

國立臺灣大學生物資源暨農學院生物產業機電工程學系

博士論文

Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

酚類感測之電化學法的研究

Study on Phenols Sensing by Electrochemical Methods

陳柏中

Po-Chung Chen

指導教授：鄭宗記 博士

Advisor: Tzong-Jih Cheng, Ph.D.

中華民國 98 年 6 月

June, 2009

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

酚類感測之電化學法的研究
Study on Phenols Sensing by Electrochemical Methods

本論文係陳柏中君 (F92631027) 在國立臺灣大學生物產業
機電工程學系、所完成之博士學位論文，於民國 98 年 06 月 23
日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

鄭宗祀

(簽名)

(指導教授)

艾群

陳世強

吳靖宙

陳力松

系主任、所長

林達德

(簽名)

誌謝

本論文承蒙恩師鄭教授宗記、陳教授力騏和prof. Gunther Wittstock的指導，並提供良好的實驗室環境與設備，使得研究得以完成，謹致衷心的敬意與謝意。論文口試期間感謝艾教授群、陳教授世銘、吳教授靖宙、鄭教授宗記和陳教授力騏的細心匡正以及惠予諸多建議，使得論文更趨完備。研究期間幸有學長張福祥，同學謝博全、蕭賢義的相互切磋，以及學妹洪悅慈於實驗上的協助，特此誌謝。最後，將此論文獻給我摯愛的家人和朋友，感謝他們對我的支持與關懷。



中文摘要

本論文的研究是以發展適用於酚類感測的電化學技術為核心，將其應用於茶品工業的分類和品管以及酚類污染物感測上，並開發新穎微尺度的電沉積局部固定化酵素技術，以利未來新型酚類生物感測器的發展。

本論文之各部分研究摘要如下：

一、以茶品萃取液的氧化還原電位作為評估茶品醱酵程度的指標

茶品萃取液的氧化還原電位被建議作為茶品醱酵程度的電化學指標，其氧化還原電位係利用高輸入阻抗($>1000\text{ G}\Omega$)電位計對白金電極和 Ag/AgCl 參考電極進行量測，並利用赤/黃血鹽標準氧化還原對驗證氧化還原電位量測的信賴性。單寧酸濃度和抗壞血酸對於單寧酸氧化還原電位的影響被分別探討。茶葉的室內萎凋醱酵過程，氧化還原電位與醱酵時間表現出高度的關聯性。不同醱酵程度的茶葉，如煎茶、碧螺春、台灣烏龍茶、立頓綠茶、立頓紅茶和台灣紅茶，其氧化還原電位被探討比較。

二、以赤血鹽對單寧酸預氧化開發定量茶品中單寧濃度之定電位式流動分析系統

本研究提出利用赤血鹽對單寧酸預氧化策略，有效地避免直接電氧化單寧造成的電極污染問題，應用於開發茶單寧定量的定電位式流動分析系統。工作電壓與流率對於量測系統的影響被討論(最佳量測條件：工作電壓： $-0.1\text{ V vs. Ag/AgCl}$ ；流率： 2.28 mL min^{-1})。系統對單寧酸的線性檢量範圍可利用不同濃度的赤血鹽(1 mM 和 10 mM)進行調控(其檢量線分別為 $10\text{-}50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 和 $100\text{-}500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$)。本研究所提出的方法與 Folin-Ciocalteu method 和 the ferrous tartrate method 進行比對驗證，有高度的正相關($r = 0.9808$; $r = 0.9899$)。不同醱酵程度茶的單寧酸濃度被量測。

三、以黃血鹽基質循環增幅法於固定化酪胺酸酶定電位式流動分析系統定量鄰苯二酚、苯酚、雙酚 A

本研究提出利用酪胺酸酶(EC 1.14.18.1)催化酚類反應的線上流動分析酚類生物感測系統。固定化酪胺酸酶反應器係利用 controlled pore-size aminopropoyl glass

beads 作為固定化基質，裝填至流動分析系統的管路中。檢測電流可利用 10 mM 黃血鹽 (溶於 pH 7.0, 10 mM 磷酸緩衝液) 與酪胺酸酶催化酚類氧化反應形成基質循環增幅檢出訊號，鄰苯二酚、苯酚的檢測極限可以被增幅 100 倍，而濃度為 2.5×10^{-6} M 雙酚 A 可被檢出 (S/N>3; 工作電壓: +0 V vs. Ag/AgCl; 流率: 1.0 mL min^{-1})。

四、局部電沉積幾丁聚醣方法開發與固定化酵素之應用

本研究利用電極對間所產生 pH 梯度的電化學現象，分別嘗試以掃描式電化學顯微鏡 (Scanning electrochemical microscope, SECM) 的 direct mode 與微流道局部電沉積幾丁聚醣於導體基材表面。利用 SECM direct mode (對極: Pt 微電極; 工作電極: 平板 Au 基質電極) 與脈衝電壓 (1 s, -1.0 V vs. Ag/AgCl)，可造成局部的 pH 梯度，直接沉積直徑為數百微米幾丁聚醣於基質電極上，並藉由於不同位置上依序地電沉積形成幾丁聚醣沉積陣列；另一策略利用微流道限制幾丁聚醣的流動並電沉積 (10 min, -3.0V Au substrate vs. Pt wires)，可形成微尺度的幾丁聚醣帶狀圖案 (line width = 100 μm)。其沉積層表面的胺基係利用 NHS-fluorescein 與其反應，於共軛焦雷射掃描式顯微鏡下進行觀察。相較於使用 SECM direct mode，利用微流道電沉積幾丁聚醣，其沉積層較具重複性且可產生被定義的圖案。二方法皆可於電沉積幾丁聚醣的過程同時包埋葡萄糖氧化酵素，其活性利用 SECM generation-collection mode 觀察，使用微流道的固定化酵素活性分布較為均一，而其表面粗糙度則利用非接觸式原子力顯微鏡觀察。

關鍵字：茶品氧化還原電位、赤血鹽對單寧預氧化、黃血鹽基質循環增幅、局部電沉積幾丁聚醣

ABSTRACT

Novel electrochemical sensing methods for phenolic compounds have been developed for the quality control in tea industry (Part 1 & 2) and for the detection of phenolic pollutants based on substrate recycling amplification strategy (Part 3). Electrodeposition techniques of proteins on a charged bio-matrix were designed to immobilize analytical enzymes on a micro-pattern (Part 4), localized substrate recycling amplification may be investigated on the micro-fabricated bio-patterns.

Part 1: Redox potential of tea infusion as an index for the degree of fermentation

Redox potential of tea infusion was suggested as a working index for estimating the extent of tea fermentation. The redox potential of tea infusion was measured between platinum and Ag/AgCl electrode pair with a voltmeter with a high input impedance ($>1000\text{ G}\Omega$). The reliability of redox potential measurement was verified with a standard redox couple, ferricyanide / ferrocyanide. Effect of tannic acid concentration and ascorbic acid to the redox potential of tannic acid were discussed. Redox potential showed a high correlation with the fermentation degree and the indoor withering time (fermentation time). Several kinds of tea with different fermentation extents including Japanese Sencha (unfermented), Chinese Pilochn (slightly fermented), Taiwanese Pouchong (mild fermented), Taiwanese Oolong (partial-fermented), Western black tea (fully fermented) were measured and compared.

Part 2: Determining the levels of tannin in tea by ferricyanide pre-reaction in an amperometric flow-injection system

An amperometric flow-injection assay for tea tannin was proposed, which was based on ferricyanide pre-oxidation to prevent the electrode fouling problems frequently encountered in oxidation of phenolic compounds. The working potential and flow rate were optimized to be $-0.1\text{ V vs. Ag/AgCl}$ and 2.28 mL min^{-1} , respectively. The linear

dynamic range of tannic acid ($10\text{-}50 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $100\text{-}500 \mu\text{g mL}^{-1}$) can be adjusted using 1 mM and 10 mM ferricyanide, respectively. The proposed method was verified with Folin-Ciocalteu method ($r = 0.9808$), and the ferrous tartrate method ($r = 0.9899$). Tea with various fermentation degrees were successfully measured with a sample throughput of 15 samples h^{-1} .

Part 3: Amperometric flow-injection determination of catechol, phenol and bisphenol A by ferrocyanide substrate recycling amplification within an immobilized tyrosinase

An on-line phenols sensing flow-injection analysis (FIA) system was proposed, which was based on the broad phenolic oxidation capacity of mushroom tyrosinase (EC 1.14.18.1). The enzyme was densely immobilized on controlled pore-size aminopropoyl glass beads packed within a mini-reactor, and the reactor was installed in the flow stream of an amperometric FIA system. By reacting with 10 mM ferrocyanide (in pH 7.0, 10 mM phosphate buffer) supplied from the side stream of the flow system, substrate recycling amplification was conducted to regenerate the reduced phenols for the subsequent oxidation process catalyzed by the immobilized tyrosinase. The signals of catechol and phenol were amplified 100 fold, bisphenol A, an important endocrine disruptor, can be detected at $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($\text{S/N} > 3$; working potential: +0 V vs. Ag/AgCl; flow rate: 1.0 mL min^{-1}).

Part 4: Localized Electrodeposition of Chitosan as Matrix for Enzyme Immobilization

Based on the pH gradient electrochemically generated between electrodes, two localized chitosan electrodeposition methods were developed by either scanning electrochemical microscope (SECM) direct mode or microfluidic electrodeposition. With SECM direct mode, a localized pH gradient was induced between planar Au working electrode (the substrate) and the Pt auxiliary microelectrode by potential pulses

(1 s, -1.0 V vs. Ag/AgCl). An array of chitosan spots with hundreds of μm in diameter can be directly deposited on the Au substrate sequentially. The procedure could be carried out within a microfluidic channel in order to restrict the spreading of chitosan solution. Chitosan was gradually deposited (10 min, -3.0V Au substrate vs. Pt wires) along the channels with defined micro-scaled geometry (line width = 100 μm). The surface amino groups labeled with NHS-fluorescein were observed with confocal laser scanning microscopy. The deposition method using microchannels demonstrated a more reproducible and well-defined surface. Both methods can also be used to entrap glucose oxidase (GOx) during the deposition process. SECM in the generation-collection mode was used to detect the activity of GOx within the chitosan micro-patterns by oxidation of the formed hydrogen peroxide. The activity distribution of the immobilized GOx on the deposited chitosan layer was more uniform with the microfluidic channel method as compared to that obtained by SECM direct mode. The roughness was investigated with non-contact atomic force microscopy.

Keywords: redox potential of tea infusions, tannin pre-reaction with ferricyanide, ferrocyanide substrate recycling amplification, localized electrodeposition of chitosan

目 錄

=====

第一章 導論	1
第二章 以茶品萃取液的氧化還原電位作為評估茶品醱酵程度的指標	4
2.1 前言	4
2.2 材料與方法	7
2.2.1 化學藥品	7
2.2.2 台灣綠茶、烏龍茶、紅茶之室內萎凋製程	7
2.2.3 茶品萃取方法	7
2.2.4 氧化還原電位量測	7
2.3 結果與討論	9
2.3.1 氧化還原電位量測系統信賴性驗證	9
2.3.2 單寧酸濃度對氧化還原電位量測之影響	11
2.3.3 抗壞血酸對氧化還原電位量測之影響	13
2.3.4 室內萎凋對氧化還原電位之影響	14
2.3.5 綠茶與紅茶混合比例的氧化還原電位	16
2.3.6 不同醱酵程度茶品的氧化還原電位	18
2.4 結論	19
第三章 以赤血鹽對單寧酸預氧化開發定量茶品中單寧濃度之定電位式流動分析系統	20
3.1 前言	20
3.2 材料與方法	22
3.2.1 化學藥品	22
3.2.2 流動注射分析系統	22
3.2.3 單寧定量程序	22

3.2.4 茶品萃取方法	22
3.2.5 Folin-Ciocalteu method	23
3.2.6 The ferrous tartrate method	23
3.3 結果與討論	25
3.3.1 單寧酸電極毒化現象之觀察	25
3.3.2 典型單寧酸預氧化之流動分析訊號	27
3.3.3 工作電壓與流率之影響	29
3.3.4 系統效能	31
3.3.5 與單寧酸檢量公定法比較驗證	33
3.3.7 茶樣品實測	35
3.4 結論	36
第四章 以黃血鹽基質循環增幅法於固定化酪胺酸酶電化學流動分析系統定量鄰 苯二酚、苯酚、雙酚 A	37
4.1 前言	37
4.2 材料與方法	40
4.2.1 化學藥品	40
4.2.1 固定化酪胺酸酶	40
4.2.3 流動注射分析系統	40
4.3 結果與討論	42
4.3.1 基質循環增幅典型響應	42
4.3.2 工作電壓與流率之影響	44
4.3.3 鄰苯二酚、苯酚、雙酚 A 之檢量	47
4.4 結論	50
第五章 局部電沉積幾丁聚醣方法開發與固定化酵素之應用	51
5.1 前言	51

5.2 材料與方法	53
5.2.1 化學藥品	53
5.2.2 基材電極和微流道製備	53
5.2.3 掃描式電化學顯微鏡系統架設	53
5.2.4 共軛焦雷射和原子力顯微鏡	54
5.2.5 利用 SECM direct mode 局部沉積幾丁聚醣與酵素	54
5.2.6 利用微流道局部沉積幾丁聚醣與酵素	54
5.3 結果與討論	56
5.3.1 利用 SECM direct mode 局部沉積幾丁聚醣	56
5.3.2 利用 SECM direct mode 包埋葡萄糖氧化酵素於幾丁聚醣中	58
5.3.3 利用微流道局部沉積幾丁聚醣	60
5.3.4 利用微流道局部包埋葡萄糖氧化酵素於幾丁聚醣中	63
5.4 結論	65
第六章 總結	66
參考文獻	67



圖 目 錄

=====

圖 2-1 兒茶素經有氧醱酵作用氧化並聚合轉變成 theaflavins 的過程.....	6
圖 2-2 赤/黃血鹽氧化還原對的能斯特圖.....	10
圖 2-3 單寧酸濃度於氧化還原電位的影響.....	12
圖 2-4 室內萎凋時間對於氧化還原電位的影響.....	15
圖 2-5 綠茶與紅茶混合溶液的氧化還原電位.....	17
圖 3-1 本研究所提出流動分析系統架構的簡圖.....	24
圖 3-2 於流動分析系統觀察單寧酸的電極汙染.....	26
圖 3-3 單寧酸與赤血鹽預氧化的濃度相關電流響應.....	28
圖 3-4 工作電壓和流率對於電流響應的影響.....	30
圖 3-5 系統對單寧酸的檢量線.....	32
圖 3-6 本研究與美國和日本公定法的相關性.....	344
圖 4-1 本研究所提出流動分析系統架構的簡圖.....	39
圖 4-2 鄰苯二酚於流動分析系統的電流響應.....	43
圖 4-3 工作電壓對流動分析系統中電流響應的影響.....	45
圖 4-4 流率對鄰苯二酚與黃血鹽所形成基質循環增幅倍率的影響.....	46
圖 4-5 不同濃度鄰苯二酚與黃血鹽反應的電流響應.....	48
圖 4-6 鄰苯二酚與黃血鹽形成基質循環增幅的檢量線.....	49
圖 5-1 利用 SECM direct mode 局部電沉積幾丁聚醣.....	57
圖 5-2 利用 SECM GC mode 觀察包埋於幾丁聚醣中葡萄糖氧化酵素的活性.....	59
圖 5-3 利用微流道局部電沉積幾丁聚醣.....	61
圖 5-4 利用 SECM feedback mode 觀察微流道電沉積的幾丁聚醣沉澱.....	62
圖 5-5 葡萄糖氧化酵素-幾丁聚醣沉澱的非接觸式原子力顯微鏡圖.....	64

表 目 錄

=====

表 2-1 抗壞血酸對單寧酸氧化還原電位量測的影響.....	13
表 2-2 不同醱酵程度茶品萃取液的氧化還原電位.....	18
表 3-1 不同茶樣品單寧酸含量實測.....	35
表 4-1 本系統對鄰苯二酚、酚、雙酚 A 的檢測極限.....	47



符 號 說 明

=====

- d : 微電極和基材電極的距離(μm)
- E_T : 外加於微電極的偏壓(V)
- E° : 氧化還原對(redox couple)濃度相等時的正規電位(formal potential, V)
- ΔE : 被量測溶液的電位(V)
- F : 法拉第常數(Faradic constant, C)
- K : 氧化物的無因次常數
- K' : 還原物的無因次常數
- n : 氧化還原對電子轉移的化學計量數(stoichiometric number of electron transferred)
- $[O]$: 氧化物的活性(activity)
- r_T : 微電極的半徑(μm)
- R : 氣體常數(gas constant, $\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)
- RG : 包含絕緣層的微電極半徑與微電極半徑的比值
- $[R]$: 還原物的活性(activity)
- T : 絕對溫度(absolute temperature, K)

第一章 導論

酚類定義為帶有 OH 官能基的芳香環化合物，化學結構上以苯酚為基礎，衍生出多種酚類化合物。

自然界中，植物二次代謝產物的主要成分包含許多酚類化合物 (Beart, et al., 1985)，具有調控植物生長、繁殖和對於病原體防護的功能。天然酚類化合物亦表現出廣泛的生理活性，例如抗氧化、抗過敏、抗血栓、心血管保護等。飲料工業與蔬菜和水果之農業產品的品質，酚類成分扮演著影響味道與顏色的重要角色。

合成酚類於化工產業中被廣泛地使用，例如抗氧化劑、殺菌劑、透明塑膠等。但由於部分酚類結構與荷爾蒙結構相似，會對動物體的內分泌系統造成干擾，於環境會造成嚴重的危害，而許多的合成酚類亦帶有毒性，因而酚類污染物的感測對於環境監控上是非常重要的。

目前酚類分析和定量方法主要是以光學檢測受到信賴。Folin-Ciocalteu (或 Folin-Denis) assay 為定量植物和飲料中酚類混合物總量最廣為使用的光學方法 (A.O.A.C, 1980); 對於縮合單寧的定量是利用 Vanillin assay (Price, et al., 1978); 水解型單寧則是利用 potassium iodate 與其反應 (Haslam, 2003); 而多元酚類的生物活性則是利用蛋白質沉澱 (protein precipitation)，例如血紅蛋白與牛血清白蛋白，進行評估 (Hahn, et al., 1984)。而酚類化合物的分離、純化與定量則是以高效能層析法 (high performance liquid chromatography) 搭配光學檢出為主流 (Merken and Beecher, 2000)。

電化學方法相較於光學方法，具有較低的檢出極限以及易與半導體微影製程整合可被微小化等特性，因而目前所發展的實驗室晶片，多以電化學原理開發檢出器 (Wang, 2002)。由於許多的酚類化合物具有電化學活性，因而可利用電化學方法對酚類化合物進行分析，藉由循環伏安法 (Cyclic Voltammetry)，可以決定其氧化還原電位與可能的氧化作用機制 (Lunte, et al., 1988)。而與液相層析的搭配，使用電化學雙電極感測器的設計，則有較 UV 感測器選擇性好的潛力 (Chiavari, et al.,

1988)。

然而目前酚類化合物的電化學感測上，受限於直接電化學氧化酚類化合物造成電極污染的問題，使得重複性不佳；另一課題，則是如何降低電化學感測酚類化合物的檢出極限，特別是在環境中所殘留低濃度酚類污染物的檢出。

本論文的研究是以電化學技術為主軸，將其應用於酚類化合物相關的品質感測、環境感測。提出評估茶多酚生物轉化程度的電化學指標、避免電化學氧化單寧污染電極表面的新策略，以及嘗試降低酚類化合物電化學式生物感測器的檢出極限和發展新穎微尺度的局部固定化酵素技術，以利未來新型酚類生物感測器的發展。由茶品醱酵程度的評估和茶品單寧酸成分的定量乃至酚類污染物生物感測器研發，以及發展器局部電聚合幾丁聚糖於導體表面包埋酵素的基礎生物感測器界面研究。本論文之各部分主題如下：

第二章: 嘗試以開路電位法評估茶品醱酵程度。首先進行量測系統對氧化還原電位量測信賴性的驗證，接著探討單寧酸濃度、溶氧以及抗壞血酸對氧化還原電位量測之影響，並量測半醱酵茶萎凋製程、市售不同醱酵程度的茶品的氧化還原電位以及綠茶與紅茶混合比例的氧化還原電位，結果顯示茶品萃取液的開路氧化還原電位與醱酵程度有高度正相關。

第三章: 利用赤血鹽對單寧酸的預氧化策略，發展適用於定量茶品中單寧酸濃度的電化學流動分析系統。首先進行電化學氧化單寧酸所造成電極污染現象的觀察，接著利用赤血鹽對單寧酸的預氧化改善系統量測單寧酸的重複性，並探討流動分析注射系統的最佳化，並與光學量測單寧酸的公定法比較驗證，和進行市售茶品的樣品實測。

