

附錄一 化學生物感測器講義

東華大學化學系 蘇宏基編著

(為響應環保自本年度起改提供電子檔，以節約紙張保護地球)

一、生物感測器定義

生物感測器(biosensors)是由具特異性(specificity)之生物辨識元件與可將生化性訊號轉變成處理及顯示訊號之轉換元件(transducer)所組成之分析儀器。生物辨識元件包含具催化作用的酵素、微生物、組織等，與不具催化作用之親和性抗體(antibody)、受體(receptor)、核酸等，轉換元件的原理有電化學法、光學、熱、與聲波等，生物感測器利用生物辨識元件獨特之高度選擇性、敏感性與轉換元件之快速訊號處理及顯示之即時輸出(real-time output)之特性，可以模擬生物體中許多如味覺、嗅覺、內分泌系統中受體與荷爾蒙、神經系統中受體蛋白質與神經傳導物質、酵素與基質、免疫系統中抗體與抗原等包含訊息辨識與傳遞作用之生化現象，簡單的說，生物感測器將大自然界生物體千萬年來一直使用之原理，應用於分析量測技術上，這種方法與傳統分析方法有極大差異，具有其獨特之特性與優點，在某些分析上可以補償傳統分析方法之缺點或可以取而代之。圖 1 是生物感測器構成與原理之簡圖。

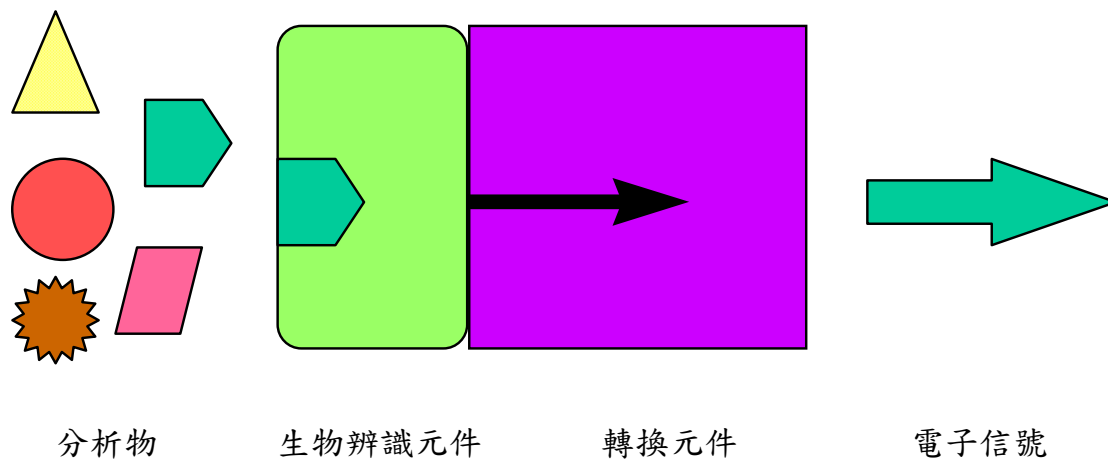


圖 1 生物感測器構成與原理

生物感測器另一種定義，廣泛的包括所有使用生物辨識元件之分析方法，但是這樣一來有太多方法都可以稱為生物感測器，所以在此將縮小範圍，以具有生物辨識元件與轉換元件之定義為主，其實有一些學者狹義的認為，生物感測器中之生物辨識元件與轉換元件必需要緊密連在一起，不可以有任何間隙存在，即二者必需結合為一，但由於固定(immobilization)生物辨識元件技術與轉換元件特性等問題，許多生物感測器研究並未能將二者完全緊密合而為一，在此將不侷限於此定義，簡單說同時具有生物辨識元件與轉換元件所組成之分析儀器即是生物感測器。使用化學方法製作具有生物辨識能力之化學分子如分子嵌印高分子(molecular imprinting polymer)、冠狀醚(crown ether)、導電高分子(conducting polymers)等與轉換元件所組成之分析儀器因

