成酵素與產物，在反應過程中，錯合物濃度沒有累積，其濃度變化量為零，意即此錯合物達(Steady state)狀態：

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (12)$$

做好前面幾項假設後，便可以開始計算酵素動力式，了解系統中各物質的關係對反應速率的影響，首先將 Eq. (12)利用各物種濃度與反應速率常數表示出來，如 Eq. (13)：

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (13)$$

接著，將移項過的總酵素濃度公式 Eq. (14)帶入 Eq. (13)中，經由整理後可得 Eq. (15)：

$$[E] = [E_t] - [ES] \quad (14)$$

$$[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \quad (15)$$

將 Eq. (15)帶入 Eq. (11)，即可得到速率定律式，如 Eq. (16)：

$$\begin{aligned} R &= k_2 \frac{k_1[E_t][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \\ &= \frac{k_2[E_t][S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \end{aligned} \quad (16)$$

經由整理後，定義兩項參數 R_{max} 與 K_M ，如 Eq. (17)與 Eq. (18)， K_M 為 Michaelis Constant：

$$R_{max} = k_2[E_t][S] \quad (17)$$



$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (18)$$

將兩參數帶回 Eq. (16) 可得 Eq. (19)，即為 Michaelis-Menten Equation：

$$R = \frac{R_{max}[S]}{[S] + K_M} \quad (19)$$

等號兩邊同時取倒數後可得 Eq. (20)，使其呈線性關係，為 Double Reciprocal Plot，稱為 Lineweaver-Burke Plot：

$$\frac{1}{R} = \frac{1}{R_{max}} + \frac{K_M}{R_{max}[S]} \quad (20)$$

其中， K_M 表示待測物質與酵素的接合度(Affinity)， K_M 值越小，表示待測物與酵素間的接合度越高； R_{max} 表示的其接合速率快慢， R_{max} 值越大，表示待測物與酵素的接合速率快。因此 K_M 值越小、 R_{max} 值越大，代表此系統待測物與酵素接合反應的表現越佳。

當我們偵測系統所產生的電流訊號時，則將電流訊號類比為反應速率，反應所消耗的待測物濃度低，視系統待測物濃度(Bulk concentration)為一定值 C ，因此將 Michaelis-Menten Equation 修改為 Eq. (21) 與 Eq. (22)：

$$I = \frac{I_{max} \times C}{C + K_M'} \quad (21)$$

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_M'}{I_{max} \times C} \quad (22)$$

藉此反推，估算系統的 K_M 值與 R_{max} 值，與文獻相比較。



1.5.3 固定化酵素

酵素為一種生物性催化劑，有效降低化學反應的活化能，促使反應的發生，因酵素十分昂貴，因此酵素的重複使用更為重要。固定酵素在特定空間中，限制其移動，稱為固定化酵素，固定化酵素提供許多優點：可重複使用酵素，在反應程序免除回收酵素、純化酵素的步驟；可提供酵素較佳的環境，提升其酵素活性。本研究非連續性的反應，無須回收酵素的步驟，但由於固定化酵素可藉由提供較佳環境、提升酵素活性，因此在製作生物感測器時，也要重視酵素固定化的步驟，以達到有效的感測。目前研究已經有使用多種酵素固定化的方法[32]，將酵素固定在電極上的方法如：吸附法(Adsorption)、交聯法(Crosslinking)、電化學共聚法(Electrochemical copolymerization)、共價鍵結法(Covalent attachment)以及使用高分子膠(Polymeric gels)或碳膠(Carbon paste)的包陷法等。然而歸納整理上述多種酵素固定化，也有不同的分類方式，這邊提兩個常見的分類方式，如圖 1-17[16, 33]及圖 1-18[34]。圖 1-17 中將酵素固定化方法分為物理(Physical)方法與化學(Chemical)方法，而圖 1-18 則是分為包埋法(Entrapment)與表面固定法(Surface immobilization)，我們利用第一種分類方式，來介紹常見的酵素固定化方法。

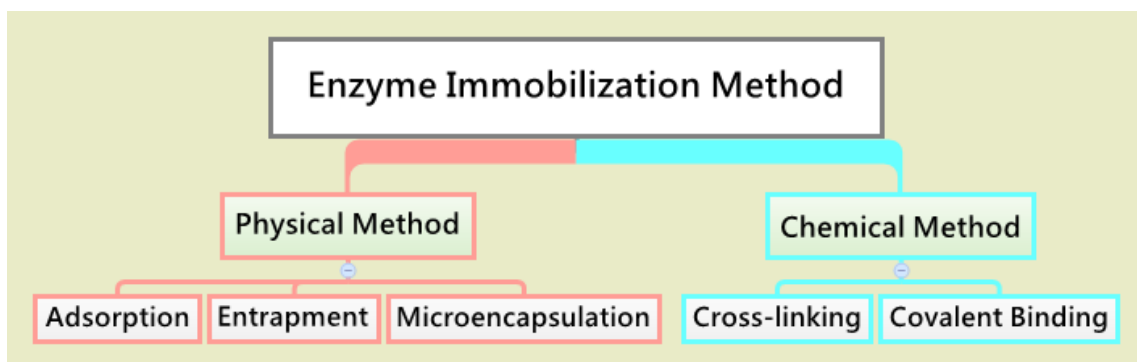


圖 1-17 酵素固定化方法

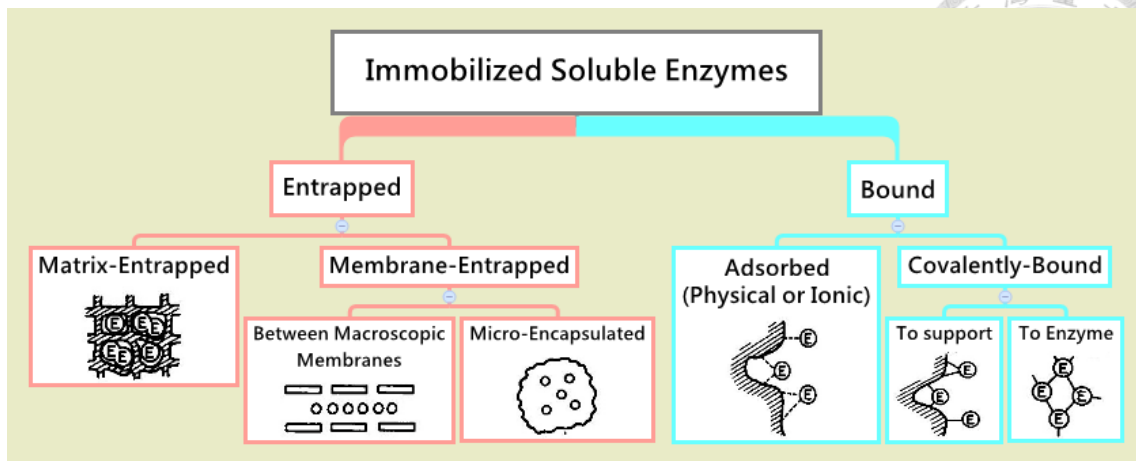


圖 1-18 酵素固定化方法[34]

首先，介紹圖 1-17 中的其中一項分類—物理方法，物理方法分為：物理吸附法(Adsorption)、包陷法(Entrapment)、微膠囊包覆法(Microencapsulation)。物理方法多能維持酵素的活性，但利用物理方法所固定之酵素，因其作用力弱，較化學方法易脫落。其中，物理吸附法可再分為一般物理吸附法與靜電力吸附法，如圖 1-19 所示。兩種方法利用酵素與基材間的作用力，使基材能吸附酵素，固定其位置。一般物理吸附法利用酵素與基材間的凡得瓦力、疏水性作用、氫鍵、偶極性作用力等產生吸附作用而固定，但其作用力較弱。靜電力吸附法，又可稱離子鍵結吸附法，是利用酵素與基材因帶電性不同，產生靜電吸引力固定酵素，如下圖：

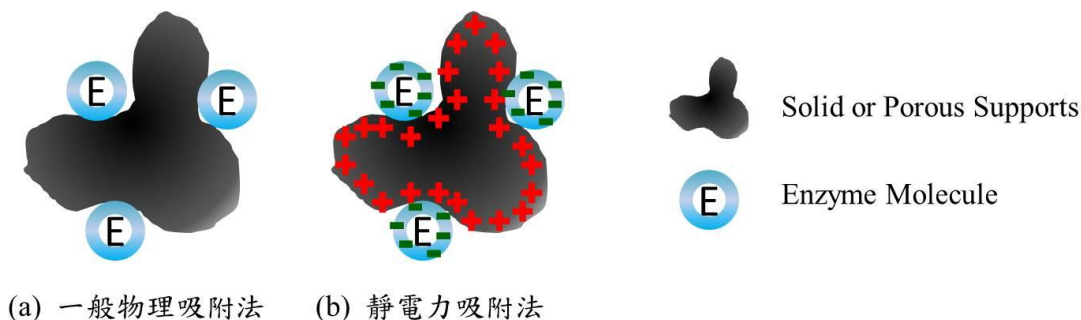


圖 1-19 酵素固定化方法：物理吸附法

包陷法則是藉由膠狀或纖維狀高分子基材，將酵素包陷於基材中，如圖 1-20 所示：

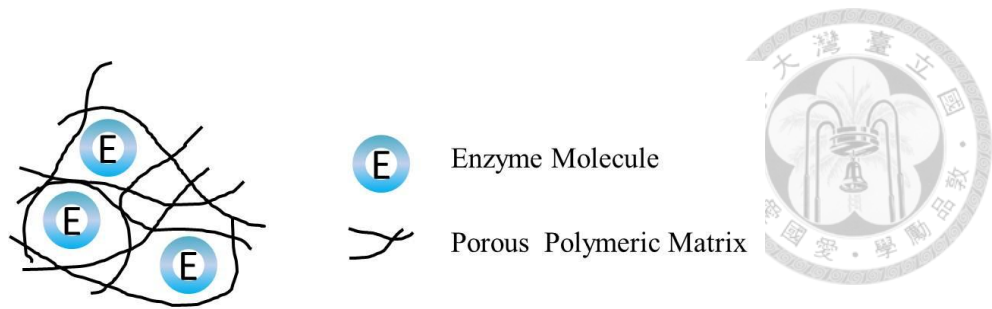


圖 1-20 酵素固定化方法：包陷法

微膠囊包覆法則是利用高分子或界面活性劑形成半透膜微膠囊，利用此種基材將酵素包覆在內之固定方法，可分為相分離法、界面聚合法等。如圖 1-21：

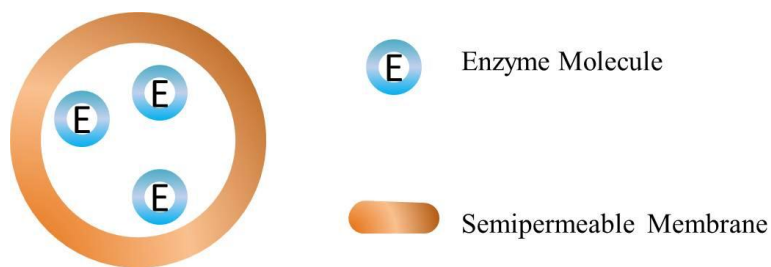


圖 1-21 酵素固定化方法：微膠囊包覆法

接下來，介紹圖 1-17 中的另一項分類—化學方法，化學方法分為：共價結合法(Covalent binding)、交聯法(Cross-linking)。化學方法利用強作用力(共價鍵結)固定酵素，使用此方法所固定的酵素不易脫落，但因為生成共價鍵涉及化學反應，需與酵素上的官能基反應成鍵，若反應位置(Active site)與基材反應，則會降低酵素的活性。圖 1-22 為化學方法中共價結合法的示意圖，利用酵素分子上非主要(Nonessential)之胺基、氫氧基、氫硫基等反應性高之官能基，與基材中的官能基產生化學反應，形成共價鍵結，此一固定方法鍵結力強。

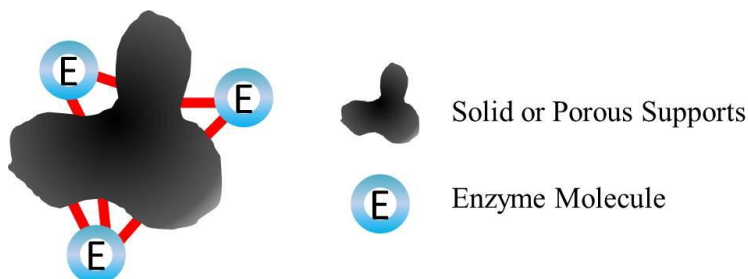


圖 1-22 酵素固定化方法：共價結合法



交聯法以雙官能基或多官能基之交聯劑與酵素分子相互交聯，如圖 1-23(a)，或是進一步搭配基材再進行第二次交聯，如圖 1-23(b)，形成不溶於水及有機溶劑之固定化酵素。常用的交聯劑為戊二醛(Glutaraldehyde)等。

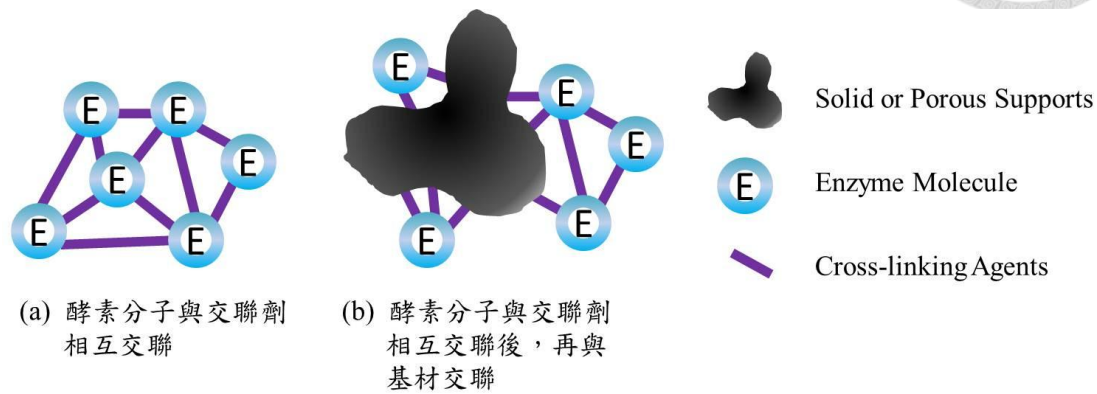


圖 1-23 酵素固定化方法：交聯法

最後將前面所提到的所有固定化酵素的方法，其各項特性優劣列於下一面表 1-2 比較[35]。以及利用表 1-3 整理目前研究中常見的酵素固定法，以及該文獻所使用的材料，和其電極表現效果的研究結果。本研究中為了避免化學方法降低酵素活性，並且搭配噴墨技術的製程，選擇物理方法中的包陷法，利用纖維狀高分子材料固定酵素。

表 1-2 各式酵素固定法之比較[35]

固定法	物理吸附法		包陷法	共價結合法	交聯法
	一般物理吸附法	靜電力吸附法	微膠囊包覆法		
製備容易度	簡單	簡單	困難	困難	中等
鍵結力	低	中等	中等	強	強
酵素活性	中等	高	低	高	低
固定化成本	低	低	中等	高	高
穩定性	低	中等	高	高	高

表 1-3 文獻回顧各式固定化酵素方法、使用材料與電化學線性表現

Immobilization method	Compounds	Linear range	Reference
Adsorption method	Pt/CNT/graphite electrode	0.1-13.5 (mM)	Hao Tang, et al. Analytical Biochemistry(2004) [32]
Entrapment Electropolymerization	PEDOT	0.1-10.0 (mM)	Po-Chin Nien, et al. Electroanalysis(2006) [16]
Crosslinking method	Cellulose acetate -PMMA Glutaraldehyde	—	S. Rauf, et al. Journal of Biotechnology(2006) [36]
	Glutaraldehyde Nafion BSA	0.05-5.0 (mM)	F. Ricci et al. Analytica Chimica Acta(2003) [37]
Covalent binding	Polymer and Trien	—	Brian A. Gregg, et al. Anal. Chem(1990) [38]



1.6 過氧化氫簡介

藉由葡萄糖氧化酶與待測物質葡萄糖反應後，生成過氧化氫(Hydrogen Peroxide)。過氧化氫俗稱雙氧水，分子式為 H_2O_2 ，分子量為 34.01，呈澄清液態，黏度稍高於水。過氧化氫具弱酸性(純過氧化氫之 pH 為 6.2)，且為一強氧化劑，因為過氧化氫有很強的氧化能力，而常被用來當作漂白劑或清潔劑。當過氧化氫存在於水溶液中時，因過氧化氫會與水分子形成氫鍵，形成共晶(Eutectic)改變凝結點(50 wt%, $-52^\circ C$)。

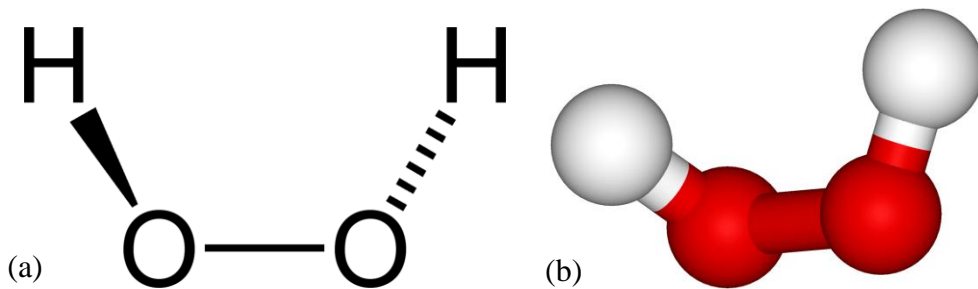
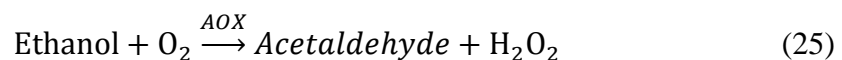
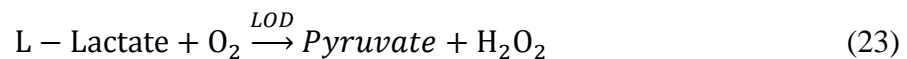



圖 1-24 過氧化氫結構：(a) 結構式；(b) 三維立體分子結構

在許多氧化酶催化反應過程中，皆會產生過氧化氫，像是乳酸氧化酶(Lactate oxidase)[39]、尿酸氧化酶(Uricase)[40]、乙醇酶(Alcohol oxidase)[41]等，都會在待測物質氧化過程中產生過氧化氫，如 Eq. (23)、Eq. (24)及 Eq. (25)所示。



若欲偵測溶液中待測物質(如：葡萄糖、乳酸、尿酸、乙醇等)的濃度，可以利用待測物質與特定氧化酶反應產生的過氧化氫，藉由測定過氧化氫濃度，就能夠



間接得到溶液中待測物質的濃度訊號。在我們的系統中，欲得知葡萄糖的濃度，便是藉由葡萄糖與葡萄糖氧化酶反應生成過氧化氫，並且偵測過氧化氫濃度，然而如何可測得過氧化氫濃度，則使用電化學方法—安培法(Amperometry)，電化學方法將會在章節 1.8 說明。

若要直接偵測過氧化氫的話，須施加操作電位高於+0.7 V[42]，而在如此高的電位下，溶液中其他干擾物質(Interference)如尿素(Urea)、尿酸(Uric acid)、抗壞血酸(又稱維生素 C，Ascorbic acid)等物質，也會在高電位下產生反應，而干擾到偵測訊號。因此為了降低訊號干擾，許多研究中，加入能夠電催化過氧化氫的物質，大幅降低過氧化氫進行電化學反應的電位，像是在電極表面額外修飾觸媒物質(Catalysts)，如鍍鉑的碳(Platinised carbon)等；或修飾中介物質(Mediators)，如環戊二烯基鐵(Ferrocene)及其衍伸物二茂鐵甲醇(Ferrocenemethanol, FcMeOH)、曼陀拉藍(Meldola blue)、亞甲基綠(Methylene green)、普魯士藍(Prussian blue, PB)等；或修飾另一酵素，製作複雜的雙酵素系統，如：HRP(Horseradish peroxidase)；也可利用催化性材料，如鈦(Ruthenium, Ru)、銻(Rhodium, Rh)、銥(Iridium, Ir)等材料，或混合價化合物(Mixed-valence compound)，如：鉻黃血鹽(Chromium hexacyanoferrate)，也可降低偵測過氧化氫的過電位(Overvoltage)[21]。上述的所有修飾物質，都可以使系統操作在較低的電位下，感測過氧化氫，因此可以明顯降低干擾物質產生的電流訊號[43]。

在章節 1.2 中，提到中介層／換能層(Mediator/Transducer layer)會產生電化學反應，藉此將化學能轉換為電能，並將電流訊號輸出給導電層，透過儀器偵測。中介層的材料有許多選擇，然而，如何可以順利感測到物質，好的中介層選擇，不但要能夠與酵素層所產生的物質反應，更能夠有效降低該物質氧化還原的電位。

如此一來便能有效降低所需提供的電位(Applied voltage)，降低在高電位環境下，產生其他電催化物質的雜訊干擾的機會。





1.7 普魯士藍概述

在 1984 年發現普魯士藍對氧氣與過氧化氫的催化效果，是由於普魯士藍特殊的立體結構所造成。普魯士藍的還原態普魯士白，擁有催化氧氣和過氧化氫產生還原反應的能力；而普魯士藍的氧化態則擁有催化過氧化氫進行氧化反應的能力。Itaya 認為由於普魯士藍的三維結構，當氧氣與過氧化氫分子滲入普魯士藍的晶格中，該分子的周圍會有四個高自旋的鐵離子圍繞，進而被催化還原，造成過氧化氫進行四顆電子轉移的還原反應[44]。更進一步在 1995 年，有文獻指出普魯士藍對於過氧化氫甚至擁有比白金更為優異的催化效果[8]，也因為此特性使得普魯士藍常被用來與氧化酶結合製成生物感測器(圖 1-25)。

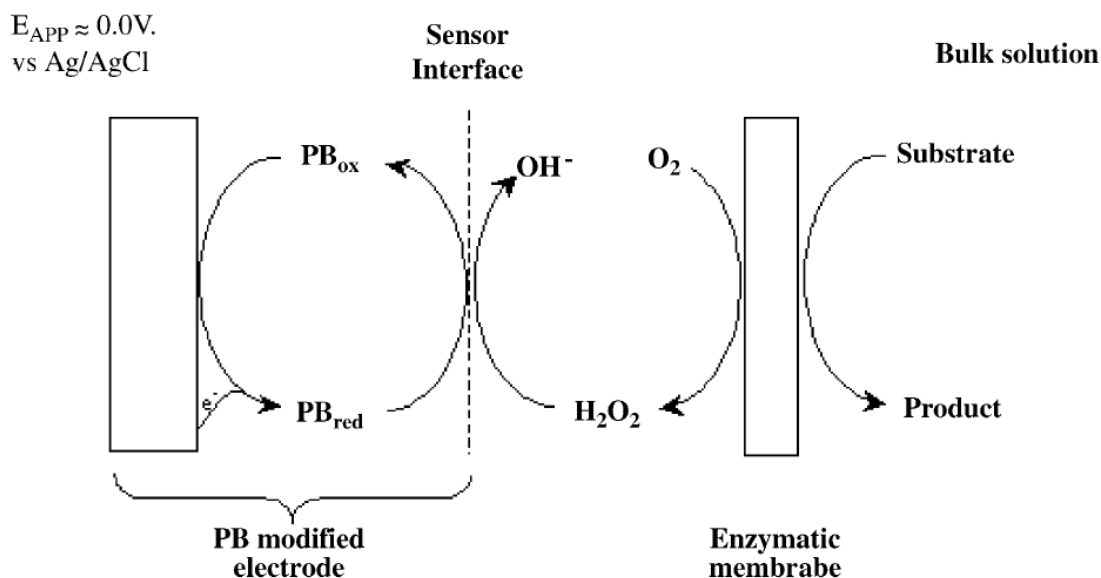


圖 1-25 以氧化酶酵素與普魯士藍為基材之感測器反應概述圖[44]

普魯士藍一般分為兩種形態，分別是可溶性普魯士藍($KFe^{III}[Fe^{II}(CN)_6]$ ，圖 1-26)與不可溶性普魯士藍($Fe_4^{III}[Fe^{II}(CN)_6]_3 \cdot xH_2O$ ，圖 1-27)，這裡提到的可溶與不可溶是針對物質對鉀鹽的膠溶作用(Peptization)程度區分，而非對水的溶解度，對水而言，兩者均為不可溶。膠溶作用指的是膠體粒子分散在介質中，形成穩定膠

體溶液的過程，這種分類是針對普魯士藍對鉀鹽的膠溶作用(Peptization)程度作分類，可溶性普魯士藍容易與水溶液中的鉀鹽產生膠溶作用，故稱為可溶性的普魯士藍[45]。普魯士藍的結構最早是在 1936 年，由 Keggin 和 Miles[46]利用 X 光粉體繞射(X-ray Powder Diffraction)來探討，提出可溶性普魯士藍是由二價鐵離子和三價鐵離子所構成的面心立方結構，二價鐵離子被氰離子(Cyanide, CN^-)中的碳原子包圍(Carbon-coordinated)，而三價鐵離子與氰離子中的氮原子形成八隅體配位(Nitrogen-coordinated)，鉀離子則位於晶格間的空隙位置[47]。之後 Ludi 等學者提出不溶性普魯士藍結構模型，發現這些結構中有四分之一的未佔滿空間形成晶格缺陷的結構。這晶格缺陷允許 14 至 16 個水分子進入每個立方結構的組成中，其中部份水分子填滿氮原子的空缺，剩下的水分子佔據間隙位置，使得整個晶格內的電荷維持電中性[47-49]。

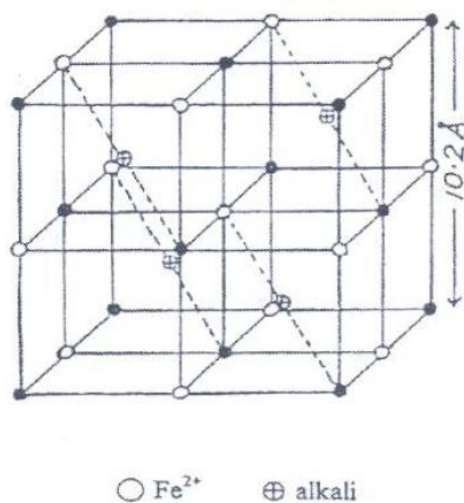


圖 1-26 可溶性普魯士藍之晶體結構[45, 50]

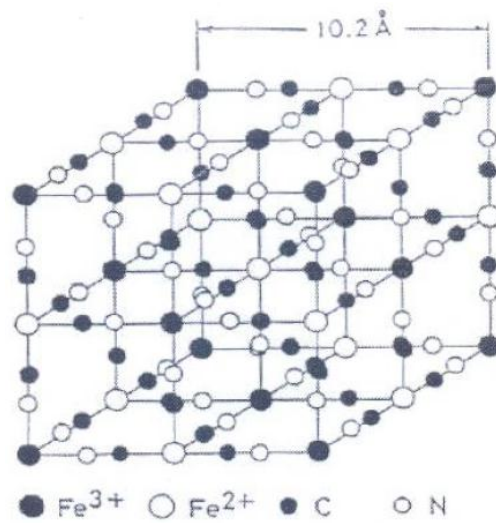
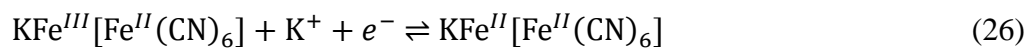


圖 1-27 不可溶性普魯士藍之晶體結構[45, 47]

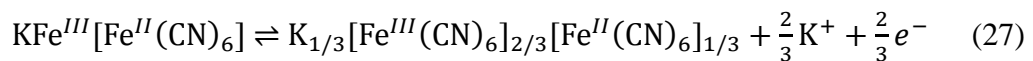
Neff 是第一個利用電化學方法將普魯士藍修飾在白金片上，從循環伏安法的實驗證明了普魯士藍具有氧化還原特性，發現了還原態普魯士藍之外，更發現了其氧化態，柏林綠(Berlin green)[51]。此後，普魯士藍的電化學性質成為許多人的研究目標，而因為普魯士藍分為可溶和不可溶兩種不同物質，所以氧化還原關係式分別由 Ellis(A)和 Itaya(B)提出不同解釋[44]：

(A)