第四章: 以黃血鹽與固定化酪胺酸酶所催化的酚類氧化反應形成基質循環增，降低固定化酪胺酸酶所催化酚類的檢出極限，以利於微量殘留酚類污染物的初步檢出。首先以鄰苯二酚評估黃血鹽的增幅效果，之後進行流動分析系統的最佳化參數探討，並量測酚類污染物苯酚與雙酚 A。

第五章: 發展局部幾丁聚醣電沉積於導體表面技術並將其應用於包埋酵素。首先嘗試掃描式電化學顯微鏡(Scanning electrochemical microscope, SECM)的 direct mode 局部電沉積幾丁聚醣，並包埋酵素於幾丁聚醣中，再利用 SECM 觀察酵素活性，結果顯示酵素可被局部固定化於幾丁聚醣沉積層中，但由於 SECM direct mode 產生的 pH 梯度難以控制，使得幾丁聚醣沉積層的型態難以控制，而改採微流道限制幾丁聚醣溶液的空間分佈，再分別利用 SECM 與原子力顯微鏡觀察其局部電沉積的幾丁聚醣以及酵素，結果顯示幾丁聚醣與酵素可被控制地局部電沉積於導體表面。



第二章 以茶品萃取液的氧化還原電位作為評估茶品醱酵程度的指標

2.1 前言

茶品醱酵程度(Tea fermentation degree) 對於茶品品質有決定性的影響，特別是半醱酵茶的製程(Harbowy and Balentine, 1997)，但至今仍然缺乏監控醱酵程度較快速的分析方法和簡易的量化指標。現代的茶農，茶品醱酵程度僅憑著經驗判斷，半醱酵茶的品質因而難以控制與標準化。

紅茶全醱酵茶的製程，Borah 和 Bhuyan 利用電荷耦合元件相機(charge-coupled device camera)直接監控醱酵過程新鮮茶葉片的 RGB 顏色變化值(Borah and Bhuyan, 2005)，但對於許多不同種類的半醱酵茶，顏色相近但成分有所差異，臨界值難以判定，因而此方法並不適於半醱酵茶製程的監控。而近紅外光(near infrared)方法雖可以粗略的分類綠茶(未醱酵茶)、烏龍茶(半醱酵茶)與紅茶，但此方法尚未針對於品項眾多的半醱酵茶進行評估(Zhao, et al., 2006)。

茶有氣醱酵過程(aerobic tea fermentation) 是兒茶素(tea catechins) 一連串的氧化與聚合反應(Haslam, 2003)。兒茶素會轉變成許多不同種類的多元酚，包含 theasinensin 和 theaflavins，如圖 2-1 所示，其兒茶素濃度會逐漸降低。茶品中的多元酚組成會於醱酵過程變化，對於茶品品質有決定性的影響。醱酵程度對兒茶素含量的影響，由 Wu 等人利用薄層色層分析(Thin layer chromatography)評估(Wu, et al., 1975)，但此法須費時 2 天，高效能液相層析(high performance liquid chromatography)和毛細管電泳(capillary electrophoresis)對茶中多元酚成分的分離定量應可被進一步地利用(Dalluge and Nelson, 2000; Fernandez, et al., 2000; Horie and Kohata, 1998)。

對剛摘下的新鮮茶葉片中的兒茶素的主要成分進行定量分析，在經茶葉有氣醱酵製程後，主要兒茶素成分濃度發生變化，依其減少量進行醱酵程度評估，如

下式(2-1)，但對於市售與外來的眾多茶品，進行有氧醱酵之前主要兒茶素濃度成分以及可被信賴的生產資料實際取得不易，且台灣地區一般茶農屬於小經濟規模，對於大部分台灣茶農而言，其分離分析技術成本過高。

$$\text{Fermentation degree (\%)} = 1 - \frac{\text{Residual catechins content in fermented tea}}{\text{Initial catechins content in fresh leaves}} \quad (2-1)$$

本研究利用茶品萃取液的開路氧化還原電位作為評估茶品醱酵程度的指標，其開路氧化還原電位主要是受茶品萃取液中氧化還原物種濃度比例所影響，因而不受限於須取得進行有氧醱酵之前新鮮茶葉兒茶素濃度的生產資料，並且本系統由簡易的高輸入阻抗電位計和電化學工作電極和參考電極所組成，量測程序簡便，有利用一般人員進行實際的樣品量測。本研究的結果顯示茶品萃取液的開路氧化還原電位與醱酵程度有高度正相關。



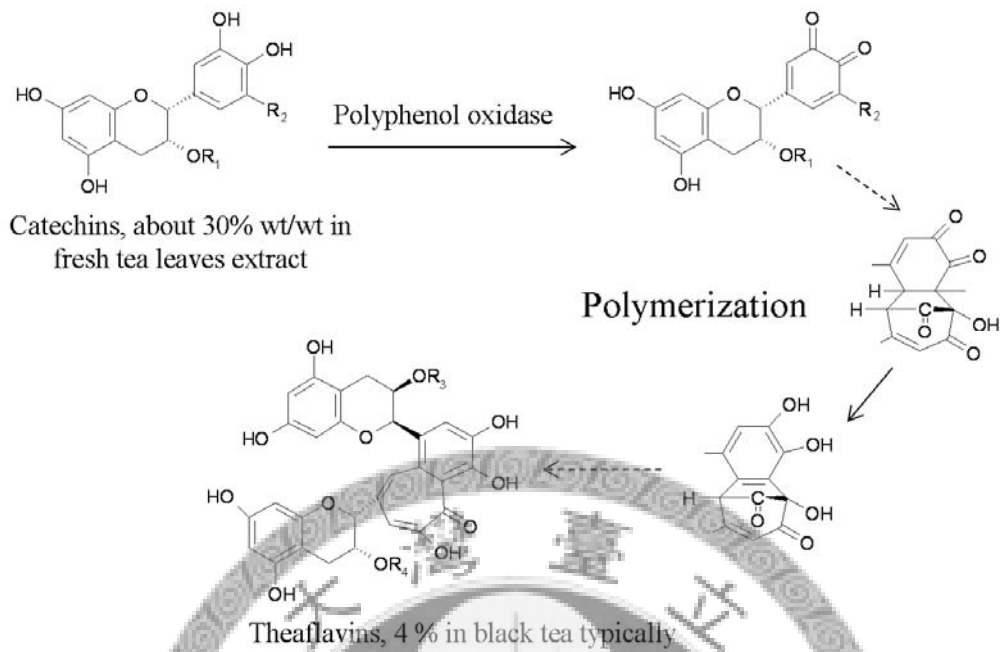


圖 2-1 兒茶素經有氧化酶作用氧化並聚合轉變成 theaflavins 的過程。兒茶素主要包含 epicatechin (R_1 : H, R_2 : H), epicatechin gallate (R_1 : gallate, R_2 : H), epigallocatechin (R_1 : H, R_2 : OH) and epigallocatechin gallate (R_1 : gallate, R_2 : OH). Theaflavins 主要包含 theaflavin (R_3 : H, R_4 : H), theaflavin 3-gallate (R_3 : H, R_4 : gallate), theaflavin 3'-gallate (R_3 : gallate, R_4 : H) and theaflavin 3,3'-digallate (R_3 : gallate, R_4 : gallate)。

2.2 材料與方法

2.2.1 化學藥品

黃血鹽(ferrocyanide, Potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate) 和赤血鹽(ferricyanide, tri-potassium hexacyanoferrate (III))購於 Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan)。單寧酸(Tannic acid)則購於 Wako Co., Ltd. (Japan)。抗壞血酸(L-ascorbic acid)購於 Sigma (St, Louis, Mo, U.S.A)。所有使用的化學藥品皆為分析等級並且購入後直接使用，未再進行純化。

2.2.2 台灣綠茶、烏龍茶、紅茶之室內萎凋製程

新鮮一心二葉的茶葉是從台灣文山茶葉改良場所種植的台茶 12 號所採集，之後將所採集的一心二葉的茶葉立即進行傳統的有氧發酵室內萎凋製程(indoor withering)，並控制適當萎凋時間的間隔以取得不同萎凋時間的茶葉樣品。利用圓筒炒菁機(rotary heating oven)終止不同時間的萎凋反應，並收集不同發酵程度的茶葉樣品。其他綠茶、烏龍茶、紅茶的製備則依據文獻所記載的生產流程進行(Wu, 1997)。

2.2.3 茶品萃取方法

檢測茶品萃取液是將 3 克茶葉浸置於 150 ml 的磷酸緩衝液(10 mM, pH 7.0, 室溫)30 分鐘，然後利用濾紙(Whatman, No. 1)過濾茶葉和其他雜質後取得檢測樣品。

2.2.4 氧化還原電位量測

開路氧化還原電位是利用高輸入阻抗(>1000 GΩ)電位計(SP-701, Suntex Co., Taiwan)量測白金工作電極(CHI 102, CH Instrument Co.)與 Ag/AgCl 參考電極(RE-6, BAS Co.) 之間溶液的開路氧化還原電位。量測流程如下，將電極對插入待測溶液中 3 分鐘後，記錄溶液的電位值。2.2.3 節所準備的茶葉樣品萃取液於一小時內量測完成。使用 10 mM 磷酸緩衝溶劑(pH 7.0)，作為量測開路氧化還原電位的輔助電解質，可降低溶液阻抗和穩定帶測物化學性質。為避免工作電極表面受到汙染，

在每一次的電位測量後，立即利用去離子水沖洗三次，而殘留的溶液則用拭淨紙
移除。



2.3 結果與討論

2.3.1 氧化還原電位量測系統信賴性驗證

本節量測不同濃度比例赤/黃血鹽溶液的氧化還原電位，並對量測數據進行分析確認是否符合能斯特方程式(式 2-2)的量測，以驗證本系統量測氧化還原電位的信賴性。

$$\Delta E = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[O]}{[R]} \quad (2-2)$$

其中， ΔE 是被量測溶液的電位(V)， $E^{o'}$ 是所量測化學物氧化還原對(redox couple)的正規電位(formal potential, V)， R 是氣體常數(gas constant, $\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)， F 是法拉第常數(Faradic constant, C)， n 是氧化還原對電子轉移的化學計量數(stoichiometric number of electron transferred)， T 是絕對溫度(absolute temperature, K)， $[O]$ 和 $[R]$ 分別是氧化物和還原物的活性(activity)。

若標準氧化還原對的電極反應速度足夠快，則可以忽略其他共存的氧化還原物種對氧化還原電位量測的干擾，例如溶氧。如圖 2-2，本實驗所使用的赤/黃血鹽氧化還原的濃度與電位的半對數圖所示，其不同濃度比例的氧化還原對($[O]/[R]$)所量測到的氧化還原電位與其比例呈現線性關係($r \cong 1.0$)， $CV < 1\%$ ，且其一次回歸線斜率為 58.34 mV，其值接近量測溶液溫度為 22.9°C 時的能斯特理論斜率 58.7 mV，可得知本研究所使用的氧化還原電位量測系統具有量測的可靠性。

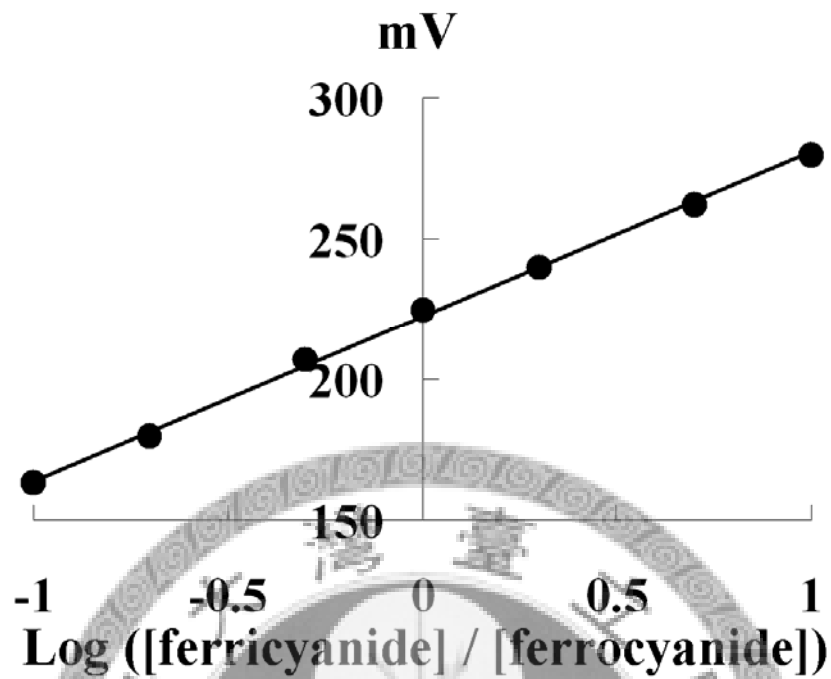


圖 2-2 赤/黃血鹽氧化還原對的能斯特圖。樣品溶液係利用 20 mM 赤血鹽與 20 mM 黃血鹽所混合成含不同濃度比例的赤黃血鹽(溶劑為 10 mM, pH 7.0, 22.9 °C 磷酸緩衝溶液)。每個資料點為 3 次量測的平均值(CV < 1%)。

2.3.2 單寧酸濃度對氧化還原電位量測之影響

本研究使用未經去氧 10 mM pH 7.0 磷酸緩衝溶液做為實驗溶劑，所量測的氧化還原電位包含溶液中較慢電極反應的溶氧分子，本節以混合物單寧酸作為標準品探討單寧酸濃度對於氧化還原電位的影響。如圖 2-3 所示，隨著單寧酸濃度的增加，氧化還原電位逐漸達到一穩定的電位值，當濃度高於 0.5 mg mL^{-1} ，所量測的氧化還原電位主要由單寧酸成分所造成，而溶液中的溶氧對於不同濃度的單寧酸電位量測干擾有限。



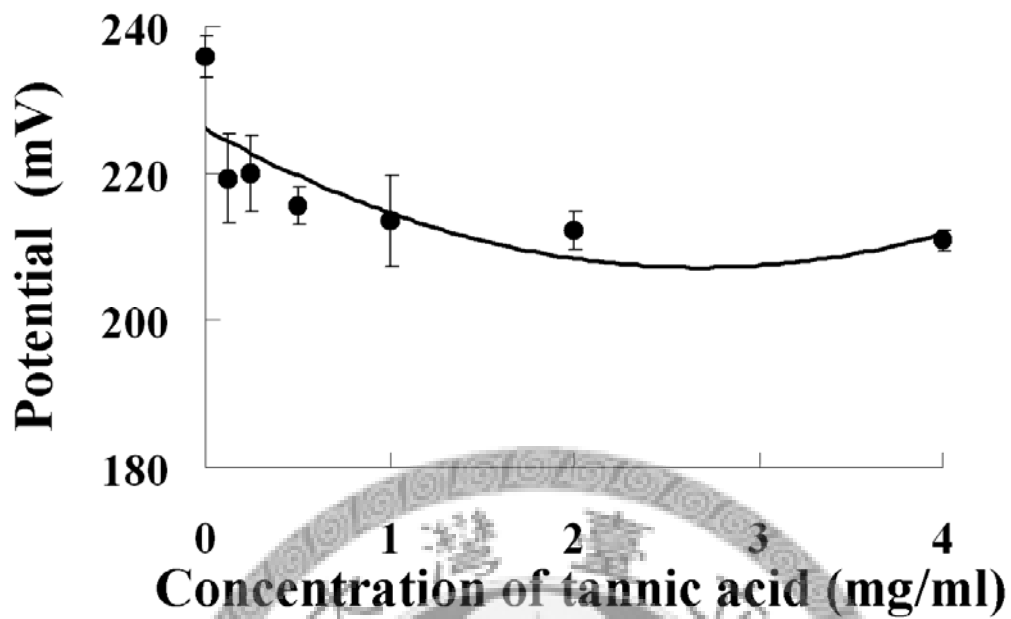


圖 2-3 單寧酸濃度於氧化還原電位的影響。單寧酸溶於 10 mM 磷酸緩衝液中(pH 7.0, 24.9 °C)。每個資料點為 3 次量測的平均值(CV < 3%)。圖中近似曲線係利用二次回歸($r^2 = 0.6233$)。



2.3.3 抗壞血酸對氧化還原電位量測之影響

茶品萃取液中，抗壞血酸為主要非酚類的電活性物質成分之一。在剛摘取下的茶葉中，抗壞血酸的含量約占不超過 10 % (wt/wt) 的茶單寧含量，但經過醱酵程序以及長時間儲存後會因氧化而逐漸減少。本節對 0.5 mg mL^{-1} 的單寧酸標準品，添加不同濃度的抗壞血酸，如表 2-1 所示，還原劑抗壞血酸對於單寧酸的氧化還電位的影響並不顯著，當抗壞血酸的濃度 ($0.0625 \text{ mg mL}^{-1}$) 相對於單寧酸的濃度為 12.5 % (wt/wt) 僅有 6.6 mV 訊號的降低。於前人文獻 (Tomlinson and Kilmartin, 1997) 亦探討類似的抗壞血酸於酒品中的氧化還原電位量測現象。

表 2-1 抗壞血酸對單寧酸氧化還原電位量測的影響。不同濃度的抗壞血酸被摻入 0.5 mg mL^{-1} 單寧酸，其溶劑為 10 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0, 24.9 °C)。

Concentration of ascorbate (mg/ml)	Potential (mV, n= 3)
0.0000	210.3±3.3
0.0625	203.7±3.8
0.1250	192.3±5.4
0.2500	190.7±6.1
0.5000	186.7±4.1

2.3.4 室內萎凋對氧化還原電位之影響

本節量測經由不同有氧發酵時間所製備的茶品，評估傳統部分發酵包種茶的發酵製程，其室內萎凋時間對於氧化還原電位的影響。如圖 2-4 所示，氧化還原電位隨著室內萎凋時間增加而逐漸增加，於室內萎凋過程茶多元酚會氧化成其醜的類似物，而所量測的茶品萃取液其顏色亦從黃綠色轉為黃褐色，兒茶素的生物化學轉化程度應可藉由氧化還原電位評估。



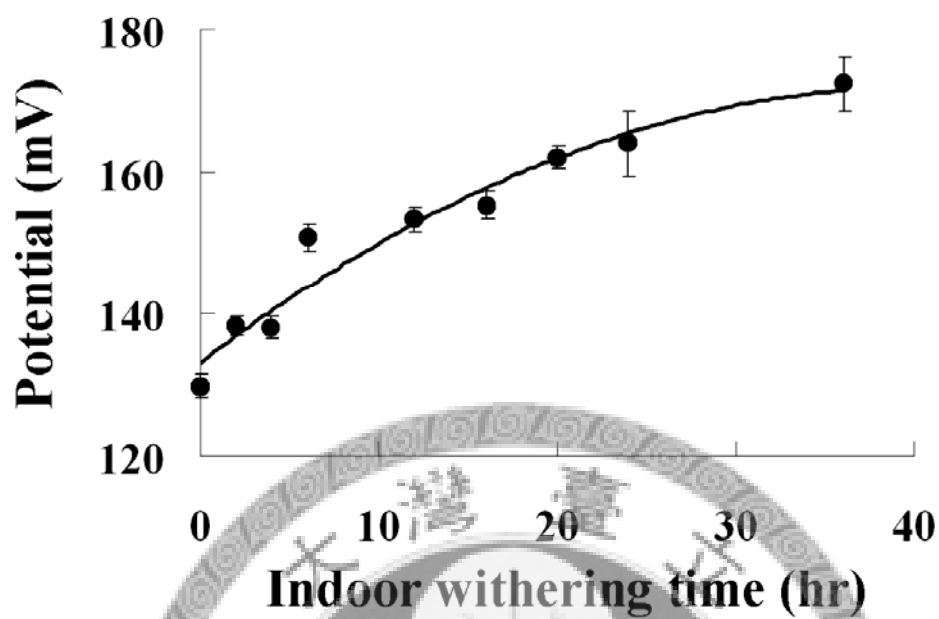


圖 2-4 室內萎凋時間對於氧化還原電位的影響。茶品利用 10 mM 磷酸緩衝液(pH 7.0, 24.9 °C)萃取。每個資料點為 3 次量測的平均值(CV < 3%)。圖中近似曲線係利用二次回歸($r^2 = 0.9506$)。

2.3.5 綠茶與紅茶混合比例的氧化還原電位

本節探討混合不同的 Lipton™ 綠茶與紅茶萃取液，其氧化還原電位與濃度比例的關係，如圖 2-5 所示，呈現線性相關，並應可藉由經修正的能斯特方程式預測(式 2-3)。新鮮茶葉的萃取物中的兒茶素約佔 30 % (wt/wt)，而全醱酵紅茶的萃取物中的茶黃素約佔 4 % (wt/wt)，綠茶與紅茶的混合萃取液中，許多不同的電活性物質對於所量測到氧化還原電位的貢獻，可能如式 2-3 所示，式 2-3 亦見於電生理學的 constant field equation(Goldman, 1943; Hodgkin and Katz, 1949)。

$$\Delta E = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\sum_i k_i [O_i]}{\sum_j k'_j [R_j]} \quad (2-3)$$