屬於化學感測器範疇，將不在此討論。

二、生物辨識元件

由圖 1 可知，生物感測器分析之特異性，乃由其所使用之生物辨識元件而定，因此具有決定性之地位，值得詳加介紹。簡單依生物辨識元件特性將生物辨識元件分為兩大類：第一類是催化型(catalysis)生物辨識元件如酵素、微生物、組織等，利用此類生物辨識元件之催化能力與選擇性，將待測分子代謝所產生之變化或代謝產物藉由轉換元件偵測後，將訊號轉換成電子信號後表現出來。另一類是親和型(affinity)生物辨識元件如染料(dye)、抗體、受體、核酸等，此類生物辨識元件不具催化作用，但對特別之待測分子有親和力，當生物辨識元件與待測分子因親和力結合時，產生電化學、光、熱或質量變化由轉換元件偵測後，轉換成電子信號讀出。在此將選擇重要辨識元件一一討論。

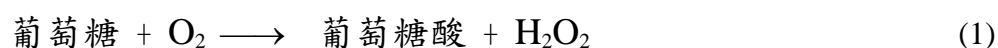
(一)催化型生物辨識元件

(1)酵素

酵素是生物體中最重要之催化劑，種類繁多，依照酵素命名手冊資料(IUB, 1979)，至少有兩千種以上酵素被分類，其他未被發現、分離研究分類尚有許多，酵素與其受質(substrate)反應，在生物感測器發展歷史上，是最早被利用來製作生物感測器，因為酵素種類與數量

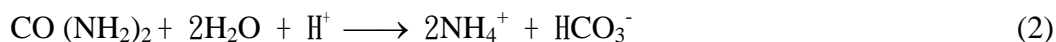
繁多，還有許多酵素與其受質反應可以被用來分析許多分析物，因此在生物感測器研究上，倍受重視。最早也是被廣泛研究與商業化之生物感測器即利用葡萄糖氧化酵素(glucose oxidase, GOD)分析血液中葡萄糖含量其反應式如下：

GOD



最早是使用氧電極分析氧氣消耗量推算出血液中葡萄糖含量，但由於樣品中氧含量易影響葡萄糖氧化酵素催化速度，後來以電流式電極分析過氧化氫濃度，這種葡萄糖生物感測器可偵測血液中葡萄糖濃度範圍 1-30 mM，每分鐘可分析 60 個樣品，此感測器可以有數個月的使用壽命。另一種生物感測器常用酵素是尿素分解酵素(urease)分析尿素其反應式如下：

urease



使用氫離子選擇性電極(ammonia ion selective electrode)可分析尿素低到 μM 濃度，每分鐘可分析 20 個樣品，此感測器可以有 2 個月的使用壽命。除此之外酵素亦可用於其抑制物(inhibitor)之定量，利用在固定條件下酵素受抑制物影響產生之酵素活性下降，推算出樣品中抑制

物之量，最知名的方法即利用有機磷與氨基甲酸鹽類農藥對乙醯膽鹼酯酵素(acetylcholinesterase)之抑制性，製作分析有機磷與氨基甲酸鹽類農藥殘留之生物感測器。一般而言，偵測極限約為 $\mu\text{mol/L}$ ，如果需要分析更低濃度，則使用受質再循環(substrate recycling)，可使偵測極限下降至 p mol/L 水準。基本上，選用適當酵素與轉換元件，分析分析物或分析物被催化後之產物已可解決大部分之問題，但如果分析物使用單一酵素催化後，因待測分子代謝所產生之變化不易偵測或代謝產物無適當轉換元件可用時，加入第二個酵素催化第一個酵素之產物是最常用之方法，表 1 是生物感測器中使用酵素序列(enzyme sequences) 之例子。