Soluble PB

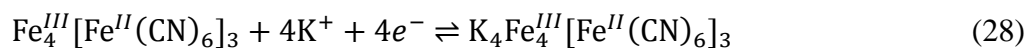
Prussian White



Soluble PB

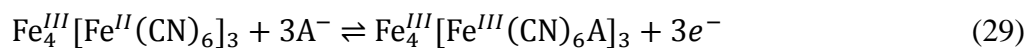
Berlin Green

(B)



Insoluble PB

Prussian White



Insoluble PB

Berlin Green

亦可從循環伏安圖(圖 1-28)得知，普魯士藍與普魯士白(Prussian white)、柏林綠(Berlin green)在不同電位之下的轉換關係[44]。然而由於普魯士藍可催化過氧化氫的氧化還原反應，故本研究著重在普魯士藍與普魯士白之間的轉換。藉由循環伏安圖上的氧化與還原峰，來確認普魯士藍的電化學反應是否可行。

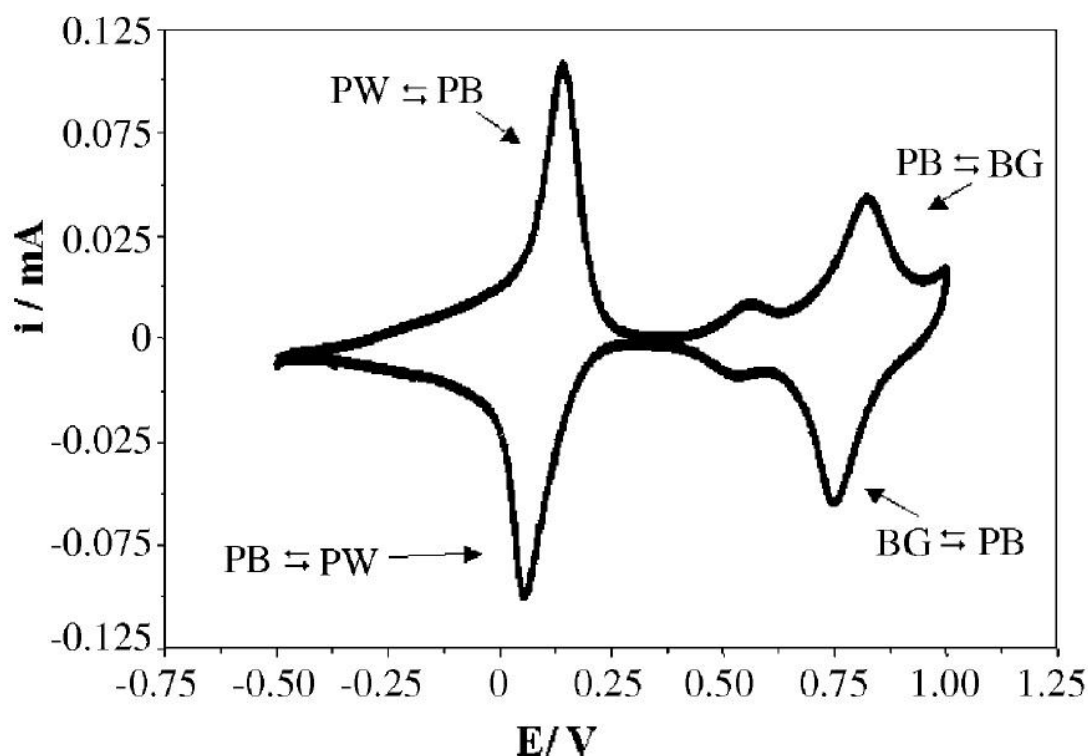


圖 1-28 普魯士藍修飾電極循環伏安圖，可見普魯士藍氧化與還原峰[44]

傳統上，將普魯士藍修飾在各種不同的電極上主要有化學反應和電沉積兩種方式。最常見的方式是電沉積法(Electrodeposition)，其中電沉積法可再分為兩種不同的方式，一種是施加固定電位於電極一段時間，在電極表面沈積普魯士藍層[52]，而另一種方式為變換電位來回掃引數圈，即循環伏安法，在此電位變換過程中，電極上也可形成一層普魯士藍層[53]，至於沉積用的電解液，大多使用含有氯化鐵(Ferric chloride)和亞鐵氰化鉀(Potassium ferrocyanide)的電解液，如同前一段所述，在1978年，由Neff提出藉由化學自發反應在白金電極表面形成一層普魯士藍薄膜，同時顯示了普魯士藍具有良好的氧化還原特性[51]，即是使用循環伏安法的修飾方

式而發現此一特性；以化學沈積法的操作方式則是將電極放入含有氯化鐵和亞鐵氰化鉀的電解溶液中，靜置數分鐘後在電極的表面就會生成一片藍色的普魯士藍薄膜[13, 37]；然而，在 2012 年，Hu et al.提出了另一種普魯士藍沈積法，利用噴墨製程能噴塗精準且定量的墨水於指定位置此優點，將普魯士藍墨水沈積於碳膠電極上，並從實驗證實此方法沈積得到的普魯士藍膜，亦能夠表現出普魯士藍氧化還原表現[54]。

文獻提到普魯士藍的含量會影響循環伏安圖中氧化還原的峰值與兩峰差值。因為含量增多，氧化還原峰的訊號值理所當然會提升，但為什麼兩峰差值會因為含量增多，而兩峰分離(Peak Separation, ΔE_p)更為明顯，這是因為在進行循環伏安法時，電子的傳遞快慢會影響訊號，因為普魯士藍量增多，電極厚度也就隨之變厚，因而減緩了電子的傳遞速率，而使兩峰表現出最大氧化還原峰的電位，比理論值所需電位還要大，稱為過電位(Overpotential)，因此造成峰分離更為明顯[55]。所以在製作普魯士藍層時，厚度的選擇也是需考慮的重點之一。

了解普魯士藍結構，並且將普魯士藍修飾在電極上之後，接著討論其應用。過氧化氫原本需在-0.745 V(對參考電極 Ag/AgCl 在飽和 KCl 水溶液)的電位下，才可進行還原反應；+0.817 V 的電位下，才可進行氧化反應[42]。但經由普魯士藍對過氧化氫的催化效果，可使過氧化氫的反應電位，降至-0.1 V(圖 1-29(a))，並且可成功隔阻干擾物質抗壞血酸(又稱維生素 C, Ascorbic Acid, AA)的電化學行為，如圖 1-29(a), (b)所示[56]。

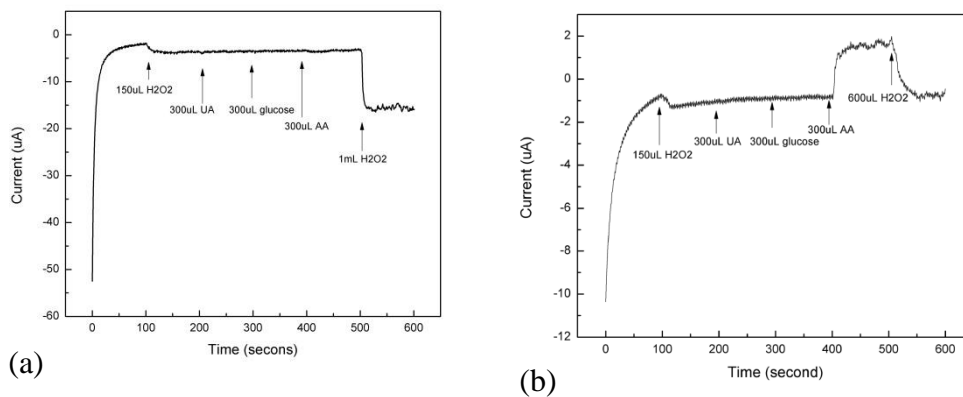


圖 1-29 利用普魯士藍與 PEDOT/PSS 修飾電極，偵測待測物質所得之電流對時間干擾測試曲線。

修飾電極對過氧化氫(H_2O_2)、尿酸(Uric acid, UA)、維生素 C(Ascorbic acid, AA)之電流訊號：(a) 操作電位設定為 -0.1 V ；(b) 操作電位設定為 $+0.15\text{ V}$ [56]

在操作電化學反應時，要特別注意普魯士藍所處環境，以維持其穩定性，如酸鹼值、所施加的掃描電位等。文獻中提到，電化學反應所使用的電解液也會影響普魯士藍的電化學表現，電解液中所含的離子不同，對普魯士藍進行循環伏安法時，會產生不同的現象(圖 1-30)。在鈉離子(Na^+)或鋰離子(Li^+)所處的電解液環境下，可見其氧化還原峰不明顯且難以區別，且兩峰分離的情況明顯；相較於鉀離子(K^+)所處的環境中，可見其氧化還原峰值明顯且突出(sharp)，兩峰分離情況較小。這是因為不同陽離子的水合離子半徑不同，且在氧化還原的過程中，陽離子會穿梭於普魯士藍的晶格中，因此其水合離子半徑大小，需與普魯士藍的晶格通道大小相符，在本文獻中發現鉀離子(K^+)較適合本系統使用[17]。

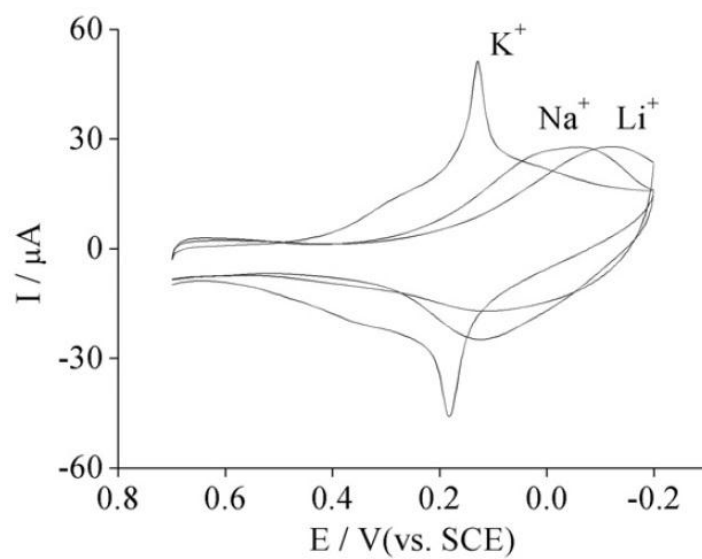


圖 1-30 修飾電極 PBNPs-PANI/MWNTs/GCE 在不同陽離子電解液中之循環伏安圖[17]



1.8 電化學原理

電化學反應發生於電極與電解液間的界面上，涉及電極本身與電解液中物質之間的電子傳遞，伴隨著電荷在兩相之間轉移的化學反應。那電荷是如何轉移的呢？在電化學實驗中，藉由控制電極上施加的電位，來改變電極上電子能量高低，使電荷跨越電極與電解液的界面，促使氧化還原反應進行。當電極電位由正往負移動時，電極上的電子能量提高，當電子的能量高於電解液中反應物質的最低未佔用分子軌域(Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO)時，電極上的電子能量足夠，因此跨越電極與反應物質間的不連續界面，電子從電極轉移至反應物上，使反應物獲得電子，行還原反應，在電化學的定義上稱此電極為陰極。反之，若電極電位由負往正向移動時，則電極上的電子能量降低，當電子的能量低於電解液中反應物質的最高填滿分子軌域(Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO)時，反應物上的電子能量足夠，跨越其兩相間的不連續界面，電子從反應物轉移至電極上，因此反應物失去電子，為氧化反應，在電化學的定義上稱此電極為陽極[57]，如圖 1-31。

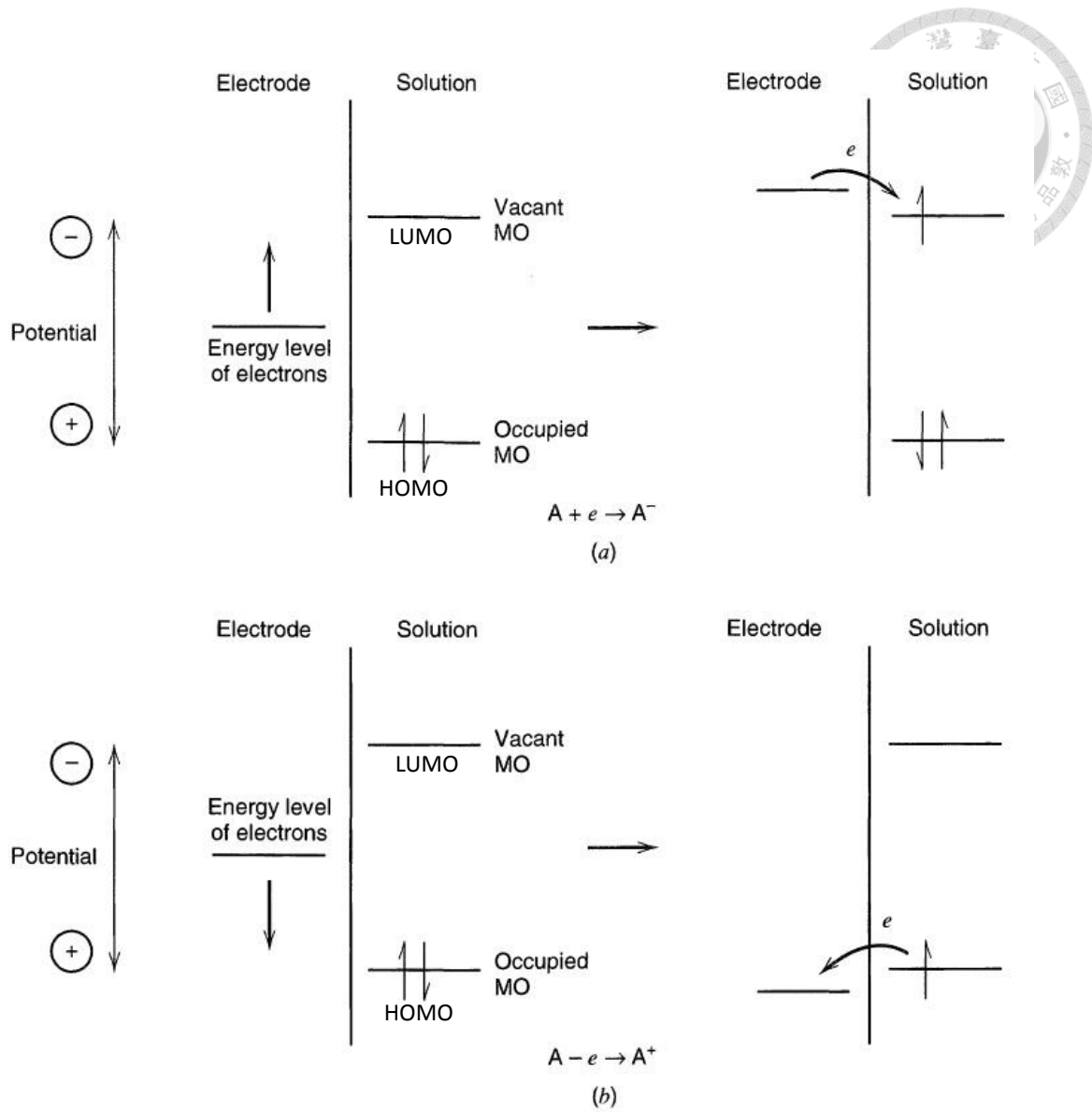


圖 1-31 溶液中氧化還原反應過程示意圖，以物質 A 為例[57]



1.8.1 電極界面—電雙層現象


藉由調整電極電位，可產生氧化或還原反應，而因電壓的施加，發現在兩者之間的界面存在著電雙層(Electrical double layer)。當電極與電解液接觸時，若在電極上施予電壓，電極會因為其所受電壓而帶電荷，然而電極表面所帶之電荷會吸引溶液中異電性離子、排斥同電性離子，故在電極表面與電解液之間的界面附近，會帶有與電極所帶電荷電性相反、但電量相同的電荷，以讓整個系統維持電中性，電極表面形成電雙層。因此自十九世紀便有學者提出電雙層理論，至二十世紀初仍有其他學者提出修正，以下簡述電雙層的各式理論模型。

亥姆霍茲平行板模型(The Helmholtz Model)

電雙層理論模型，最早由亥姆霍茲在 1853 年提出雙層(Double Layer)結構模型。使用簡單的平行板電容器來模擬電極板界面與外層的結構，電容的兩板平行且電性相反，其中一板代表電極上通過表面電荷的平面，另外一板則代表溶液中被靜電吸引到電極表面的離子電荷，兩板之間距離為分子間距離(圖 1-32(a))。Helmholtz 模型可解釋界面中電容值的存在，但由於此模型只考慮庫侖靜電力的影響，忽略粒子間熱運動的現象，因此無法解釋電雙層電容值與電極電位和電解質濃度之間的關係。

古依與查普曼擴散電雙層理論(The Gouy-Chapman Theory)

為了有效解釋電雙層電容值與電位、電解液濃度的關係，古依(1910)和查普曼(1913)分別對 Helmholtz 模型進行修正，提出了擴散層(Diffuse Layer)的概念。溶液中的電雙層結構，並非異性電荷平行地被吸附於電極表面相鄰的液相中，如兩平



行帶電板，而是擴散分布在電極表面(圖 1-32(b))，距離電極越近，則其帶電粒子濃度增大，因為距離電極板越近，溶液的帶電粒子所受電極板的靜電力越大，帶電粒子濃度越高，然而距離越遠離電極板，因所受靜電力下降，帶電粒子濃度逐漸下降。此時在擴散層中，因帶電性離子濃度不同而表現出電位，此電位與溶液內部電位之差稱為 Zeta 電位(Zeta potential, 亦作 ζ -potential)，擴散層厚度受電極板帶電量大小影響，若電極板帶電量大，則擴散層較緊密，電容提高。因此修正 Helmholtz 模型中的電極板與被吸附離子的距離 d ，Gouy-Chapman 模型因電極板外離子濃度不同，因此將距離 d 定義為平均距離，修正電容的表示方式。Gouy-Chapman 模型中因將離子視為點電荷，沒有將體積因素考慮進去，而透過此理論計算的電容值與實驗結果不符，說明此模型仍須進一步修正。

斯特恩修正模型(Stern's Modification)

在 1924 年斯特恩進一步對 Gouy-Chapman 模型修正，因 Gouy-Chapman 模型中，將離子視為點電荷，忽略其體積，並假設它可以任意接近電極表面。然而，這假設並不合理，離子有其大小，與電極的距離不可能小於其離子半徑。Stern 結合了 Helmholtz 和 Gouy-Chapman 所提出的模型，認為 Gouy-Chapman 模型中的擴散雙電層應分為多層，最靠近電極的內層(Inner layer)是緊靠電極表面的緊密層(Compact layer, 又稱 Stern layer, Helmholtz layer)，該層中電位變化情況與 Helmholtz 模型中類似，包含離子與溶劑分子，這些被特定吸附(Specifically adsorbed)物質，構成 Helmholtz 內層(Inner Helmholtz plane, IHP)；在此層之外，為粒子半徑較大的水合離子(Solvated ions)所構成的 Helmholtz 外層(Outer Helmholtz plane, OHP)，此層水合離子與電極表面的距離遠，其間靜電作用力小，水合離子無特定吸附(Nonspecifically adsorbed)；從 OHP 之外則為一層類似 Gouy-Chapman 模型中的擴散層(圖 1-32(c))，然而在擴散層外側是整體溶液(Bulk solution)。電解質濃度

比較濃、電極電位比較高時，實驗結果與 Helmholtz 模型較吻合，反之，在稀電解質環境、電極電位比較低時，則與 Gouy-Chapman 模型相符。Stern 在粒子外層分散的部分忽略了離子大小，但在電極表面則考慮離子大小，形成和離子半徑相同厚度的 Helmholtz 薄層。1947 年格雷厄姆 Grahame 對 Stern 提出之模型再作補充修正，將 Stern 模型中的緊密層與擴散層中滑動面以內的部分結合為內層，將滑動面以外視為擴散層，強調質點表面電荷分布的不均勻性。

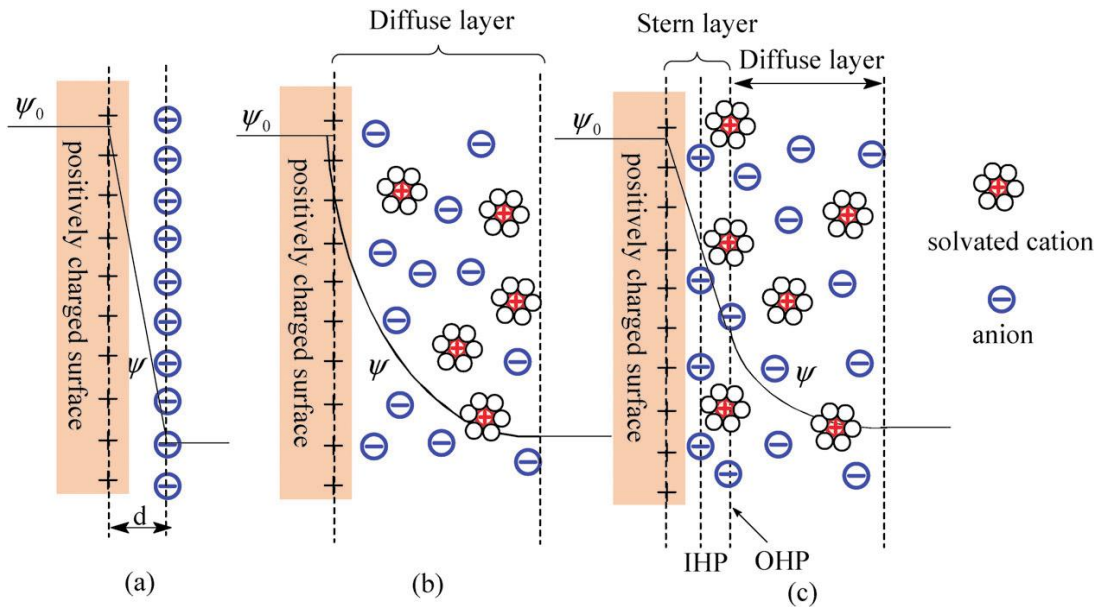


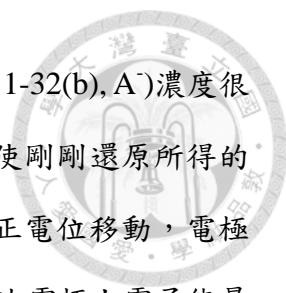
圖 1-32 帶正電荷表面之電雙層模型示意圖：(a) 亥姆霍茲模型(the Helmholtz model)；(b) 古依—查普曼模型(the Gouy–Chapman model)；(c) 斯特恩模型(the Stern model)，符號 d 表示由亥姆霍茲模型(the Helmholtz model)提出的電雙層距離，符號 ψ_0 與 ψ 各別表示電極表面電位與電極電解液界面電位[58]



1.8.2 循環伏安法

通常在電化學實驗中，藉由控制電極的電位來改變電極上電子的能量高低，促使電荷發生轉移，產生氧化還原反應。在電化學中有許多分析方法，如：伏安法(Voltammetry)、計時安培法(Chronoamperometry)、庫倫法(Coulometry)和極譜法(Polarography)等。

循環伏安法(Cyclic voltammetry)為一種常用於電活性物質(Electroactive species)分析的電化學技術，可用來分析電極表面的氧化還原行為和探討電極動力學，可作為定性、定量的研究和探討。近年來研究多採用特殊材料製備的固體電極進行分析，包括微電極、超微陣列電極、化學修飾電極，達成更高靈敏度(Sensitivity)、選擇性(Selectivity)等目的。對於典型的循環伏安法，掃描的電位隨著時間呈線性變化，電位先隨著時間增加，然後到達設定掃描電位的最大值時，電位反轉成隨著時間增加而降低，電位對時間作圖，便形成一個三角形的波形(圖 1-33(a))，三角形兩個線段的斜率代表電位改變的速率，亦即循環伏安法的掃描速率(Scan rate)。隨著電位改變，紀錄工作電極的電流改變，了解電極在每一個電位下的氧化還原情況。施加電位從比較高的電位往負電位(圖 1-33(b)，由圖左側到右側)的方向改變，一開始電位不足，沒有化學反應所以沒有法拉第電流(Faradic current)生成，隨著電位繼續往負電位方向移動，電子帶有的能量提升，電極上的電子含有足夠的能量，促使部分的反應物經過還原反應產生了生成物，隨著電位持續改變會讓反應速率越來越大，電極表面的反應物不斷進行反應，使得偵測到的法拉第電流大小持續增加，當電極表面的反應物(圖 1-33(b)，A)濃度趨近於零時，電流出現極值，此電位為還原峰值發生的位置，經過此電位後電流訊號開始下降，整個電極系統進入質傳控制(Diffusion control)的階段，主要是因為在電極表面外的反應物產生濃度極化(Concentration polarization)，造成電流訊號的減弱，此時訊號強弱決定於反應物



擴散到電極表面的速率。當電位到達 E_{λ} 時，電極表面生成物(圖 1-32(b), A^-)濃度很高，此時改變電極電位掃描方向，而進行電極表面的逆反應，使剛剛還原所得的生成物進行氧化反應，而電流也會因前述原因，因施加電位往正電位移動，電極上電子能量降低，待系統中反應物(A^-)所擁有電子的能量足夠，比電極上電子能量高，則可進行氧化反應，氧化電流漸增，且因表面反應物濃度趨近於零，進入質傳控制階段，產生極值的現象。

藉由循環伏安法(Cyclic voltammogram)所得的電流對電位曲線(i - E Curves)中，有兩測量值值得討論，兩峰電流比值(The ratio of peak currents, i_{pa}/i_{pc})以及兩峰分離差值(Peak separation, ΔE_p)，兩峰電流比值越接近 1，也就是當還原峰值與氧化峰值訊號越接近，表示此物質為一穩定物質，對一個簡單可逆的氧化還原反應，氧化峰和還原峰的電流大小幾乎相同，而且氧化電位和還原電位的平均值會等於標準氧化還原電位，即熱力學上的平衡電位或稱為式電位(Formal potential)。然而可以從循環伏安圖(Cyclic voltammogram)發現，對於一個不可逆的反應，兩個峰的位置會隨著掃描速率增加而更遠離，兩峰分離差值較大，主要是因為電子在非勻相(Heterogeneous)間的轉移速率較慢所致。

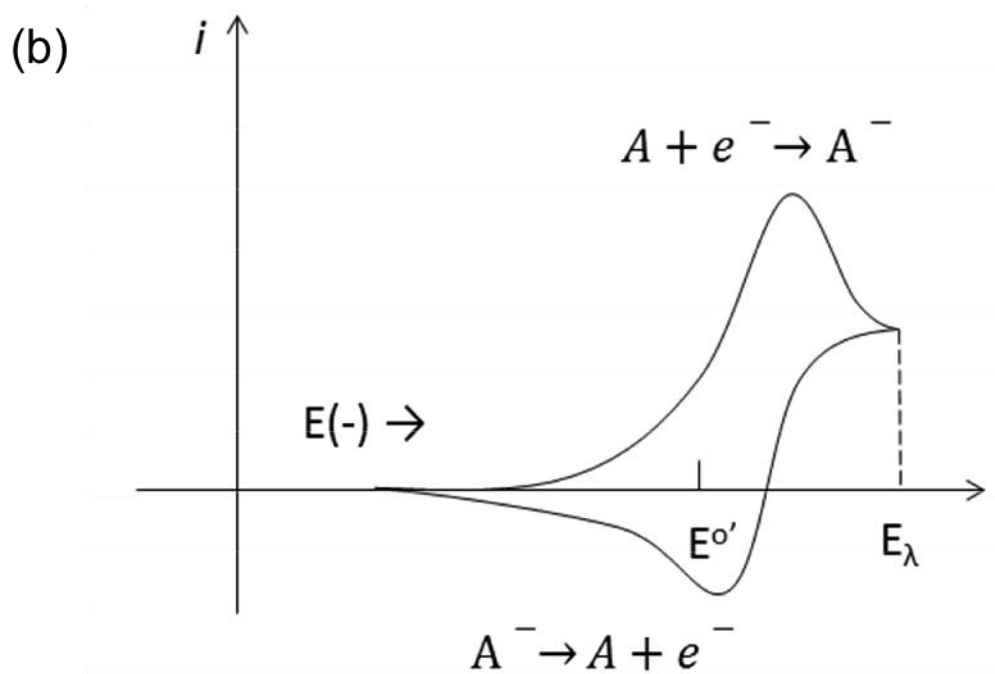
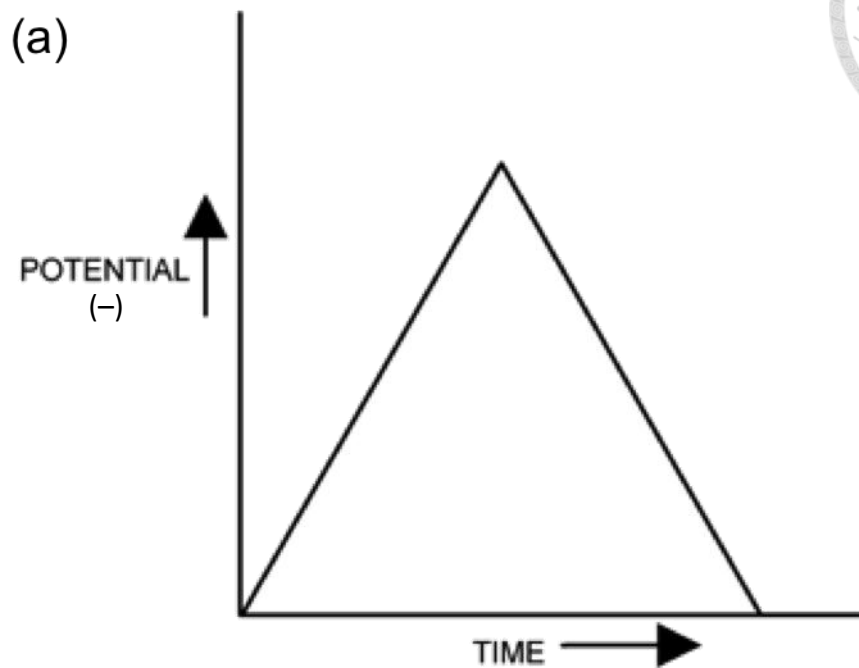