其中，K 和 K' 分別是氧化物和還原物的無因次常數，由 2.3.3 節的抗壞血酸對氧化還原電位影響的實驗結果(表 2-1)可得知抗壞血酸的無因次常數應甚小於單寧酸。而溶液中的溶氧對於利用氧化還原電位量測茶品萃取液多酚類組成的變化影響並不顯著。

另外針對不同品種的紅茶與綠茶的氧化還原對進行試驗，其線性回歸皆接近理想值($r^2 > 0.96$)，這些試驗資料應可做為茶品醱酵程度尺規的參考。

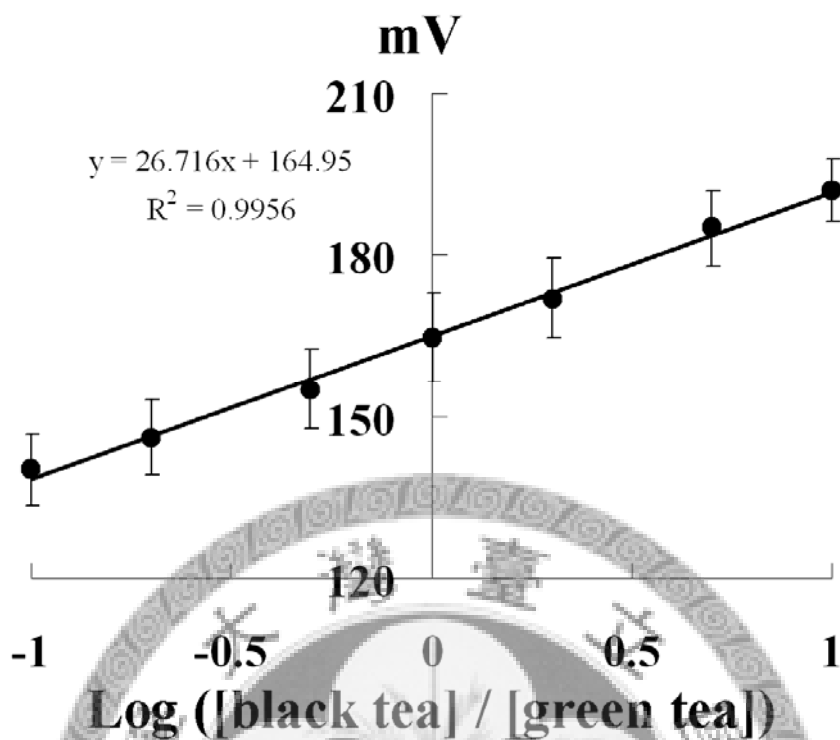


圖 2-5 綠茶與紅茶混合溶液的氧化還原電位。樣品溶液係利用綠茶與紅茶萃取液混合成不同體積比例，茶品利用 10 mM 磷酸緩衝液(pH 7.0, 24.9°C)萃取(詳見 2.2.3 節)。每個資料點為 3 次量測平均值(CV<5%)。

2.3.6 不同醱酵程度茶品的氧化還原電位

本節對各種不同醱酵程度茶品的萃取液進行氧化還原電位的量測，如表 2-2 所示，全醱酵紅茶相較未醱酵的日本煎茶其電位低了約 40-120 mV，而輕醱酵與部分醱酵茶，包含碧羅春、包種茶、立頓綠茶以及台灣烏龍茶，其電位則介於未醱酵茶與全醱酵茶間，結果顯示茶品醱酵程度與茶品萃取液的氧化還原電位有高度的關聯性。

表 2-2 不同醱酵程度茶品萃取液的氧化還原電位。每個資料點為 3 次量測平均值 (CV < 5%)。

Tea sample	Degree of Fermentation	Potential (mV)
Japanese green tea (sencha) ^a	Unfermented	121.3 ± 4.5
Pilochun ^a	Slightly fermented	124.0 ± 5.0
Pilochun ^b	Slightly fermented	129.7 ± 1.7
Pouchong ^a	Partially fermented	134.6 ± 4.0
Pouchong ^b	Partially fermented	138.0 ± 1.6
Lipton™ green tea ^a	Partially fermented	136.3 ± 2.6
Formosa Oolong tea ^a	Partially fermented	148.7 ± 4.2
Formosa Oolong tea ^b	Partially fermented	158.0 ± 4.5
Taiwanese black tea ^a	Fermented	161.3 ± 3.9
Taiwanese black tea ^b	Fermented	238.0 ± 6.5
Lipton™ black tea ^a	Fermented	200.0 ± 4.5

^a Commercially available tea

^b Prepared as in Materials and Methods section

2.4 結論

氧化還原電位的測量已被廣泛的應用於許多方面，包含電位滴定 (potentiometric titration)、水質分析(water quality analysis)和釀酒產業(Degueldre, et al., 1999; Durliat and Comtat, 2005; Sawyer and Robert, 1974; Teasdale, et al., 1998)。在食品分析的分類工具開發上，電位式的電子舌為未來的發展方向之一(Gallardo, et al., 2005)。對於酒的熟成度，電化學電位法已經被研究超過六十年(del Alamo, et al., 2006; Mourgues, et al., 1967)，而本研究則是首先嘗試將電化學電位法應於茶品醱酵度的分析，其量測方式簡易且成本相對低廉，有利於非實驗室的人員進行量測。由實驗的分析結果，茶品萃取液的氧化還原電位應可以做為一個客觀的茶品醱酵程度指標。



第三章 以赤血鹽對單寧酸預氧化開發定量茶品中單寧濃度之 定電位式流動分析系統

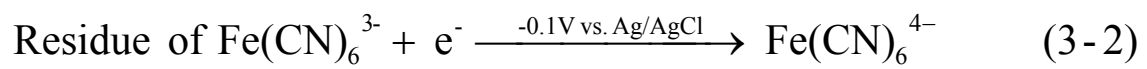
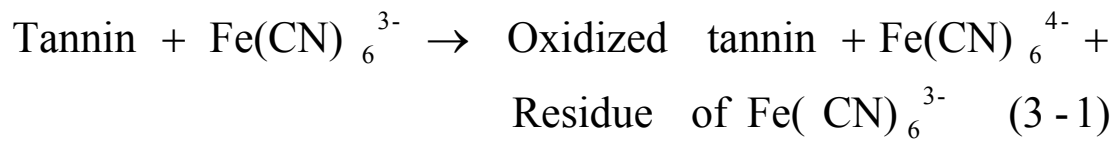
3.1 前言

茶品中的單寧成分是影響官能品評澀味的主要關鍵(Charalambous and Katz, 1976)，由於單寧會與唾液中的proline-rich 蛋白質形成非共價鍵結合(de Freitas and Mateus, 2002)。此外，茶單寧為茶品中的主要抗氧化成分(Hagerman, et al., 1998; Haslam, 2003)。對於茶品的品質，茶單寧含量有著決定性的影響。

單寧為分子量介於500至3000的水溶性多元酚類(Florkin and Mason, 1963)，其檢量的光學公定方法，美國官方使用與單寧形成氧化還原反應的Folin-Ciocalteu試劑(A.O.A.C, 1980)；而日本官方則採用與單寧形成複合物反應的ferrous tartrate方法(Iwasa and Torii, 1962)，此法具有不受到抗壞血酸干擾的優點。但是上述的公定法，反應程序準備繁瑣耗時。不利於線上分析系統的開發。

單寧的電化學檢量上，利用差位脈衝極譜(differential pulse polarography)(Hilton, 1973)和循環伏安法(cyclic voltammetry)(Fernando and Plambeck, 1988; Kilmartin and Hsu, 2003; Qu, et al., 2002)，可以對具有電活性(electrochemically active)的茶多酚，進行定量分析其等效單寧，但電氧化單寧於電極上形成氧化層的現象造成電極表面的污染問題(Gattrell and Kirk, 1993; Iotov and Kalcheva, 1998; Kilmartin and Zou, 2001; Wang, et al., 1991)，會影響定量分析的重複性，於單一樣品的量測上，則需利用具可再現性(reproducible)電極研磨程序，使得重複性提高。

本研究提出利用赤血鹽預混合氧化單寧的電化學檢量方法，如式(3-1)和式(3-2)所示，赤血鹽作為氧化劑，利用量測與單寧反應後剩餘的赤血鹽還原電流減少量反推定量單寧，不需要電極表面處理即可有效避免直接氧化單寧所造成的電極污染，並建立線上檢測單寧的流動分析系統。



3.2 材料與方法

3.2.1 化學藥品

赤血鹽(ferricyanide)和 ammonium ferrous sulfate hexahydrate 購於 Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan)。單寧酸 (Tannic acid) 購於 Wako Co., Ltd. (Japan)。Folin-Ciocalteu 試劑是從 Sigma Chemical Co. (St, Louis, Mo, U.S.A) 購買。所有使用的化學藥品皆為分析等級並購入後直接使用，未進行進一步的純化。

3.2.2 流動注射分析系統

本研究所使用的系統(圖3-1)由流動注射管路(1 mm 內徑的矽膠管)和聚丙烯(polypropylene)連接器所組裝，溶液由低壓蠕動幫浦所驅動(SMP-23S, Tokyo Rikakikai Co., Japan)，200 μL 樣品被注入於自製的電化學三極式流穿槽(flow cell) (Zhao, et al., 2006)，其中參考電極為Ag/AgCl/3M KCl (RE-6, BAS)，對極為不銹鋼管，工作電極為白金線(1 mm diameter)。氧化還原電流訊號是由電化學電位計(PGSTA-30, Autolab)所監控與紀錄，使用軟體為GPES 4.9 (Eco Chemie BV, the Netherlands)。

3.2.3 單寧定量程序

分別將4.5 mL的單寧酸溶液(濃度100-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ，溶於去離子水)加入0.5 mL 1 M磷酸緩衝溶液(pH 7.0)，再分別與5 mL 20 mM的赤血鹽(溶於0.1 M pH 7.0磷酸緩衝溶液)預先混合氧化，其樣品注入於流動分析管路中，並由0.1 M pH 7.0磷酸緩衝溶液載體溶液(carrier)推動樣品(流率2.28 mL min^{-1})，流經電化學三極式流穿槽記錄其氧化還原電流訊號，其中白金電極相對Ag/AgCl參考電極外加-0.1 V偏壓。而4.5 mL濃度為10-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的單寧酸溶液則加入0.5 mL 1 M pH 7.0磷酸緩衝溶液再分別與5 mL 2 mM赤血鹽(溶於0.1 M pH 7.0磷酸緩衝溶液)混合。茶樣品萃取液則稀釋至系統可檢出單寧酸濃度範圍進行檢測。

3.2.4 茶品萃取方法

碧螺春綠茶(未發酵茶)、文山包種茶(半發酵茶)、台灣烏龍茶(半發酵茶)和

台茶十八號紅茶(醱酵茶)的萃取液是分別將3 g茶葉浸置於恆溫83 °C 150 mL的熱水30分鐘，之後利用濾紙(Whatman, 11 µm of diameter) 過濾，並將樣品於水浴中冷卻後使用。

3.2.5 Folin-Ciocalteu method

將1mL 濃度為20-100 µg mL⁻¹ 的樣品分別加入5 mL 經10倍稀釋的Folin-Ciocalteu 試劑並於室溫下反應5分鐘，之後與75 g L⁻¹ 碳酸鈉(sodium carbonate)溶液混合，於室溫下反應兩小時後，利用分光光度計(UV/VIS spectrometry, V-530, Jasco)量測765 nm 的吸光值(Packer, 1999)。

3.2.6 The ferrous tartrate method

將0.2 mL 濃度為50-300 µg mL⁻¹ 的樣品分別加入0.5 mL 的 ferrous tartrate 溶液 (0.1 g ammonium ferrous sulfate hexahydrate 和 0.5 g potassium sodium (+)-tartrate tetrahydrate 溶於 100 mL 去離子水)，再加入2.5 mL 0.1 M pH 8 磷酸緩衝溶液，於混合20分鐘之後，量測混合溶液於540 nm 的吸光值(Iwasa, 1975)。



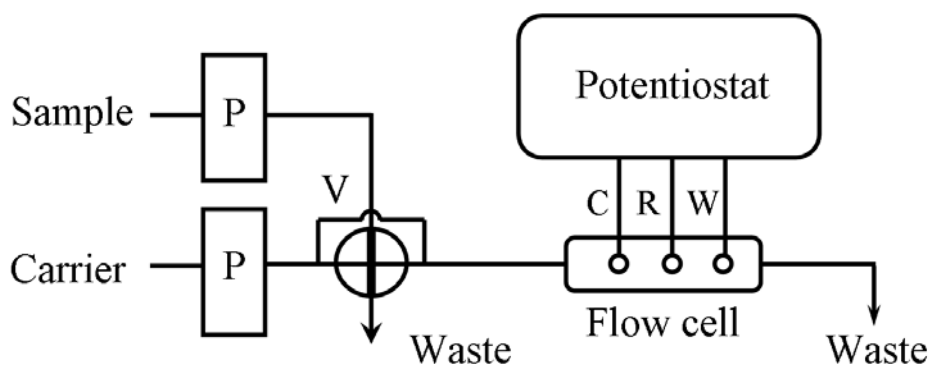


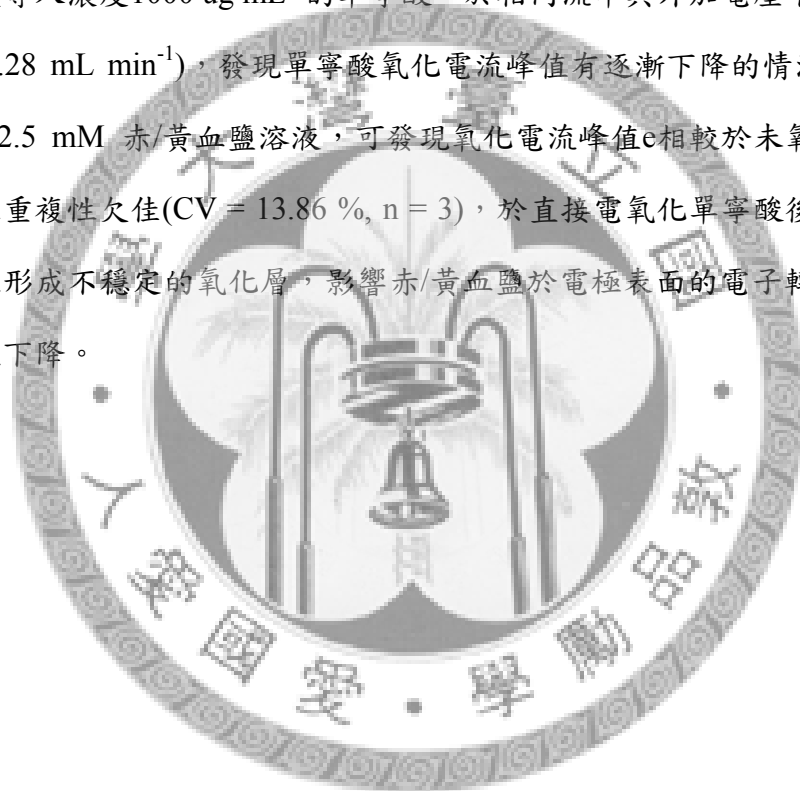
圖 3-1 本研究所提出流動分析系統架構的簡圖。P:低壓蠕動幫浦; V:六向閥; C:對極; R: 參考電極; W: 工作電極。



3.3 結果與討論

3.3.1 單寧酸電極毒化現象之觀察

將單寧酸導入本研究所使用的電化學流動分析系統，觀察直接電化學氧化單寧酸的電流響應與電極表面狀態(圖3-2)。首先，使用2.5 mM 赤/黃血鹽作為電極表面狀態的電化學氧化還原指標，觀察尚未電氧化單寧酸前電極的表面狀態，由重複性佳的赤/黃血鹽氧化電流峰值a ($CV = 0.45\%$, $n = 3$)可發現電極表面乾淨與穩定，之後導入濃度 1000 ug mL^{-1} 的單寧酸，於相同流率與外加電壓下($+0.35\text{ V vs. Ag/AgCl}$, 2.28 mL min^{-1})，發現單寧酸氧化電流峰值有逐漸下降的情況(峰值 b, c, d)，再導入2.5 mM 赤/黃血鹽溶液，可發現氧化電流峰值e相較於未氧化單寧酸前明顯下降且重複性欠佳($CV = 13.86\%$, $n = 3$)，於直接電氧化單寧酸後，單寧酸於白金電極上形成不穩定的氧化層，影響赤/黃血鹽於電極表面的電子轉移與擴散造成氧化電流下降。



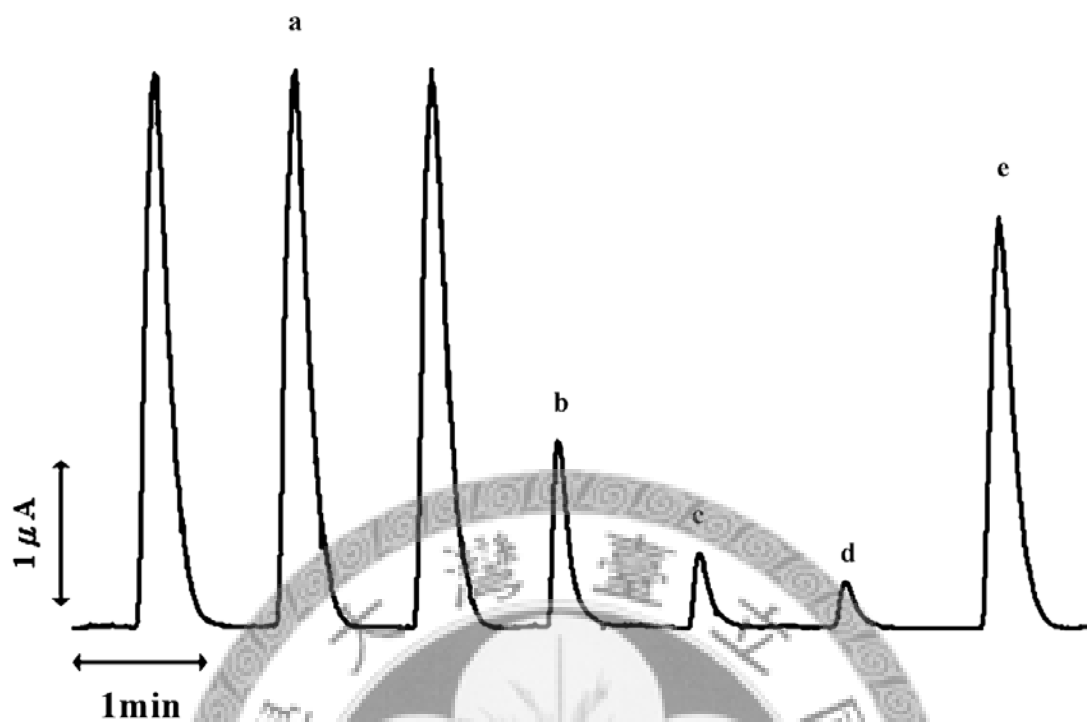


圖 3-2 於流動分析系統觀察單寧酸的電極污染。(a)和(e): 2.5 mM 赤黃血鹽溶液 (1:1, v/v); (b)-(d): $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ 單寧酸。工作電壓: +0.35 V (vs. Ag/AgCl); 流率: 2.28 mL min^{-1} 。

3.3.2 典型單寧酸預氧化之流動分析訊號

本節利用赤血鹽預氧化單寧酸策略可取得與單寧酸濃度相關($100\text{-}500\ \mu\text{g mL}^{-1}$)且重複性佳的($\text{CV} < 5\%$, $n = 3$)還原電流響應，如圖3-3所示。藉由預先添加與單寧酸混合的赤血鹽氧化單寧酸，並導入電化學流動分析系統，工作電極的外加電壓設為 $-0.1\ \text{V vs. Ag/AgCl}$ ，可避免原先單寧酸直接電氧化的汙染問題($+0.35\ \text{V vs. Ag/AgCl}$)，並利用赤血鹽與不同濃度單寧酸與氧化所造成還原電流峰值的減少量定量分析單寧酸濃度。