表 1 使用酵素序列之生物感測器

分析物	酵素序列	產物	轉換元件
有機磷類農藥	乙醯膽鹼酯酵素+	H_2O_2	碳粉電極

	(acetylcholinesterase) 鹼酯氧化酵素 (choline oxidase)		
乳糖	乳糖水解酵素+ (β -galactosidase)	熱	熱感測器
乳糖	葡萄糖氧化酵素 乳糖水解酵素+ 葡萄糖氧化酵素	H_2O_2	電化學
蔗糖	轉化酵素+ (invertase)	H_2O_2	氧電極
木質素 (xylose)	Mutarotse 木質素轉化酵素+ (xylose isomerase)	NADH	化學修飾電極
澱粉	Mutarotse + 葡萄糖脫氫酵素 (glucose dehydrogenase) α 、 β -澱粉酵素+ Mutarotse + 葡萄糖氧化酵素	H_2O_2	電流式電極

(2)細胞、組織

在生物感測器發展上，生物辨識元件除了純化之酵素外，使用細胞、組織亦有許多成功之例證。可是由於使用細胞、組織中包含了許多酵素反應，有較多其他干擾物質干擾分析，也有更多側反應(side reaction)使生物感測器對其他分析物有反應，使生物感測器選擇性降低，這也是使用細胞、組織生物辨識元件在生物感測器發展上較不受歡迎之主要原因。使用細胞、組織時，細胞、組織之生理狀況十分重要，文獻上有使用僅有少數酵素參與之休眠細胞(resting cells)、也有人使用正快速生長繁殖之細胞，使用細胞、組織時，如何保持細胞、

組織一致之細胞膜性質，避免其他酵素因細胞膜通透性改變滲出，或分析物因細胞膜通透性改變，影響生物感測器分析之重複性與穩定性，以商業化的觀點而言，此類生物感測器並無前景，但從教育與訓練觀點，由於細胞、組織可省下可觀之酵素萃取與純化之花費，對學生之訓練上還是有助益。表 2 是使用細胞、組織之生物感測器。

表 2 使用細胞、組織之生物感測器

基質	生物材料	分析元素
麩氨酸	豬腎細胞	氨
AMP	兔肌肉組織	氨
H ₂ O ₂	牛肝細胞	氨
麩氨酸	南瓜組織	CO ₂
丙酮酸	玉米粒	CO ₂
尿素	大豆乳	氨
多巴胺dopamine	香蕉泥	O ₂
酪氨酸tyrosine	甜菜組織	O ₂
半胱氨酸	黃瓜葉	氨

(3)胞器(organelles)

和使用細胞、組織一樣，胞器也可以做為生物辨識元件，使用大鼠肝臟微小體(microsome)在電極分析甲狀腺素(thyroxine) 與使用豬腎小球細胞之粒腺體(mitochondria)固定在氨氣感測器上分析麩氨酸(glutamine)。由於胞器不像細胞、組織一樣有細胞膜保護，比酵素、細胞、組織更不安定，因此極易失去活性，分離胞器也較不方便，除了有特別需要如某些酵素一離開胞器即失去活性，使用細胞又有干擾物時才會使用此辨識元件。

(二)親和型生物辨識元件

親和型生物反應有許多可歸納免疫化學、受體與核酸三大類，其中以免疫化學結合反應最為詳細研究與被實際商業應用於生物感測器上。使用受體於生物感測器上曾被認為極有潛力但目前仍然無真正的突破離商業應用尚極待投入研究，親糖蛋白質(lectin)與碳水化合物結合反應也曾被廣泛研究。一般說來，因為親和型反應在低濃度分析物時與親和物(ligand)有較強結合性，所以在低濃度親和型生物反應比催化型生物反應更敏感，表 3 使用催化型生物辨識元件如酵素與親和型免疫化學抗體分析之比較。

表 3 催化型生物辨識元件如酵素與親和型免疫化學抗體分析之比較

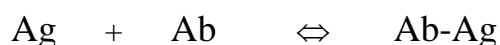
條件	酵素/受質	抗體/抗原
分析物濃度	μ mole	n mole
選擇性	+	++
新分析物 使用便利性	-	+
生產辨識元 件便利性	-	+
大分子分析物定量	-	+
分析所需時間	+	-