圖 1-33 (a) 循環掃描電位；(b) 循環伏安圖[57]



1.8.3 計時安培法

計時安培法(Chronoamperometry)藉由恆電位儀控制工作電極的電位，並隨著時間紀錄工作電極的電流響應(Current Response)變化，可分為電位階躍法和定電位法。在一動態系統中，對工作電極施加電位，足夠讓待測物產生反應，紀錄電極上因反應而產生的電流大小，便可從電流大小的變化判讀得到相關資訊，如：待測物的濃度高低。

在施加某一電壓，此時電解液中無分析物存在時，溶液中因電解質的存在，會提供一穩定的電流，在時間對電流的訊號圖上可以獲得一條近似水平的直線，此時的電流值視為背景電流。在某個時間點加入定量的待測物質，透過流動或攪拌，使得系統迅速達到均勻狀態，此時待測物質因為受到電極表面電子能量的影響，進行化學反應，並產生電流。因為攪拌速率固定不變，且系統中的各物質濃度在反應進行之後視為不變，所以將溶液中的電雙層厚度也視為固定，擴散到電極表面的待測物量，因濃度梯度和電雙層狀態不變而固定，因此就能偵測到於此分析物濃度下的電流值。在連續加入分析物的過程中，逐漸使得電極表面和溶液之間的濃度梯度增加，而讓電流反應量增加，因此在訊號圖上可以看到如階梯般的圖形。

當電極電位控制在使反應呈現擴散控制的區域，以致於擴散到電極表面的物質立即反應，使得電極表面的反應物質濃度始終為零，此時反應物質的擴散速率與電極表面反應物質的反應速率相等，即：

$$\frac{i}{nFA} = D_r \frac{\partial C_r(0,t)}{\partial x} \quad (30)$$

透過質傳統御方程式配合初始條件及邊界條件可求得濃度分布為：

$$C_r(x,t) = C_{bulk,r} \left\{ 1 - \operatorname{erfc} \left[\frac{x}{2\sqrt{D_r t}} \right] \right\} \quad (31)$$

可以求得電極表面的電流表示式—Cottrell方程式為：

$$i_d(t) = \frac{nFA\sqrt{D_r}C_{bulk,r}}{\sqrt{\pi t}} \quad (32)$$

由於這是在擴散控制的條件下導出，因此這時的電流稱為擴散控制電流。





1.9 研究動機與目的

前面提過，血糖儀中扮演重要角色、耗資較高的血糖儀試片屬於拋棄型耗材，因此如何改善試片的生產成本，使其也可流通到經濟發展較為落後的地區，並且藉由調整噴墨參數，改善其表現，使其測量靈敏度得以提升，提升其偵測血糖的精準度，即本研究著重的部分。目前試片的製作方式多屬於網印製造等方式生產，目前仍存在校正的問題，因為網印較難精準控制沉積物質的量與厚度，因此同批次製造的產品，在使用之前，需使用其專門校正用試片校正，才可進行測量。

本研究期望開展出新穎的製程與製作方式，藉由噴墨技術來有效控制材料用量，精準定量沉積物質，並且藉由噴墨技術的特性—精準控制沉積位置與控制各式噴塗圖樣，藉由此方式，找到可使感測器靈敏度(Sensitivity)較高的圖樣，在相同濃度變化下，有較大的電流提升，增加感測的精準度。



1.10 論文架構

本研究分為六章節，第一章節為緒論，闡述研究動機和文獻回顧，針對研究內容、材料與方法做概略介紹；第二章節為實驗用品與流程，詳述實驗藥品、儀器與過程，說明本實驗的方法與實驗操作細節；第三章節說明葡萄糖感測器是否擁有感測效果，並確認其基本性質；第四章節針對噴墨製程沉積不同圖樣的葡萄糖氧化酶，測試其圖樣與靈敏度間的關係；最後總結於第五章節，並在第六章節期許本研究能對相關領域的研究發展有所幫助。

第三章節為「利用噴墨製程之葡萄糖感測器表現」，確定感測器的結構，找尋感測器適當的操作環境，並且利用干擾測試確認其專一性。先了解感測器結構是否可行，葡萄糖氧化酶固定與否，藉著利用電化學方法找尋適合的操作電壓與電解液酸鹼值，最後為了確定其專一性，需進行感測器的干擾測試。

第四章節為「改變噴墨參數對葡萄糖感測器靈敏度之探討」，利用噴墨技術，沉積不同圖樣的葡萄糖氧化酶於電極表面上，致力於找尋靈敏度較佳的噴塗參數與圖樣設定；接著嘗試增加粗糙度，以便增加普魯士藍與葡萄糖氧化酶的接觸點，增加反應產生之過氧化氫可接觸普魯士藍的面積。

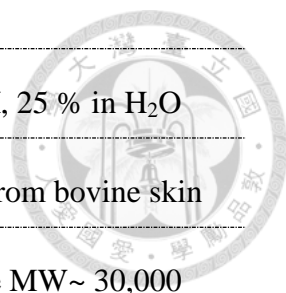
第二章 實驗用品與流程



2.1 實驗藥品

表 2-1 實驗藥品

實驗藥品名稱	廠牌/供應商	規格
碳膠	Acheson	ELECTRODAG 423SS
碳紙	CeTech	Thickness 0.18 mm
普魯士藍 ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$)	Sigma-Aldrich	—
乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	HY Biocare Chem.	HPLC grade
乙二醇 ($\text{CH}_3\text{OHCH}_3\text{OH}$)	Sigma-Aldrich	Purity \geq 99.5 %
葡萄糖氧化酶 (GOx)	Sigma	From <i>Aspergillus niger</i> , activity: 50 KU.
尿素氧化酶 (Uricase)	Sigma	<i>Candida</i> species recombinant, Expressed in <i>E. coli</i> , activity: 4.7 units/mg solid
石蠟	First Chemical Works	—
甲苯 (C_7H_8)	First Chemical Works	—
過氧化氫 (H_2O_2)	Sigma-Aldrich	34.5 – 36.5 %
葡萄糖 (D-(+)-Glucose)	Sigma	Minimum 99.5 %
磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4)	J.T.Baker	Purity $>$ 99.9 %
氯化鉀 (KCl)	Yakuri Prue Chemicals	Purity $>$ 99.5 %




戊二醛 (Glutaldehyde)	Sigma-Aldrich	Grade II, 25% in H ₂ O
明膠 (Gelatin)	Sigma	Type B, from bovine skin
醋酸纖維素	Sigma-Aldrich	Average MW~ 30,000
尿酸 (Uric acid)	Sigma	Purity ≥ 99 %, crystalline
維生素 C (L-Ascorbic acid)	Sigma-Aldrich	—
氫氧化鉀 (KOH)	—	—

2.2 實驗儀器

表 2-2 實驗儀器



實驗儀器	廠牌	型號
噴墨設備	MicroFab Technologies	Jetlab 4
電化學分析儀	Gamry Instruments	Reference 3000
白金電極	Alfa Aesar	Diameter 0.5 mm
銀/氯化銀參考電極	BASi	MF-2052
掃描式電子顯微鏡	FEI COMPANY	Nova NanoSEM 230
超音波震盪洗滌器	Delta New Instrument	DC300H
離心機	HERMLE Labortechnik	Z 206A
pH 測定計	Thermo Scientific	ORION STAR A211
磁石加熱攪拌器	Dragon Lab	MS-H-PRO
微量電子天平	Mettler-Toledo	AL 204
可調式微量吸管 (100、1000 μL)	SOCOREX	Acura [®] manual 825
可調式微量吸管 (10 μL)	Dragon Lab	MicroPette Pipettor
針式過濾頭 (0.45 μm)	ADVANTEC	Hydrophilic PTFE
感光乳膠	Matina Co., Ltd	乳劑 335

透明膠片	UNIVERSAL MACHINE Co., Ltd	-	
絹框	-	-	150 目
點膠機	EFD	RERFORMUS™ III	
網印機	HOUN JIEN INDUSTRIAL, Co., LTD.	RJ-55AC	
均質機	Betatek Inc	Sonics VC5020AT	



2.3 墨水製作

2.3.1 普魯士藍墨水—噴墨製程(Inkjet Printing)用

- i. 首先，先在樣品瓶中秤取 1.5 g 的 HPLC 級乙醇。
- ii. 接著，秤取 0.15 g 的普魯士藍粉末加入乙醇中。
- iii. 最後，再加入 3.5 g 的去離子水並輕微搖晃後，再經震盪與沉澱，篩選出合適的普魯士藍懸浮液。
- iv. 用於工業用噴墨印表機，其墨水中顆粒要小且墨水需穩定，因此配置好上述溶液後，須再將懸浮液置於超音波震盪機中，連續震盪 1 小時，使其穩定懸浮。
- v. 離心機設定轉速 3500 rpm，離心 1 小時，去除沈澱於離心管底部的普魯士藍，分離顆粒較大之普魯士藍，而得普魯士藍懸浮液。根據 Hu et al.的結果，這樣可得到粒徑約 100 nm 的普魯士藍墨水[54]。

2.3.2 普魯士藍墨水—針筆繪製(Pen-writing)用

- i. 取普魯士藍粉末與 HPLC 規格的乙醇，以 0.1913 克普魯士藍與 6.1854 克 HPLC 級乙醇混合，依重量百分比約 3%的比例配置。
- ii. 為使其均勻混合，利用超音波震盪一小時。

2.3.3 普魯士藍墨水—點膠噴塗製程用

- i. 取普魯士藍粉末與 HPLC 規格的乙醇，以 0.2056 克普魯士藍與 6.0659 克 HPLC 級乙醇混合，依重量百分比約 3%的比例配置。
- ii. 為使其均勻混合，利用超音波震盪一小時。
- iii. 為了在塗佈時，提高溶液黏度，提高內聚力，使其沉積於碳膠表面

時，不會擴散出去。因此將上述普魯士藍乙醇溶液與乙二醇等體積混合配置，體積百分比溶液 50%。

- iv. 同樣為了均勻混合，使用超音波震盪一小時。



2.3.4 葡萄糖氧化酶墨水—噴墨製程(Inkjet Printing)用

- i. 秤取 0.0554 g 葡萄糖氧化酶粉末，置入樣品瓶中。
- ii. 加入 pH 值約 7.0 左右的磷酸緩衝水溶液 4 毫升。
- iii. 震盪約 10 分鐘，粉末即可完全溶於水中。

2.3.5 石蠟墨水—浸製塗佈(Dip Coating)用

- i. 取 20 mL 甲苯，至於樣品瓶中。
- ii. 秤量 0.0203 g 石蠟(Paraffin wax)，加入甲苯中，石蠟重量百分比含量 0.101 % (w/w)。
- iii. 震盪 1 小時後，石蠟即完全溶解於甲苯中，石蠟墨水完成。



2.4 工作電極製作

2.4.1 碳膠層

此層為電極最基層，作為工作電極的導電層，使用網印技術，網刷碳膠電極，網印的技術，分為兩部分：第一部分—網版製作、第二部分—網印碳膠電極。所得的碳膠電極，稱為網刷碳膠電極，本文會以 SPCE(Screen-printed carbon paste electrode)為代號簡稱此修飾電極。

網版製作

- i. 使用 150 目絹網版，將周邊的絹網絲剪掉，以免干擾網版製作。
- ii. 用水沖洗，沖去灰塵與木屑；並利用洗潔劑清洗網版，洗去雜質。
- iii. 可陰乾或利用吹風機強熱將絹網版吹乾。
- iv. 接下來要利用感光乳膠製作模板，由於感光乳膠遇光會固化，因此接下來步驟五到步驟八，需在暗房下操作。
- v. 取適量的感光乳膠，利用軟尺均勻的塗佈乳膠在絹網板上，輕輕刮上一層薄薄的感光乳膠即可。注意需均勻地塗抹在絹網版表面上，以免造成下一步的操作困擾。
- vi. 塗抹上感光乳膠的絹網版靜置平放，以吹風機吹乾，準備進行曝光的操作。
- vii. 將電極圖案光罩與絹網版一併放在光源上，蓋上黑布，壓上重物，避免光線散射，以免造成製作出的模板解析度不佳。固定曝光時間後，進行移除未固化乳膠的步驟。本實驗操作的曝光時間約為一分鐘，薄

層乳膠需固化時間約一分鐘即可，若曝光太久可能連帶的使光罩下的乳膠也因微弱散射光而固化。因此曝光時間的掌控極為重要。

- viii. 將絹網版置於注滿水的水槽中，浸水約五分鐘，除去未固化的部分，可觀察到未曝光的塗樣顏色較淺，且藍色的感光乳膠會漸漸剝落。接著利用微弱水柱，將圖樣中的殘餘乳膠沖下，以便得到通透的網孔。
- ix. 此時模板已完成，可離開暗房，靜置晾乾，絹網版模板完成。

網印碳膠電極—利用手動網刷

- i. 利用固定支架將絹網版模板固定好，下方放入透明膠片，將絹網版模板下放於透明膠片正上方。
- ii. 取適量碳膠置於絹網版模板上方無圖樣處，均勻的分散在上方，確保網刷時，其碳膠量能均勻分散在模板上。
- iii. 手動網刷時，為了使印刷圖樣厚度均勻，墨量相同，在印刷時，刮刀需固定角度與力道，並且固定刷過模板的次數。
- iv. 刷完後，形成碳膠電極圖樣。
- v. 市面上碳膠有兩類，加熱固化型與溶劑蒸散型，本實驗所使用的碳膠屬於溶劑蒸散型，因此在印刷之後，需加熱使溶劑揮發並且乾燥。因此在此網印後，將碳膠電極放入烘箱，在常壓下，以 70 °C 烘烤 30 分鐘。

網印碳膠電極—利用網印機網刷

- i. 打開抽氣裝置，將絹網版模板固定於網印機上，網印機基板放上透明膠片，並且外接抽氣，固定膠片位置。
- ii. 調整網版與刮刀位置，刮刀需接觸到網版，使網版輕微的繃緊；並且




- 調整網版與基板位置，網版下移至基板時，需與基板距離約一枚五元硬幣的厚度。
- iii. 調整好距離之後，將刮刀與回墨刀抬起，將碳膠置於刮刀與回墨刀中間、下方的網版上，將刮刀與回墨刀放回印刷位置，左右來回刷一次、回墨一次，先將墨均勻散在網版上後，開始網刷。
 - iv. 放上基材，使用網刷機網刷，將網版與刮刀緊繃度固定，進而固定網刷角度與力道，因此可以使印刷圖樣厚度固定，且出墨量也固定。固定刷過去的次數，設定為刮刀刷過一次，接著回墨一次，最後再刷一次，總共刷兩次墨，回墨一次。
 - v. 刷完後，形成碳膠電極圖樣。
 - vi. 同樣在網印後，將碳膠電極放入烘箱，在常壓下，以 70 °C 烘烤 30 分鐘，除去溶劑。

2.4.2 普魯士藍層

此層為電極中介層，作為工作電極產生訊號的中間層，將化學濃度大小訊號轉換成電子電流訊號。本研究使用了多種噴墨技術，噴塗普魯士藍層於碳膠電極上，使用的技術皆為直接噴塗(Direct writing)的噴墨製程，以下介紹三種製程實驗步驟。文獻指出經加熱修飾後的普魯士藍薄膜會比較穩定[56]，因此以下列出的三種製程，最後都會藉由加熱修飾(Sinter)，穩定普魯士藍層。

噴墨製程(Inkjet Printing)

簡略介紹如何使用噴墨製程來沈積普魯士藍層，噴墨操作機台的詳細介紹會在章節 2.4.5 一併說明。

- 
- i. 在移動式載台上放上碳膠電極固定，先利用噴墨機台內建功能與攝影機找出碳膠電極的坐標。找好坐標之後，依實驗需要修改噴塗指令。
 - ii. 使用墨水前，先將墨水震盪 30 分鐘，使其穩定懸浮。
 - iii. 將墨水儲存槽內的墨水換上普魯士藍墨水，並透過調整參數來改變電壓波形，使液滴穩定；並且在調整波形過程中，需要控制背壓找出穩定液滴的條件，得到穩定且直徑約為 50 到 60 微米的液滴。
 - iv. 設定移動載台溫度在 45 °C，並在電極位置開始噴塗圖樣。
 - v. 待噴塗完成，將已沈積普魯士藍的電極放進烘箱，在常壓下，以 100 °C 加熱烘烤 1 小時，取出冷卻至室溫，將普魯士藍修飾電極存放於無光照之處。

針筆繪製(Pen-writing)

由於上述的噴墨製程需要非常穩定而且分散性極強的奈米墨水，需要新鮮配置的墨水，才能順利的應用在噴墨製程的工業用印表機上，且不阻塞其噴頭。因此為了使配置好的墨水使用期限可以延長，降低墨水分散性的要求，我們採用針筆繪製(0.8mm)，塗佈普魯士藍墨水。

- i. 使用墨水前，先將墨水震盪 30 分鐘，使其穩定懸浮。接著，將墨水填入針筆墨水匣中，在白紙上試畫後，確認出墨量穩定。
- ii. 在碳膠電極上，利用針筆畫上普魯士藍層，輕觸碳膠電極，避免留下太多刮痕。
- iii. 塗佈後，將普魯士藍的電極放進烘箱，在常壓下，以 100 °C 加熱烘烤 1 小時。



點膠噴塗

針筆繪製方法證實可順利沉積普魯士藍，但此方法不易固定沉積上碳膠電極表面的普魯士藍量，無法統一沉積品質，也因為針筆在繪製的過程中，會刮傷碳膠電極表面，因此後來選用點膠噴塗技術，其針頭較噴墨製程粗、不易阻塞，且可以利用固定壓力與出墨秒數來固定出墨量改善上述的缺點。


- i. 使用墨水前，先將墨水震盪 30 分鐘，使其穩定懸浮。將墨水填入點膠機墨水匣中，設定出墨秒數與壓力，在白紙上試畫後，確認出墨量穩定。秒數定為 0.1 秒，壓力訂在 4.5 psi，確認每次出墨量穩定。
- ii. 在碳膠電極上，利用點膠機滴上普魯士藍層，輕觸碳膠電極。
- iii. 點上普魯士藍墨水後，將普魯士藍的電極放進烘箱，在常壓下，以 100 °C 加熱烘烤 1 小時。

2.4.3 葡萄糖氧化酶層

此層為酵素層，扮演極重要的地位，負責感測系統待測物質的濃度，並藉由酵素生物化學反應，將待測物質濃度，轉化成過氧化氫濃度。酵素層需要明確精準的定量，並且精確的沉積氧化酶在我們想要的位置上，再加上氧化酶製作不易，其氧化酶成本都十分昂貴，因此點對點直接印刷、墨水減量是我們所需的製程特點，在這邊我們所使用的製程為噴墨製程。

噴墨製程(Inkjet Printing)

- i. 使用墨水前，先將墨水震盪 10 分鐘，使其穩定懸浮。
- ii. 在移動式載台上將電極固定，先利用噴墨機台內建功能與攝影機找出


- 
- 電極的坐標。找好坐標之後，依實驗需要修改噴塗指令。
- iii. 將墨水儲存槽內的墨水換上葡萄糖氧化酶墨水，並透過調整參數來改變電壓波形，使液滴穩定；並且在調整波形過程中，需要控制背壓找出穩定液滴的條件，得到穩定且直徑約為 55 到 60 微米的液滴。
 - iv. 為了使液滴沉積表面時，可以快速乾燥，形成欲噴塗圖樣，避免墨水接觸到親水性普魯士藍表面後，擴散出去，無法準確噴塗想要的圖案，然而又因葡萄糖氧化酶酵素受熱會變性，活性下降，因此藉由實驗嘗試後，設定移動載台溫度在 40 °C，並在特定位置噴塗圖樣。
 - v. 待噴塗完成，收納於培養皿中，避免空氣中灰塵汙染電極，並且放置在無太陽光直射的地方，以免酵素活性受影響。

2.4.4 石蠟層

酵素層噴塗上去之後，最後一個重要步驟即是需要覆蓋上一固定層，能夠將酵素固定在電極表面上，而不會在磷酸緩衝溶液的系統中脫附。固定酵素有許多方法，分為兩類，物理方法與化學方法，其中物理方法如：物理吸附法(Physical adsorption)、物理包埋法(Entrapment)、微膠囊包覆法(Microencapsulation)，化學方法如：交聯法(Cross-linking)、共價鍵結法(Covalent binding)。在這邊我們選用物理包埋法固定酵素，一方面因為此方法屬於物理固定方法，可避免化學反應影響、降低酵素活性，另一方面使用物理包埋法固定，相較物理吸附法，前者的固定效果較佳，也較適用於本電極系統上。

浸製塗佈(Dip Coating)

- i. 利用實驗室自製浸製塗佈機(Dip coater)，將電極利用固定夾夾住。

- 
- ii. 下方放置石蠟的甲苯溶液，塗佈機固定夾設定全速下降，直到電極感測部分(即圓形部分)全部沒入；沒入後，立即全速上升，使電極完全離開溶液。上升與下降的速率為 0.422 mm/s。
- iii. 放在通風櫥(Hood)待甲苯溶液揮發，靜置五分鐘，電極製作完成。



2.4.5 噴墨技術介紹

本實驗中所使用的印表機為工業用印表機(MicroFab Technologies Inc., Plano, TX)，其噴墨運作原理為壓電驅動墨水噴出，系統包括壓電式雙噴頭、電壓控制電路—提供脈衝的設備、背壓(Back pressure)控制模組、線性移動載台(Moving stage)、兩獨立 CCD 鏡頭—一個觀測噴出液滴穩定性與物理性質、另一個觀看欲塗佈的基板位置、液體回收系統及電腦內建一套整合軟體利用圖像式介面軟體整合噴墨參數及觀察噴塗影像。系統外觀 MicroFab Jetlab 4 如章節 1.3.1 圖 1-6 所示。以下進一步說明儀器規格及使用原則：

噴墨模組

噴墨模組是由兩個噴頭、波形產生器以及背壓控制器所組成。噴頭使用型號為 MJ-AT50，此型號的噴嘴孔內徑直徑為 50 μm 。墨水會從墨水儲存槽(玻璃製樣品瓶)經由鐵氟龍管連接至噴頭，此種噴頭是由玻璃材質製成的毛細管嵌在圓柱型金屬管內，前段由金屬包覆保護，中段由壓電驅動器所包圍，末端段露出約 5 mm 長的玻璃噴嘴，特別注意末端段容易受外力撞擊而斷裂，也因末端段噴嘴孔徑小，要小心外界異物汙染或阻塞，因此在操作以及清潔時須格外謹慎。

在墨水使用上，則須注意墨水黏度不可大於 50 cp，不可使用過於濃稠的液體；墨水配製方法若是藉由溶劑來懸浮顆粒，則需要注意墨水中懸浮粒子大小及穩定性，以及粒子在溶劑中是否有聚集現象(Aggregation)也要謹慎考慮，以免過大的顆粒阻塞噴頭。接著藉由波形產生器參數的調整以及背壓的控制，形成穩定的微小液滴。噴頭的尺寸極小，毛細現象(Capillary)明顯，此時墨水會從噴頭尖端流出，因此需提供負壓力，將墨水倒抽，使墨水得以受到控制，維持在尖端而不溢出；

而波形的調整將於稍後作說明。



觀測設備與移動平台

在操作過程中，機台其中一個 CCD 鏡頭專門用來觀察噴頭噴出後的小液滴落至移動平台間的過程，利用閃頻器的高功率 LED 作為照相光源，藉由亮暗間隔達到快速曝光以擷取影像，設定閃頻器亮暗的頻率，搭配液滴形成的頻率，當兩頻率相同就能捕捉到液滴的動態影像，藉由這影像來確定液滴的狀態和穩定度，確認是否有衛星點(Satellite)產生，落下過程是垂直落下或歪斜，液滴有無多顆不穩定形成的情況，若遇到上述問題，可透過微調電壓波形、調整背壓大小和改變噴頭表面的濕潤狀態來調整液滴的狀態。除此之外，亦可透過軟體設定的功能，搭配 CCD 鏡頭的影像藉由推算畫素來分析液滴大小和飛行速度，由於影像擷取分析計算液滴與鏡頭的解析度密切相關，因此不可任意更換 CCD 鏡頭，以免造成估算錯誤。

由於在噴印圖形時，為了維持液滴的穩定，噴頭須固定不動，因此系統利用線性移動平台可精準移動的特性來完成噴印。移動平台在噴印圖形時，主要是沿著兩條線性軸方向移動，重複精度可達 $\pm 20 \mu\text{m}$ ，噴頭相對平台坐標可以由內建程式控制與紀錄。噴塗圖樣可藉由本系統程式語言語法或是製作 bitmap 圖片檔(.bmp)與簡易指令，即可透過該軟體控制平台移動速度與方向，進而畫出特定圖樣。

軟體操作

軟體的用途是整合噴墨系統各元件，使各元件能夠互相配合來達到墨滴穩定及噴塗圖形完整性。因此在操作機台時，如何操作軟體內程式的各項指令，也屬



於噴墨技術的重要部分。

主程式中有下列幾項主要標籤：Jet Setup、Motion、Calibrations、Print Patterns 和 Print，每個標籤有其主要用途，以下就使用到的標籤，逐一介紹。Jet Setup 標籤中，主要是設定電壓波形，用以形成穩定的液滴，利用改變 Jet Setup 標籤下方各波形參數：Rise Time、Dwell Time、Fall Time、Echo Time、Dwell Voltage 和 Echo Voltage 的數值，改變電壓波形(圖 2-1 紅色方框處)，並且調整合適的背壓，產生穩定的液滴，這時依照實驗噴塗指令設定來反推噴墨頻率(Frequency)，藉此可以觀察在噴塗過程中液滴狀態。接著利用 Drop Analysis(圖 2-1 藍色方框處)來獲得液體直徑、液滴體積和飛行速度等資訊。