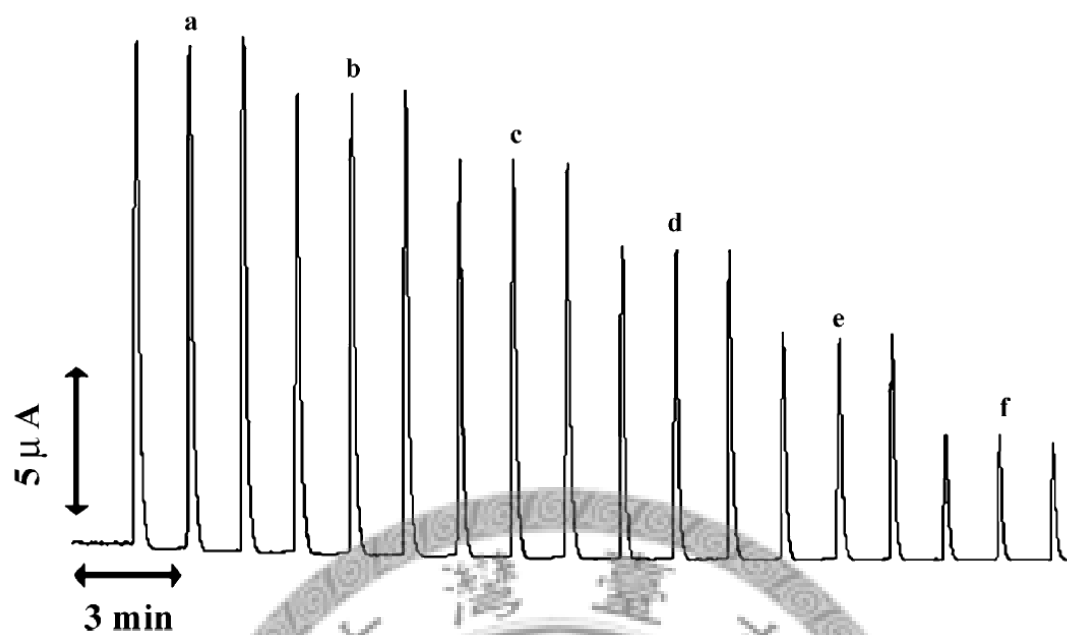
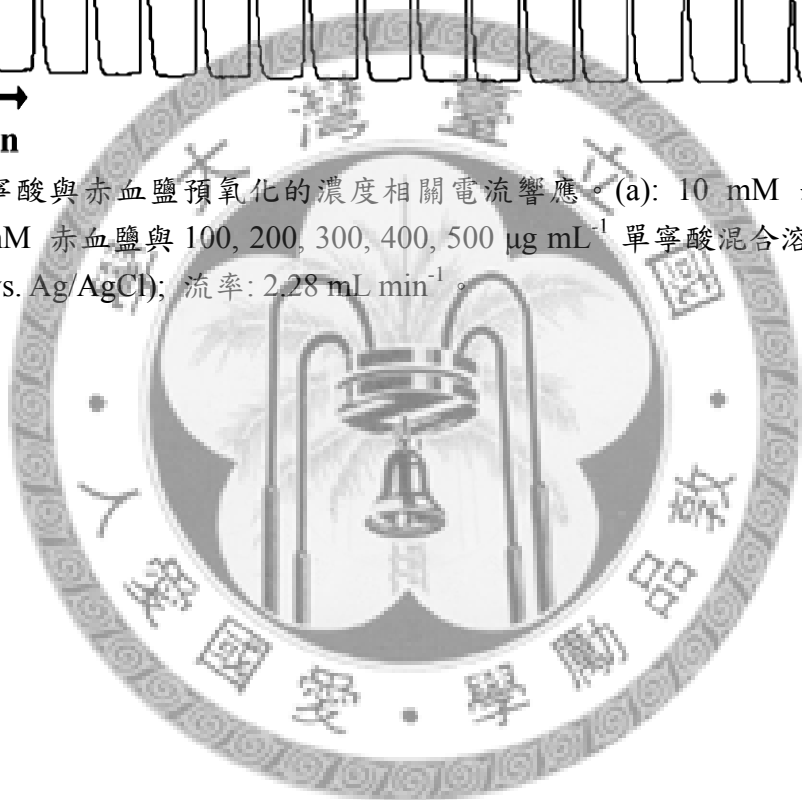


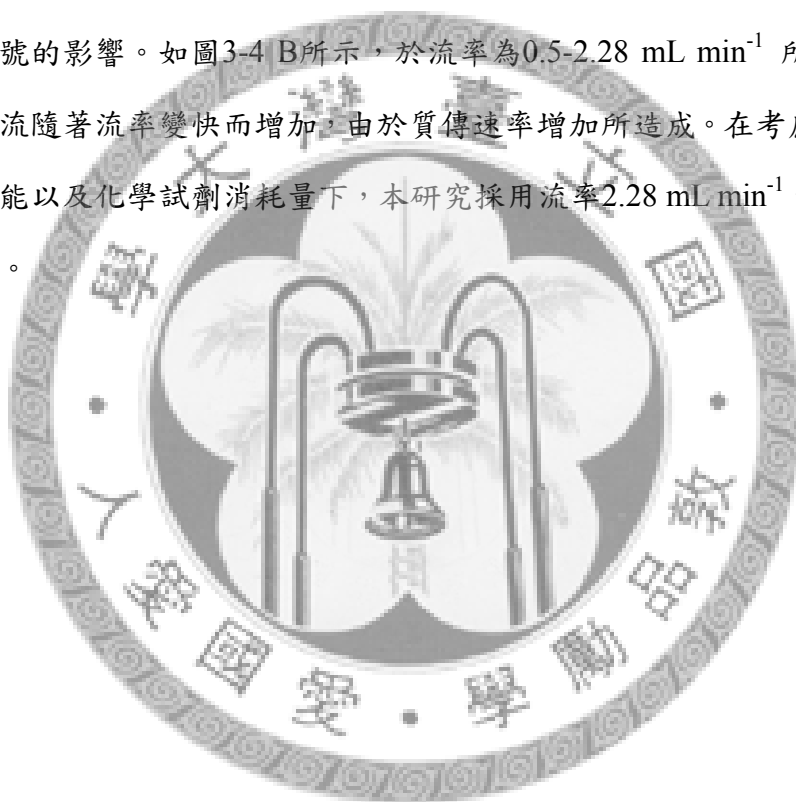
圖 3-3 單寧酸與赤血鹽預氧化的濃度相關電流響應。(a): 10 mM 赤血鹽溶液;
 (b)-(f): 10 mM 赤血鹽與 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 單寧酸混合溶液。工作電
 壓: $-0.1 \text{ V (vs. Ag/AgCl)}$; 流率: 2.28 mL min^{-1} 。



3.3.3 工作電壓與流率之影響

本節探討工作電壓與和流率對於10 mM 赤血鹽電流響應的影響，以取得量測系統最佳化條件。如圖3-4 A所示，赤血鹽於工作電壓0.2 V 以下還原電流開始增加並還原成黃血鹽，工作電壓-0.1 V以下還原電流增加量逐漸減少。為避免溶液中其他氧化物對於還原電流量測上的干擾，例如氧氣，與接近擴散限制電流的電位，以取得較大的電流響應，本實驗選擇-0.1 V vs. Ag/AgCl作為工作電壓。

於-0.1 V vs. Ag/AgCl的工作電壓下，進一步探討系統流率(0.18-2.28 mL min⁻¹)對於量測訊號的影響。如圖3-4 B所示，於流率為0.5-2.28 mL min⁻¹ 所量測到的赤血鹽還原電流隨著流率變快而增加，由於質傳速率增加所造成。在考慮取樣時間、蠕動幫浦性能以及化學試劑消耗量下，本研究採用流率2.28 mL min⁻¹，每小時可檢出15個樣品。



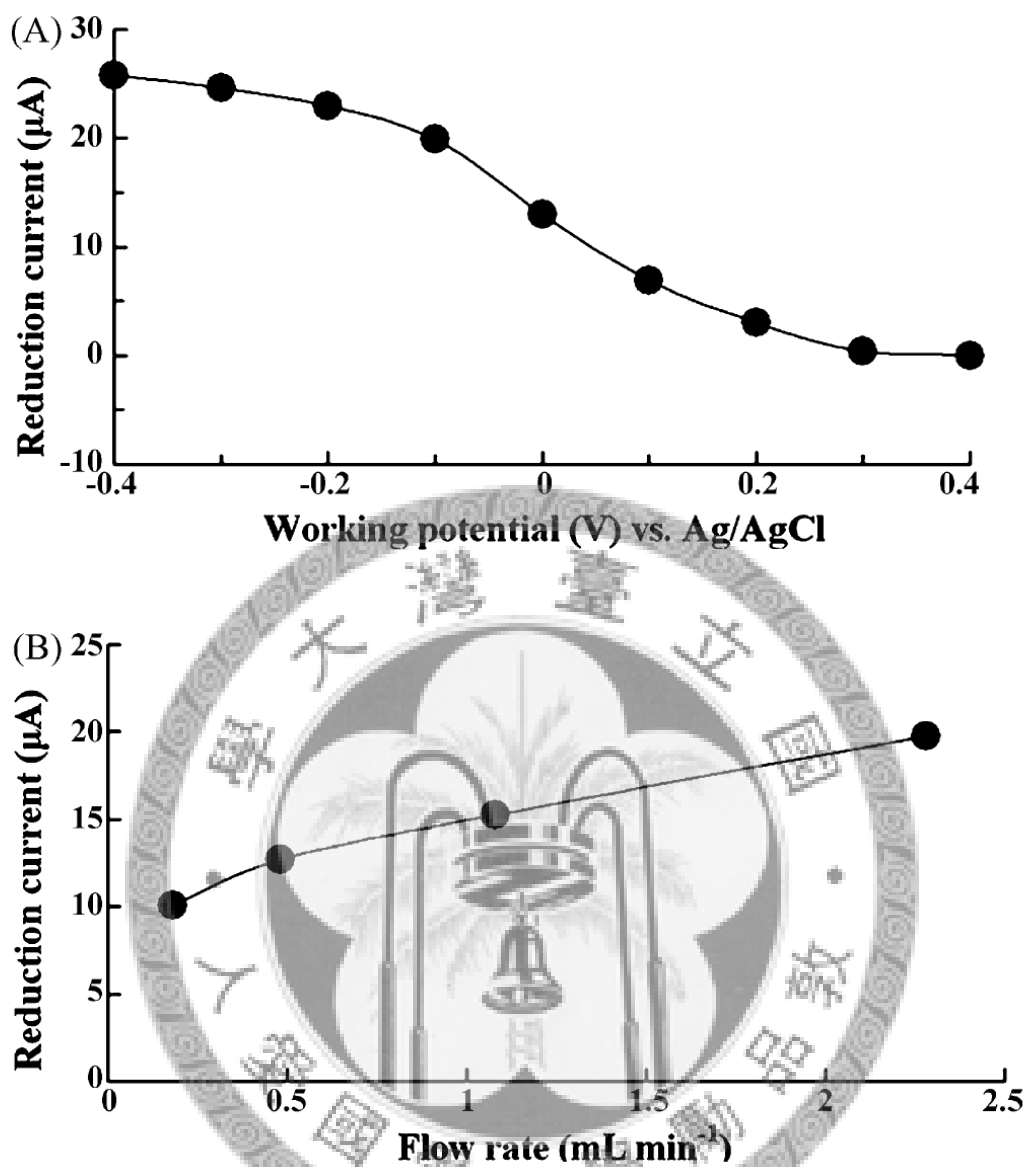


圖 3-4 工作電壓和流率對於電流響應的影響。(A) 工作電壓之影響，流率: 2.28 mL min^{-1} ; (B) 流率之影響，工作電壓: $-0.1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ 。皆利用 10 mM 赤血鹽進行探討。

3.3.4 系統效能

圖3-5 是本系統的單寧酸濃度檢量線。使用濃度為1 mM 的赤血鹽， $10\text{-}50\ \mu\text{g mL}^{-1}$ 單寧酸與赤血鹽預氧化所造成還原電流減少百分比呈現線性關係；使用濃度為10 mM 的赤血鹽， $100\text{-}500\ \mu\text{g mL}^{-1}$ 單寧酸與赤血鹽預氧化所造成還原電流減少百分比的呈現線性關係。藉由控制赤血鹽的濃度，單寧酸濃度檢測極限與可受到調控，相較使用濃度為10 mM 的赤血鹽，濃度為1 mM 的赤血鹽，系統有較高的靈敏度與較低的檢測極限，此一系統特性，可彈性地被利用於不同的單寧酸濃度檢測需求上。



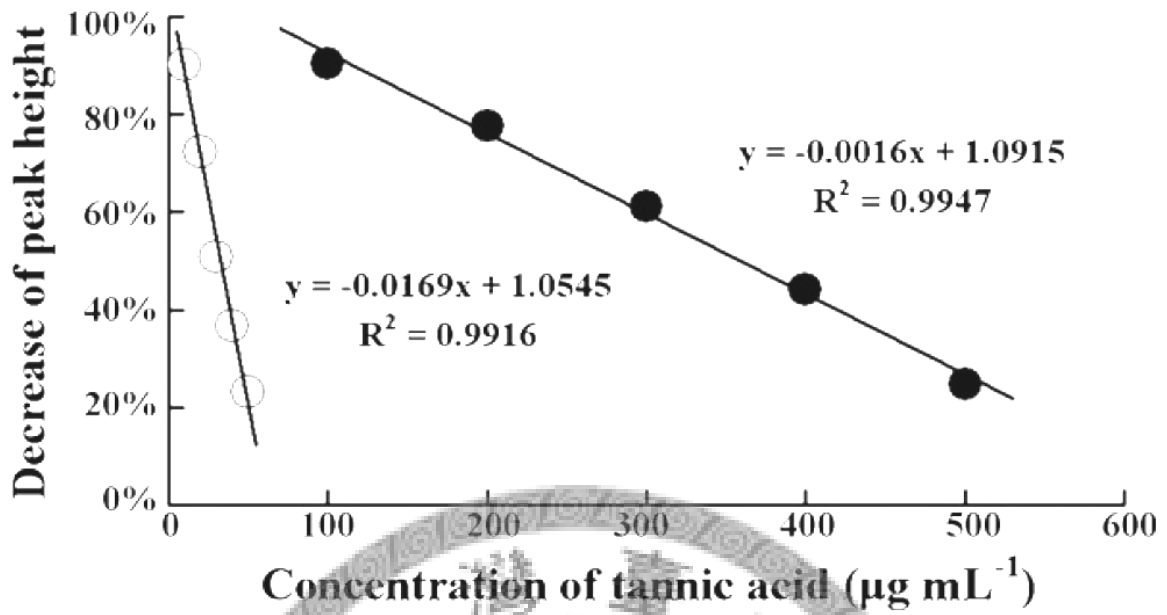
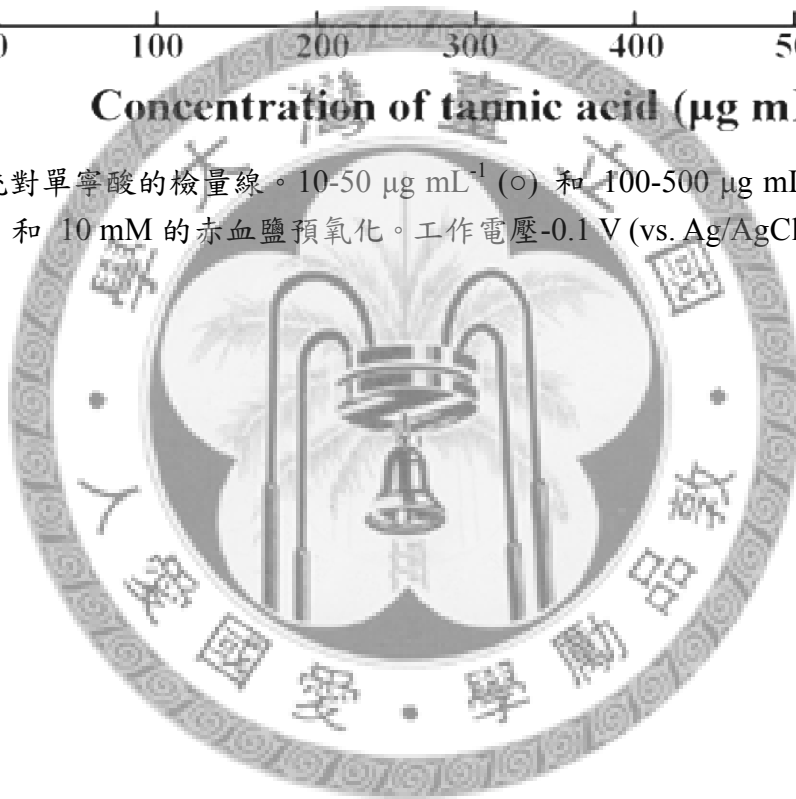


圖 3-5 系統對單寧酸的檢量線。10-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (○) 和 100-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (●)，分別使用 1 mM 和 10 mM 的赤血鹽預氧化。工作電壓-0.1 V (vs. Ag/AgCl); 流率: 2.28 mL min^{-1} 。



3.3.5 與單寧酸檢量公定法比較驗證

本節分別使用光學定量單寧酸濃度的日本公定法(The ferrous tartrate method)與美國公定法(Folin-Ciocalteu method)與本研究所提出的電化學方法進行對單寧酸濃度檢量的比較驗證，其結果如圖3-6所示，分別可得高度正相關的響應，此二光學方法分別使用不同的化學試劑與單寧酸標準品反應，其濃度檢量範圍亦有所差異 (0-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ by the ferrous tartrate method; 100-300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ by Folin-Ciocalteu method)，但本研究所提出的電化學法僅使用赤血鹽並藉由調控赤血鹽濃度即可得包含此二公定法的線性檢量範圍，簡測程序較為簡便。



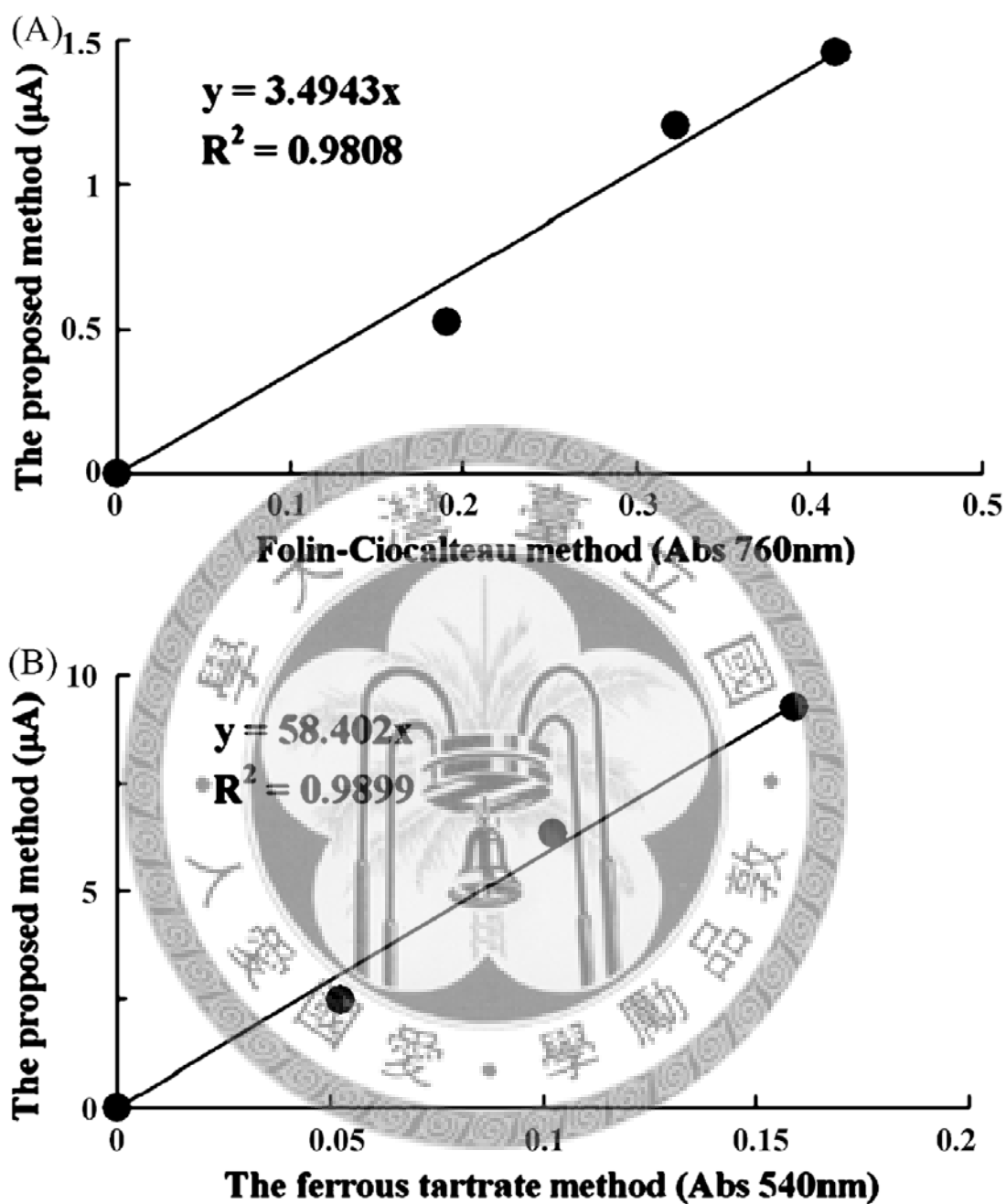


圖 3-6 本研究與美國和日本公定法的相關性。(A): 與 Folin-Ciocalteu method (with 20, 40, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of tannic acid)的相關性; (B): 與 the ferrous tartrate method (with 100, 200, 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of tannic acid).的相關性。