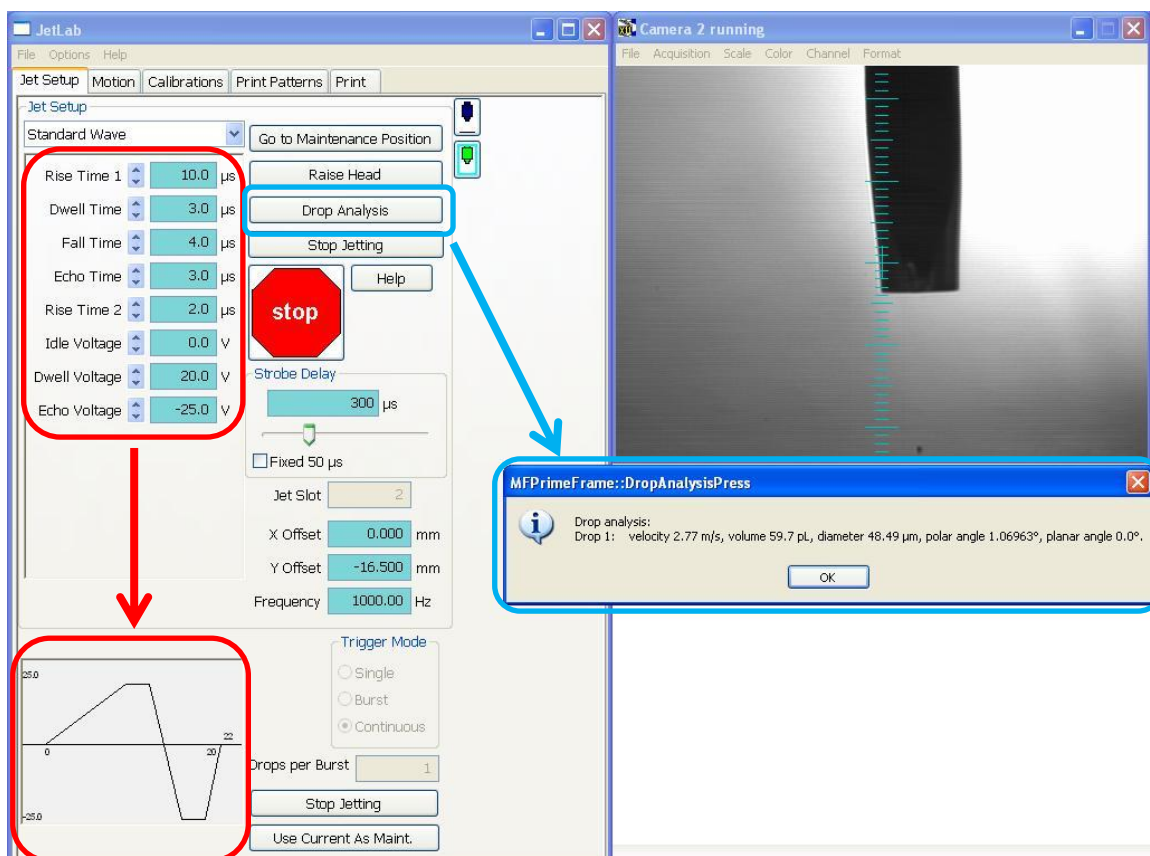


圖 2-1 利用軟體中 Jet Setup 頁面，觀察液滴形成並分析其液滴物理性質

因本實驗的感測器製作方法是採用逐層沈積方法 (Layer-by-layer, LBL)，因此要準確地將葡萄糖氧化酶準確沉積在普魯士藍碳膠電極上，並且繪製出特定圖樣，就必須得知電極於移動平台上的座標，利用 Motion 的功能(圖 2-2)搭配觀測平台表面的 CCD 鏡頭可取得電極座標位置，按下 Motion 標籤中的 Joystick ON 會跳出控制視窗(圖 2-2 紅色方框處)，並利用此視窗來控制移動平台尋找碳電極，等到 CCD 鏡頭捕捉到的畫面位置確定，按下 Move to Crosshair 讓噴頭移動到 CCD 鏡頭的位置(圖 2-2 藍色方框處)，並從視窗中間上方的數據中，可以讀取到坐標(圖 2-2 綠色方框處)，將坐標紀錄下來，待稍後噴塗時輸入位置。

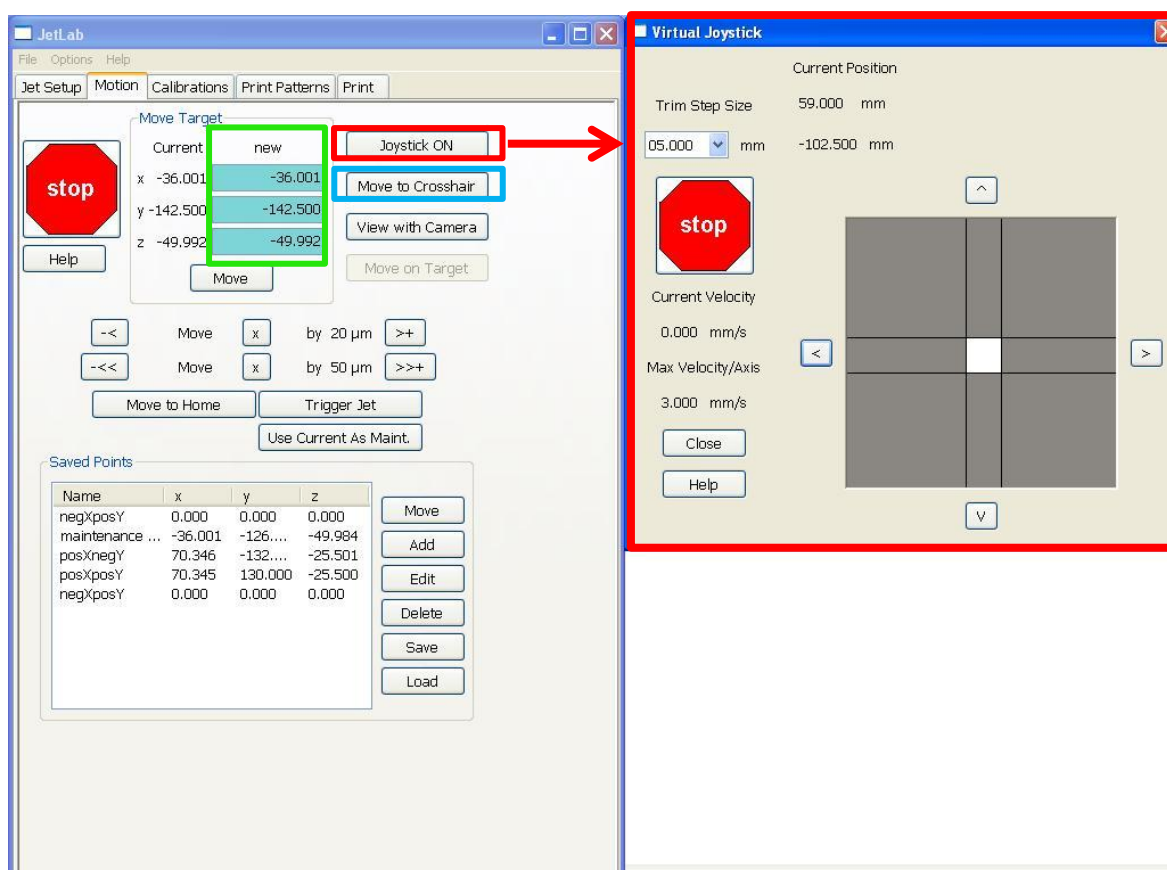
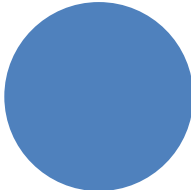


圖 2-2 利用軟體中 Motion 頁面，決定噴塗位置

在噴塗時，將畫面切換到 Print 標籤下(圖 2-3)，可以指定內建指令或是外部自行撰寫指令來噴塗圖樣。使用內建指令，只需要挑選特定的指令，輸入點距、點數等參數，即可開始噴塗。若使用外部撰寫指令，如同本實驗所使用之方法，則


須依相關格式在文字檔(.txt)檔案內輸入噴塗參數，如下所示，右上方為該指令預期噴塗圖形的示意圖。以下為圓形圖樣噴塗指令：

<pre>Circle set fly on 3.0 beginpolycurve 1 0.05 0.0 0.05 1 0 0.0 0.0 360.0 0.0 2.5 endpolycurve ;beginpolycurve <type> <step> <angle> <margin> <option1> <option2> ;<x1> <y1> <phirange> <xc> <yc> <eccentricity> <majorangle> <pendown></pre>	噴塗示意圖： 
---	---

指令內使用的單位為公釐

指令檔案中，若欲修改點距則更改指令中對應<step>的值，若欲調整半徑則調整指令中對應<yc>的值。

以下為直線圖樣噴塗指令：

<pre>Shapes beyond line and rectangles set fly on 3.0 0 moveto 0 0 select 2 array 0.05 100 0 1 0 1 ;array <step> <points> <linedistance> <lines> <angle> <function></pre>	噴塗示意圖： 
---	--

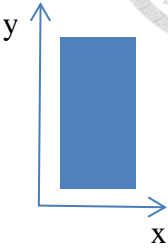
指令內使用的單位為公釐

指令檔案中，若欲修改點距則更改指令中對應<step>的值，若欲調整直線長度則調整指令中噴塗點數，噴塗點數對應<points>的值，則噴塗出的直線為 $0.05 \times 100 = 5$ mm，修改對應<angle>的值則可旋轉該直線。

以下為方形矩陣圖樣噴塗指令：

```
Shapes beyond line and rectangles
set fly on 3.0 0
moveto 0 0
select 2
array 0.05 20 0.05 40 0 1
;array <step> <points> <linedistance> <lines> <angle> <function>
```

噴塗示意圖：



令內使用的單位為公釐

指令檔案中，點距與線距設為相同，可藉由更改指令中對應<step>與<linedistance>的值，若欲調整 x 方向長度則調整指令中噴塗點數，噴塗點數對應<points>的值，則噴塗出的 x 方向直線長度為 $0.05 \times 20 = 1 \text{ mm}$ ；然而若欲調整 y 方向長度則調整指令中噴塗線數，噴塗線數對應<lines>的值，則噴塗出的 y 軸寬度為 $0.05 \times 40 = 2 \text{ mm}$ 。

將指令寫好後，存為文字檔(.txt)，並進入軟體中，將 Print 標籤內之下拉式選單展開並選取 External File(圖 2-3 箭頭指向)，並找到文字檔的路徑，將其載入即可按下 Start 開始噴塗程序(圖 2-3 紅色方框處)。

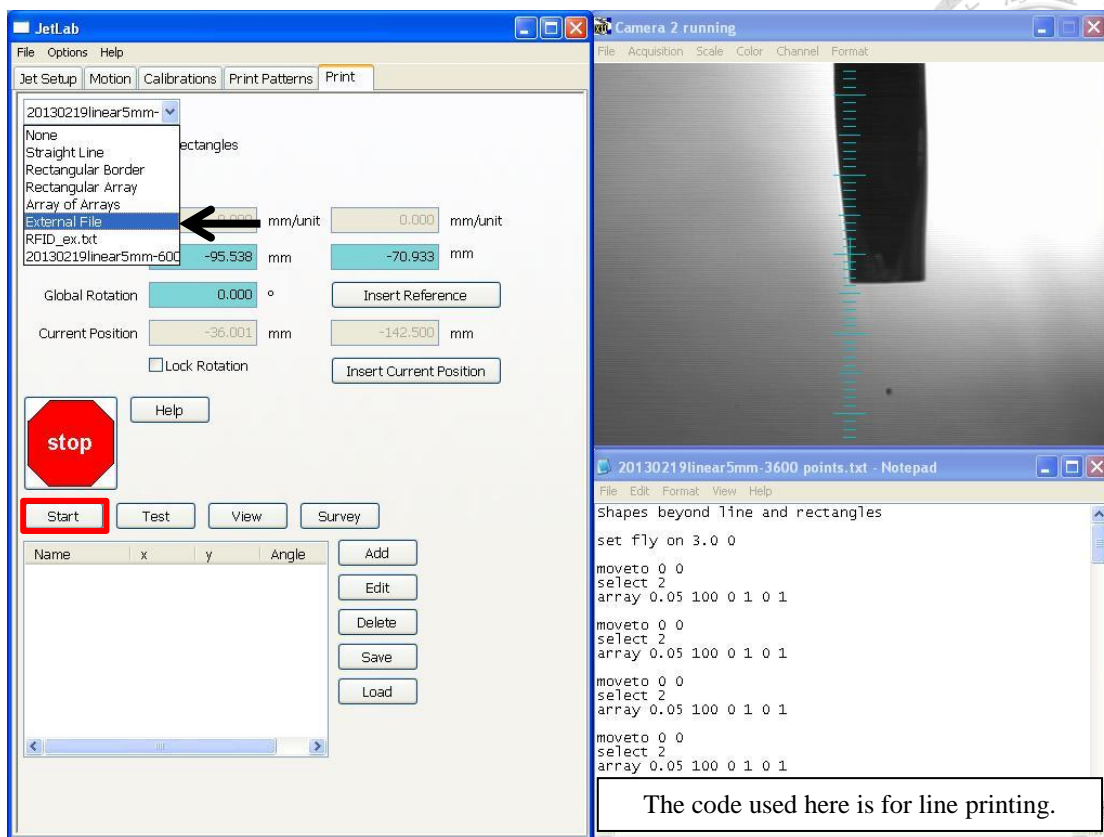


圖 2-3 利用軟體中 Print 頁面，設定噴塗圖樣



2.5 自製工作電極電化學表現測試

2.5.1 磷酸緩衝水溶液

- i. 利用分析天平秤取磷酸二氫鉀(KH_2PO_4) 15.7786 g，氯化鉀(KCl) 20.2210 g 以及氫氧化鉀(KOH) 5.1127 g，重量百分比約為 3 : 4 : 1。
- ii. 放入 500 mL 容量瓶中，加入去離子水至標線，確認固態溶質完全溶解。
- iii. 轉置入樣品瓶中後，利用 0.25 M 氫氧化鉀溶液調整 pH 值，調整 pH 值至 7 左右。
- iv. 配置完磷酸緩衝水溶液，存放至 4 °C 冰箱中儲存。
- v. 在使用前取出，達到室溫後使用。

2.5.2 葡萄糖水溶液

- i. 取 10.1655 克葡萄糖，置入 500 毫升容量瓶，加去離子水至標線。得 112.95 mM 之葡萄糖水溶液。
- ii. 為了使用較小濃度的葡萄糖水溶液，進行電極的電化學表現，因此取其中 100 毫升稀釋至 500 毫升，得 22.59 mM 之葡萄糖水溶液。待電化學測量計時安培法時使用。

2.5.3 過氧化氫水溶液

- i. 取過氧化氫 6.9091 克，置入樣品瓶中，加入 100 毫升去離子水，均勻混合可得約 2 M 之過氧化氫水溶液。
- ii. 取上述 2 M 過氧化氫水溶液一毫升，放入另一樣品瓶中，加入 100 毫升去離子水稀釋，均勻混合可得約 20 mM 之過氧化氫水溶液。



2.5.4 尿酸水溶液

- i. 取 0.1712 克尿酸，置入 50 毫升容量瓶中，加去離子水至標線。
- ii. 然而，因尿酸在 20 °C 微溶於水，溶解度約為 60 mg/L，因此本步驟所配得的尿酸水溶液為飽和溶液，其濃度為 0.36 mM。

2.5.5 維生素 C 溶液

- i. 取 0.1803 克維生素 C，置入 50 毫升容量瓶中，加去離子水至標線。
- ii. 可得 20.5 mM 維生素 C 水溶液。



2.5.6 電化學分析

三電極系統

本實驗中電化學分析皆使用三電極系統，工作電極(Working electrode)使用自製工作電極，對電極(Counter electrode)使用白金(鉑、Pt)線，而參考電極(Reference electrode)使用 Ag/AgCl (3 M NaCl)，電解液(Electrolyte)則是使用磷酸緩衝溶液來固定操作環境之 pH 值。工作電極為了固定反應範圍，需使用絕緣膠帶將未修飾的碳膠區域蓋住，避免其他副反應干擾訊號。

恆電位儀

由於本實驗使用的電化學儀器 Reference 3000 (Gamry instruments, US) 非常靈敏，一旦有搬動或是溫度變化太大都會造成測量不準確，因此使用前須先使用校正工具(Dummy cell)，搭配軟體內所附的校正軟體來校正儀器，校正完成之後務必將地線確實接地。

在使用時，將顏色相近的接頭接在一起如圖 2-4，將藍綠色系的連接到三電極系統中的工作電極，紅橘色系的接線連接到對電極，白色的接頭接到參考電極。電化學分析進行的過程中，須確保參考電極底部和工作電極修飾表面須完全浸泡於電解液中。

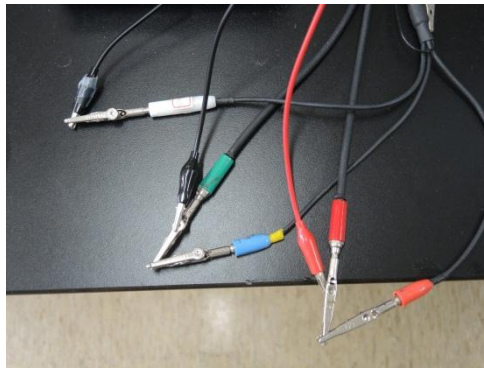


圖 2-4 電化學儀器 Gamry 電線接線方法

循環伏安法

將磷酸緩衝溶液從冷藏庫中取出，靜置三十分鐘，待磷酸緩衝溶液升至室溫，利用 0.45 微米針式過濾頭過濾磷酸緩衝溶液，過濾其中雜質，取 20 毫升磷酸緩衝溶液放入 50 毫升規格燒杯中，設定攪拌子轉速為 450 rpm，攪拌子長 2 公分、直徑約 0.55 公分。架好參考電極、對電極及工作電極，使其三電極皆能避開攪拌子，且三電極互不接觸。系統架設好後，利用電化學軟體，進行循環伏安法(Cyclic voltammetry)，設定掃描的電壓範圍，訂為 400 mV 至 -200 mV，掃描圈數訂為三圈。

計時安培法

攪拌子持續攪拌，開啟軟體計時安培法(Chronoamperometry)功能，設定電壓訂在 -0.1 V，避免在一開始因為過電位太高，而影響訊號真實性，因此先預掃約兩百秒，待訊號穩定，且背景訊號維持在 1 uA 以下，才進行正式的計時安培法。計時安培法同樣定電壓在 -0.1 V，每一百秒加入定量、定濃度的葡萄糖溶液(或尿酸溶液、過氧化氫溶液等待測物質溶液)。實驗設計為每一百秒加入 500 uL、22.59 mM 葡萄糖溶液。


第三章 利用噴墨製程之葡萄糖感測器表現



3.1 感測器結構介紹

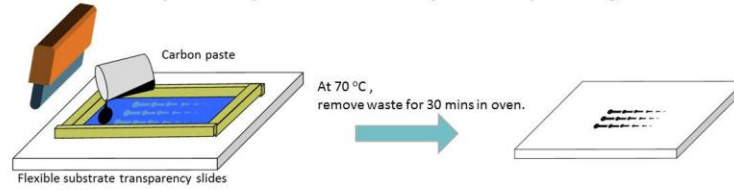
3.1.1 感測器表面結構

本實驗採用逐層堆疊(Layer-by-layer)的方式製作生物感測器工作電極，利用各式塗佈方式，將許多不同材料依序堆疊而製成感測器，本實驗堆疊方法與流程如圖3-1，依照此特定噴塗程序製成本實驗工作電極。最底部支持的骨架為透明膠片，以聚對苯二甲酸乙二酯(Polyethylene Terephthalate, PET)材料製成，選用此膠片作為基材，是因為其可彎曲、高韌性的特性，此膠片可加熱至約 160 °C 且不形變，這些高耐受度的特性，適合用來作為基板，進行後續加工。在 PET 上，網刷碳膠做為電極導電層，負責導電並且傳遞電極表面物質因反應而產生的電流訊號，此碳膠電極在網印、烘乾後，測量得到片電阻約為 20-30 Ω/\square 。接著本實驗使用許多種塗佈方式沉積普魯士藍層，如：噴墨技術、針筆繪製、點膠機噴塗，由於普魯士藍墨水溶液穩定性不佳，靜置一段時間後，形成大顆粒聚集，因而不適用噴墨技術中，然而針筆繪製方法需要針筆的金屬套管與碳膠表面接觸，會將碳膠表面刮出刻痕，且此法以手工控制力道與移動速度，不易統一每次工作電極的品質，因此本研究選擇點膠機噴塗，一方面因為此方法可使用粒子粒徑較大的墨水，無須擔心阻塞噴頭，另一方面此方法可藉由設定出墨時間與壓力，統一操作方法，藉此使每次工作電極品質趨於一致。葡萄糖氧化酶酵素層則使用噴墨技術噴塗，因為此一酵素層是扮演感測葡萄糖的重要材料，因此需要精準掌握其葡萄糖氧化酶的墨水量與噴墨位置，以便後續探討沉積在電極上的墨水含量與訊號的關係，更因葡萄糖氧化酶此一材料較稀少且昂貴，因此使用噴墨技術可有效且準確地應用此墨水，成本的考量也是在製程上不可忽略的一環。最後固定層利用浸製塗佈，

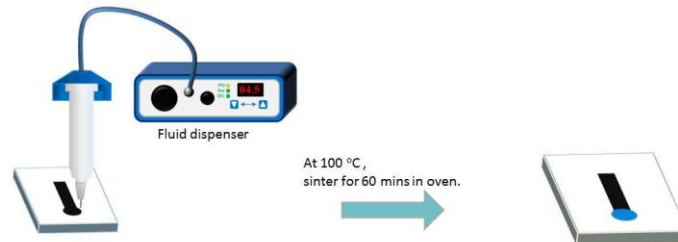


使用石蠟作為酵素固定層，關於酵素固定下段會再做詳細的實驗結果說明。在這四步驟層層堆疊後，可見圖 3-2，分別為每一層堆疊材料的光學顯微鏡圖與電子顯微鏡圖(Scanning Electron Microscope, SEM 圖)，圖 3-2(a)中，為碳膠電極表面微觀的表面型態，可從 SEM 圖中看出，碳膠表面並不平坦，為一片片的碳膠混摻著黏接劑(Binder)，構成碳膠表面高低起伏、且有孔洞存在的片狀結構；接著，將普魯士藍層沉積上去後，可見圖 3-2(b)，原本碳膠表面的片狀、孔洞結構被普魯士藍給填滿，圖中可看到些微的碳膠片狀外觀，以及較小的孔洞，表面整體而言比純碳膠的表面平坦；最後利用噴墨將葡萄糖氧化酶沉積在普魯士藍上層，可由圖 3-2(c)看出在原本的表面上，有些許亮點，那些亮點的位置為葡萄糖氧化酶經由噴塗，沉積普魯士藍的狀況。

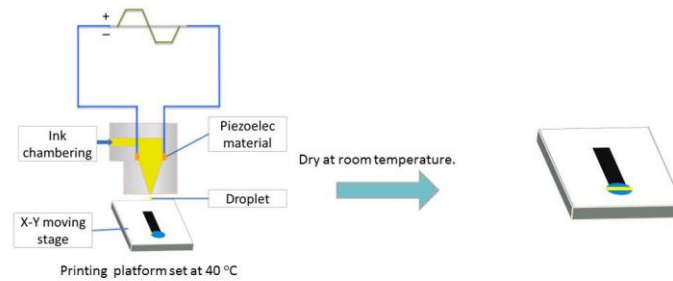
1. Carbon paste layer fabricated by screen printing



2. Prussian blue layer deposited by fluid dispenser



3. Glucose oxidase layer deposited by inkjet printing



4. Paraffin wax layer deposited by dip coating

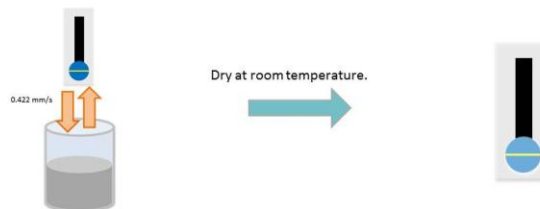


圖 3-1 製作葡萄糖感測器之流程示意圖

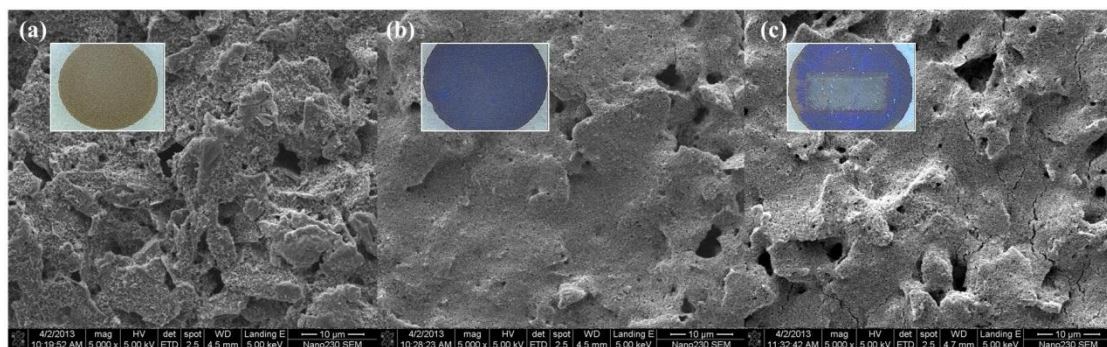


圖 3-2 製作完成之電極表面電子顯微鏡與光學顯微鏡圖(左上角)：(a) 碳膠電極表面(SPCE)；(b) 普魯士藍修飾電極表面(PB/SPCE)；(c) 葡萄糖氧化酶普魯士藍修飾電極(GOx/PB/SPCE)

本生物感測器感測反應機制簡圖可見圖 3-3。外界添加葡萄糖後，酵素層的葡萄糖氧化酶便立即與葡萄糖產生反應，將葡萄糖轉換氧化為葡萄糖酸，水溶液中的氫氧根離子還原為過氧化氫，接著在特定的操作電位下，過氧化氫與普魯士白反應，使過氧化氫還原回氫氧根離子，普魯士白氧化為普魯士藍，最後在工作電極上外加操作電位，可使普魯士藍經電位驅動而還原為普魯士白，因而可再次進行上述的反應，感應環境中葡萄糖的濃度。其中葡萄糖會與氧氣反應氧化為葡萄糖酸，但因本系統所需氧量極少，因此視為氧氣為過量反應物(可見章節 1.5.1)。

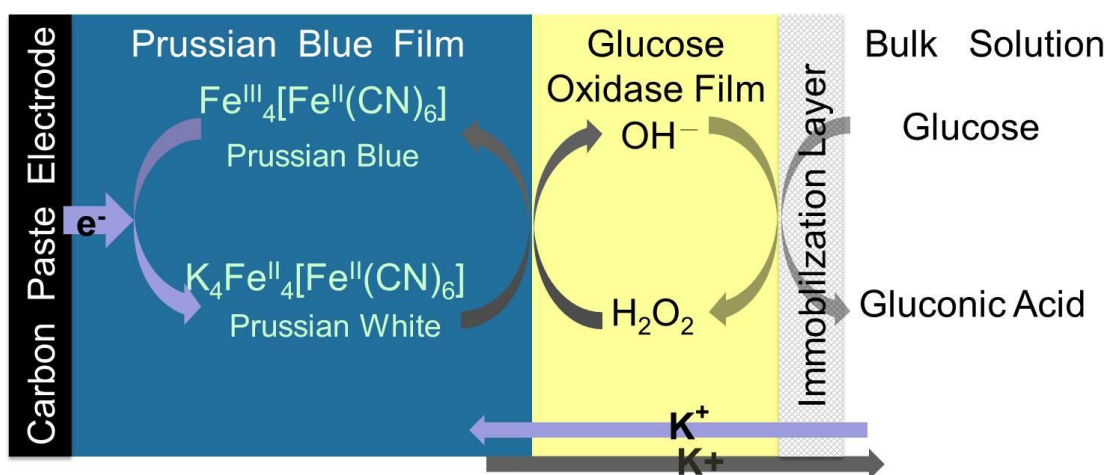


圖 3-3 修飾電極偵測葡萄糖之反應機制示意圖



3.1.2 利用明膠與戊二醛的交聯性質固定葡萄糖氧化酶

在章節 1.5.4 中，討論到葡萄糖氧化酶的固定方式，固定化酵素可提供酵素較佳環境，進而提升酵素活性，因此在製作生物感測器時，勢必要探究如何固定化酵素，以達到有效的感測。為了避免化學方法鍵結降低酵素活性位置，因此搭配噴墨技術的製程，選擇物理方法中的包陷法，利用纖維狀高分子材料固定酵素。文獻中提及因部份明膠碎片利用物理性的交聯，稱為 Physical crosslink，因存在物理性交聯的作用力，使未反應的明膠(Gelatin)在高於 20 °C 以上，才有機會溶於水，然而明膠與戊二醛(Glutaraldehyde, GA)可進行反應，產生化學性的交聯，稱為 Chemical crosslink，這樣的化學性交聯讓明膠不溶於任何溶劑中。戊二醛可視為一種交聯劑(Crosslinker)，戊二醛與蛋白質(如：明膠)的反應是非常複雜的，可簡略呈現如圖 3-4。

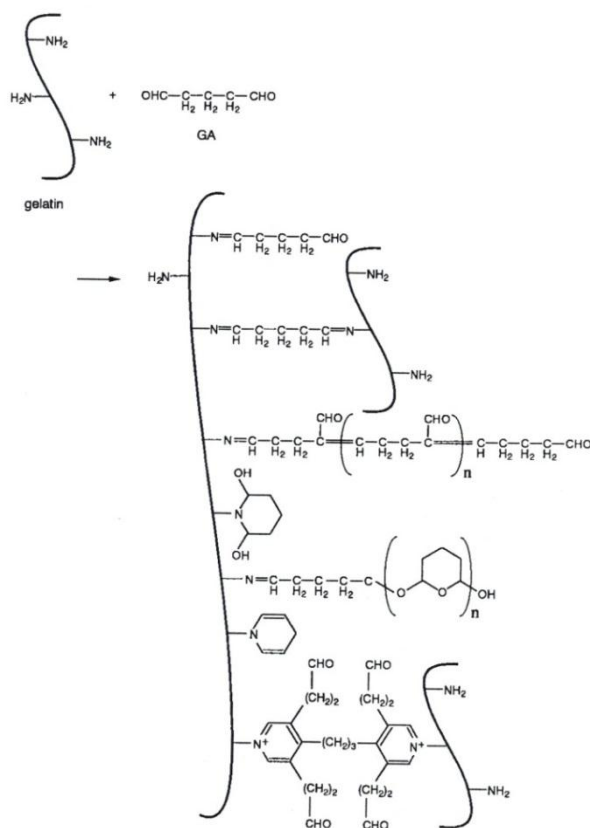


圖 3-4 明膠與戊二醛化學反應式[59]

因此本研究利用明膠與戊二醛可進行化學性交聯的性質，形成不易溶於各式溶劑的高分子，應用於固定酵素上，將明膠混於葡萄糖氧化酶中，利用噴墨製程將葡萄糖氧化酶噴塗於普魯士藍層上，再利用戊二醛水溶液噴塗在該層之上，使其進行化學交聯，進一步固定住葡萄糖氧化酶。其結果可見感測所得到電流對時間的圖，如圖 3-5(a)，可看到在二十秒內，訊號皆快速達穩定，電流訊號成階梯形狀，表示在每次滴入定量、定濃度的葡萄糖水溶液時，葡萄糖氧化酶感應後所產生的過氧化氫，立即擴散到普魯士藍周圍，進行後續氧化還原的反應，傳遞電流。若葡萄糖氧化酶並沒有固定在表面上，則其訊號會成斜直線，電流訊號漸進性的攀升，甚至久久無法達到穩定電流(圖 3-5(b))，因為未固定的葡萄糖氧化酶，分布在環境中，偵測到葡萄糖，立即反應產生的過氧化氫需要一段時間才能擴散到電極表面的普魯士藍上，與之反應。因此從本實驗的圖中可推論，葡萄糖氧化酶固定在電極上，使之感應葡萄糖後，產出的過氧化氫立即擴散到周圍與下層的普魯士藍，產生電流。得到電流對時間的圖之後，將添加的濃度經換算後，與其電流訊號作圖，可得如同圖 3-6 中，一斜直線，並且可判讀其靈敏度(Sensitivity)與線性範圍(Linear range)，圖 3-6 中靈敏度為 $5.51 \mu\text{A}/\text{mM}$ ，除以酵素層圓半徑 0.2 cm 後，得靈敏度通量 $43.85 \mu\text{A}/\text{mM}/\text{cm}^2$ ，線性範圍為 0 mM 至 2.8 mM 。

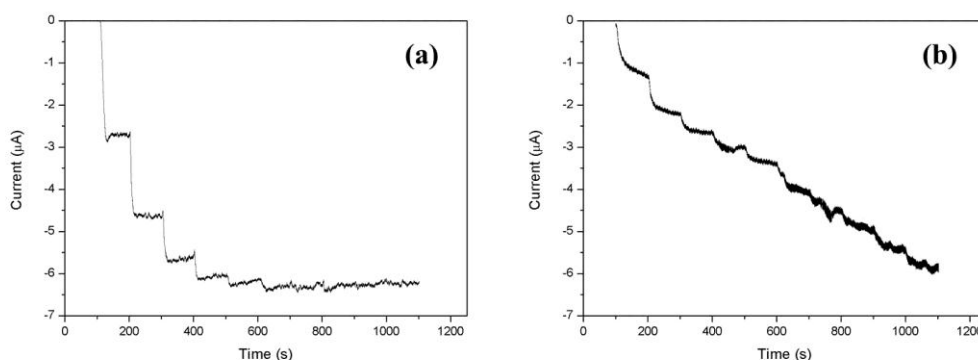


圖 3-5 修飾電極之電流對時間曲線，用以判斷葡萄糖氧化酶固定與否：(a) 葡萄糖氧化酶固定；
(b) 葡萄糖氧化酶未固定

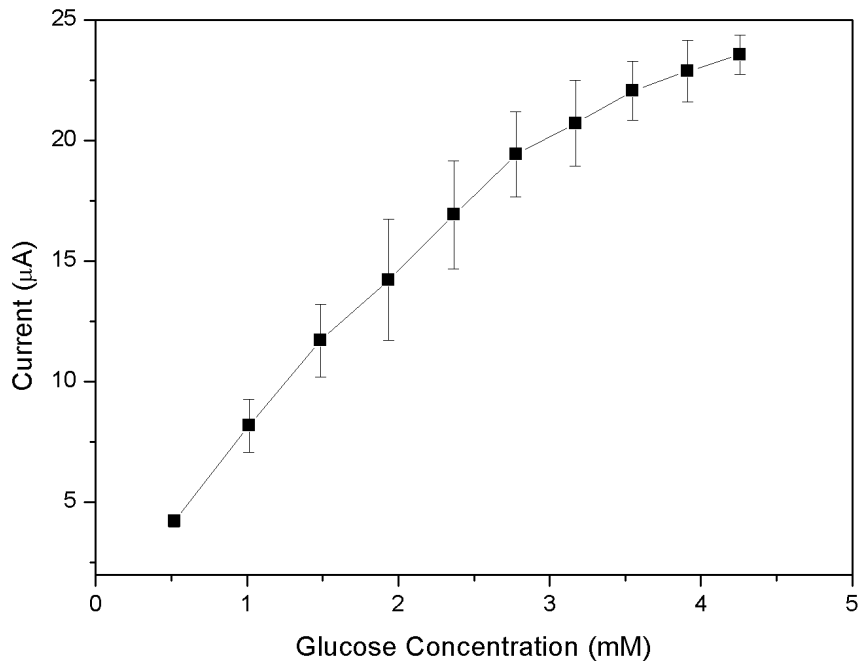


圖 3-6 利用明膠固定葡萄糖氧化酶之修飾電極電流對濃度曲線

材料噴塗的順序也十分重要，在本系統中，嘗試過三種噴墨方式，第一種為葡萄糖氧化酶與戊二醛均勻混合後，沉積在普魯士藍碳膠電極上，再將明膠沉積於其上；第二種將上述兩層物質噴塗順序調換，先噴塗明膠，在沉積葡萄糖氧化酶與戊二醛混合物；另一種則交換戊二醛與明膠的順序，將葡萄糖氧化酶與明膠均勻混合後，沉積於普魯士藍碳膠電極上，再將戊二醛塗佈於電極上，使其進行化學交聯反應。然而進行電化學反應後的結果如圖 3-7。從第一種方法的結果中可見(如圖 3-7(a))，循環伏安法中，可見普魯士藍的氧化與還原峰，表示離子可自由穿梭於明膠層中，普魯士藍順利進行電化學氧化還原反應，然而，計時安培法中，加入葡萄糖卻無法測出電流訊號，此結果表示明膠層過於緊密，葡萄糖無法穿過明膠層與下一層的葡萄糖氧化酶反應；第二種方法中(如圖 3-7(b))，不易讀出普魯士藍的氧化與還原峰，顯示此時離子不易進出電極表面，在計時安培法中，也無法感測到葡萄糖產生的電流訊號，此兩種方法表示明膠的結構較緊密，若噴塗明

膠層時，將明膠層完全覆蓋於電極表面，會形成一緻密的高分子層，阻礙葡萄糖分子或者鉀離子的傳遞。然而在第三種方法中(如圖 3-7(c))，可清楚看見循環伏安法中，普魯士藍的氧化與還原峰，在計時安培法中，可讀到葡萄糖產生的電流訊號，表示明膠與葡萄糖氧化酶噴塗後，再加上交聯劑戊二醛所形成的結構，可使葡萄糖穿過戊二醛與明膠的固定層，進入酵素層中進行反應。由於酵素層是由明膠與葡萄糖氧化酶混合後噴塗於電極上，明膠並未全部覆蓋於電極表面上，而是與葡萄糖氧化酶均勻地散布電極上，因此一方面該層的明膠可與戊二醛交聯固定，利用形成的網格狀結構，將葡萄糖氧化酶固定住，另一方面葡萄糖可穿過交聯層，抵達葡萄糖氧化酶與明膠的混合層，與該層的葡萄糖氧化酶反應，而不會被明膠所構築出的高分子層阻擋，因此可以從圖 3-7(c)下方電流對濃度的圖中，證實此種噴塗方式可行。

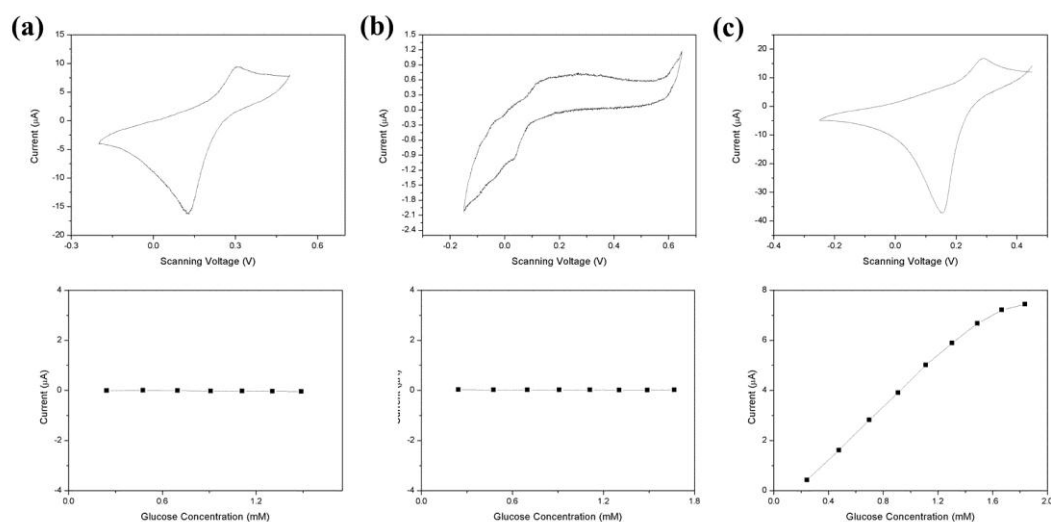


圖 3-7 不同噴塗製程所得電化學結果，上圖為循環伏安圖、下圖為電流對濃度曲線：(a) Gelatin/GOx+GA/PB/SPCE；(b) GOx+GA/Gelatin/PB/SPCE；(c) GA/GOx+Gelatin/PB/SPCE



3.1.3 利用石蠟固定葡萄糖氧化酶

文獻中，利用石蠟(Paraffin wax)固定脲酶(Urease)，因石蠟無毒，因此其在醫療上的用途極廣，因為脲酶是一種可耐高溫(Thermostable)的酵素，溫度高於 80°C 時，才會失去活性，石蠟熔點為 58°C 至 60°C ，因此非常適合利用石蠟來固定[60]；然而，本研究使用的葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase)，葡萄糖氧化酶溫度耐受度較低，其熱轉變溫度(Apparent Transition Temperature)為 54.8°C 至 56.8°C ，一旦超過此溫度，葡萄糖氧化酶便失去活性[31]，因此將石蠟溶於甲苯中，便可在室溫下操作，利用浸製方法將石蠟沉積在電極表面上。下方圖 3-8 為使用石蠟為固定層材料的電流對葡萄糖濃度的結果。圖 3-8 中靈敏度為 $3.19\ \mu\text{A}/\text{mM}$ ，除以酵素層圓半徑 $0.2\ \text{cm}$ 後，可得靈敏度通量 $25.39\ \mu\text{A}/\text{mM}/\text{cm}^2$ ，線性範圍為 $0\ \text{mM}$ 至 $3.6\ \text{mM}$ 。

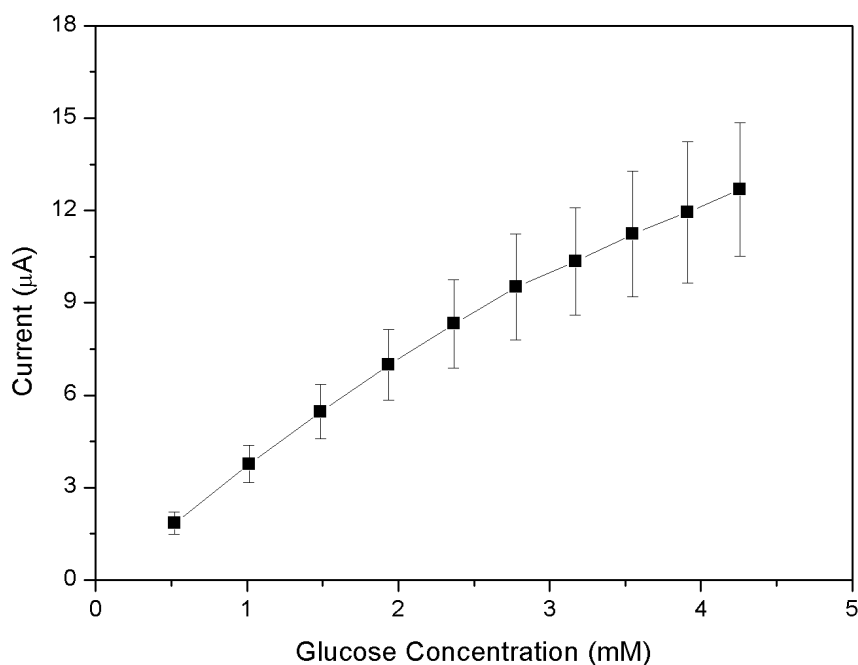


圖 3-8 利用石蠟固定葡萄糖氧化酶之修飾電極電流對濃度曲線



3.1.4 利用醋酸纖維素固定葡萄糖氧化酶

利用另一種高分子纖維—醋酸纖維素(Cellulose Acetate)固定葡萄糖氧化酶。滴醋酸纖維素溶液於製作好的工作電極上，放置在抽風櫥中，常溫乾燥，進行電化學測試，結果如圖 3-9。圖中為電流對時間的訊號結果，可見醋酸纖維素的固定效果不佳，訊號無法迅速地達到穩定平衡，因此醋酸纖維素無法固定葡萄糖氧化酶，無法應用在本系統上。

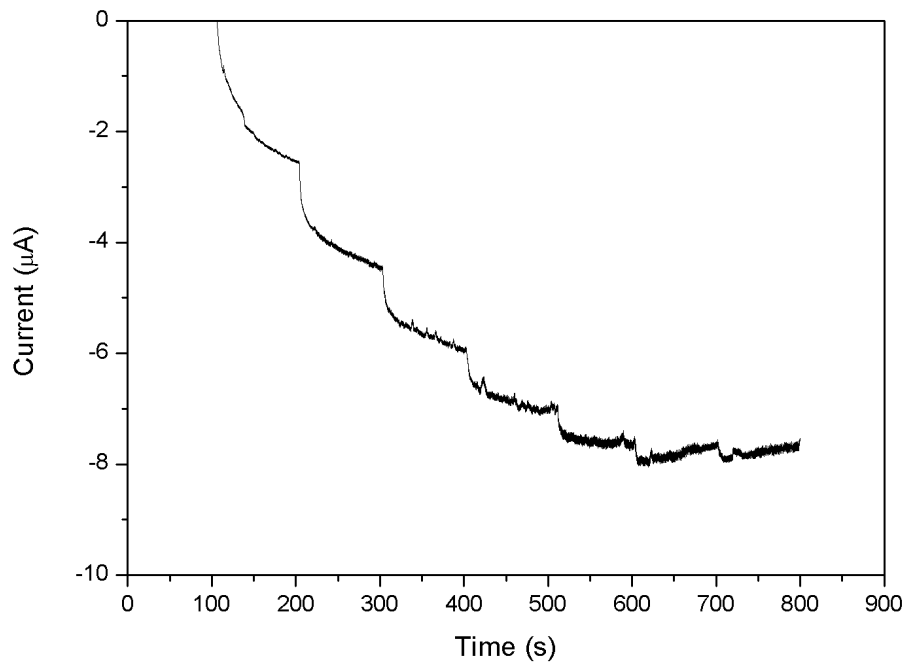


圖 3-9 利用醋酸纖維素固定葡萄糖氧化酶之修飾電極電流對時間曲線

3.2 操作電壓對於葡萄糖氧化酶感測器靈敏度影響探討



電化學所施加的電壓會影響反應進行程度，文獻中提到該系統電壓的影響，當操作電位往負電位移動，系統反應的電流會逐漸增加[61]。這是因為本反應產生的過氧化氫會與普魯士白反應，生成普魯士藍，此時過氧化氫還原為氫氧根離子，而普魯士白氧化為普魯士藍，這時若施加一負電位，則可因電極電子能量提升，使電極易將電子丟出給溶液可接收的物質，因此施加一負電位，電子能量提升，便能驅動普魯士藍還原回普魯士白。所以若電極上所施加的操作電位越往負向移動，則電極上的電子便能提升至更高的能量，有更大的驅動力驅使普魯士藍還原回普魯士白，使中介層—普魯士藍層達到更有效的重複利用。

本研究系統的電流訊號與電壓的關係如圖 3-10，圖中可見當施加的操作電壓越偏負電位，所得到的電流訊號越大，靈敏度越高。然而，操作電位的選擇並非越偏負電位越好，若施加過大的負電，容易造成干擾，使系統中其他電活性物質，受到較大的負電位驅動，而進行反應干擾訊號，因此本系統選擇-100 mV 作為系統操作電壓。

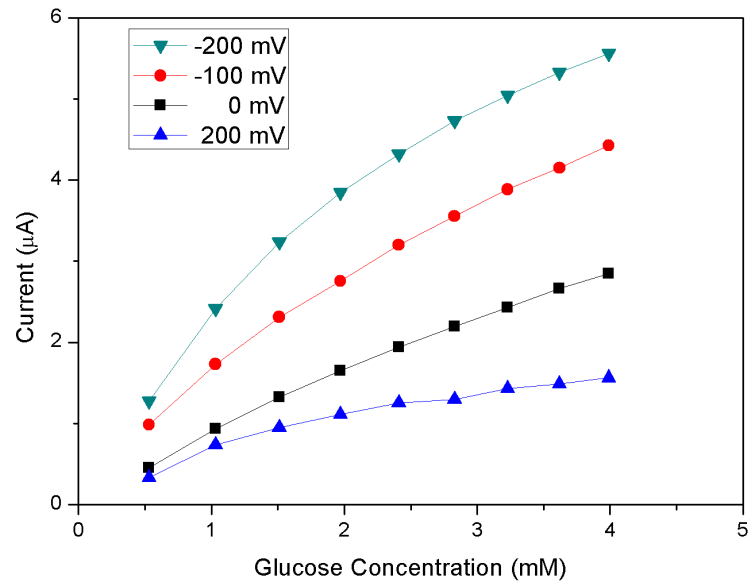


圖 3-10 修飾電極在不同操作電位下，電流對濃度曲線圖



3.3 電解液酸鹼值對於葡萄糖氧化酶感測器靈敏度影響探討

葡萄糖氧化酶為一種酵素，屬於蛋白質組成，各種酵素都有其適合生存的溫度範圍與酸鹼環境，從葡萄糖氧化酶的文獻與物質安全資料表中，記載葡萄糖氧化酶較佳的操作酸鹼環境約為 pH 值適當的作用範圍為 3.5 至 6.5，文獻中說明當 pH 值介於 6.0 至 7.0 時，其可反應活性(maximal activity)約為 95%，然而若 pH 值升至 8.0 時，則該活性則會降至可反應理論活性的 75%。在沒有保護劑的存在下，在過鹼(pH 值>8.0)、過酸(pH 值<3.0)時，會立即失去活性[30]；然而其適合的溫度範圍一般約為 30 至 60 °C。

由於人體血液中的酸鹼值約為 pH 值 7.4，為了先確定電化學測量時的酸鹼值參數對於靈敏度的影響，以便設定系統 pH 值，本研究探討 pH 值 6.5 與 pH 值 7.4 此兩種酸鹼環境，選擇此兩種酸鹼值是因為葡萄糖氧化酶在 pH 值 6.5 時，活性最大，而以人體血液中酸鹼值約為 pH 值 7.4 為依據，因此本研究做了溶液酸鹼值與操作電位，對於訊號強弱的實驗。由圖 3-11 中，可觀察在弱酸的環境下(pH 值 6.53)的環境下與在中性偏鹼(pH 值 7.4)的環境下，其電極靈敏度的表現差不多，可觀察在弱酸的環境下，其線性表現較中性偏鹼的環境下稍好，但溶液的酸鹼度對訊號靈敏度的強弱無明顯提升。反倒是操作電位對於訊號靈敏度的提升更為顯著。因為在此兩種酸鹼環境下，訊號差異不大，因此本研究的電化學實驗電解質溶液，選擇仿人體血液的酸鹼值環境，將電解液的酸鹼值設定在 pH 值約 7.4。

操作電位在前一小節討論過，當施加的電位越偏負電位，訊號靈敏度越強，從圖中也可證實，不論酸鹼環境，只要施加電位為-200 mV 的電極，其訊號強度的

表現都會比施加電位為-100 mV 的電極靈敏度表現還好，但受限於樣品中干擾物質的電活性，所施加的電位還是控制在-100 mV 為佳。

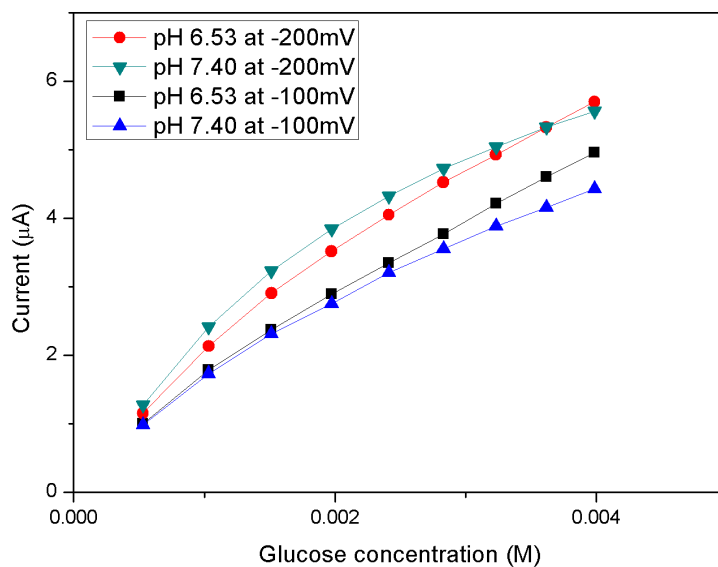


圖 3-11 修飾電極在不同操作電位和不同酸鹼值的電解質下，電流對濃度曲線圖




3.4 干擾測試

確定製作出來的工作電極可順利感應葡萄糖，並且將葡萄糖氧化酶固定於表面上，找到系統較佳的操作參數—操作電位與系統酸鹼值後，接著若要確定本系統可實際應用在血糖測量上，則必須要進行生物感測器干擾測試，進行干擾測試的目的是要確定該電極是否具有選擇性(Selectivity)，因為所有偵測的樣品中，不只存在待測物質—葡萄糖，同時也會存在其他干擾物質，因此進行干擾測試，目的是要確定這些干擾物質是否會與系統進行反應，與葡萄糖同時反應產生電流，形成訊號的干擾。

從文獻中得知削弱干擾物質產生電流訊號的方法，可以藉由塗佈上一層具有選擇性滲透的薄膜，經由不同高分子結構、多層結構或混合層的結構，利用該層結構對於電性、分子大小、分子極性的選擇性，將易於反應的共存電活性化合物阻隔於電極之外；另一種方法則是藉由調整適當的操作電位，針對過氧化氫的系統，若將電位設定在+0.0 V 至-0.20V(vs Ag/AgCl)，則可消除易氧化的干擾物質反應[5]。另一文獻中，進行實驗發現，維生素 C 在正電位下會進行氧化反應，產生電流訊號，因此若將電位設定在 0.0 V 以下，便可避免維生素 C 的氧化干擾[56]。因此考量章節 3.2 中針對操作電位的實驗結果，施加負電位對於系統反應訊號較佳，以及文獻中藉由調整電位，避免過大的正電位或負電位，可避開干擾物質的反應，將操作電位訂在-0.1 V，進行干擾測試。

在系統中，測試尿酸(Uric acid)與維生素 C(L-Ascorbic acid)在與葡萄糖共存時，是否會影響訊號大小，因此實驗藉由不同時間下，分別加入待測物或干擾物質，觀察訊號是否有變動。圖 3-12 設定操作電位為+160 mV，由圖中可見，加入葡萄糖水溶液時，訊號都有明顯的階梯狀改變，然而當尿酸加入系統中，訊號完全沒



有改變；加入維生素 C 時，訊號有小幅度的提升，然而到達穩定時，維生素 C 所產生的訊號量約是葡萄糖所產生訊號量的三分之一倍。接著改變操作電位至 -100 mV，由圖 3-13 可見訊號變化與前者類似，然而由於電極製作方式不完全相同，前者使用噴墨技術刷製普魯士藍層，後者使用點膠製程沉積普魯士藍層，所產生的訊號大小不全相同，且後者的訊號較小、雜訊起伏較大，但可見其訊號皆隨著葡萄糖的加入而改變，而當系統加入尿酸時，訊號變化不大、甚至無訊號變化，若加入維生素 C，則會有小幅度的訊號提升，訊號改變皆小於葡萄糖訊號量的一半。因此可知本系統對於葡萄糖的選擇性佳，系統在特定電位條件下，不會受其他干擾物質影響。

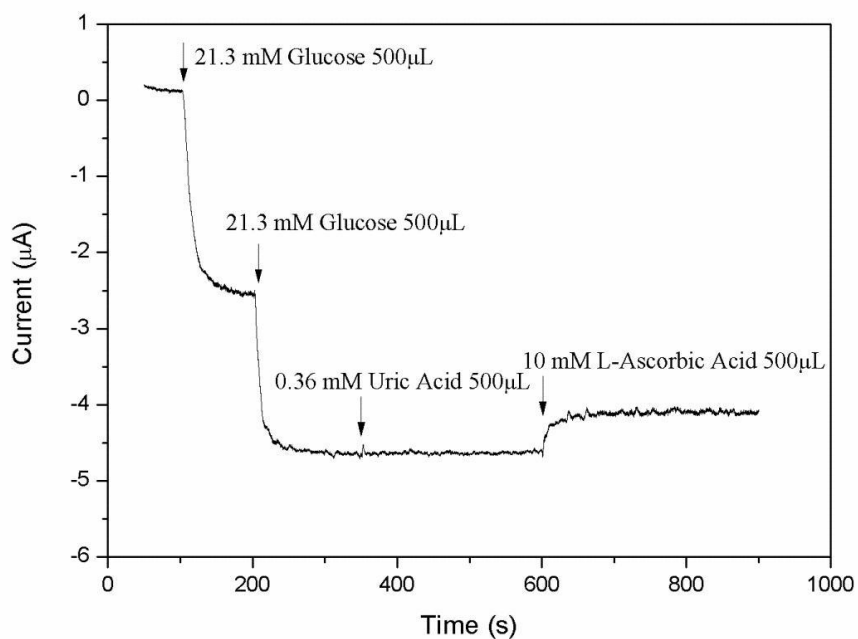


圖 3-12 干擾測試：修飾電極 Wax/GOx/PB/SPCE 在操作電位+0.16 V 時，加入葡萄糖(Glucose)、尿酸(Uric acid)、維生素 C(L-Ascorbic acid)之電流對時間曲線