3.3.7 茶樣品實測

本節對不同醱酵程度的茶樣品進行樣品實測，如表3-1所示，並與二公定法所量測到的結果進行分析比較，由於不同醱酵程度的茶品中，不同茶多元酚的成分以及醱酵過程中所生成其他物種的化學性質差異，不同量測原理的二公定法與本研究提出的方法所測量的等效單寧酸濃度依茶品的醱酵程度有所差異。於碧螺春綠茶中，三個方法量得接近的單寧酸濃度，但半醱酵茶和全醱酵茶的測量上，Folin-Ciocalteu method由於受到茶湯顏色的影響，量測到較其他方法高的單寧酸濃度，而the ferrous tartrate method目前僅作為於未醱酵茶的量測公定法。

表 3-1 不同茶樣品單寧酸含量實測。

Tea sample	Type	Content of tannin ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		Proposed method	Folin-Ciocalteu method	The ferrous tartrate method
Pi-lo-chun green tea	Non-fermented	2655.20	2859.54	2707.20
Wenshan Pouchong tea	Semi-fermented	1566.24	1895.06	1569.80
Formosa Oolong tea	Semi-fermented	1913.09	2356.84	1740.50
Taiwanese No.18 black tea	Fermented	2272.09	2864.20	2465.30

3.4 結論

本研究開發了一相對簡易的電化學茶單寧定量方法，利用赤血鹽的預氧化可有效避免電極毒化，且系統對單寧酸的線性檢量範圍可利用不同濃度的赤血鹽(1 mM和10 mM)進行調控(其檢量線分別為10-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 和100-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)。相較使用其他電化學量測單寧方法所使用的電極修飾和電極再生程序，本方法具有相對容易的檢測流程，且與二光學公定法有高度相關性，並可即時線上量測，不需二公定方法複雜的試劑準備與費時的反應時間，同時不受到茶湯顏色本身的干擾，可作為茶品單寧酸成分的檢量系統。



第四章 以黃血鹽基質循環增幅法於固定化酪胺酸酶電化學流動分析系統定量鄰苯二酚、苯酚、雙酚 A

4.1 前言

人工酚類所合成的產品被廣泛地使用在日常生活中，但是部份酚類對動物和人的健康影響甚大，特別是一些帶有chloro或nitro官能基的酚類於生物體中表現出毒性(Patty, 1963)以及一些被認定為環境赫爾蒙的的酚類，例如17 β Estradiol 和 bisphenol A，會干擾內分泌系統(Birkett and Lester, 2003)，而這些酚類的疏水性和非極性性質，使得這些酚類污染物容易殘留在環境中。為保護環境和食品安全，發展可以線上監控/篩選酚類污染物的系統是很急需且重要的。

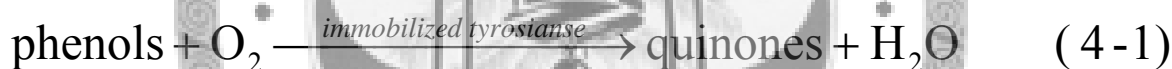
目前篩選可疑酚類環境荷爾蒙的方法可以藉由對內分泌干擾的活性初步地檢出，如競爭配基結合分析(competitive ligand binding) (White, et al., 1994)、細胞增生試驗(cell proliferation) (Korner, et al., 1999)、重組受體-指標性基因測試(recombinant receptor-reporter gene (Gaido, et al., 1997) 方法。進一步的確認，則需透過體內試驗判定，如雌鼠子宮增生法(rodent uterotrophic method) (Odum, et al., 1997)。而對這些已知酚類污染物的定量，目前則以氣相層析(gas chromatography)和液相層析(liquid chromatography)為主要定量方法(Grob, 1991; McIntyre and Lester, 1983; Petrovic and Barcelo, 2000)。

然而對於發展現場(*in-situ*)監控酚類污染物的系統，生物感測器則較其他方法具有相對優勢，因為不需要較為複雜的前處理和分離程序，利用酵素的特異性，即可直接偵測目標分子，且容易與流動注射分析系統整合(Rodriguez-Mozaz, et al., 2006)。酚類生物感測器通常利用酪胺酸酶(tyrosinase, EC 1.14.18.1)，因為酪胺酸酶可以較廣泛的催化酚類的氧化作用，使其轉變成醌類，可藉由溶氧的消耗量或是醌類的生成量定量酚類(de Faria, et al., 2007)。但是，對於一些低溶解度且極微量對健康就有影響的酚類污染物，如雙酚A，僅使用酪胺酸酶的生物感測器，面臨檢測

極限是不足以檢出的困境。

為改善酚類生物感測器的檢測極限，針對酪胺酸酶的增幅反應策略被提出。利用葡萄糖去氫酶(glucose dehydrogenase, GDH)或辣根過氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)協同酪胺酸酶的催化反應，可使得雙酵素增幅達成(Makower, et al., 1996; Stanca, et al., 2003); 利用電化學媒介物，例如抗壞血酸、黃血鹽、煙醯胺腺嘌呤二核酸(NADH)，配合酪胺酸酶的催化反應，亦可增幅反應(Brown, et al., 1994; Hasebe, et al., 1993; Schiller, et al., 1978; Smit and Rechnitz, 1993; Uchiyama, et al., 1993)。

本研究發展利用黃血鹽與固定化酪胺酸酶酵素反應器定電壓式感測鄰苯二酚、苯酚和雙酚A的流動注射分析系統。其系統如圖4-1所示，固定化酪胺酸酶反應器與電化學流穿槽(flow cell)分離; 其檢測原理，如式(4-1)至式(4-3)所示，因而酚類氧化所造成的固定化酪胺酸酶電極污染問題(Nistor, et al., 1999)可以避免。



黃血鹽作為被固定化酪胺酸酶催化酚類氧化生成醌類的還原劑，而基質循環則形成於固定化酪胺酸酶所催化的反應物與產物之間，酚類的濃度則可間接地由生成的赤血鹽還原電流進行定量，並降低檢測極限。

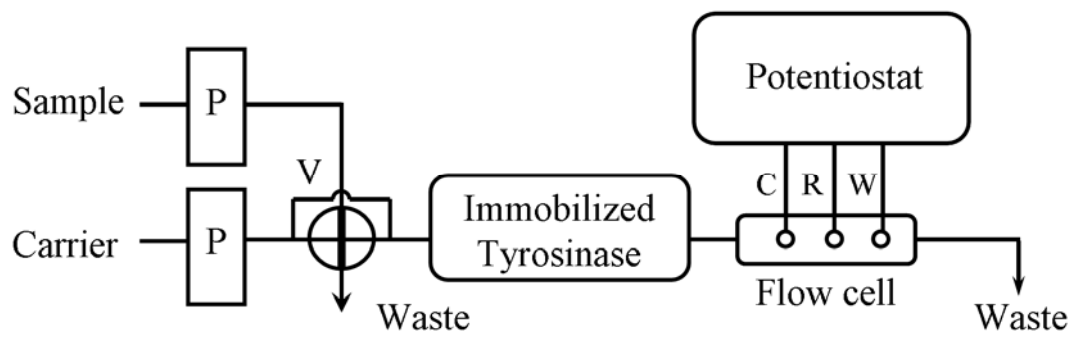


圖 4-1 本研究所提出流動分析系統架構的簡圖。P: 蠕動幫浦; V: 六向閥; C: 對極; R: Ag/AgCl 參考電極; W: 白金工作電極 (直徑 1 mm)。



4.2 材料與方法

4.2.1 化學藥品

酪胺酸酶(tyrosinase; EC 1.14.18.1) 和 controlled pore-size aminopropoyl glass bead (aminopropoyl-CPG, 80-120 mesh, 70 nm of average pore size) 是從Sigma Chemical Co. (St, Louis, Mo, U.S.A)所購得。鄰苯二酚(catechol)和戊二醛(glutaraldehyde)是從Wako Co., Ltd. (Japan) 所取得。雙酚A(Bisphenol A)則是購於Aldrich Co. (St, Louis, Mo, U.S.A)。黃血鹽(ferrocyanide)和苯酚(phenol)來自於Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan)。所有使用的化學藥品皆為分析等級並購入後直接使用，未進行進一步的純化。

4.2.1 固定化酪胺酸酶

利用戊二醛作為交聯劑(cross-linking reagent)將酪胺酸酶(20 mg) 固定於 0.1 g aminopropoyl-CPG 的表面上。其固定流程是先將 0.1 g aminopropoyl-CPG 以 0.2 M 碳酸緩衝溶液(pH 10.0) 沖洗，並將其浸置於 4 ml 的碳酸緩衝溶液中，然後加入 1 ml 濃度為 25% 的戊二醛，於室溫下經兩小時的搖晃混合，使其胺基官能基活化(activating)與戊二醛形成共價鍵。之後以 0.1 M 磷酸緩衝液(pH 6.8)過濾沖洗，再加入溶有 20 mg 酪胺酸酶 1 ml 的磷酸緩衝液(pH 6.8)，於 4 °C 下，經過 12 小時反應。所產生的固定化酪胺酸酶 slurry 以 3% (w/v) NaCl, 0.1 M, pH 6.8 磷酸緩衝溶液過濾沖洗，移除非共價鍵酵素的吸附。之後將酵素 slurry 填裝至兩端塞有棉花的矽膠管(2 mm i.d.)，防止酵素 slurry 流出，以作為適用於流動分析系統中使用的固定化酵素反應器。未使用固定化酪胺酸酶反應器時，將其保存在 4 °C 的環境中。

4.2.3 流動注射分析系統

本研究所使用的低壓流動分析系統(圖4-1)由傳統的流動注射管路(silicon tubes with 1 mm i.d.)、固定化酪胺酸酶反應器和電化學三極式流穿槽組裝。溶液由蠕動幫浦所驅動(SMP-23S, Tokyo Rikakikai Co., Japan)，經固定化酪胺酸酶反應器反應後於自製的電化學三極式流穿槽檢測，其中參考電極為Ag/AgCl/3M KCl (RE-6,

BAS)，對極為不銹鋼管，白金線(1 mm diameter)為工作電極。氧化還原電流訊號是由電化學電位計(PGSTA-30, Autolab)所監控與紀錄，使用軟體為GPES 4.9 (Eco Chemie BV, the Netherlands)。



4.3 結果與討論

4.3.1 基質循環增幅典型響應

本節利用酪胺酸酶催化鄰苯二酚的氧化反應，探討導入黃血鹽對於其反應所造成的影響。如圖 4-2 所示，觀察電流響應 b(未使用黃血鹽作為載體溶液)，可得知於鄰苯二酚注入流路中後，鄰苯二酚被固定化酪胺酸酶催化，形成被氧化的鄰苯二酚，經電化學流穿槽，量測到其還原電流峰。而由電流響應 a(使用黃血鹽作為載體溶液)可發現，還原電流峰訊號相較未使用黃血鹽作為載體溶液的電流響應明顯增大，增幅原因為基質循環於固定化酪胺酸酶反應器中形成。



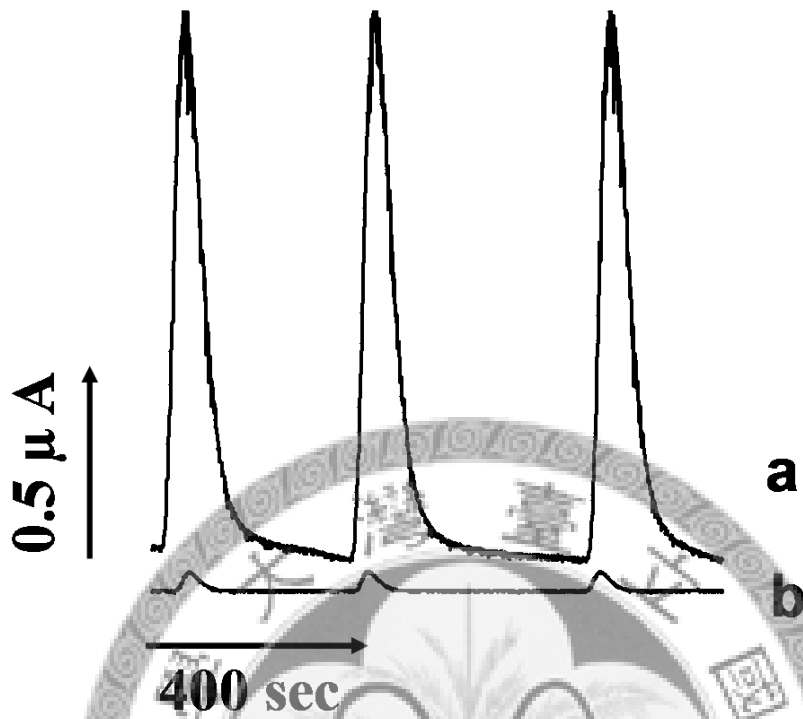


圖 4-2 鄰苯二酚於流動分析系統的電流響應。鄰苯二酚濃度為 10^{-4} M (a) 使用 10 mM 黃血鹽作為載體溶液; (b) 不使用 10 mM 黃血鹽作為載體溶液。溶劑為 10 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.0)。工作電壓: 0 V (vs. Ag/AgCl); 流率: 1.0 mL min^{-1} 。

4.3.2 工作電壓與流率之影響

本節探討工作電壓與和流率對於系統響應的影響，以找出增幅的最佳條件。將黃血鹽和鄰苯二酚分別作為載體溶液直接流入電化學三極式流穿槽，未經固定化酪胺酸酶反應器，如圖 4-3 所示，在工作電壓-0.3 至 0 V (vs. Ag/AgCl)，黃血鹽和鄰苯二酚的還原電流略為減少，當工作電壓超過 0 V，黃血鹽和鄰苯二酚被電化學氧化，隨著工作電壓的增加，黃血鹽較鄰苯二酚氧化電流有較顯著的增幅。本實驗為量測所生成的赤血鹽(式 4-3)，避免其他電化學物種的干擾，例如未反應完的黃血鹽，工作電位選擇為 0 V (vs. Ag/AgCl)。

圖 4-4 為流率對增幅響應倍率的影響，隨著流率降低，增幅倍率增加，推測是因為反應物於固定化酪胺酸酶反應器中的滯留反應時間增加，使得基質循環次數增加所造成。權衡取樣時間、增幅倍率和試劑消耗，選擇 1.0 mL / min 作為系統流率，每小時可檢出 8 個樣品。



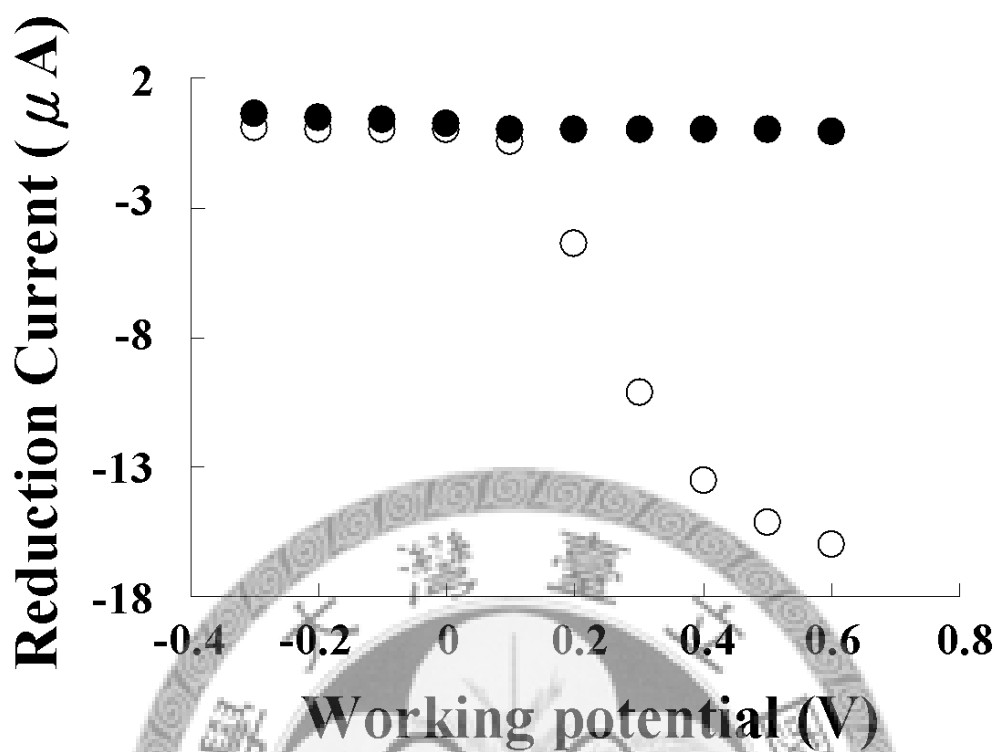


圖 4-3 工作電壓對流動分析系統中電流響應的影響。(●) 10^{-4} M 鄰苯二酚; (○) 10 mM 黃血鹽。溶劑為 10 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.0)。溶液僅流過電化學流穿槽，未經固定化鉻胺酸酶反應器。流率: 1.0 mL min^{-1} 。

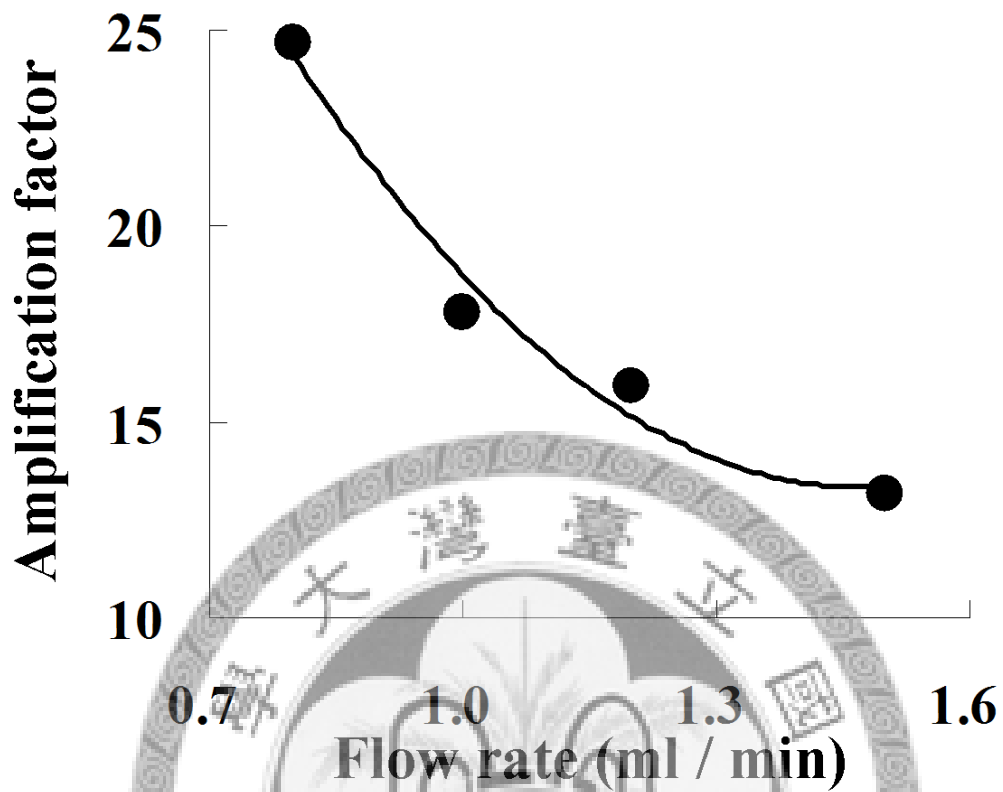


圖 4-4 流率對鄰苯二酚與黃血鹽所形成基質循環增幅倍率的影響。鄰苯二酚濃度為 10^{-4} M，黃血鹽濃度為 10 mM，皆溶於 10 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0)，工作電壓: 0 V (vs. Ag/AgCl)。

4.3.3 鄰苯二酚、苯酚、雙酚 A 之檢量

圖4-5為利用黃血鹽增幅所得到與鄰苯二酚濃度相關的電流響應圖，當鄰苯二酚濃度為 10^{-2} M- 10^{-8} M時，還原電流峰值隨濃度降低。而鄰苯二酚濃度為 1×10^{-2} M時，增幅訊號稍為被抑制，推測是黃血鹽濃度不足，使得基質循環增幅受限所造成(式 4-1與式4-2)，圖4-6為其檢量線，檢量範圍為 10^{-3} M- 10^{-7} M ($n=3$, $CV < 3\%$)。

酪胺酸酶具有較廣的特異性可以催化一些酚類的氧化，本研究嘗試開發基於酪胺酸酶的線上酚類檢測系統以找出可能的酚類污染物。以苯酚和雙酚 A 作為可能的酚類污染物，其檢出結果如表 4-1 所示，苯酚的偵測極限可被提高 100 倍，而檢量範圍為 10^{-4} M- 10^{-6} M ($n=3$, $CV < 7\%$); 雙酚 A 僅能在使用黃血鹽時被偵測到，檢測極限為 2.5×10^{-6} M ($S/N > 3$)。