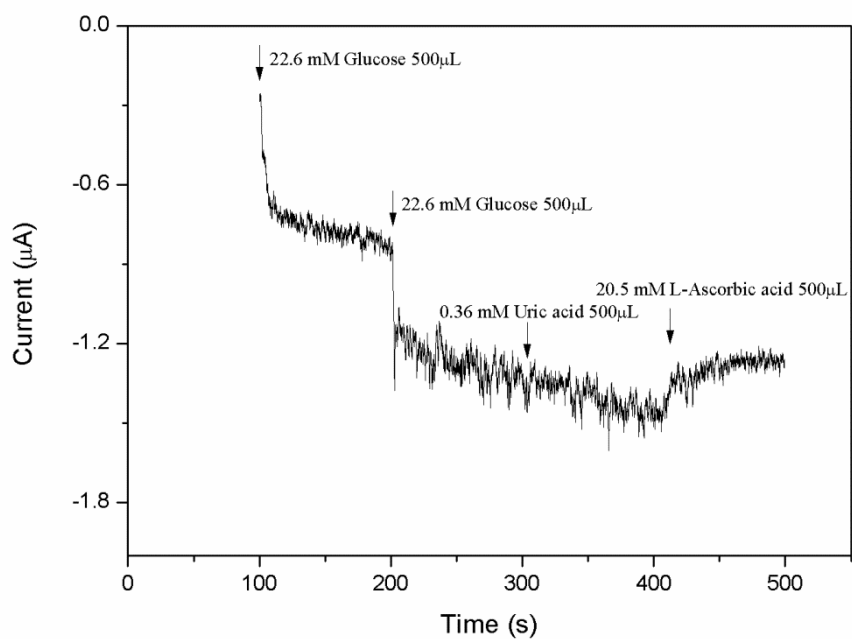


圖 3-13 干擾測試：修飾電極 Wax/GOx/PB/SPCE 在操作電位-0.10 V 時，加入葡萄糖(Glucose)、尿酸(Uric acid)、維生素 C(L-Ascorbic acid)之電流對時間曲線



第四章 改變噴墨參數對葡萄糖感測器靈敏度之探討

4.1 噴塗參數對於沉積葡萄糖氧化酶於感測器表面之探討

應用噴墨技術沉積材料時，有許多噴塗參數會影響著噴墨的品質以及噴塗出來的感測器訊號表現。以下就噴墨速度、噴墨基板溫度以及噴塗材料之層數逐一討論。

4.1.1 噴墨速度對感測器表面樣態之影響

噴塗參數中，噴墨沉積上的物質是否平整，與噴墨的速度、基材表面的粗糙度有很大的關係，墨水—基材間的接觸角度也會對噴墨成果造成很大的影響。若將葡萄糖氧化酶直接噴塗在碳膠表面上，從光學顯微鏡下可看到一層白色的氧化酶薄層，如圖 4-1(a)；然而將葡萄糖氧化酶噴塗在普魯士藍碳膠電極表面上，從圖 4-1(b)，可見表面白色圖樣分布不均，推測因為顆粒乾燥速度較慢，而噴墨速度又過快(30 mm/s)，又因為普魯士藍層表面親水性較碳膠層好，液滴噴塗在普魯士藍層，較易向外擴散，與周圍的液滴聚集，造成液滴在表面形成液膜，因此造成乾燥過程中，表面產生流體流動，造成表面葡萄糖氧化酶沉積不均勻。因此調整噴墨速度為 8 mm/s 後，減緩噴墨速度，使得每次噴塗的液滴乾燥後，才噴下一滴墨水，避免液滴聚集產生不均勻現象，所得的結果可見圖 4-1(c)，可觀察到其表面較為均勻。



圖 4-1 修飾電極之光學顯微鏡圖：(a) 葡萄糖氧化酶以 30 mm/s 噴墨速率噴塗在碳膠電極上；(b) 葡萄糖氧化酶以 30 mm/s 噴墨速率噴塗在普魯士藍碳膠電極上；(c) 葡萄糖氧化酶以 8 mm/s 噴墨速率噴塗在普魯士藍碳膠電極上



4.1.2 噴墨基板溫度對感測器表面樣態與電化學表現之影響

除了配合液滴乾燥速度、基材親疏水性，改變噴墨速度之外，也可以藉由提高基材表面的溫度，增加液滴的乾燥、揮發速度，因為液滴乾燥速度較快，液滴降落到表面沉積後，溶劑揮發、溶質乾燥沉積在該點，使噴塗的圖樣更均勻，也能更如實的呈現出噴墨指令設定的圖樣，如圖 4-2 中可見，在不同溫度下噴塗直線狀的葡萄糖氧化酶於普魯士藍上，可清楚觀察到圖 4-2(a)中，在室溫下(約 22 °C)噴塗直線，可以發現線寬不均勻，右側線寬較左側為寬，然而，在圖 4-2(b)到圖 4-2(d)中則可以看到若將噴墨儀器的實驗操作平台溫度上升，高於 40 °C，便可得較平直的直線，且邊界筆直，改善室溫下噴塗而得曲折的邊界。但是溫度最適當的操作溫度應該如何設定，則需要評估電化學測試的結果而定。

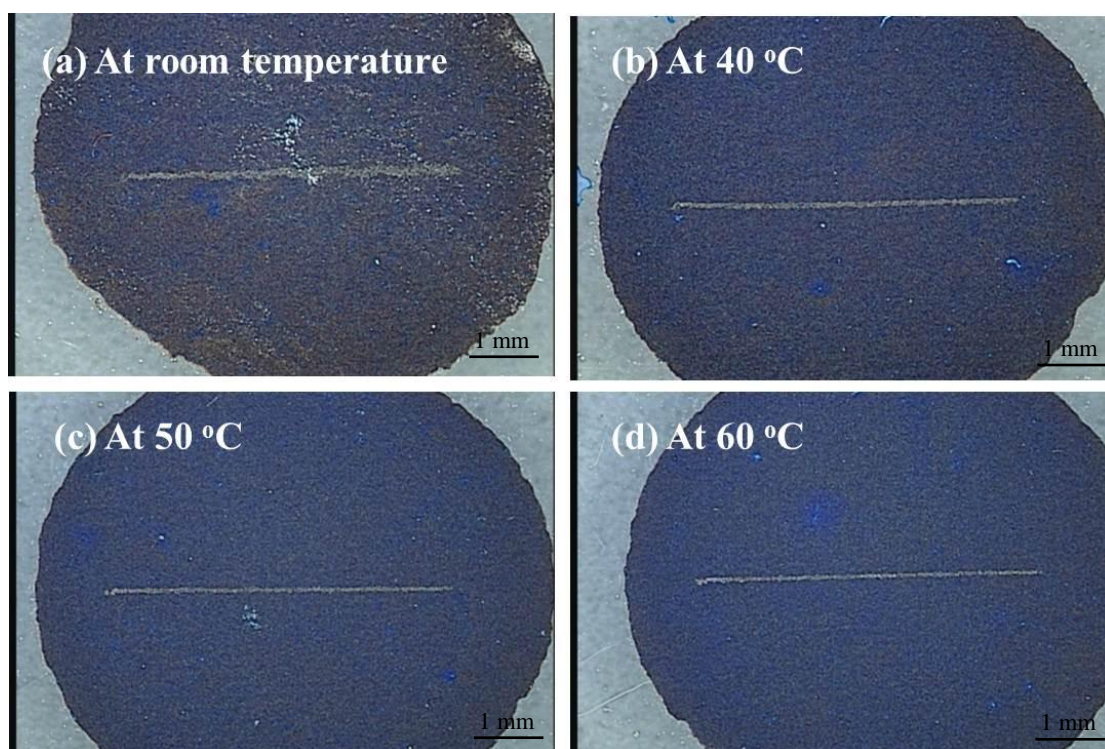


圖 4-2 在不同的基板溫度下，修飾葡萄糖氧化酶於電極表面之光學顯微鏡圖：(a) 室溫下；(b) 於 40 °C 下；(c) 於 50 °C 下；(d) 於 60 °C 下噴塗

接著，進行電化學測試，對照其電化學測定後的結果，計時安培法經換算後得到電流對濃度的結果如圖 4-3，與室溫為基準比較，發現當溫度提升越高，高於 50 °C 時，訊號量大幅下降，這是因為葡萄糖氧化酶溫度耐受度較低(章節 1. 5. 1 曾提及)，其熱轉變溫度為 54.8 °C 至 56.8 °C，一旦超過此溫度，葡萄糖氧化酶便失去其活性，因此在本結果中，得到證實，在 50 °C 甚至高於此溫度時，酵素失去其大部分活性，使訊號量變的很低。然而，若噴墨基板溫度設在 40 °C 時，訊號量與室溫所得到的訊號量相差不大，因為經此實驗可推論，在噴墨基板溫度設定高於 50 °C 時，雖然噴塗出的直線筆直，但葡萄糖氧化酶活性受溫度而大幅降低，在 40 °C 下，則為最佳噴墨設定參數，噴塗出來的直線不僅可呈現筆直，其訊號量也與室溫所得訊號相近。

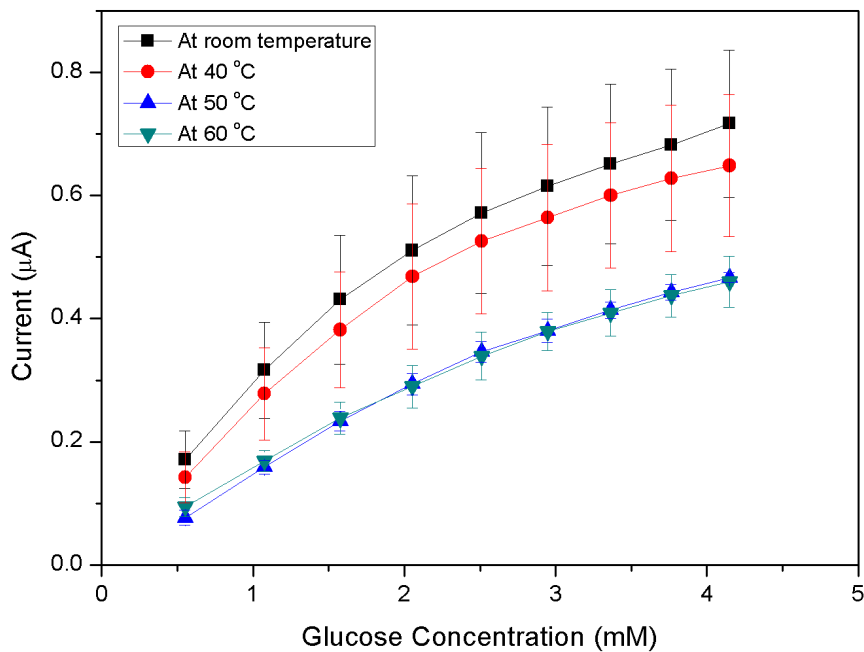


圖 4-3 在不同基板溫度下，修飾葡萄糖氧化酶之電極其電流對濃度曲線圖

4.1.3 材料噴塗層數對感測器電化學表現之影響



普魯士藍層數對過氧化氫感測之表現

探討噴塗的厚度，是否會影響訊號量，影響感測器靈敏度，如圖 4-4 所示，圖中為使用噴墨技術噴塗普魯士藍層，分別沉積不同層數的普魯士藍，可見當普魯士藍層越厚，沉積上的普魯士藍量越多，其訊號量越大，且其線性範圍較大，此時過氧化氫為過量反應物，普魯士藍為限量試劑，普魯士藍量的多寡決定過氧化氫反應的量，決定電化學表現的電流大小。然而，為什麼沉積的普魯士藍量越多，其線性範圍也會變寬，這是因為過氧化氫反應時，除了促成普魯士藍氧化還原反應、產生電流，同時也會產生氫氧根離子，造成電極周圍局部氫氧根離子濃度較高，導致普魯士藍中的鐵三價離子與氫氧根離子強作用力，形成氫氧化鐵，而漸漸破壞普魯士藍晶格中鐵(Fe)與氰(CN)的鍵結，使訊號無法繼續隨著過氧化氫濃度提高而上升[62]，因此普魯士藍量越多，整體晶格受反應破壞的程度較慢，可承受較多的過氧化氫反應產生的氫氧根離子，其感測訊號的線性範圍較大。

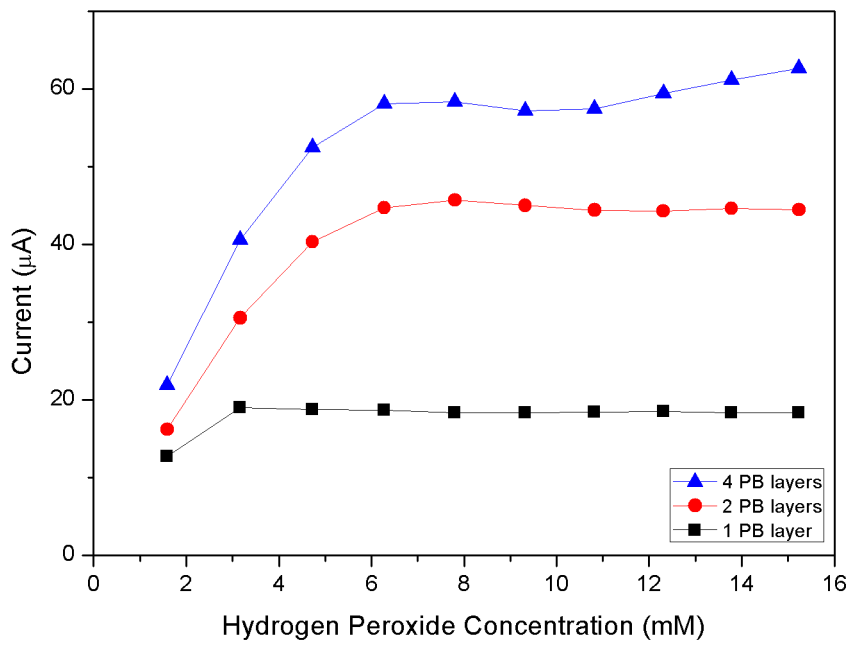


圖 4-4 沉積不同層數普魯士藍的修飾電極，其感測過氧化氫之電流對濃度曲線圖



普魯士藍層數對於葡萄糖感測之表現

然而，進一步探討普魯士藍層的量是否會影響感測器偵測葡萄糖的訊號，由圖 4-5 中可發現當葡萄糖氧化酶含量固定時，反應產生的過氧化氫濃度相同，而經由擴散接觸到周圍電極表面的普魯士藍，電流訊號量相同。由於葡萄糖氧化酶本身催化活性，使得葡萄糖氧化酶與葡萄糖反應產生的過氧化氫濃度低，此時普魯士藍為一過量反應物，決定電化學表現的因素取決於過氧化氫的濃度，因此感測葡萄糖訊號不受普魯士藍層數所影響。

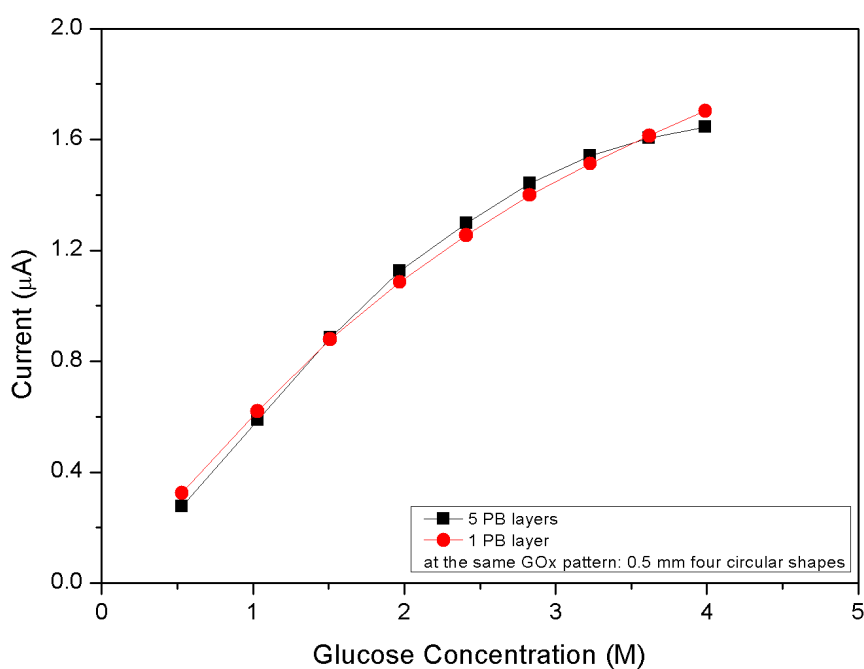


圖 4-5 沉積不同層數的普魯士藍、相同層數與圖樣的葡萄糖氧化酶修飾電極，其感測葡萄糖之電流對濃度曲線圖



葡萄糖氧化酶層數對於葡萄糖感測之表現

接著探討葡萄糖氧化酶的量是否會影響感測器訊號，碳膠層與普魯士藍層使用相同製作方法，而葡萄糖氧化酶層則是利用噴墨技術沉積不同層數的酵素量，從圖 4-6 中可發現，當葡萄糖氧化酶的層數由兩層變為十層，感測器的訊號隨著葡萄糖氧化酶沉積量增加，訊號也因此增加，但是後者訊號量並未增加為前者訊號的五倍大，這可能是因為葡萄糖氧化酶層層堆積，十層葡萄糖氧化酶堆疊上去後，並非所有葡萄糖氧化酶皆固定在電極上，可從圖 4-7 計時安培圖觀察，圖 4-7(a)中，兩層葡萄糖氧化酶電極的電化學結果，清晰可見階梯圖樣的電流訊號，然而反觀圖 4-7(b)中，十層葡萄糖氧化酶的電化學結果，則可見下降幅度較圖 4-7(a)大，然而訊號卻持續下降，不見其訊號迅速達穩定，無階梯狀電流訊號產生，這表示雖然在電極上噴塗了十層的葡萄糖氧化酶，但並非所有葡萄糖氧化酶皆固定在電極上，其脫落的葡萄糖氧化酶與葡萄糖產生反應，生成的過氧化氫，並未立即性的被電極感測到，而造成無階梯狀的電流訊號，且訊號量沒有呈現等比例上升。

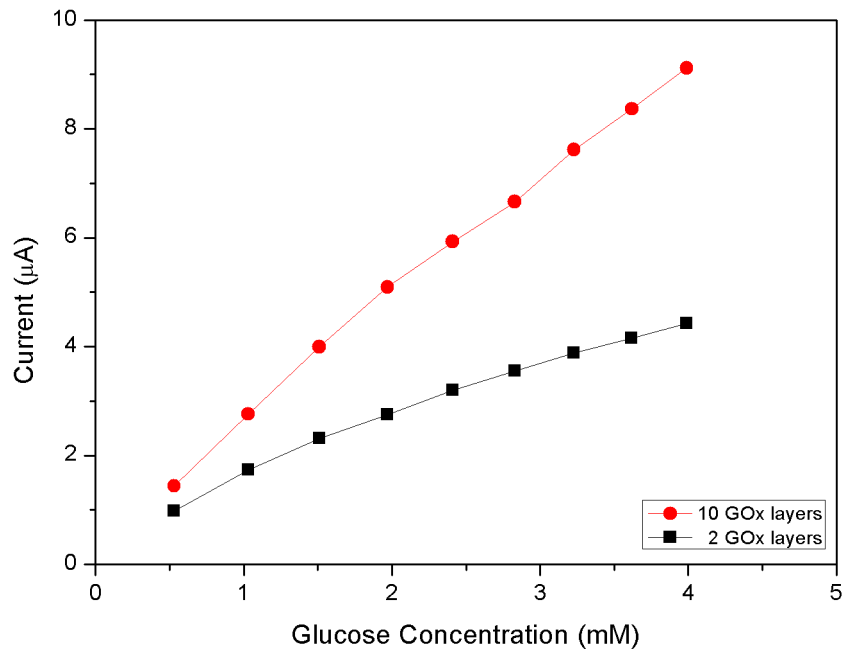
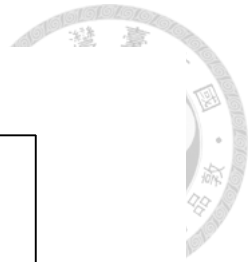


圖 4-6 沉積不同層數的葡萄糖氧化酶修飾電極，其感測葡萄糖之電流對葡萄糖濃度曲線圖

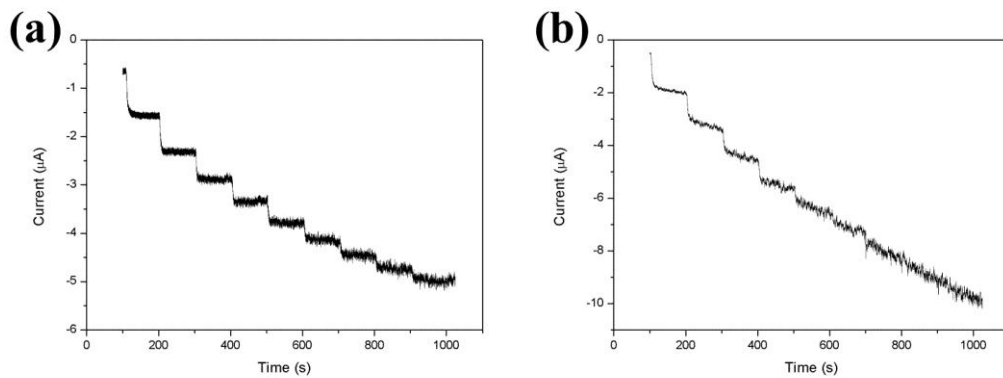


圖 4-7 沉積不同層數的葡萄糖氧化酶修飾電極，其感測葡萄糖之電流對時間曲線圖：(a) 沉積兩層葡萄糖氧化酶；(b) 沉積十層葡萄糖氧化酶

4.2 塗佈形狀對於葡萄糖感測器靈敏度影響探討



將噴墨技術應用在葡萄糖氧化酶上，噴墨技術最大的優勢就是極易改變噴塗形狀，利用章節 2.4.5 介紹的噴墨系統，利用軟體操作改變指令，便可任意且快速的更改噴塗圖樣。因此利用噴墨噴塗圖樣的便利性，探究噴塗上的葡萄糖氧化酶訊號面積大小、形狀，對感測器靈敏度的影響。製作感測器工作電極，各層皆經過相同程序處理製作，僅酵素層上噴塗沉積不同半徑的葡萄糖氧化酶圓形圖樣，藉由電化學方法測量而得電流對濃度的結果，由圖 4-8 中，可發現當噴塗上感測器的葡萄糖氧化酶半徑越大，代表沉積在電極上的葡萄糖氧化酶量越多，可以產生較大的訊號，得到較大的靈敏度；然而，若所有的數據除以該電極沉積上的葡萄糖氧化酶面積後，可發現訊號量與沉積的葡萄糖氧化酶面積並非成正比，面積越大，其單位面積所產生的電流越小，反之，面積漸漸變小，其單位面積所產生的電流也漸漸變大，相當於葡萄糖氧化酶面積較小的感測器電流，單位面積所提供的訊號量較大(如圖 4-9)。但是值得注意的是，若葡萄糖氧化酶量過小(如圖 4-9 中 0.3 mm)，電極訊號過小，則無法提供等量的訊號輸出。

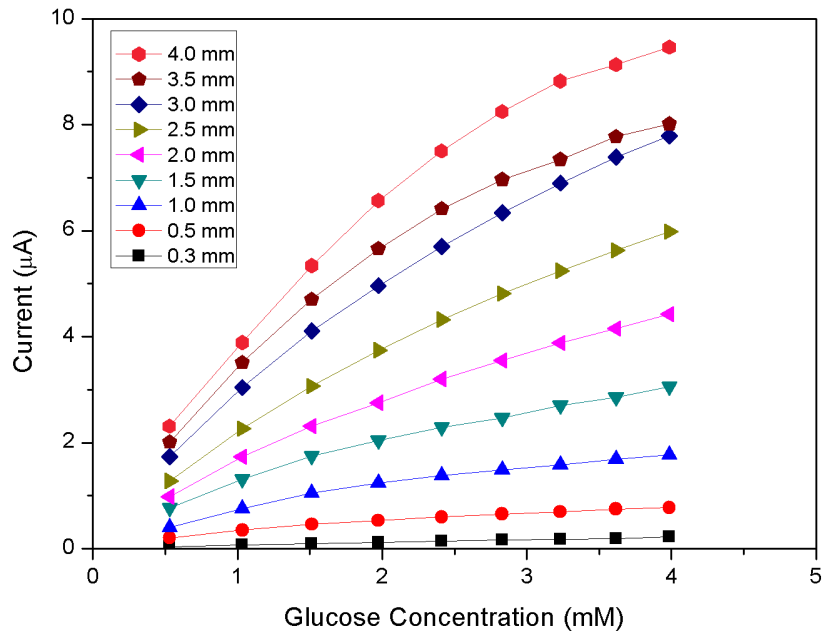


圖 4-8 沉積不同半徑的葡萄糖氧化酶圓形圖樣於電極上，其電流對葡萄糖濃度曲線

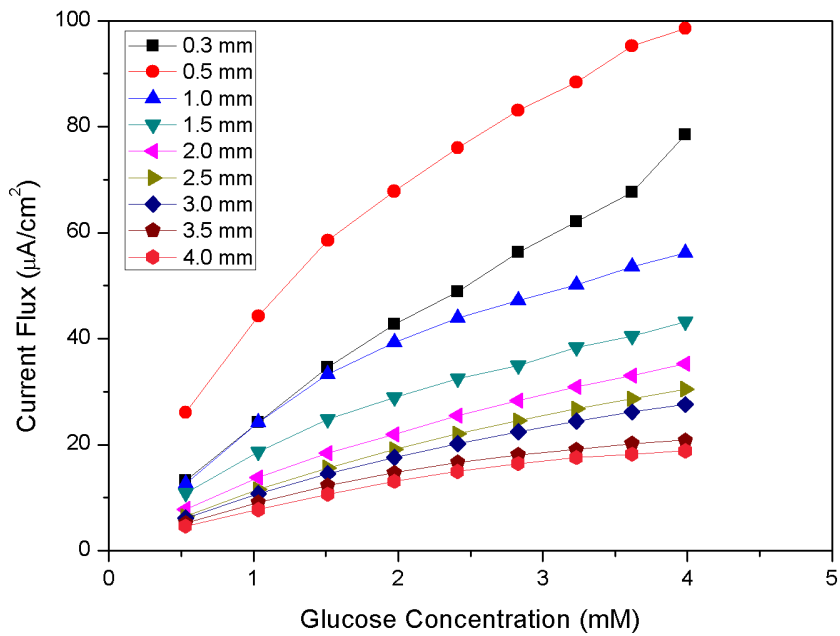


圖 4-9 沉積不同半徑的葡萄糖氧化酶圓形圖樣於電極上，其電流通量對葡萄糖濃度曲線

從上一段落中，得到了沉積在電極上的葡萄糖氧化酶量多寡、面積大小會影響單位面積所提供的訊號量，因此接下來要探討固定葡萄糖氧化酶沉積量，噴塗相同面積、不同形狀的葡萄糖氧化酶，檢測其電化學結果。噴塗一個半徑為 1 公分的圓，與噴塗四個半徑為 0.5 公分的圓，比較其訊號強度，可從圖 4-10 中發現，當噴墨提供的葡萄糖氧化酶面積、墨水量相同時，所產生的訊號大小相近。

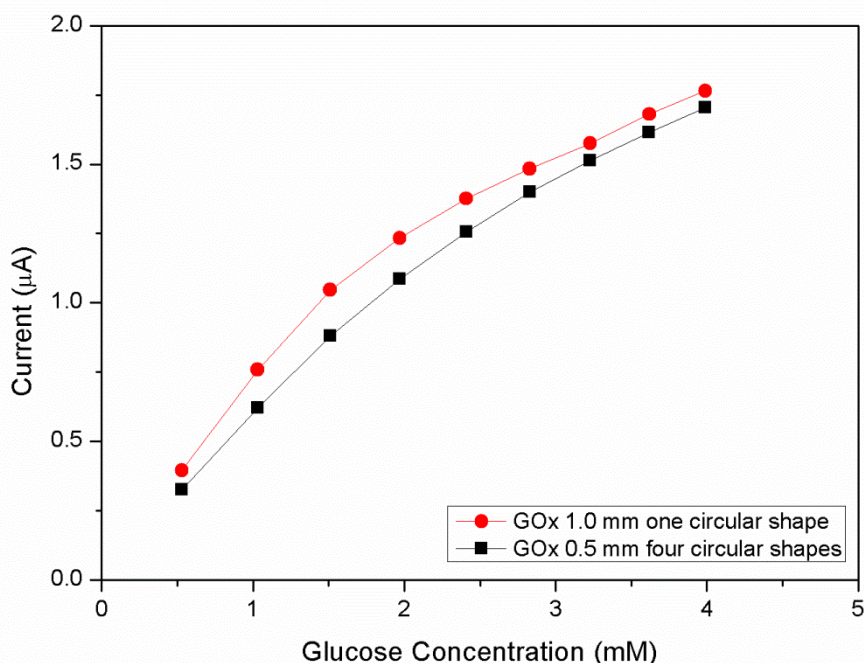


圖 4-10 沉積相同量、不同圖樣的葡萄糖氧化酶於電極上，其電流對葡萄糖濃度曲線

然而，若利用相同墨水量，噴塗不同線條、不同面積的葡萄糖氧化酶圖樣，可從圖 4-11 與圖 4-13 結果中可發現，當葡萄糖氧化酶與普魯士藍的接觸面積越大，訊號會越強。如圖 4-11，圖樣「十」、「＝」與「一」皆利用 600 點葡萄糖氧化酶噴塗而成，噴塗「十」與「＝」圖樣的電極所得訊號靈敏度相近，幾乎重疊，然而相同點數但噴塗成「一」圖樣的電極訊號，相較起來較小；推測圖樣「一」的葡萄糖氧化酶多層堆疊、其表面沉積密度較大，因此葡萄糖氧化酶與普魯士藍接觸的點較圖樣「十」與圖樣「＝」少，因此訊號量較小，反之，圖樣「十」與圖



樣「=」可接觸普魯士藍的位置一樣多、表面沉積密度相近，且接觸位置皆比圖樣「一」多一倍，因此從圖中可看出圖樣「十」與圖樣「=」訊號量相近，且訊號變化量約為圖樣「一」訊號變化量的兩倍。

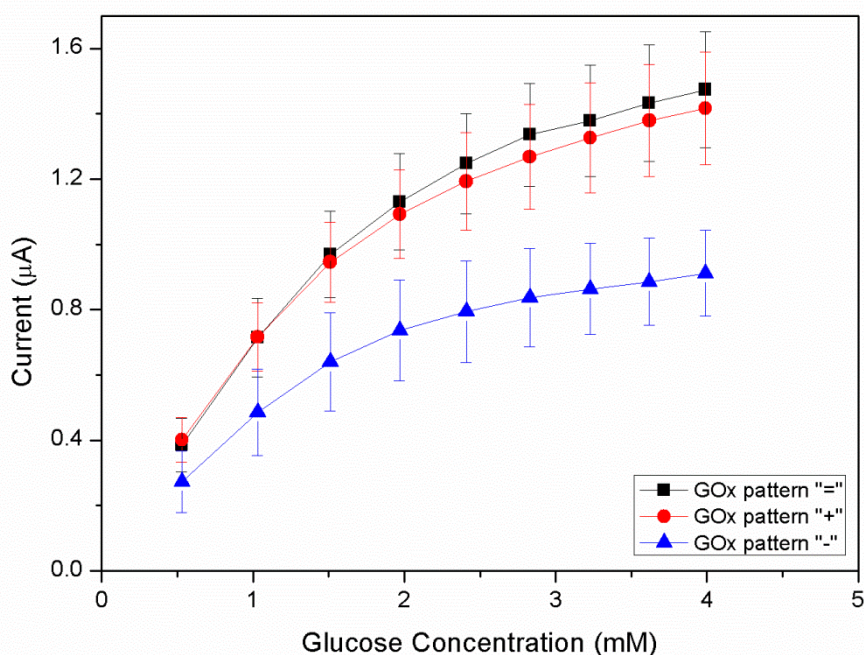


圖 4-11 沉積相同量、不同線狀圖樣的葡萄糖氧化酶於電極上，其電流對葡萄糖濃度曲線

接著圖 4-12 與圖 4-13，也是利用相同墨水量，噴塗更多不同面積的圖樣，進行探討，噴塗的樣品可見圖 4-12，圖 4-12(a)與圖 4-12(b)，皆為長度相同的線狀圖樣，然而圖 4-12(a)使用 600 點葡萄糖氧化酶液滴噴塗，圖 4-12(b)則是使用 3600 點葡萄糖氧化酶液滴噴塗，圖 4-13 所得結果如同一開始所說，噴塗的葡萄糖氧化酶量越多，則可得較強訊號；而圖 4-12(b)與圖 4-12(c)，則是控制其噴塗點數相同，皆為 3600 點葡萄糖氧化酶液滴，但圖 4-12(b)為直線型，圖 4-12(c)為網格狀，從圖 4-13 發現，相同的量，但是噴塗成網格狀，相較於直線型圖樣，網格狀使葡萄糖氧化酶與普魯士藍接觸點變多，訊號增強。

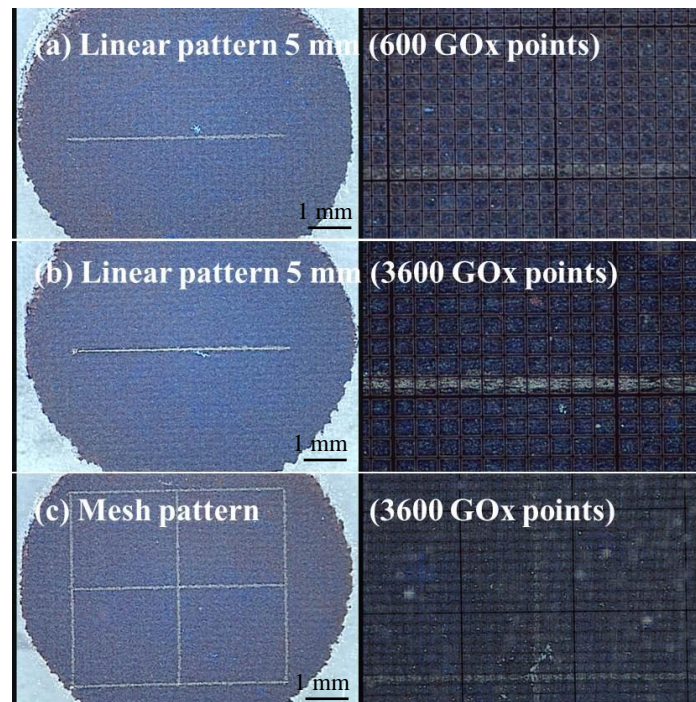


圖 4-12 不同線狀圖樣的葡萄糖氧化酶於電極上之光學顯微鏡圖：(a) 線性圖樣 5 mm(共 600 滴 GOx 墨水)；(b) 線性圖樣 5 mm(3600 滴 GOx 墨水)；(c) 網格圖樣(3600 滴 GOx 墨水)

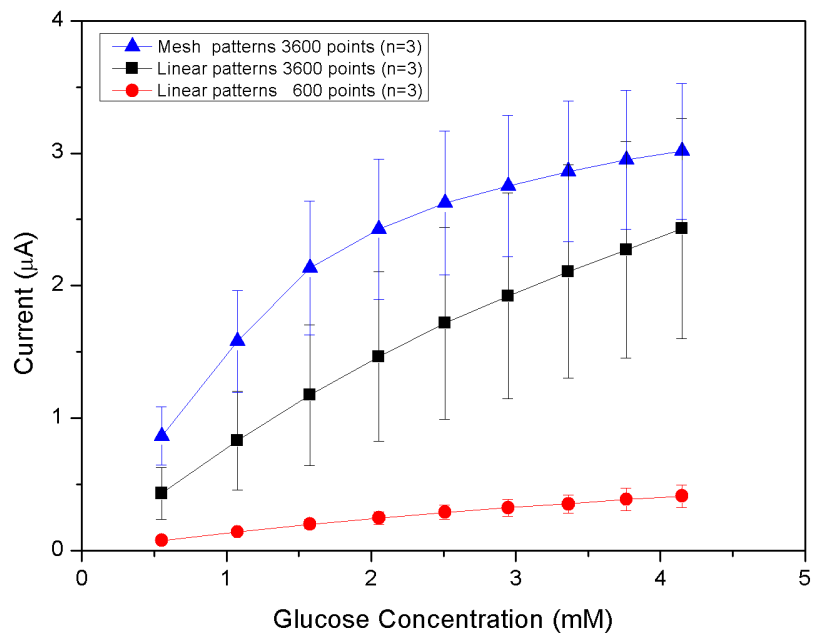


圖 4-13 比較沉積不同量與不同葡萄糖氧化酶圖樣對於電流與濃度曲線的影響

最後利用相同點數，在圖 4-14 中，利用 3600 點葡萄糖氧化酶液滴，噴塗不同的圖樣，可由結果圖 4-15 中發現將葡萄糖氧化酶均勻的噴塗，噴塗面積越大，葡萄糖氧化酶密集程度越低，表示減少葡萄糖氧化酶彼此堆疊的機會，增加葡萄糖氧化酶與基材普魯士藍的接觸位置，因此當葡萄糖氧化酶反應生成過氧化氫時，在擴散的過程中，可增加過氧化氫接觸普魯士藍的機會，與普魯士藍反應。因此噴塗一層大面積葡萄糖氧化酶，其訊號靈敏度表現會比噴塗密集、小面積、噴塗密度較高的葡萄糖氧化酶圖樣靈敏度表面來的好。文獻中提到酵素進行反應時，其與導電基材邊界的重要性，電子需要從邊界(Periphery)穿隧、跳躍到反應的活性中心位置(Active site)，或電子從活性中心位置跳躍到邊界上，便能順利的使電子在反應酵素與該環境中順利傳遞[63]。因此與本研究結果對照，雖然酵素的多寡直接影響訊號高低，但如何利用固定量、有限的酵素，有效地排列酵素在電極表面上更為重要，使酵素與中介層的接觸邊界越多，越能增加電子有效傳遞的機會，因而提升訊號量、增大訊號靈敏度。

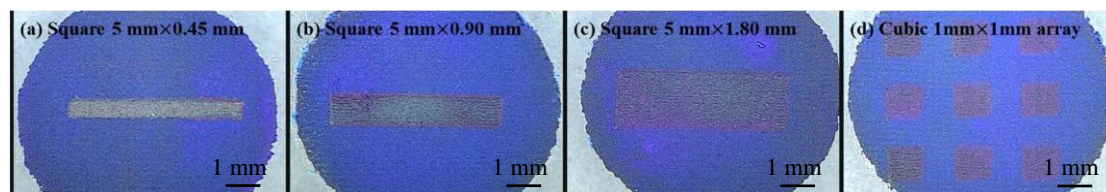


圖 4-14 不同沉積面積的葡萄糖氧化酶於電極上之光學顯微鏡圖：(a) 矩形狀 5 mm×0.45 mm；(b) 矩形狀 5 mm×0.90 mm；(c) 矩形狀 5 mm×1.80 mm；(d) 正方形狀 1 mm×1 mm 九宮格矩陣

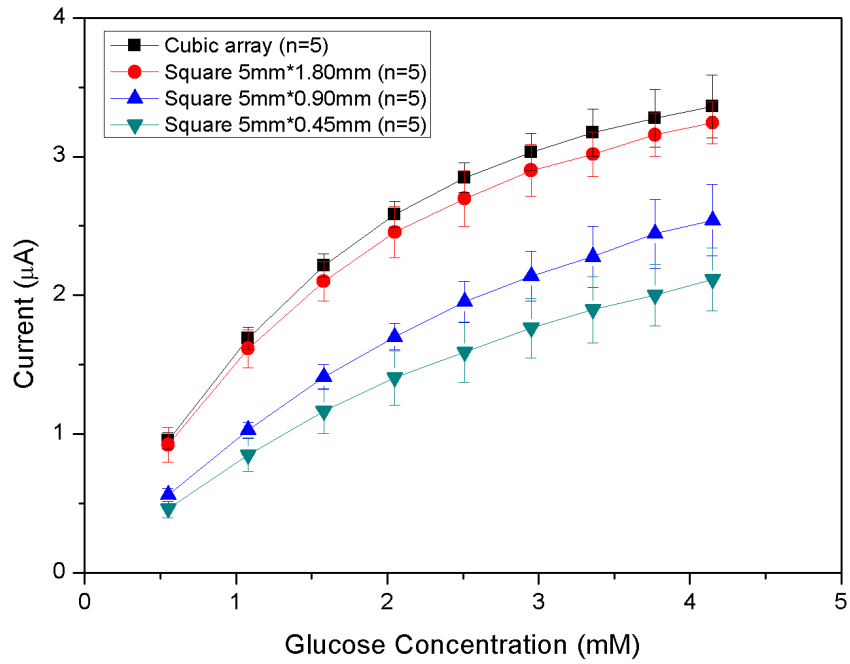


圖 4-15 比較沉積相同量但不同葡萄糖氧化酶面積圖樣對於電流與濃度曲線的影響



4.3 表面粗糙度對葡萄糖感測器靈敏度之影響

藉由噴塗圖樣所得到的結果得知，若增加葡萄糖氧化酶與基材普魯士藍的接觸點，則所得的訊號靈敏度會變大。因此如何調整感測器的結構，使訊號靈敏度在定量的葡萄糖氧化酶能表現最好，便是接下來的研究課題。

首先，設計以夾層的方式，在原本葡萄糖氧化酶層外，再沉積一層普魯士藍層，利用普魯士藍將葡萄糖氧化酶夾在中間，如同三明治的結構(如圖 4-16)，藉此使葡萄糖氧化酶反應所產生的過氧化氫，向四面八方擴散時，皆可接觸到普魯士藍，產生後續的反應。實驗結果如圖 4-17，可發現添加葡萄糖於系統中時，無法被夾在普魯士藍中間的葡萄糖氧化酶感測到，推測是外層的普魯士藍阻隔了葡萄糖與葡萄糖氧化酶的接觸，因此無法產生酵素催化反應，然而若添加過氧化氫於系統中時，可見普魯士藍感測產生電流訊號，此一結果證實普魯士藍層是可順利運作，離子與電子可自由穿梭，可偵測到過氧化氫，但因為葡萄糖無法接觸到內層的葡萄糖氧化酶，無法進一步產生過氧化氫，因此在圖中無訊號產生。

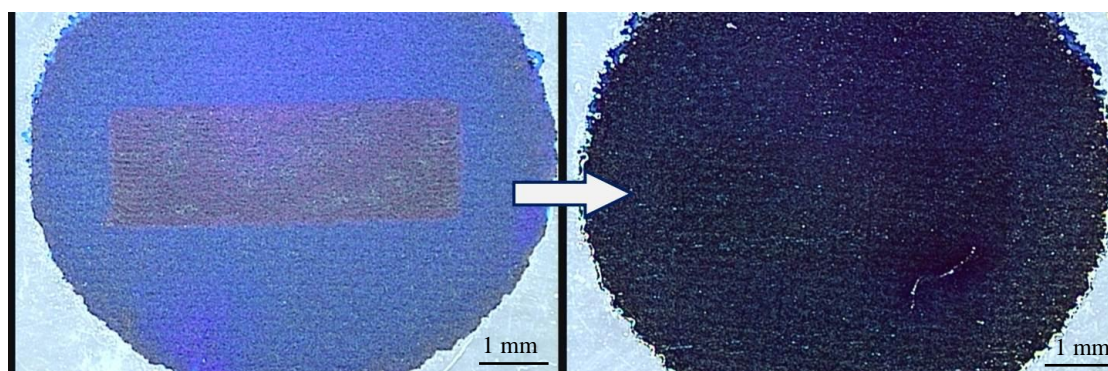


圖 4-16 左圖為 GOx/PB/SPCE 電極之光學顯微鏡圖，以及沉積另一層普魯士藍層於 GOx/PB/SPCE 電極，形成右圖 PB/GOx/PB/SPCE 電極之光學顯微鏡圖

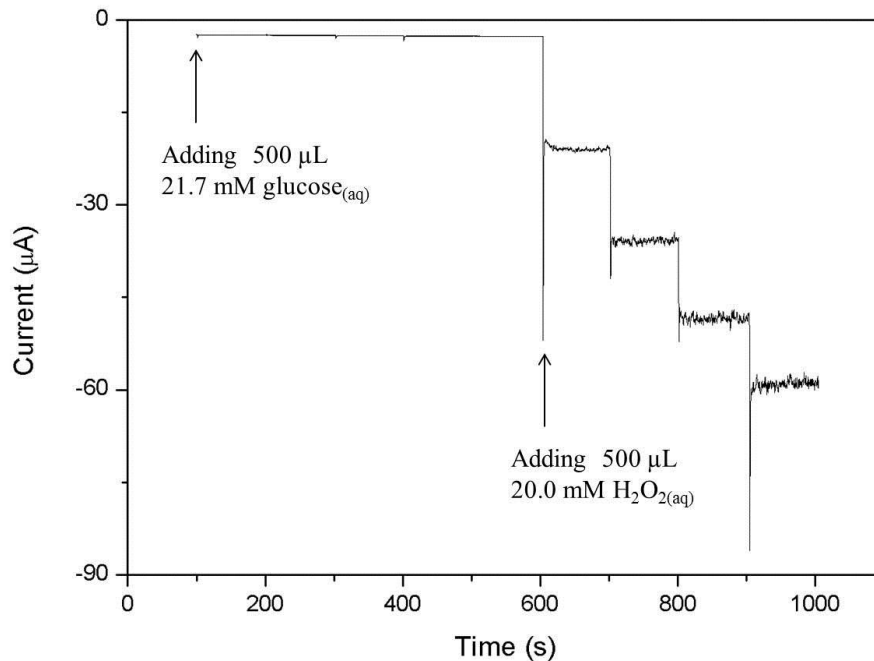


圖 4-17 利用 PB/GOx/PB/SPCE 電極感測葡萄糖與過氧化氫水溶液之電流訊號表現

接著嘗試改變基材，試圖增加普魯士藍的粗糙度，希望能藉此增加葡萄糖氧化酶接觸普魯士藍基材的位置，同時增加普魯士藍在電極表面立體結構。因此將原本的透明膠片基材更改為 A4 紙與濾紙，將碳膠網刷至各式基材上，預期表面粗糙度會提高，藉此在後續塗佈普魯士藍與葡萄糖氧化酶時，其粗糙度也能提升。然而，從電子顯微鏡圖(SEM 圖)中，可觀察到不論是將碳膠刷至 A4 或濾紙上，其碳膠表面的起伏狀況與粗糙程度並未受基材所影響，可以看到圖 4-18(a)中，右側可見 A4 紙的纖維結構，然而左側刷上碳膠之後的結構，並未隨著紙的纖維起伏；而圖 4-18(b)中，圖上方為濾紙的纖維結構，然而下方為刷碳膠之後的表面結構，也可見碳膠並無濾紙纖維起伏的結構。由於碳膠的黏稠度與緻密性，網刷上的碳膠不易隨著基材的粗糙度而隨之起伏，因此無法利用更換基材來提升碳膠層與普魯士藍層表面粗糙度。

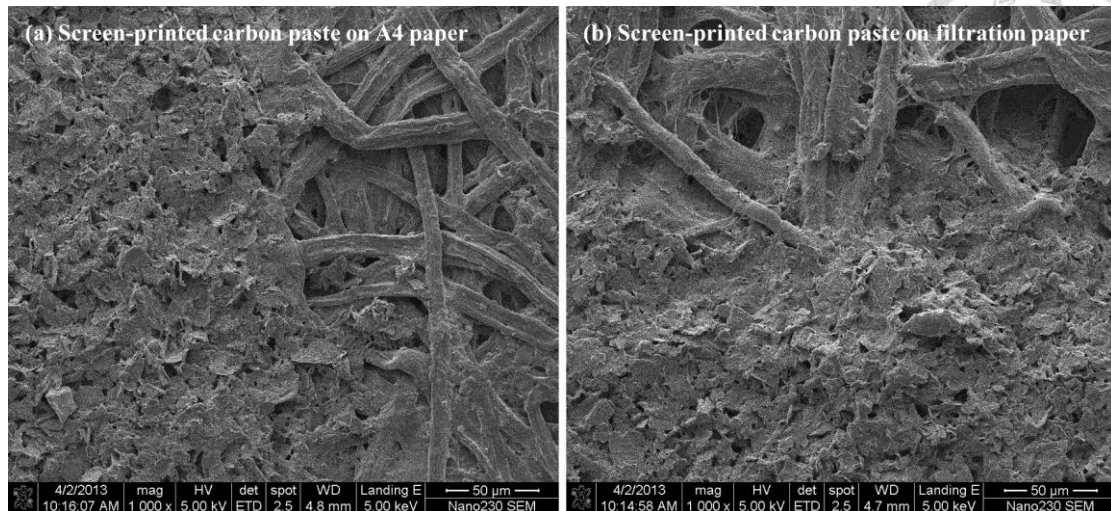
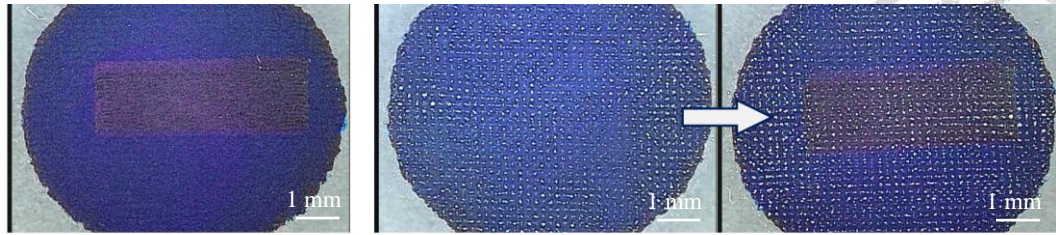


圖 4-18 電子顯微鏡圖：(a) 網印碳膠層於 A4 紙基材上；(b) 網印碳膠層於濾紙基材上

為了增加普魯士藍的粗糙度，採用網印的技術，將絹網網格的刻痕刷至普魯士藍表面上，製造出網格狀的紋路，接著利用噴墨噴塗葡萄糖氧化酶於表面上，進行電化學測試，將沒有刻痕的工作電極訊號與有刻痕加工過的電極訊號做一比較(結果如圖 4-19 與圖 4-20)，可從圖中發現有無刻痕對於該訊號靈敏度無明顯影響，推測是因為刻痕所製造出來的粗糙起伏不精細，刻痕間距大概在 $100\ \mu\text{m}$ 的等級，相較於噴塗葡萄糖氧化酶的液滴間隔 $50\ \mu\text{m}$ ，塗佈上的葡萄糖氧化酶仍覆蓋在普魯士藍層上，葡萄糖氧化酶沿著普魯士藍起伏的表面沉積，刻痕沒有增加普魯士藍的立體結構，也無法提升普魯士藍與葡萄糖氧化酶生成的過氧化氫反應的面積，因此利用這一方法仍然無法有效增加葡萄糖氧化酶或反應產生的過氧化氫與普魯士藍接觸的面積。



(a) GOx Square 5 mm×1.80 mm on PB/SPCE (b) GOx Square 5 mm×1.80 mm on grooved PB/SPCE

圖 4-19 光學顯微鏡圖：(a) 基本 GOx/PB/SPCE 電極；(b) 左側為刻痕加工的 grooved PB/SPCE 電極，右側為沉積葡萄糖氧化酶為 GOx/grooved PB/SPCE 電極

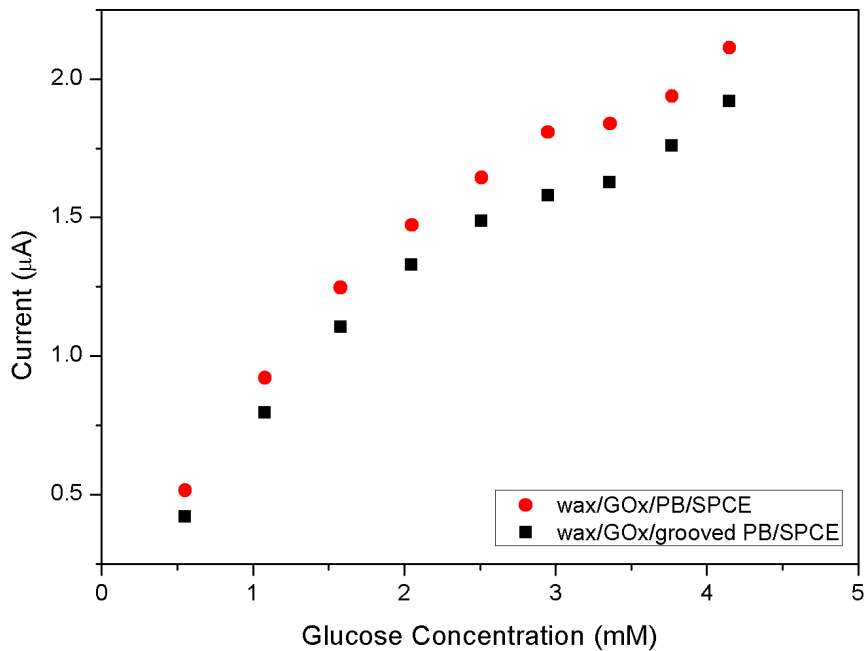


圖 4-20 葡萄糖氧化酶修飾電極的電流對濃度曲線：Wax/GOx/PB/SPCE 電極以及 Wax/GOx/grooved PB/SPCE 電極

由於藉由製造刻痕，嘗試改變目前沉積層的粗糙度，無法增加葡萄糖氧化酶與普魯士藍的接觸點，或增加反應產生的過氧化氫擴散至普魯士藍的接觸面積，因此實驗嘗試利用其他材料與普魯士藍混摻後，一同沉積在碳膠表面上，藉此增加過氧化氫向四周擴散時，接觸到普魯士藍的可能性。為了增加普魯士藍的粗糙

表面，本研究利用碳紙浸染在普魯士藍溶液中，與章節 2.4. 說明的操作流程類似，但碳膠層與普魯士藍層的做法略微更動，將浸染普魯士藍碳紙放入烘箱，烘箱設定在 100 °C 下，加熱修飾(Sinter)一小時，將碳膠網刷至透明膠片，在碳膠層還沒烘乾之前，便將普魯士藍碳紙放置在碳膠層上，放入烘箱設定在 70 °C 下、三十分鐘，接下來的葡萄糖氧化酶層實驗作法與章節 2.4.3 相同，所得到的樣品表面如圖 4-21，而圖 4-22 為電子顯微鏡圖，圖 4-22(a)與(b)為碳紙的纖維表面，可見纖維表面平滑，然而圖 4-22(c)至(f)則為浸染普魯士藍的碳紙纖維，可見纖維表面有普魯士藍顆粒。利用此一工作電極，進行電化學實驗，所得的電極訊號表現如圖 4-23。圖 4-23(a)中，可看到在固定時間添加過氧化氫，電流產生階梯形的訊號，然而電流對過氧化氫濃度的曲線(圖 4-23(a)右上角插圖)有線性化的表現，對過氧化氫的線性範圍為 0 mM 至 3.7 mM，經後續實驗發現其的線性範圍可達 6.0 mM(圖 4-24)，代表普魯士藍碳紙順利且正常的接合在碳膠電極上，可使離子進出，進行普魯士藍的氧化還原反應，感測過氧化氫，以及順利地傳遞電子至碳膠層；然而圖 4-23(b)中，在固定時間添加葡萄糖，電流卻沒有產生階梯狀訊號，在每次添加時，訊號下探後，而又攀升回原本的背景值，推測是因為葡萄糖氧化酶藉由噴塗，沉積在普魯士藍碳紙基材中較內層的地方，因此添加葡萄糖時，由於普魯士藍碳紙層較厚，厚度約為 0.18 mm，造成過大的擴散阻力，使葡萄糖無法藉由擴散進入碳紙中，因此無法與碳紙上吸附的葡萄糖氧化酶反應。

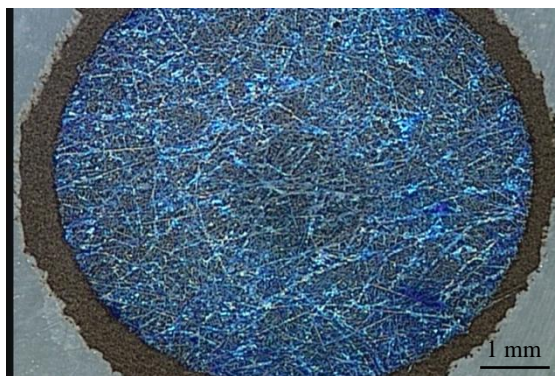


圖 4-21 將碳紙吸附普魯士藍，沉積在碳膠電極上的光學顯微鏡圖(PB-Carbon Paper/SPCE)