表 4-1 本系統對鄰苯二酚、酚、雙酚 A 的檢測極限。

Substrate	Reducing agent (1E-2M)	Detection limit (M) (S/N>3)
Catechol	Ferrocyanide	1.00E-07
	None	1.00E-05
Phenol	Ferrocyanide	1.00E-06
	None	1.00E-04
BisphenolA	Ferrocyanide	2.50E-06
	None	No detection

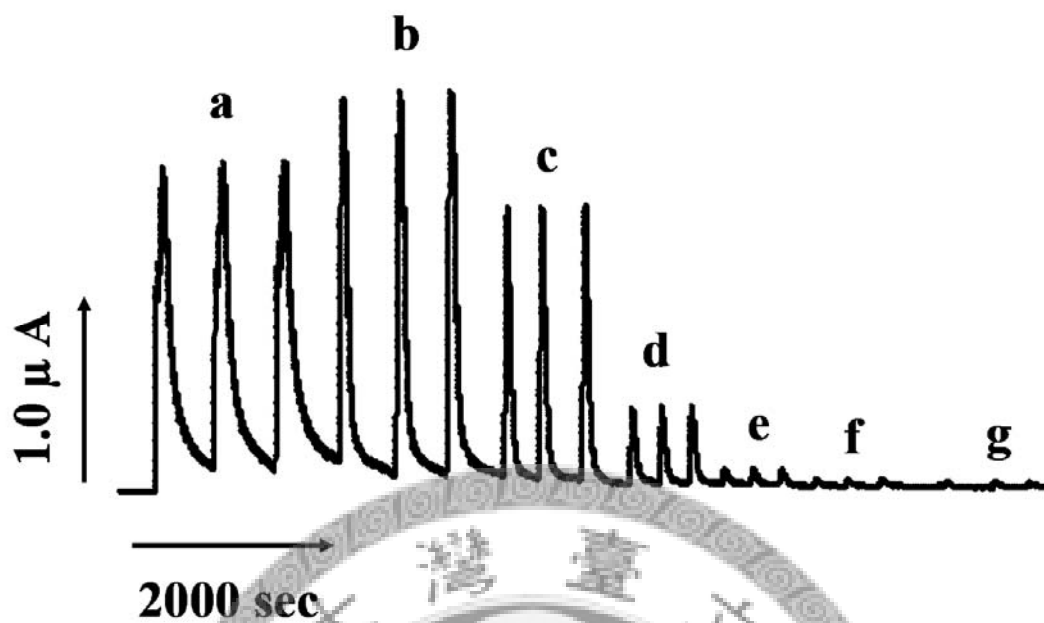


圖 4-5 不同濃度鄰苯二酚與黃血鹽反應的電流響應。(a)–(g): 10^{-2} M– 10^{-8} M 鄰苯二酚(濃度間隔為十倍稀釋), 以 10 mM 黃血鹽為載體溶液, 皆溶於 10 mM 磷酸緩衝液溶(pH 7.0)。工作電壓: 0 V (vs. Ag/AgCl); 流率: 1.0 mL min^{-1} 。

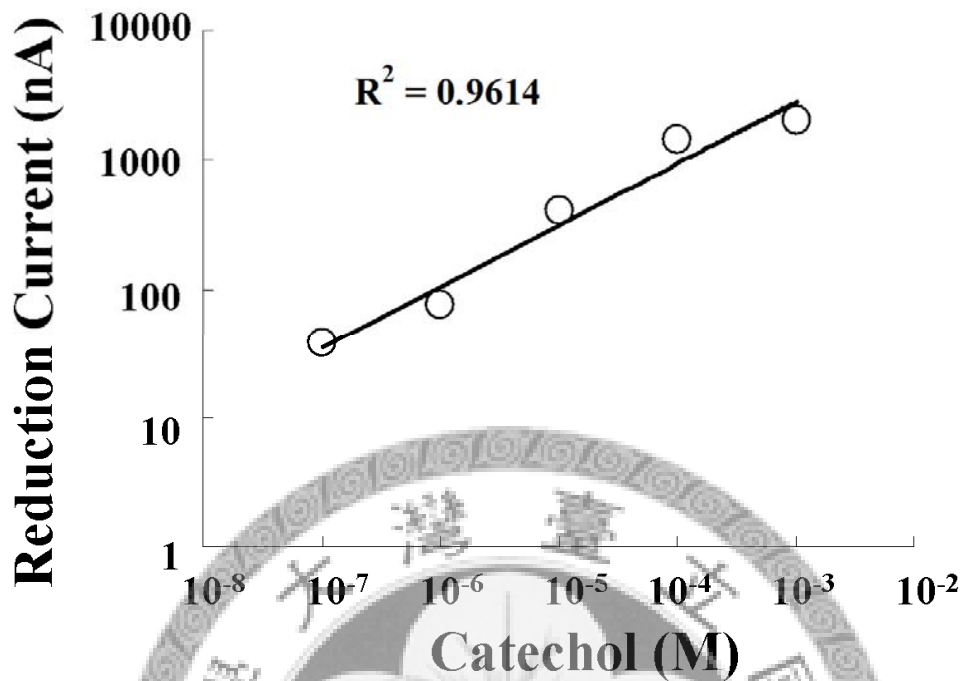


圖 4-6 鄰苯二酚與黃血鹽形成基質循環增幅的檢量線。皆溶於 10 mM 磷酸緩衝液溶(pH 7.0)，10 mM 黃血鹽為載體溶液。工作電壓: 0 V (vs. Ag/AgCl); 流率: 1.0 mL min⁻¹。

4.4 結論

本研究開發了一簡單定電位式流動注射酚類分析系統。利用黃血鹽與固定化酪胺酸酶的催化反應，形成基質循環增幅，可降低鄰苯二酚、苯酚的檢測極限一百倍，其檢測範圍分別為 10^{-3}M - 10^{-7}M ($n=3$, $\text{CV} < 3\%$)和 10^{-4}M - 10^{-6}M ($n=3$, $\text{CV} < 7\%$)，而雙酚A的檢測極限為 $2.5 \times 10^{-6}\text{M}$ ($\text{S/N} > 3$)。其他可被酪胺酸酶所催化的酚類和其抑制劑可被預期於本系統檢出。



第五章 局部電沉積幾丁聚醣方法開發與固定化酵素之應用

5.1 前言

發展圖案化(Patterning)不一樣的生物分子或細胞於單一的基材是發展多功能生物感測器(multifunctional biosensor)與高通量(high-throughput)微陣列晶片的關鍵技術。根據不同的基材和生物分子/細胞兩者的表面特性，不同的局部固定化技術被發展，例如包含硫醇官能基的化合物可以於金基材上形成自組裝單層，藉由接觸轉印(microcontact printing) (Bernard, et al., 1998; Kane, et al., 1999; Quist, et al., 2005; Wilhelm and Wittstock, 2002)，微流道網絡(microfluidic networks) (Chiu, et al., 2000; Delamarche, et al., 1997)，噴墨印刷(inkjet printing) (Rianasari, et al., 2008)，原子力顯微鏡技術(Kramer, et al., 2003)或沾筆式奈米微影(dip-pen nanolithography) (Lee, et al., 2002)等技術，可以製造可被定義的硫醇微圖案，生物分子可藉由靜電力或是共價鍵結黏附於自組裝單層上。利用掃描式電化學顯微鏡(scanning electrochemical microscope, SECM)可使得硫醇自組裝單層被電化學脫附和修飾，形成反硫醇的微圖案(Kramer, et al., 2003; Wittstock and Schuhmann, 1997; Zhao, et al., 2006); 使用微流道的電化學技術，則可平行快速的建立和修飾硫醇圖案(Li, et al., 2007; Westcott and Yousaf, 2008)。

另一方面，電聚合人造聚合物於導體基材上也可共固定化生物分子在可被定義的聚合物微圖案中，例如可被電聚合的酚類衍生物(derivatized phenols)在微影製程的微電極上形成不同官能基的聚合物層，並可選擇性的和DNA與蛋白質結合(Stern, et al., 2006)，而雜環芳香吡咯(heterocyclic aromatic pyrrole) 可利用SECM與脈衝電壓技術，直接電聚合於導體基材上形成吡咯圖案(Schuhmann, et al., 1997)。利用 directly electrospotting oligonucleotides-pyrrole則可製造DNA晶片(Szunerits, et al., 2005)。

但是對於發展侵入式感測器或是組織工程所使用的支架(scaffold)，具生物相容性的生物材料也許更適合作為固定化基質。幾丁聚醣是一種豐富且低免疫反應的

生物材料，具有胺基，於酸性環境下可被質子化(protonated)，帶有正電(Krajewska, 2004)。但將溶於酸性的幾丁聚醣，使其pH成中性和鹼性下，胺基會被去質子化(deprotonated)應而逐漸失去溶解度。最近利用電極對所形成的pH濃度梯度沉澱幾丁聚醣於陰極上的技術被發展(Fernandes, et al., 2003; Wu, et al., 2002)，此技術類似利用合成的聚合物或其前驅物的電泳漆技術，電泳漆技術可應用於防腐蝕亦可絕緣微電極(Bach, et al., 1993)和包埋生物分子(Kurzawa, et al., 2002)。幾丁聚醣於電極對外加電壓所造成的電場中會向陰極遷移，但陰極於外加電壓下會有質子還原的現象發生，使得陰極附近的pH值上昇，造成陰極附近的幾丁聚醣去質子化，並沉澱於陰極上，此方法相較傳統的溶劑揮發(solvent evaporation)方法，可較容易的控制幾丁聚醣膜的厚度。奈米粒子或是其他生物分子，例如蛋白質，可於此沉澱過程包埋於其中 (Luo, et al., 2004; Luo, et al., 2005; Qu, et al., 2002; Wu, et al., 2005)，或者於沉澱過程的前後結合於沉澱前後的幾丁聚醣上(Qu, et al., 2002; Shi, et al., 2008; Zhao, et al., 2006)。幾丁聚醣分子可依據電極圖案沉澱於整個電極表面上，但至今局部地沉澱幾丁聚醣和利用局部地沉澱幾丁聚醣包埋酵素則尚未被實現。

本研究提出兩個局部地沉澱幾丁聚醣的簡易策略於macroscopic的導電基材上：
i) 利用SECM direct mode組態形成pH gradient局部地沉澱幾丁聚醣，ii) 利用微流道限制溶液，使pH gradient於微流道的空間中形成，而所產生幾丁聚醣沉澱保有可允許生物分子共價鍵結合的胺基。本研究先以葡萄糖氧化酵素為例，利用掃描式電化學顯微鏡觀察包埋後的酵素活性，評估所提出的兩個局部地沉澱幾丁聚醣策略於生物感測器的微製造的可行性，以利未來發展雙或多酵素的酚類生物微感測器。

5.2 材料與方法

5.2.1 化學藥品

葡萄糖氧化酵素(Glucose oxidase, GOx, EC 1.1.3.4, 40300 units g⁻¹)和葡萄糖是從 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)所購買。二茂鐵(Ferrocene methanol)購於 ABCR (Karlsruhe, Germany)。幾丁聚醣溶液(1.5 % w/v, pH 5.7)是先將 0.75 g 的幾丁聚醣(Chitosan 5, Wako Co., Ltd., Japan)散置於 13.3 mL 的去離子水中，再加入 35.5 mL 0.1 M 的鹽酸 (HCl)，激烈地攪拌使其溶解，再加入 1.2 mL 1 M 氫氧化鈉後並攪拌溶解因滴入氫氧化鈉所產生的幾丁聚醣沉澱，使溶液的 pH 值約為 pH 5.7。NHS-fluorescein 溶液是先將 1.2 mg 的 5(6)-carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimide ester (Fluka, Buchs, Switzerland) 溶於 0.1 mL dimethylformamide (DMF) 中，再依序加入 0.4 mL 的乙醇和 30 mL 0.1 M pH 7.4 的磷酸緩衝溶液。所有使用的化學藥品皆為分析等級並購入後直接使用，未進行進一步的純化。

5.2.2 基材電極和微流道製備

基材電極(substrate electrodes)是利用高真空蒸鍍系統(mini-coater, Tectra GmbH, Frankfurt, Germany)將 Cr 和 Au 依序沉積於標準清潔後的顯微鏡玻片上，其厚度分別為 Cr 0.6 nm 和 Au 101.2 nm。

Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) 微流道是利用 10 : 1 (v/v) Sylgard 184 silicone elastomer 和 curing agent (Dow Corning Co., Ltd., USA) 的混合液填裝於置有預先圖案化的矽晶圓晶片(pre-patterned silicone wafer master) 的培養皿中(Petri dish)，然後在室溫下 curing 過夜，隔天將所產生的 PDMS 塊小心地從預先圖案化的矽晶圓晶片母模剝除，之後利用乙醇沖洗 PDMS 微流道再以氮氣乾燥。

5.2.3 掃描式電化學顯微鏡系統架設

掃描式電化學顯微鏡是依據文獻(Kirchner, et al., 2007)所自行建立整合。UME 的製備是將直徑為 10 - 50 μm 的白金線(Goodfellow GmbH, Bad Nauheim,

Germany) 熱封於 borosilicate glass (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Germany), 並將其研磨成 disk-type electrode (Kranz, et al., 1995)。本研究中的所有 SECM 實驗皆使用 Ag/AgCl/ 3 M KCl 電極(CH Instruments, Austin TX, USA)作為參考電極。SECM 資料則是利用文獻(Wittstock, et al., 2000)所開發的軟體 MIRA 進行資料處理。

5.2.4 共軛焦雷射和原子力顯微鏡

本研究使用掃描式共軛焦雷射顯微鏡(confocal laser scanning microscopy, CLSM, TCS SP2 AOBS, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)取得待測樣品的反射式影像(488 nm) 和螢光影像(488 nm excitation, 500-535 nm emission)。幾丁聚醣沉積物的表面型態則是利用原子力顯微鏡(atomic force microscopy, AFM, using Dimension 3100 stage and Nanoscope™ IIIA controller (Veeco, Santa Barbara, CA, USA)) 於 tapping mode 進行觀察。

5.2.5 利用 SECM direct mode 局部沉積幾丁聚醣與酵素

UME 和 Au 基材電極的距離(d)控制是利用溶液中溶氧的 approach curve 評估 UME 與基材電極接觸($d = 0$), 其 UME 的電位(E_T) 偏壓於 -0.6 V , 而基材電極的電位則維持開路電位(open circuit potential, OCP); 部分實驗則直接以顯微鏡觀察 UME 接觸基材電極。局部電沉積幾丁聚醣於基材電極上利用 UME ($r_T = 25.89\ \mu\text{m}$; $RG = 4$) 作為輔助電極(auxiliary electrode)的 SECM direct mode, 控制 d 為 $10\ \mu\text{m}$, 於 $1.5\ \%$ pH 5.7 幾丁聚醣溶液中, 外加脈衝電壓於基材電極 ($E_S = -1.0\ \text{V}$, $1\ \text{s}$, intervals between pulses = $10\ \text{s}$)順序電沉積幾丁聚醣。酵素包埋則是利用上述相同的電沉積程序, 但 $1.5\ \%$ pH 5.7 幾丁聚醣溶液中含有 $5\ \text{mg/mL}$ 葡萄糖氧化酵素。

5.2.6 利用微流道局部沉積幾丁聚醣與酵素

將 PDMS 微流道放置密合於 Au 基材電極上, 利用微量滴管注入 $1.5\ \%$ pH 5.7 幾丁聚醣溶液於微流道中, Pt 線則插入微流道兩端, 於 Au 基材電極外加 $-3.0\ \text{V}$ 偏壓相對於 Pt 線, 經過 10 分鐘的電沉積後, PDMS 微流道小心的移除, 經電沉積的 Au 基材電極則利用去離子水沖洗 10 次以上, 並於室溫下乾燥。酵素包埋則

是利用上述使用相同的電沉積程序，但 1.5 % pH 5.7 幾丁聚醣溶液中含有 5 mg/mL 葡萄糖氧化酵素。



5.3 結果與討論

5.3.1 利用 SECM direct mode 局部沉積幾丁聚醣

受電壓控制的幾丁聚醣電沉積於導體表面現象首先由 Wu 等人所觀察(Wu, et al., 2002)，當外加電壓於電極對，陰極附近的氫離子轉換成氫氣，而不具電活性幾丁聚醣分子則受到電極附近氫離子減少的影響去質子化並發生沉澱於電極表面的現象。本研究為了製造幾丁聚醣的微米圖案於導體基材電極表面，嘗試利用 SECM direct mode 局部電沉積幾丁聚醣。操作於 SECM direct mode 時，三極式電化學電極組態會使用 UME 作為對極而基材電極作為工作電極，流經 UME 與基材電極的電化學電流被限制於 UME 周圍的微小區域(Craston, et al., 1988; Wittstock, et al., 2007)，當實驗溶質為幾丁聚醣，局部的電沉積幾丁聚醣可形成(圖 5-1b)，而可能的實驗機制推測如圖 5-1a 所示，其電沉積機制應與前人文獻(Wu, et al., 2002)相似，在電極間產生局部 pH 梯度(pH gradient)，但於本研究中，相較於前人文獻，於本節所提出的實驗架構下，使用前人所提出的直流偏壓電沉積幾丁聚醣，無法觀察到幾丁聚醣電沉積的現象，應是由於 UME 所產生的氫離子與電極表面生成的氣泡使得 pH 梯度無法形成。產生氣泡的現象亦見於局部電沉積銅的前人研究，該研究使同調 X 射線(coherent X-ray) 進行即時觀察(Seol, et al., 2004)。為降低氣泡的干擾，本研究利用電壓脈衝代替直流偏壓並利用 CLSM reflectance mode 觀察所產生的幾丁聚醣局部沉積物。如圖 5-1b 所示，於 Au 基材電極表面，雷射光被幾丁聚醣散射，造成反射光強度的減低，另一方面，當增加電壓脈衝的次數，會導致沉積點加深或者是沉積範圍增大。為獲得再現性與相對均一厚度和形狀的幾丁聚醣沉積，進行 d , pulse duration 和幾丁聚醣濃度的最佳化，但無法有效形成可被定義的幾丁聚醣沉積圖案。

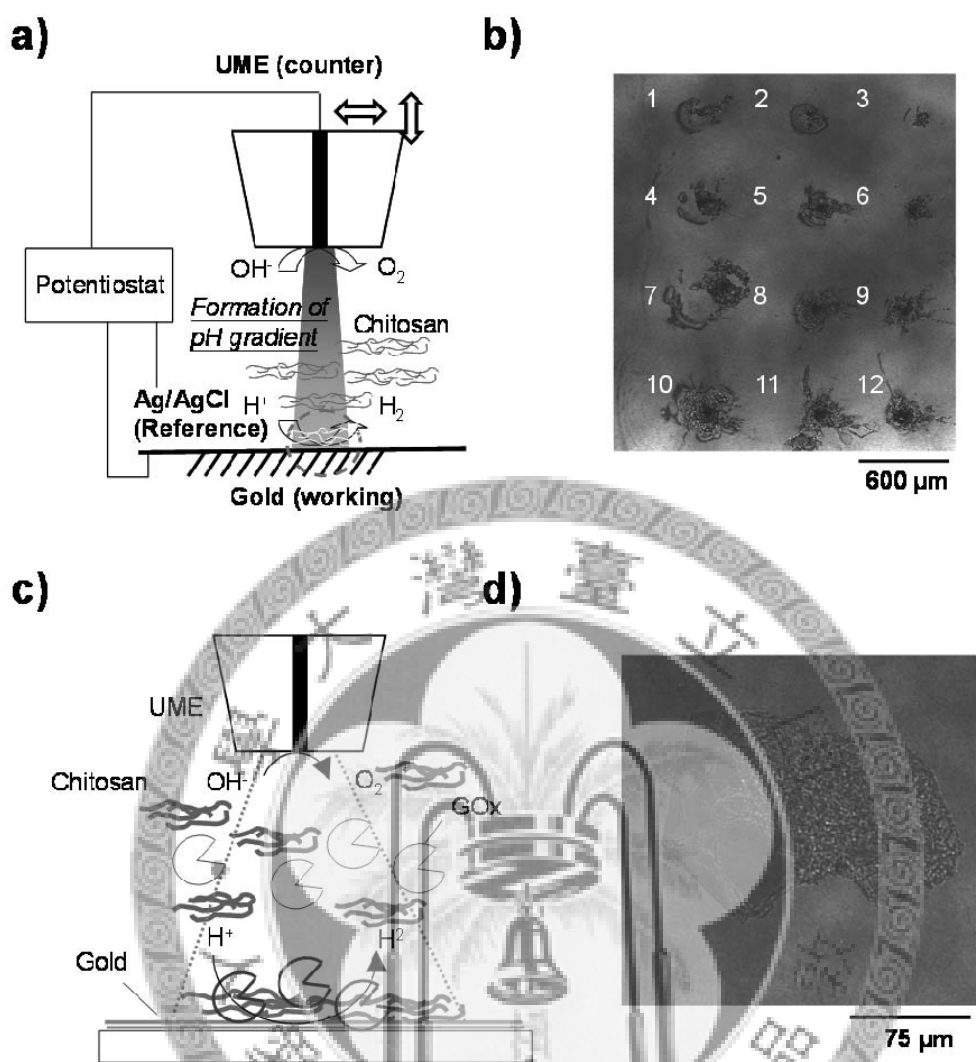


圖 5-1 利用 SECM direct mode 局部電沉積幾丁聚醣。(a)實驗架構簡圖。(b) 幾丁聚醣沉積的共軛焦雷射掃描式顯微鏡反射圖。單一脈衝 (spots 1, 2, and 3)、雙脈衝 (spots 4, 5, and 6)、三脈衝 (spots 7, 8, and 9)、四脈衝 (spots 10, 11, and 12)。電位脈衝(1 s, -1.0 V vs. Ag/AgCl)加於金基質工作電極和微電極對極間(Pt, $r_T = 25.9 \mu\text{m}$, $RG = 4$, $d = 10 \mu\text{m}$)。沉積溶液為 1.5 % chitosan (pH 5.7)。(c)利用 SECM direct mode 局部包埋葡萄糖氧化酵素的示意圖。(d)葡萄糖氧化酵素-幾丁聚醣沉積的共軛焦雷射掃描式顯微鏡反射圖。沉積程序與 SECM direct mode 沉積幾丁聚醣相同，但溶液包含 5 mg/mL 葡萄糖氧化酵素。

5.3.2 利用 SECM direct mode 包埋葡萄糖氧化酵素於幾丁聚醣中

已有數篇研究(Luo, et al., 2004; Luo, et al., 2005; Qu, et al., 2002)利用幾丁聚醣電沉積包埋酵素於整個電極表面上建立生物感測器，本研究嘗試利用 SECM direct mode 將酵素包埋於局部電沉積的幾丁聚醣中，以葡萄糖氧化酵素作為應用例，將葡萄糖氧化酵素加入幾丁聚醣，並利用 SECM direct mode 局部沉積幾丁聚醣的程序，同時沉積幾丁聚醣與包埋葡萄糖氧化酵素於其中(圖 5-1c)。利用 CLSM 觀察所產生葡萄糖氧化酵素-幾丁聚醣的沉澱形狀，結果如圖 5-1d 所示。並利用可避免於導電材料上 feedback effects 的 SECM Generation-Collection (GC) mode (Wittstock and Schuhmann, 1997; Wittstock, et al., 2007)，藉由經葡萄糖氧化酵素催化葡萄糖所產生的 H_2O_2 還原電流(圖 5-2a)，觀察葡萄糖氧化酵素於幾丁聚醣中空間分部所表現的活性。如圖 5-2b 所示，葡萄糖氧化酵素的確包埋於局部沉積的幾丁聚醣中並依然保有活性，但酵素活性的空間分佈並不均勻。



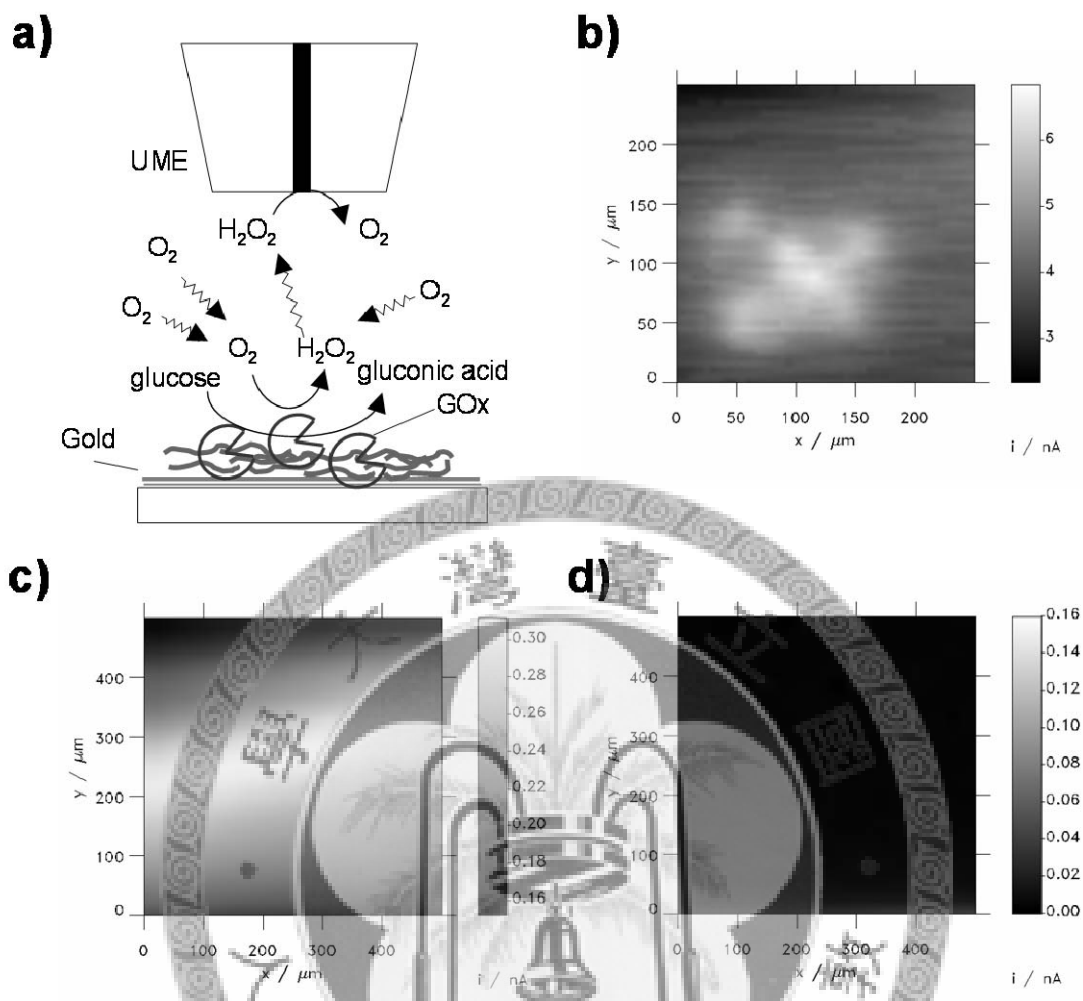


圖 5-2 利用 SECM GC mode 觀察包埋於幾丁聚醣中葡萄糖氧化酵素的活性。(a) 實驗架構簡圖。(b) 葡萄糖氧化酵素-幾丁聚醣沉澱的掃描式電化學顯微鏡圖，使用圖 5-1d 的樣品。掃描條件： $E_T = 0.6 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, $v_T = 10 \mu\text{m/s}$, $r_T = 13.2 \mu\text{m}$, $RG = 25$, $d = 10 \mu\text{m}$, 50 mM 葡萄糖溶於 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH 7.0)。(c) 利用微流道電沉積所得的葡萄糖氧化酵素-幾丁聚醣帶狀沉澱的掃描式電化學顯微鏡圖。沉積程序與圖 5-3b 相同，但沉積溶液包含 5 mg/mL 葡萄糖氧化酵素。掃描條件： $r_T = 5.6 \mu\text{m}$, $RG = 66$, $v_T = 20 \mu\text{m/s}$; $E_T = 0.6 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, $d = 30 \mu\text{m}$, 10 mM 葡萄糖溶於 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH 7.0)。(d) 圖 5-2c 的控制組實驗。實驗溶液不包含葡萄糖分子，其餘實驗條件相同。

5.3.3 利用微流道局部沉積幾丁聚醣

利用脈衝電壓和SECM direct mode可方便彈性地局部沉積幾丁聚醣，但可被重複製造的幾丁聚醣局部沉澱和均一的酵素包埋技術尚未達成，歸因於電極間氣泡(H_2 和 O_2)的累積所造成非均勻的電場分佈。為改善重複性，我們亦嘗試利用前人提出的micropipette局部電沉積技術，但所得的實驗結果與聚吡咯(polypyrrole)電沉積(Szunerits, et al., 2005)相似，由於聚合物液體於導體基板表面張力的限制，沉積直徑難以縮小至100 μm 以下。因而我們嘗試使用微流道限制聚合物液體流動(圖5-3a)，如圖5-3b所示，僅使用直流偏壓(-3.0 V Au substrate vs. Pt wires)即可取得均勻且重複性良好的幾丁聚醣電沉積，氣泡干擾問題可利用微流道與電極空間配置獲得改善。

嘗試使用與胺基會發生鍵結的螢光團分子，NHS-fluorescein，與幾丁聚醣沉積反應，以共軛焦雷射掃描式顯微鏡觀察圖案化的幾丁聚醣沉積的表面是否仍有具反應活性的胺基。如圖5-3c所示，與NHS-fluorescein反應的幾丁聚醣沉積和未反應的幾丁聚醣沉積的共軛焦雷射掃描式顯微鏡反射式影像並無明顯的差異，但如圖5-3d所示，從螢光影像可發現幾丁聚醣沉澱表面仍具有可與NHS-fluorescein反應的胺基。幾丁聚醣沉澱表面仍具有活性的胺基官能基，可被利用與生物分子共價鍵固定。

圖5-4是利用SECM feedback mode觀察幾丁聚醣沉積，溶液中含有ferrocene methanol的媒介物(mediator)。UME掃描於金基板上時，由於媒介物的循環(recycle)現象使得氧化電流增加，而掃描於金基板上沉澱的幾丁聚醣時，幾丁聚醣沉澱限制了媒介物的擴散與電子轉移，因而掃描式電化學顯微鏡觀察到較低的氧化電流。

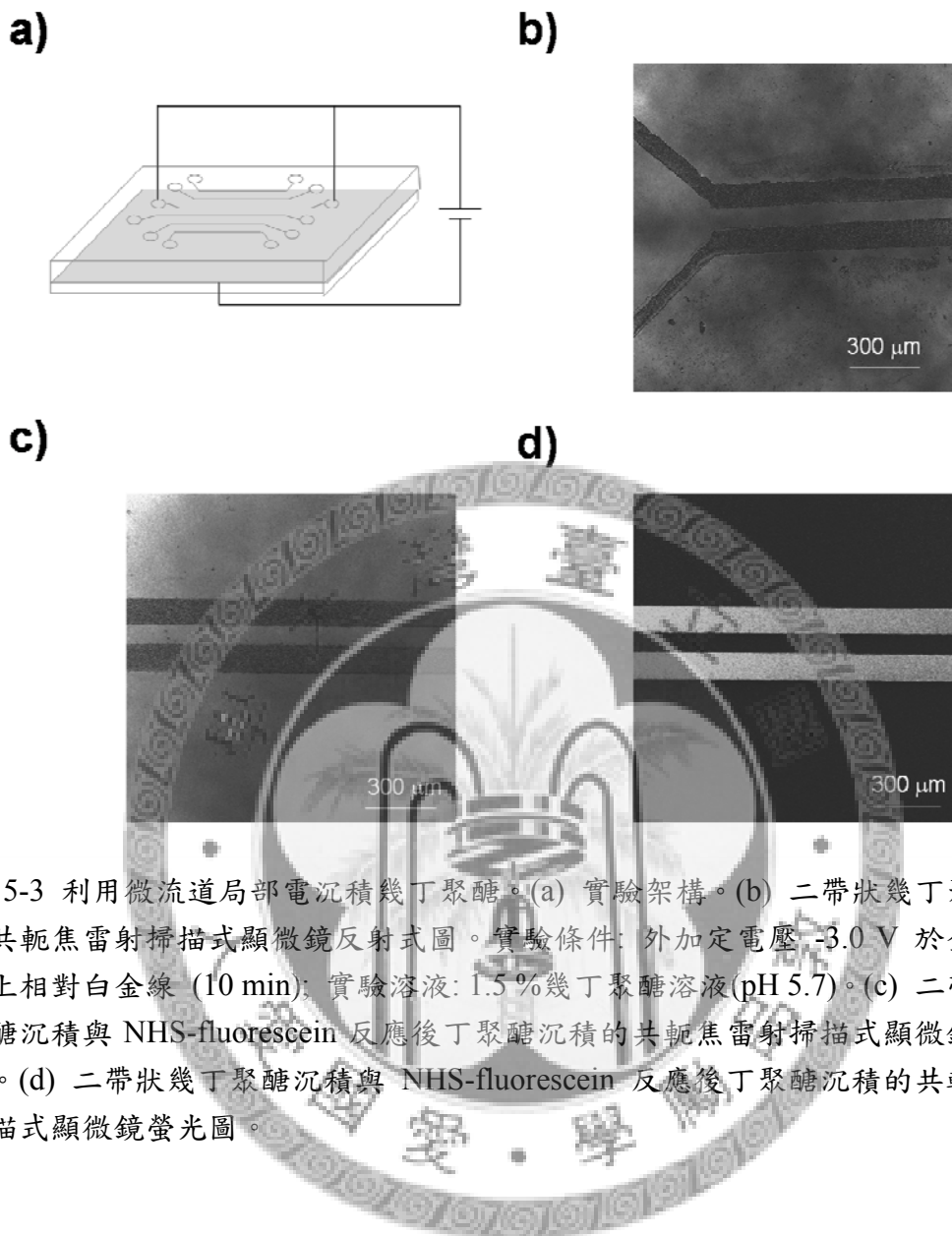


圖 5-3 利用微流道局部電沉積幾丁聚醣。(a) 實驗架構。(b) 二帶狀幾丁聚醣沉積的共軛焦雷射掃描式顯微鏡反射式圖。實驗條件：外加定電壓 -3.0 V 於金基質電極上相對白金線 (10 min)；實驗溶液：1.5%幾丁聚醣溶液 (pH 5.7)。(c) 二帶狀幾丁聚醣沉積與 NHS-fluorescein 反應後丁聚醣沉積的共軛焦雷射掃描式顯微鏡反射式圖。(d) 二帶狀幾丁聚醣沉積與 NHS-fluorescein 反應後丁聚醣沉積的共軛焦雷射掃描式顯微鏡螢光圖。

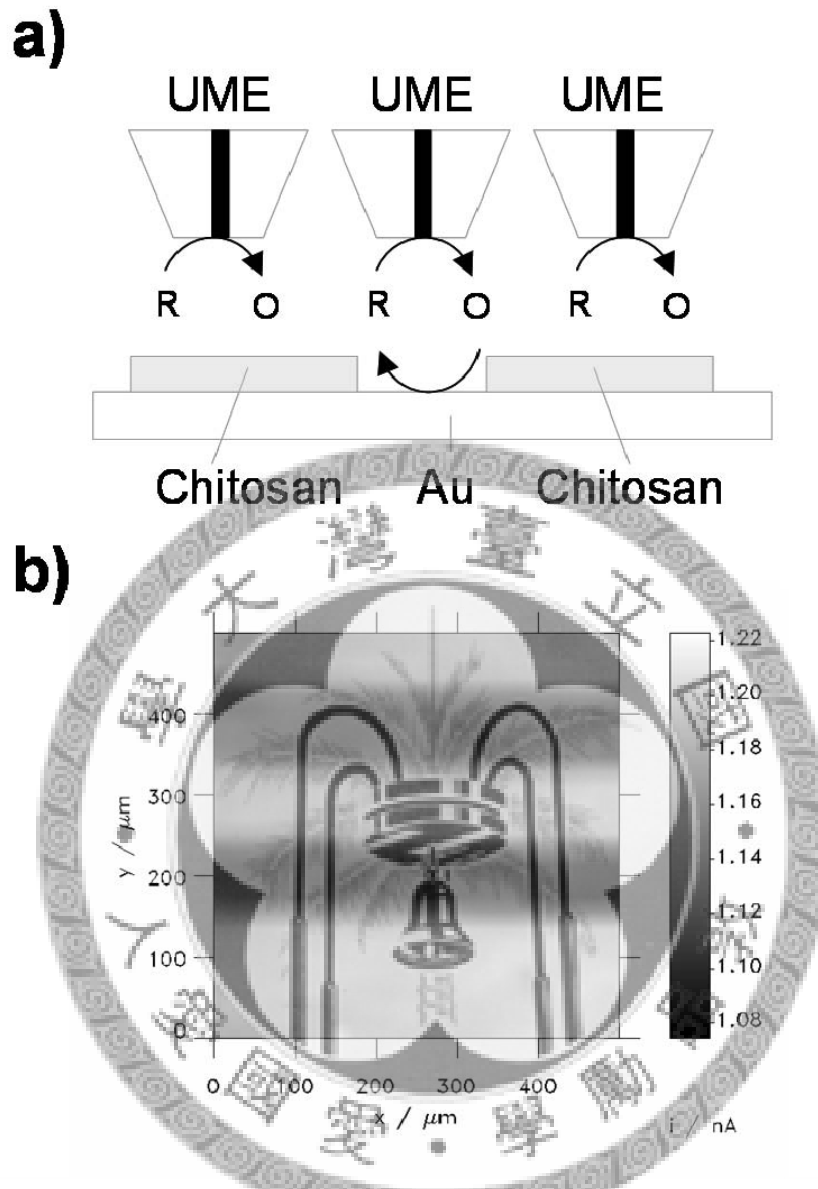


圖 5-4 利用 SECM feedback mode 觀察微流道電沉積的幾丁聚醣沉澱。(a) SECM feedback mode 的示意圖。R: 還原媒介物; O: 氧化媒介物。(b) 微流道電沉積的幾丁聚醣沉澱的掃描式電化學顯微鏡圖。實驗條件: $r_T = 5.6 \mu\text{m}$; $RG = 66$; $v_T = 20 \mu\text{m/s}$; $E_T = 0.4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$; $d = 10 \mu\text{m}$; 1 mM ferrocene methanol 溶於 0.1 M 磷酸緩衝溶液(pH 7.0)。

5.3.4 利用微流道局部包埋葡萄糖氧化酵素於幾丁聚醣中

本節利用微流道的幾丁聚醣電沉積過程，觀察生物分子是否也可以同時被包埋於幾丁聚醣中，如 5.3.2 節的實驗，於幾丁聚醣溶液中加入葡萄糖氧化酵素，並利用微流道進行電沉積，其產生的葡萄糖氧化酵素-幾丁聚醣沉積則利用掃描式電化學顯微鏡進行觀察，如圖 5-2c 所示，偵測到 homogeneous H_2O_2 氧化電流，可得知葡萄糖氧化酵素被固定於幾丁聚醣中且維持活性，其固定化酵素的活性空間分佈相較於 SECM direct mode 所產生沉積(圖 5-2b)更為均勻。圖 5-2d 是於未添加葡萄糖的對照組實驗，沒有 H_2O_2 的氧化電流被偵測到。圖 5-5 比較分別使用微流道和利用 SECM direct mode 所形成的葡萄糖氧化酵素-幾丁聚醣層的原子力顯微鏡影像，比較圖 5-5a 和圖 5-5b 可發現生物活性層(bioactive layer)的表面平滑度，使用微流道的沉積方式有明顯的改善。



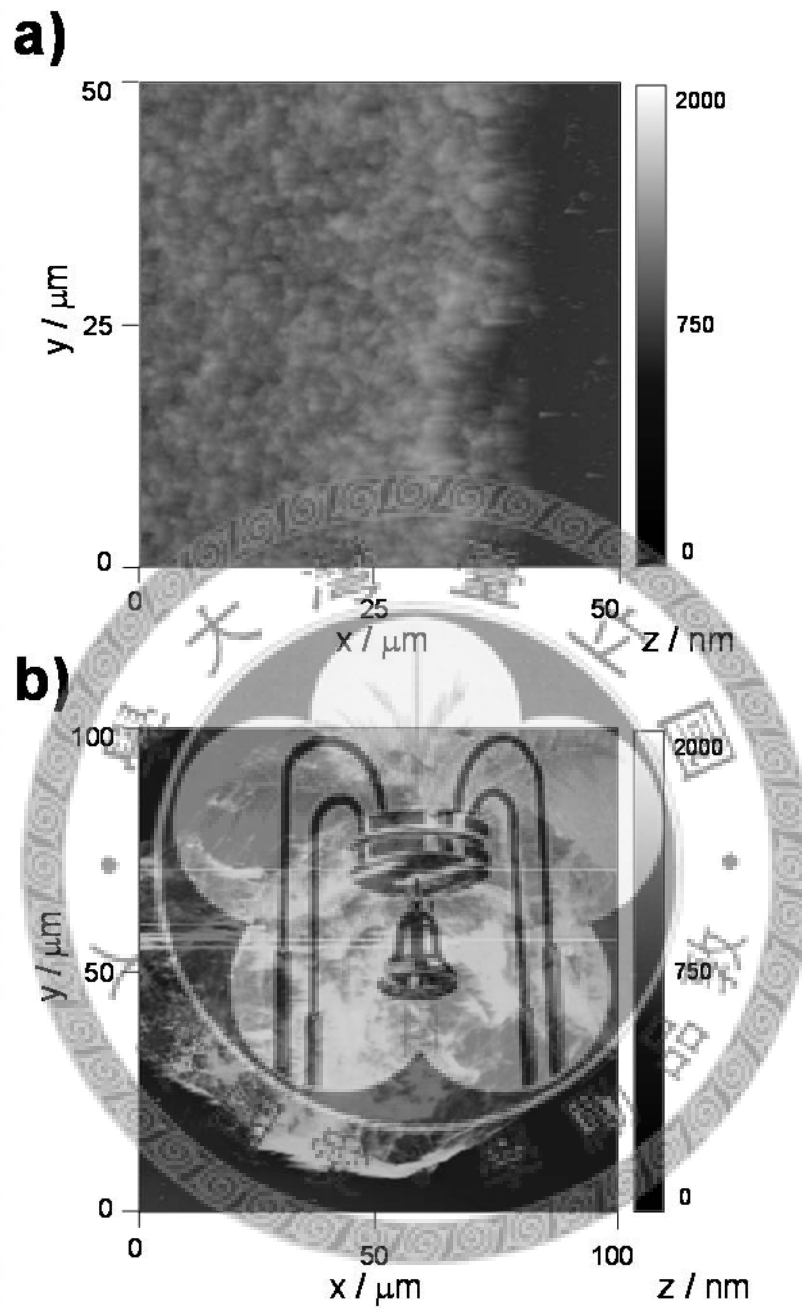


圖 5-5 葡萄糖氧化酵素-幾丁聚醣沉澱的非接觸式原子力顯微鏡圖。(a) 利用微流道沉積，圖 5-2c 所使用的沉積樣品。(b) 利用掃描式電化學顯微鏡沉積，圖 5-1d 所使用的沉積樣品。