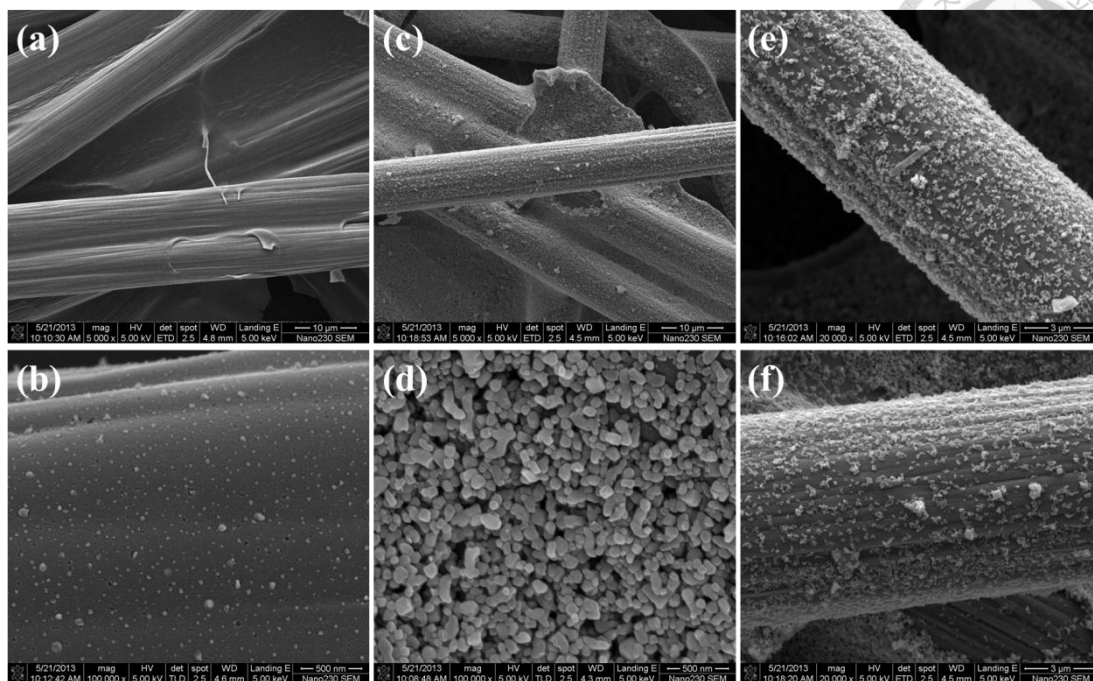


圖 4-22 電子顯微鏡圖：(a) 碳紙(5000x)，纖維結構；(b) 碳紙(100000x)，其纖維表面型態；(c) 碳紙吸附普魯士藍(5000x)；(d) 碳紙吸附普魯士藍(100000x)，其普魯士藍表面型態；(e)及(f) 碳紙吸附普魯士藍(100000x)，其碳纖維上覆蓋著普魯士藍

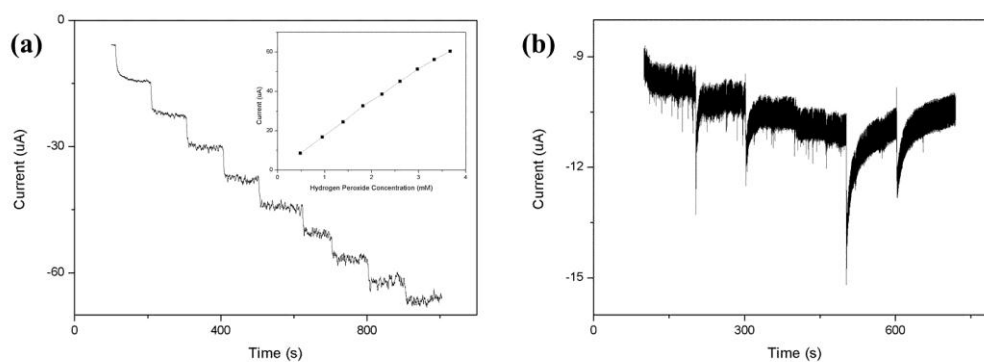


圖 4-23 電極 GOx/PB carbon paper/SPCE 之電化學結果：(a) 每一百秒加入 500 μ L 20 mM 過氧化氫水溶液之電流對時間曲線；(b) 每一百秒加入 500 μ L 21.7 mM 葡萄糖水溶液之電流對時間曲線

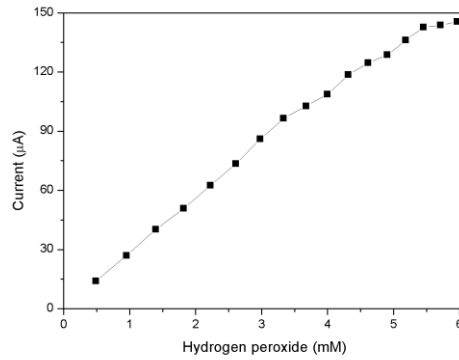


圖 4-24 電極 GOx/PB carbon paper/SPCE 在每一百秒加入 500 μL 20 mM $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$ ，其電流對過氧化氫濃度訊號曲線

為了將普魯士藍碳紙層的厚度變薄一些，本研究嘗試將碳紙磨碎，與普魯士藍墨水混合，另用微量吸管滴在基材上，樣品如圖 4-25(a)，可見其碳纖維顆粒較大，重量較重，因此無法均勻分布在基材表面上，因此進一步利用均質機將碳紙與普魯士藍均勻混合，加上乙二醇與乙醇等體積混合，製作成膠狀墨水，利用點膠噴塗方式沉積，試圖降低普魯士藍碳紙厚度，並且使其均勻沉積，完成樣品如圖 4-25(b)。接著，利用噴墨技術將葡萄糖氧化酶沉積於基材上，如圖 4-25(c)。

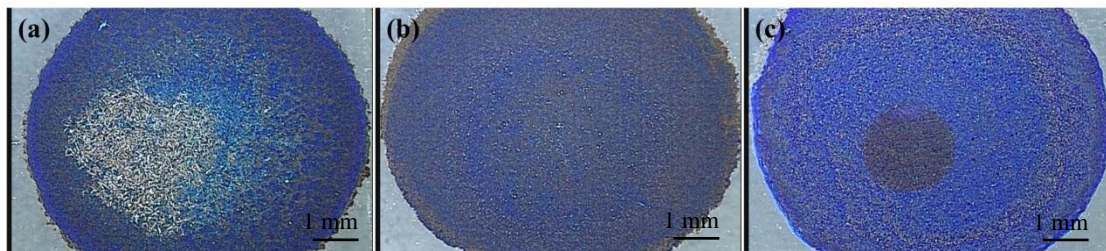


圖 4-25 各式修飾電極的光學顯微鏡圖：(a) 沉積普魯士藍混合磨碎碳紙製成電極(PB-Ground Carbon paper/SPCE)；(b) 沉積普魯士藍混合碳紙膠狀墨水製成電極(PB-Carbon paper paste/SPCE)；(c) 沉積普魯士藍混合碳紙膠狀墨水、噴墨噴塗葡萄糖氧化酶製成電極(GOx/PB-Carbon paper paste/SPCE)

圖 4-26 中呈現不同普魯士藍墨水所製作出的電極，用來感測過氧化氫時，其電化學表現，而圖 4-27 則是在不同配方的普魯士藍電極上，利用噴墨技術噴塗葡萄糖氧化酶層，觀察其對於葡萄糖的訊號表現。圖 4-26 中，可見利用碳紙與普魯士藍均勻混合的膠狀墨水沉積在碳膠上的工作電極，其在相同濃度的過氧化氫下，所偵測感應到的訊號較普魯士藍墨水製作出來的工作電極大。這有兩項可能原因，第一為普魯士藍與碳紙的膠狀墨水所帶出且沉積在碳膠上的普魯士藍量較多，因此訊號較高；第二為普魯士藍與碳紙的接觸點提升，使得與過氧化氫反應後所產生的電流訊號，經由碳紙帶入碳膠層，訊號量提升。

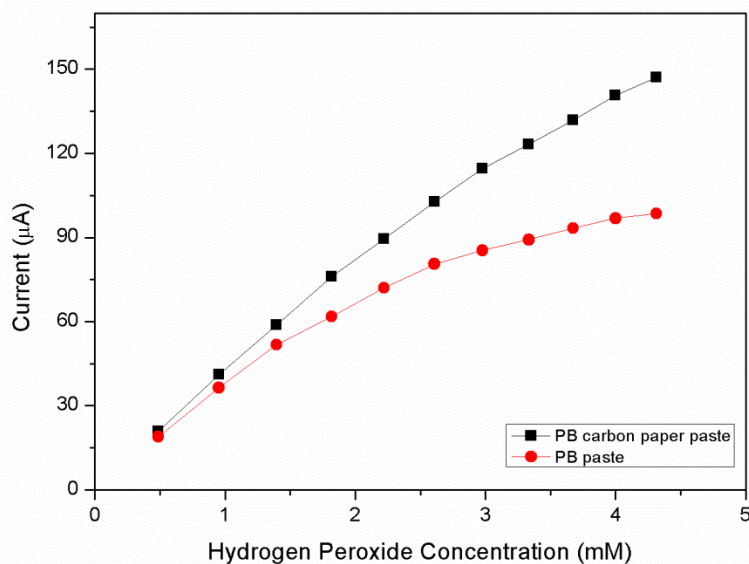


圖 4-26 利用不同方式沉積普魯士藍層製成電極(PB-Carbon paper paste/SPCE, PB/SPCE)，感測過氧化氫之電流與濃度曲線

圖 4-27 中可見，普魯士藍碳膠電極(PB/SPCE)與普魯士藍碳紙膠狀墨水沉積碳膠電極(PB-Carbon paper paste/SPCE)，同樣利用噴墨技術噴塗半徑為 1 mm 葡萄糖氧化酶圖樣，其感測葡萄糖的訊號兩者結果十分接近，這是因為滴入的待測物為葡萄糖水溶液，此時訊號的決定取決於葡萄糖氧化酶與普魯士藍層的接觸面積與接觸點，但因為葡萄糖氧化酶經由噴墨技術均勻的沉積在表面，因此即便兩者其

一為普魯士藍沉積、另一為普魯士藍混合碳紙一同沉積，兩者普魯士藍與碳膠接觸面積不同，但在上層的葡萄糖氧化酶所沉積且接觸的普魯士藍面積相同，因此仍舊無法提升葡萄糖氧化酶與普魯士藍的接觸點，因而無法提升訊號。

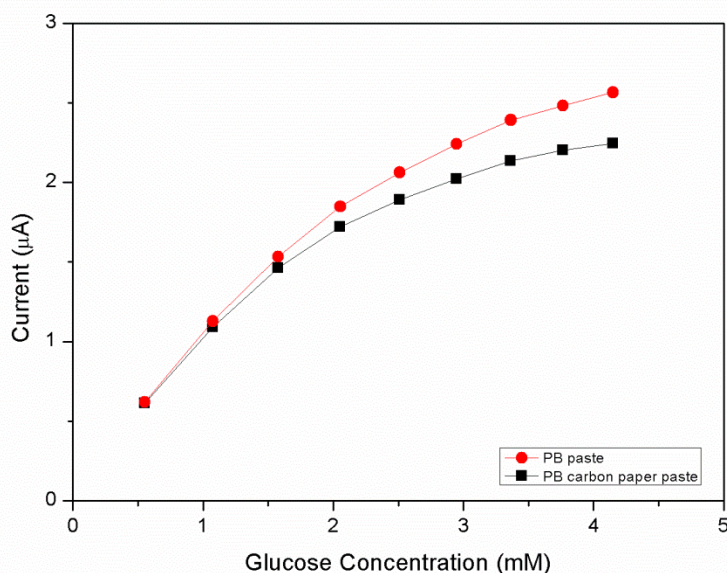


圖 4-27 不同方式沉積普魯士藍層製成電極，沉積葡萄糖氧化酶於電極上(GOx/PB/SPCE, GOx/PB-Carbon paper paste/SPCE)，感測葡萄糖之電流與濃度曲線

因此研究發現若增加界面的接觸面積，便可提升訊號，因此預期將葡萄糖氧化酶與普魯士藍均勻混合，沉積在電極上，便可增加兩者的接觸點，提升其感測訊號的靈敏度。



第五章 結論




總結本研究結果，首先，確定感測器結構是否可順利進行感測，電流能順利傳遞、普魯士藍正常進行氧化還原反應，進一步確認葡萄糖氧化酶固定在表面基材上，利用包埋法(Entrapment)將石蠟噴塗在電極表面，固定葡萄糖氧化酶。接著藉由電化學測量找尋最佳的操作環境，設定操作電位在-100 mV，電解質酸鹼環境定為 pH 值 7.4，與人體血液酸鹼值相近。最後確認感測器結構是否可行，進行了選擇性的測試—干擾測試，實驗結果尿素對系統不造成干擾訊號，而維生素 C 的干擾則可藉由改變電位，降低干擾情形至葡萄糖訊號的一半以下。

確認感測器電極表現、設定操作環境後，本研究利用噴墨技術，藉由調整噴墨參數，提升葡萄糖感測器訊號與靈敏度。研究發現液滴噴墨速度、液滴與表面的接觸角、液滴本身的乾燥速度需適當配合，便能噴塗出平整的液膜，也可藉由基板溫度的調整，讓圖樣更準確、如實的呈現噴塗指令所要求的圖樣。在噴塗葡萄糖氧化酶層時，由於顧及到酵素材料本身在高溫將會失去活性，因此實驗結果發現，基板溫度設定在 40 °C 可得到平整的圖樣，酵素也仍保持其活性。

藉由噴墨參數調整，可準確噴塗出特定圖樣後，便利用噴墨技術可任意噴塗各式圖樣此一特性，探討噴塗圖樣與靈敏度之間的關係，發現當酵素沉積在表面上的密度若固定，噴塗的圖樣越大，也就是噴塗上的葡萄糖氧化酶量越多，訊號量越大、靈敏度越高；然而，若固定葡萄糖氧化酶的量，沉積在表面上的密度越小，噴塗圖樣越大，與普魯士藍接觸的面積也越大，其訊號量與靈敏度越高。因此發現當葡萄糖氧化酶與普魯士藍接觸的位置越多，可明顯提升其訊號量。

最後，已知葡萄糖氧化酶與普魯士藍接觸的位置越多，越能提升靈敏度，因



此為了進一步提升感測器的訊號，針對普魯士藍表面的粗糙度做一探討，期望藉由調整普魯士藍的粗糙度，提升普魯士藍立體結構，使普魯士藍上的葡萄糖氧化酶在其反應過程中，產生過氧化氫，能更有效地與普魯士藍反應。本研究結果發現沉積混合普魯士藍與磨碎碳纖維的膠狀墨水於電極表面，可有效提升過氧化氫的感測訊號，然而要增強葡萄糖的感測訊號，若僅使用噴塗方法沉積一層葡萄糖氧化酶，無法增加普魯士藍與葡萄糖氧化酶的接觸點，然而藉由兩者墨水均勻的混合、一同沉積，增加普魯士藍與葡萄糖氧化酶的接觸點，預期可增加其感測訊號。

綜合以上結果可知，噴墨技術可應用在葡萄糖感測器的製作上，確定操作環境、噴墨參數的設定，有效地固定酵素，且利用噴墨技術形成圖樣的方便性，藉由圖樣的調整與設計，增加反應的界面接觸面積，以提升感測器的靈敏度。

第六章 未來展望



葡萄糖生物感測器的研究，已經發展了許久，藉由材料的改變、製程的更新、陣列的設計，期望能達到測量訊號更為準確的生物感測器元件，又因其為感測元件屬於一次性耗材，因此如何有效降低成本，開發便宜、簡單且易製作的製程也是十分重要。

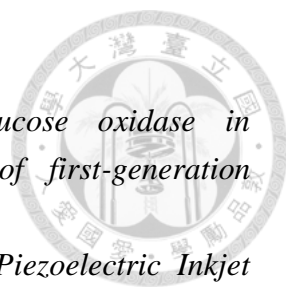
本研究利用噴墨技術改變葡萄糖氧化酶圖樣，證實可以藉由圖樣的設計，提升訊號量，藉此可更精準地測量葡萄糖的濃度，提升訊號感測的準確性，此一圖樣設計的概念可應用到各式感測元件(如尿素感測器等)，進一步製成陣列，藉由訊號的累加，提升元件靈敏度，更期許未來可以利用各式酵素製作出複合型感測電極，應用在更多層面上。

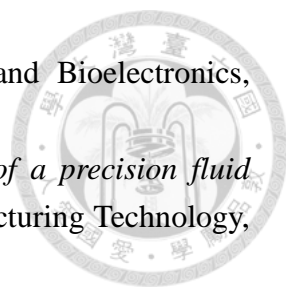


參考文獻

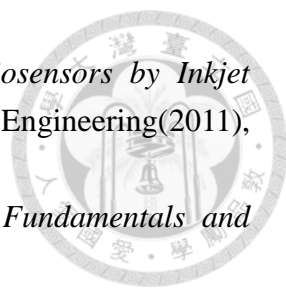


1. S.P. Mohanty, and E. Kougiannos, *Biosensors: a tutorial review*. Potentials, IEEE, 2006. **25**(2): p. 35-40.
2. D.R. Thevenot, et al., *Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification - (Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry, 1999. **71**(12): p. 2333-2348.
3. F.W. Scheller, et al., *Research and development in biosensors*. Current Opinion in Biotechnology, 2001. **12**(1): p. 35-40.
4. Wenju Wang, et al., *Amperometric bienzyme glucose biosensor based on carbon nanotube modified electrode with electropolymerized poly(toluidine blue O) film*. Electrochimica Acta, 2010. **55**(23): p. 7055-7060.
5. Joseph Wang., *Electrochemical glucose biosensors*. Chemical Reviews, 2008. **108**(2): p. 814-825.
6. Xin Che, et al., *A glucose biosensor based on chitosan-Prussian blue-multiwall carbon nanotubes-hollow PtCo nanochains formed by one-step electrodeposition*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2011. **84**(2): p. 454-461.
7. O.D. Renedo, et al., *Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications*. Talanta, 2007. **73**(2): p. 202-219.
8. A.A. Karyakin, et al., *Prussian Blue-Based First-Generation Biosensor. A Sensitive Amperometric Electrode for Glucose*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(14): p. 2419-2423.
9. S.A. Jaffari, and J.C. Pickup, *Novel hexacyanoferrate (III)-modified carbon electrodes: Application in miniaturized biosensors with potential for in vivo glucose sensing*. Biosensors & Bioelectronics, 1996. **11**(11): p. 1167-1175.
10. Chunyan Deng, et al., *Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on boron-doped carbon nanotubes modified electrode*. Biosensors & Bioelectronics, 2008. **23**(8): p. 1272-1277.
11. Yu Liu, et al., *Amperometric glucose biosensor with high sensitivity based on self-assembled Prussian Blue modified electrode*. Electrochimica Acta, 2009. **54**(28): p. 7490-7494.
12. Min-Hua Xue, et al., *In situ immobilization of glucose oxidase in chitosan-gold nanoparticle hybrid film on Prussian Blue modified electrode for high-sensitivity glucose detection*. Electrochemistry Communications, 2006. **8**(9): p. 1468-1474.
13. F. Ricci, et al., *Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability*. Biosensors &

- 
- Bioelectronics, 2003. **18**(2-3): p. 165-174.
14. A.A. Karyakin, et al., *Optimal environment for glucose oxidase in perfluorosulfonated ionomer membranes: Improvement of first-generation biosensors*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(7): p. 1597-1603.
 15. Yeon Hee Yun, et al., *A Glucose Sensor Fabricated by Piezoelectric Inkjet Printing of Conducting Polymers and Bionzymes*. Analytical Sciences, 2011. **27**(4): p. 375-379.
 16. Po-Chin Nien, et al., *Amperometric glucose biosensor based on entrapment of glucose oxidase in a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) film*. Electroanalysis, 2006. **18**(13-14): p. 1408-1415.
 17. Lei Li, et al., *Facile and controllable preparation of glucose biosensor based on Prussian blue nanoparticles hybrid composites*. Bioelectrochemistry, 2008. **74**(1): p. 170-175.
 18. C.P. McMahan, et al., *Design variations of a polymer-enzyme composite biosensor for glucose: Enhanced analyte sensitivity without increased oxygen dependence*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2005. **580**(2): p. 193-202.
 19. D. Moscone, et al., *Construction and analytical characterization of Prussian Blue-based carbon paste electrodes and their assembly as oxidase enzyme sensors*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(11): p. 2529-2535.
 20. Tong Li, et al., *Development of an amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized through silica sol-gel film onto Prussian Blue modified electrode*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2004. **101**(1-2): p. 155-160.
 21. M.S. Lin, and W.C. Shih, *Chromium hexacyanoferrate based glucose biosensor*. Analytica Chimica Acta, 1999. **381**(2-3): p. 183-189.
 22. Laura Gonzalez-Macia, et al., *Advanced printing and deposition methodologies for the fabrication of biosensors and biodevices*. Analyst, 2010. **135**(5): p. 845-867.
 23. Joseph T. Delaney, Jr, et al., *Inkjet printing of proteins*. Soft Matter, 2009. **5**(24): p. 4866-4877.
 24. M. Singh, et al., *Inkjet Printing—Process and Its Applications*. Advanced Materials, 2010. **22**(6): p. 673-685.
 25. P.C. Duineveld, *The stability of ink-jet printed lines of liquid with zero receding contact angle on a homogeneous substrate*. Journal of Fluid Mechanics, 2003. **477**: p. 175-200.
 26. M. Tudorache, and C. Bala, *Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **388**(3): p. 565-578.
 27. A.L. Hart, et al., *On the use of screen- and ink-jet printing to produce*

- 
- amperometric enzyme electrodes for lactate*. *Biosensors and Bioelectronics*, 1996. **11**(3): p. 263-270.
28. B. Nguon, and M. Jouaneh, *Design and characterization of a precision fluid dispensing valve*. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 2004. **24**(3-4): p. 251-260.
 29. *American Diabetes Association*: <http://www.diabetes.org/>.
 30. Liu Chao, et al., *Progress on Glucose Oxidase*. *Food and Drug*, 2010. **12**(7): p. 285-288.
 31. Gabriel Zoldak, et al., *Irreversible thermal denaturation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* is the transition to the denatured state with residual structure*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(46): p. 47601-47609.
 32. Hao Tang, et al., *Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode*. *Analytical Biochemistry*, 2004. **331**(1): p. 89-97.
 33. A.J. Cunningham, *Introduction to Bioanalytical Sensors*, 1998. p. 167-192.
 34. Michael L. Shuler, and F. Kargi, *Bioprocess engineering*. 2002: Prentice Hall New York.
 35. J.F. Kennedy, et al., *Immobilized Enzymes and Cells*. *Chemical Engineering Progress*, 1990. **86**(7): p. 81-89.
 36. S. Rauf, et al., *Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetate-polymethylmethacrylate membrane*. *Journal of Biotechnology*, 2006. **121**(3): p. 351-360.
 37. F. Ricci, et al., *Prussian Blue and enzyme bulk-modified screen-printed electrodes for hydrogen peroxide and glucose determination with improved storage and operational stability*. *Analytica Chimica Acta*, 2003. **485**(1): p. 111-120.
 38. Brain A. Gregg, and Adam Heller, *Cross-Linked Redox Gels Containing Glucose-Oxidase for Amperometric Biosensor Applications*. *Analytical Chemistry*, 1990. **62**(3): p. 258-263.
 39. Asha Chaubey, et al., *Co-immobilization of lactate oxidase and lactate dehydrogenase on conducting polyaniline films*. *Analytica Chimica Acta*, 2000. **407**(1-2): p. 97-103.
 40. Nobuo Kageyama, *A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system*. *Clinica Chimica Acta*, 1971. **31**(2): p. 421-426.
 41. A.M. Azevedo, et al., *Ethanol biosensors based on alcohol oxidase*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005. **21**(2): p. 235-247.
 42. Xiaocui Zhao, et al., *Redox reactions of reactive oxygen species in aqueous*

- solutions as the probe for scanning electrochemical microscopy of single live T24 cells.* Canadian Journal of Chemistry-*Revue Canadienne De Chimie*, 2010. **88**(6): p. 569-576.
43. R. Garjonyte, et al., *Prussian Blue- and lactate oxidase-based amperometric biosensor for lactic acid.* Sensors and Actuators B: Chemical, 2001. **79**(1): p. 33-38.
44. F. Ricci, and G. Palleschi, *Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes.* Biosensors & Bioelectronics, 2005. **21**(3): p. 389-407.
45. Chia-hsiang Peng, *Photochemical synthesis of Prussian blue film and its application for H₂O₂ sensor.* Master Thesis in Department of Chemical Engineering(2007), Feng Chia University, Taiwan.
46. J.F. Keggin, and F.D. Miles, *Structures and formulae of the Prussian blues and related compounds.* Nature, 1936. **137**(7): p. 577-578.
47. Jacek C. Wojdeł, *First principles calculations on the influence of water-filled cavities on the electronic structure of Prussian Blue.* Journal of Molecular Modeling, 2009. **15**(6): p. 567-572.
48. H.J. Buser, et al., *The crystal structure of Prussian Blue: Fe₄[Fe(CN)₆]₃ · xH₂O.* Inorganic Chemistry, 1977. **16**(11): p. 2704-2710.
49. Yu-Ping Lin, *Operational Stability Enhancement of a Hydrogen Peroxide Sensor Based on Prussian Blue Fabricated through Inkjet Process.* Master Thesis in Department of Chemical Engineering(2012), National Taiwan University, Taiwan.
50. R.A. Huggins, *Mixed-conducting host structures into which either cations or anions can be inserted.* Solid State Ionics, 1998. **113–115**(0): p. 533-544.
51. V.D. Neff, *Electrochemical Oxidation and Reduction of Thin-Films of Prussian Blue.* Journal of the Electrochemical Society, 1978. **125**(6): p. 886-887.
52. A.A. Karyakin, et al., *The electrocatalytic activity of Prussian blue in hydrogen peroxide reduction studied using a wall-jet electrode with continuous flow.* Journal of Electroanalytical Chemistry, 1998. **456**(1-2): p. 97-104.
53. R. Garjonyte, and A. Malinauskas, *Operational stability of amperometric hydrogen peroxide sensors, based on ferrous and copper hexacyanoferrates.* Sensors and Actuators B-Chemical, 1999. **56**(1-2): p. 93-97.
54. J.Y. Hu, et al., *Inkjet Printed Prussian Blue Films for Hydrogen Peroxide Detection.* Analytical Sciences, 2012. **28**(2): p. 135-140.
55. Yu Liu, et al., *A sensitivity-controlled hydrogen peroxide sensor based on self-assembled Prussian Blue modified electrode.* Electrochemistry Communications, 2009. **11**(2): p. 484-487.

- 
56. Jun-Yu Hu, *Applications and Process Development of Biosensors by Inkjet Printing Methods*. Master Thesis in Department of Chemical Engineering(2011), National Taiwan University, Taiwan.
57. A.J. Bard, and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications 2nd ed.* 2001: New Work: John Wiley.
58. L.L. Zhang, and X.S. Zhao, *Carbon-based materials as supercapacitor electrodes*. Chemical Society Reviews, 2009. **38**(9): p. 2520-2531.
59. S. Matsuda, et al., *Bioadhesion of gelatin films crosslinked with glutaraldehyde*. Journal of Biomedical Materials Research, 1999. **45**(1): p. 20-27.
60. Kespi Pithawala, et al., *Immobilization of urease in alginate, paraffin and lac*. Journal of the Serbian Chemical Society, 2010. **75**(2): p. 175-183.
61. Chengyan Wang, et al., *Glucose biosensor based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on Prussian blue-gold nanocomposite films*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2011. **69**(1-2): p. 1-7.
62. A.A. Karyakin, et al., *On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes*. Electrochemistry Communications, 1999. **1**(2): p. 78-82.
63. I. Willner, and E. Katz, *Integration of layered redox proteins and conductive supports for bioelectronic applications*. Angewandte Chemie-International Edition, 2000. **39**(7): p. 1180-1218.