5.4 結論

本研究所提出的局部沉積幾丁聚醣方法是基於微電化學環境的組態，利用電極間所產生的 pH 梯度，使得幾丁聚醣局部電沉積。SECM direct mode 和微流道皆可使得生物分子，如酵素，包埋於局部沉積的幾丁聚醣中於導體基材上。使用 SECM direct mode 可較簡單地彈性的形成葡萄糖氧化酵素-幾丁聚醣沉澱 microspot，其再現性與局部幾丁聚醣沉澱的均一度問題，採用另一策略，利用微製造所製備通道空間限制生物分子的分佈可獲得改善。

本研究所提出的方法可利於基於空間分隔酵素分佈和電子轉移 site 設計的微製造生物感測器的建立(Rosenwald, et al., 1998; Rosenwald, et al., 2000)，並預期可用於雙或多酵素的生物微感測器的製造上。



第六章 總結

本研究以電化學原理為基礎發展酚類感測的方法。利用開路電位法量測茶品的氧化還原電位，可直接評估茶品的醱酵程度，不受限於須取得進行有氧醱酵之前新鮮茶葉兒茶素濃度的生產資料，利於茶品的分類；使用赤血鹽對單寧酸的預氧化策略，有效地避免單寧電氧化的汙染問題，與二公定法有高度相關性且檢測程序較簡易，利於茶品單寧酸成分線上流動分析電化學系統的開發；使用黃血鹽與酪胺酸酶催化的酚類氧化反應形成基質循環增幅鄰苯二酚、苯酚、雙酚 A 的檢測極限，利於酚類污染物初步篩選線上系統的開發，建議未來可使用斷流(stopped-flow)法提高其增幅倍率；發展局部電沉積幾丁聚醣應用於局部固定化酵素，建議未來可用於發展新型雙酵素微結構的酚類生物感測器。



參考文獻

1. A.O.A.C. 1980. Official methods of analysis, Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists.
2. Bach, C. E., R. J. Nichols, W. Beckmann, H. Meyer, A. Schulte, J. O. Besenhard, and P. D. Jannakoudakis. 1993. Effective insulation of scanning-tunneling-microscopy tips for electrochemical studies using an electropainting method. *J. Electrochem. Soc.* (140): 1281-1284.
3. Beart, J. E., T. H. Lilley, and E. Haslam. 1985. Plant polyphenols - secondary metabolism and chemical defense - some observations. *Phytochemistry* (24): 33-38.
4. Bernard, A., E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H. R. Bosshard, and H. Biebuyck. 1998. Printing patterns of proteins. *Langmuir* (14): 2225-2229.
5. Birkett, J. W., and J. N. Lester. 2003. Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes, Boca Raton: Lewis Publishers.
6. Borah, S., and M. Bhuyan. 2005. A computer based system for matching colours during the monitoring of tea fermentation. *Int. J. Food Sci. Technol.* (40): 675-682.
7. Brown, R. S., K. B. Male, and J. H. T. Luong. 1994. A substrate recycling assay for phenolic-compounds using tyrosinase and NADH. *Anal. Biochem.* (222): 131-139.
8. Charalambous, G., and I. Katz. 1976. Phenolic, sulfur, and nitrogen compounds in food flavors, Washington D.C.: American Chemical Society.
9. Chiavari, G., V. Concialini, and G. C. Galletti. 1988. Electrochemical detection in the high-performance liquid-chromatographic analysis of plant phenolics. *Analyst* (113): 91-94.

10. Chiu, D. T., N. L. Jeon, S. Huang, R. S. Kane, C. J. Wargo, I. S. Choi, D. E. Ingber, and G. M. Whitesides. 2000. Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic systems. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* (97): 2408-2413.
11. Craston, D. H., C. W. Lin, and A. J. Bard. 1988. High-resolution deposition of silver in nafion films with the scanning tunneling microscope. *J. Electrochem. Soc.* (135): 785-786.
12. Dalluge, J. J., and B. C. Nelson. 2000. Determination of tea catechins. *J. Chromatogr. A* (881): 411-424.
13. de Faria, R. O., V. R. Moure, M. Amazonas, N. Krieger, and D. A. Mitchell. 2007. The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technol. Biotech.* (45): 287-294.
14. de Freitas, V., and N. Mateus. 2002. Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *J. Sci. Food Agric.* (82): 113-119.
15. Degueldre, C., F. Rocchiccioli, and A. Laube. 1999. Accelerated measurement of groundwater redox potentials: method and application. *Anal. Chim. Acta* (396): 23-31.
16. del Alamo, M., I. Nevares, and L. M. Carcel. 2006. Redox potential evolution during red wine aging in alternative systems. *Anal. Chim. Acta* (563): 223-228.
17. Delamarche, E., A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, and H. Biebuyck. 1997. Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks. *Science* (276): 779-781.
18. Durliat, H., and A. Comtat. 2005. Critical evaluation of potentiometric redox titrations in enology. *Anal. Chim. Acta* (545): 173-181.
19. Fernandes, R., L. Q. Wu, T. H. Chen, H. M. Yi, G. W. Rubloff, R. Ghodssi, W. E. Bentley, and G. F. Payne. 2003. Electrochemically induced deposition of a

- polysaccharide hydrogel onto a patterned surface. *Langmuir* (19): 4058-4062.
20. Fernandez, P. L., M. J. Martin, A. G. Gonzalez, and F. Pablos. 2000. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas. *Analyst* (125): 421-425.
21. Fernando, A. R., and J. A. Plambeck. 1988. Determination of theaflavin in tea liquors using voltammetric methods. *Analyst* (113): 479-482.
22. Florkin, A. M., and H. S. Mason. 1963. Comparative biochemistry: a comprehensive treatise, Vol. 3, New York: Academic Press.
23. Gaido, K. W., L. S. Leonard, S. Lovell, J. C. Gould, D. Babai, C. J. Portier, and D. P. McDonnell. 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (143): 205-212.
24. Gallardo, J., S. Alegret, and M. del Valle. 2005. Application of a potentiometric electronic tongue as a classification tool in food analysis. *Talanta* (66): 1303-1309.
25. Gattrell, M., and D. W. Kirk. 1993. A study of electrode passivation during aqueous phenol electrolysis. *J. Electrochem. Soc.* (140): 903-911.
26. Goldman, D. E. 1943. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* (27): 37-60.
27. Grob, R. L. 1991. Chromatographic techniques for pollution analyses. *Environ. Monit. Assess.* (19): 1-11.
28. Hagerman, A. E., K. M. Riedl, G. A. Jones, K. N. Sovik, N. T. Ritchard, P. W. Hartzfeld, and T. L. Riechel. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food. Chem.* (46): 1887-1892.
29. Hahn, D. H., L. Rooney, and C. F. Earp. 1984. Tannin and phenols in sorghum. *Cereal Foods World* (29): 776-779.

30. Harbowy, M. E., and D. A. Balentine. 1997. Tea chemistry. *Crit. Rev. Plant. Sci.* (16): 415-480.
31. Hasebe, Y., K. Takamori, and S. Uchiyama. 1993. Enzyme-based chemically amplified flow-injection determination of catechol and catecholamines using an immobilized tyrosinase reactor and L-ascorbic-acid. *Anal. Chim. Acta* (282): 363-367.
32. Haslam, E. 2003. Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry* (64): 61-73.
33. Hilton, P. J. 1973. Encyclopedia of industrial chemistry analysis, Vol. 18, New York: Wiley & Sons.
34. Hodgkin, A. L., and B. Katz. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol. (Lond.)* (108): 37-77.
35. Horie, H., and K. Kohata. 1998. Application of capillary electrophoresis to tea quality estimation. *J. Chromatogr. A* (802): 219-223.
36. Iotov, P. I., and S. V. Kalcheva. 1998. Mechanistic approach to the oxidation of phenol at a platinum/gold electrode in an acid medium. *J. Electroanal. Chem.* (442): 19-26.
37. Iwasa, K., and H. Torii. 1962. A colorimetric determination of tea tannin with ferrous tartrate. *Tea Res. J.* (26): 87-91.
38. Iwasa, K. 1975. Methods of chemical analysis of green Tea. *Japan Agricultural Research Quarterly* (9): 161-164.
39. Kane, R. S., S. Takayama, E. Ostuni, D. E. Ingber, and G. M. Whitesides. 1999. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* (20): 2363-2376.
40. Kilmartin, P. A., and H. L. Zou. 2001. The effect of electrode material on the measured redox potential of red and white wines. *Electroanalysis* (13): 1347-1350.

41. Kilmartin, P. A., and C. F. Hsu. 2003. Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chem.* (82): 501-512.
42. Kirchner, C. N., S. Szunerits, and G. Wittstock. 2007. Scanning electrochemical microscopy (SECM) based detection of oligonucleotide hybridization and simultaneous determination of the surface concentration of immobilized oligonucleotides on gold. *Electroanalysis* (19): 1258-1267.
43. Korner, W., V. Hanf, W. Schuller, C. Kempter, J. Metzger, and H. Hagenmaier. 1999. Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci. Total Environ.* (225): 33-48.
44. Krajewska, B. 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Technol.* (35): 126-139.
45. Kramer, S., R. R. Fuieler, and C. B. Gorman. 2003. Scanning probe lithography using self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* (103): 4367-4418.
46. Kranz, C., M. Ludwig, H. E. Gaub, and W. Schuhmann. 1995. Lateral deposition of polypyrrole lines by means of the scanning electrochemical microscope. *Adv. Mater.* (7): 38-40.
47. Kurzawa, C., A. Hengstenberg, and W. Schuhmann. 2002. Immobilization method for the preparation of biosensors based on pH shift-induced deposition of biomolecule-containing polymer films. *Anal. Chem.* (74): 355-361.
48. Lee, K. B., S. J. Park, C. A. Mirkin, J. C. Smith, and M. Mrksich. 2002. Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. *Science* (295): 1702-1705.
49. Li, Y., B. Yuan, H. Ji, D. Han, S. Q. Chen, F. Tian, and X. Y. Jiang. 2007. A method for patterning multiple types of cells by using electrochemical desorption of self-assembled monolayers within microfluidic channels. *Angew.*

- Chem. Int. Ed.* (46): 1094-1096.
50. Lunte, S. M., K. D. Blankenship, and S. A. Read. 1988. Detection and identification of procyanidins and flavanols in wine by dual-electrode liquid-chromatography - electrochemistry. *Analyst* (113): 99-102.
51. Luo, X. L., J. J. Xu, Y. Du, and H. Y. Chen. 2004. A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Anal. Biochem.* (334): 284-289.
52. Luo, X. L., J. J. Xu, Q. Zhang, G. J. Yang, and H. Y. Chen. 2005. Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly. *Biosens. Bioelectron.* (21): 190-196.
53. Makower, A., A. V. Eremenko, K. Streffer, U. Wollenberger, and F. W. Scheller. 1996. Tyrosinase-glucose dehydrogenase substrate-recycling biosensor: A highly-sensitive measurement of phenolic compounds. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (65): 39-44.
54. McIntyre, A. E., and J. N. Lester. 1983. Organic contaminants in the aquatic environment .4. analytical techniques. *Sci. Total Environ.* (27): 201-230.
55. Merken, H. M., and G. R. Beecher. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J. Agric. Food. Chem.* (48): 577-599.
56. Mourgues, J., P. Benard, C. Flanzy, and C. Jouret. 1967. Techniques of red wine making and redox potential. *Annales De Technologie Agricole* (16): 333-&.
57. Nistor, C., J. Emneus, L. Gorton, and A. Ciucu. 1999. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Anal. Chim. Acta* (387): 309-326.
58. Odum, J., P. A. Lefevre, S. Tittensor, D. Paton, E. J. Routledge, N. A. Beresford,

- J. P. Sumpter, and J. Ashby. 1997. The rodent uterotrophic assay: Critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul. Toxicol. Pharm.* (25): 176-188.
59. Packer, L. 1999. *Methods in enzymology: oxidants and antioxidants*, Vol. 299, San Diego: Academic Press.
60. Patty, F. A. 1963. *Industrial hygiene and toxicology* (Fassett, D. W., Irosh, D. D., and Kumler, K., Eds.), Vol. II, New York: Interscience Publishers.
61. Petrovic, M., and D. Barcelo. 2000. Determination of anionic and nonionic surfactants, their degradation products, and endocrine-disrupting compounds in sewage sludge by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* (72): 4560-4567.
62. Price, M. L., S. Vanscoyoc, and L. G. Butler. 1978. Critical evaluation of vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food. Chem.* (26): 1214-1218.
63. Qu, X. J., J. Zhou, H. Z. Yin, Y. H. Sun, and S. Q. Zhang. 2002. Electrochemical oxidation and voltammetric determination of tannic acid. *Chin. J. Anal. Chem.* (30): 192-194.
64. Quist, A. P., E. Pavlovic, and S. Oscarsson. 2005. Recent advances in microcontact printing. *Anal. Bioanal. Chem.* (381): 591-600.
65. Rianasari, I., L. Walder, M. Burchardt, I. Zawisza, and G. Wittstock. 2008. Inkjet-printed thiol self-assembled monolayer structures on gold: Quality control and microarray electrode fabrication. *Langmuir* (24): 9110-9117.
66. Rodriguez-Mozaz, S., M. J. L. de Alda, and D. Barcelo. 2006. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* (386): 1025-1041.
67. Rosenwald, S. E., N. Dontha, and W. G. Kuhr. 1998. A laser ablation method for

- the spatial segregation of enzyme and redox sites on carbon fiber microelectrodes. *Anal. Chem.* (70): 1133-1140.
68. Rosenwald, S. E., W. B. Nowall, N. Dontha, and W. G. Kuhr. 2000. Laser interference pattern ablation of a carbon fiber microelectrode: Biosensor signal enhancement after enzyme attachment. *Anal. Chem.* (72): 4914-4920.
69. Sawyer, D. T., and J. L. Robert. 1974. *Experimental Electrochemistry for Chemists*, New York: Wiley.
70. Schiller, J. G., A. K. Chen, and C. C. Liu. 1978. Determination of phenol concentrations by an electrochemical system with immobilized tyrosinase. *Anal. Biochem.* (85): 25-33.
71. Schuhmann, W., C. Kranz, H. Wohlschlager, and J. Strohmeier. 1997. Pulse technique for the electrochemical deposition of polymer films on electrode surfaces. *Biosens. Bioelectron.* (12): 1157-1167.
72. Seol, S. K., J. M. Yi, X. Jin, C. C. Kim, J. H. Je, W. L. Tsai, P.-C. Hsu, Y. Hwu, C. H. Chen, L. W. Chang, and G. Margaritondo. 2004. Coherent microradiology directly observes a critical cathode-anode distance effect in localized electrochemical deposition. *Electrochem. Solid State Lett.* (7): C95-C97.
73. Shi, X. W., Y. Liu, A. T. Lewandowski, L. Q. Wu, H. C. Wu, R. Ghodssi, G. W. Rubloff, W. E. Bentley, and G. F. Payne. 2008. Chitosan biotinylation and electrodeposition for selective protein assembly. *Macromol. Biosci.* (8): 451-457.
74. Smit, M. H., and G. A. Rechnitz. 1993. Toxin detection using a tyrosinase-coupled oxygen-electrode. *Anal. Chem.* (65): 380-385.
75. Stanca, S. E., I. C. Popescu, and L. Oniciu. 2003. Biosensors for phenol derivatives using biochemical signal amplification. *Talanta* (61): 501-507.
76. Stern, E., S. Jay, J. Bertram, B. Boese, I. Kretschmar, D. Turner-Evans, C.

- Dietz, D. A. Lavan, T. Malinski, T. Fahmy, and M. A. Reed. 2006. Electropolymerization on microelectrodes: Functionalization technique for selective protein and DNA conjugation. *Anal. Chem.* (78): 6340-6346.
77. Szunerits, S., L. Bouffier, R. Calemczuk, B. Corso, M. Demeunynck, E. Descamps, Y. Defontaine, J. B. Fiche, E. Fortin, T. Livache, P. Mailley, A. Roget, and E. Vieil. 2005. Comparison of different strategies on DNA chip fabrication and DNA-sensing: Optical and electrochemical approaches. *Electroanalysis* (17): 2001-2017.
78. Teasdale, P. R., A. I. Minett, K. Dixon, T. W. Lewis, and G. E. Batley. 1998. Practical improvements for redox potential (E-H) measurements and the application of a multiple-electrode redox probe (MERP) for characterising sediment in situ. *Anal. Chim. Acta* (367): 201-213.
79. Tomlinson, J. W., and P. A. Kilmartin. 1997. Measurement of the redox potential of wine. *J. Appl. Electrochem.* (27): 1125-1134.
80. Uchiyama, S., Y. Hasebe, H. Shimizu, and H. Ishihara. 1993. Enzyme-based catechol sensor based on the cyclic reaction between catechol and 1,2-benzoquinone, using L-ascorbate and tyrosinase. *Anal. Chim. Acta* (276): 341-345.
81. Wang, J., T. Martinez, D. R. Yaniv, and L. D. McCormick. 1991. Scanning tunneling microscopic investigation of surface fouling of glassy-carbon surfaces due to phenol oxidation. *J. Electroanal. Chem.* (313): 129-140.
82. Wang, J. 2002. Portable electrochemical systems. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* (21): 226-232.
83. Westcott, N. P., and M. N. Yousaf. 2008. Synergistic microfluidic and electrochemical strategy to activate and pattern surfaces selectively with ligands and cells. *Langmuir* (24): 2261-2265.

84. White, R., S. Jobling, S. A. Hoare, J. P. Sumpter, and M. G. Parker. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* (135): 175-182.
85. Wilhelm, T., and G. Wittstock. 2002. Generation of periodic enzyme patterns by soft lithography and activity imaging by scanning electrochemical microscopy. *Langmuir* (18): 9485-9493.
86. Wittstock, G., and W. Schuhmann. 1997. Formation and imaging of microscopic enzymatically active spots on an alkanethiolate-covered gold electrode by scanning electrochemical microscopy. *Anal. Chem.* (69): 5059-5066.
87. Wittstock, G., T. Asmus, and T. Wilhelm. 2000. Investigation of ion-bombarded conducting polymer films by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Fresenius J. Anal. Chem.* (367): 346-351.
88. Wittstock, G., M. Burchardt, S. E. Pust, Y. Shen, and C. Zhao. 2007. Scanning electrochemical microscopy for direct imaging of reaction rates. *Angew. Chem. Int. Ed.* (46): 1584-1617.
89. Wu, C. T., S. C. Yeh, and G. S. Jeng. 1975. A study on the variation of catechins content in the made tea resulted from different processes of manufacture. *J. Chin. Agr. Chem. Soc.* (13): 159.
90. Wu, C. T. 1997. *Studies on Tea Crop*, Vol. II, Taipei: Scientific Agriculture
91. Wu, L. Q., A. P. Gadre, H. M. Yi, M. J. Kastantin, G. W. Rubloff, W. E. Bentley, G. F. Payne, and R. Ghodssi. 2002. Voltage-dependent assembly of the polysaccharide chitosan onto an electrode surface. *Langmuir* (18): 8620-8625.
92. Wu, L. Q., K. Lee, X. Wang, D. S. English, W. Losert, and G. F. Payne. 2005. Chitosan-mediated and spatially selective electrodeposition of nanoscale particles. *Langmuir* (21): 3641-3646.
93. Zhao, J. W., Q. S. Chen, X. Y. Huang, and C. H. Fang. 2006. Qualitative

identification of tea categories by near infrared spectroscopy and support vector machine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (41): 1198-1204.