大部分親和型生物感測器以競爭型免疫分析為主，其主要方法是使分析物與定量之標示(label)分析物競爭有限之抗體結合位置，競爭結果由有多少標示物與抗體結合即可推出分析物之濃度。現在親和型生物感測器發展趨勢已朝直接分析親和性分析物與親和物之親和反應，不再借用標示方法，不但可以直接分析使方法更簡化也加快分析速度。

(1) 免疫化學

抗原與抗體反應是最常見之免疫化學反應，當脊椎動物受外界大分子

侵入引發免疫反應製造抗體對抗外界抗原異物，抗體是一種球蛋白，對其特定抗原具有親和性其反應如下：



此反應之親和常數(affinity constant) $K = [\text{Ab-Ag}] / [\text{Ag}][\text{Ab}]$ 在 10^5 到 10^{11} 之間，通常都大於 10^6 ，可以在低濃度分析抗原，不論使用多價抗血清或單株抗體使用免疫化學反應最大的好處是有極佳之選擇性與敏感性，缺點是無催化性，對小分子之分析較困難。使用固定化抗體分析時需小心避免使用其與抗原反應之位置，最常使用得方法是將抗體固定於Fc處或利用抗體與蛋白質A或G之親合性加以固定化。

(2) 受體

使用受體為生物感測器辨識元是極大之挑戰，因為到目前為止對受體之了解相當有限，一直到最近才有純粹受體被純化但離標準被採用尚有差距，由於所有的受體都是與細胞膜結合，與一般傳統蛋白質之操作相當不同，最為熟悉受體是神經傳導受體與荷爾蒙受體，最簡單的受體為生物感測器是像使用細胞組織般，避開純化受體之困難，例如使用牛蛙嗅覺細胞上之受體在壓電晶體轉換元件上分析氣味、揮發性化學試劑等。這種生物感測器最大的問題是受體穩定性差只有幾小時之使用壽命。使用純化受體被研究最多的是尼古丁乙醯膽鹼

(nicotinic acetylcholine)許多轉換元件如離子選擇性場效應型電晶體 (ion selective field effect transistor, IsFET) 與光纖消逝波(fiber-optic evanescent wave)等，以後者較好，使用壽命高達 30 天。

(3) 核酸

使用核酸為生物感測器辨識元與使用抗體很類似，由具專一性之 DNA 探針可以尋找與其互補之鹽基對進而偵測遺傳疾病，癌症或病毒感染，單股與雙股 DNA 探針都曾被用在生物感測器辨識元，使用核酸也需要標示，放射性螢光與酵素等都曾經被使用。由於蛋白質與基因工程技術進步，使用核酸為生物感測器辨識元，與使用基因工程改善酵素製造又新又好的酵素是許多科學家正在努力之方向。

三、生物辨識元固定方法

由於生物感測器需由生物辨識元件與轉換元件連接在一起，才能使感測器發揮功效，因此如何固定生物辨識元，保持生物辨識元之原有活性，並固定足量之辨識元件，以減少因生物辨識元在分析與儲存過程中，因為失去活性而產生之反應性下降或喪失，進而確保生物辨識元能發揮應有之功能，因此如何固定生物辨識元即成為使用生物感測器極重要之課題。現在將最常用之固定方法分為五大類，並簡易介紹其基本原理。第一種也是最常用之方法即共價結合(covalent

coupling), 將生物辨識元件以共價鍵接合於固體支持物上或轉換元件表面, 這種方法結合能力最強, 有幾種常用方式, 簡單的說皆先活化固體支持物上或轉換元件表面上某些化學官能基, 使官能基與生物辨識元件表面特定之官能基結合, 選擇共價結合方法最重要是如何選用最適當之方法使固定之生物辨識元件維持其生物活性並使共價鍵接合穩定不會與固定物失去結合, 在共價結合固定酵素時, 常為保護酵素活性位置將酵素競爭型抑制物加入保護酵素活性位置, 有時候不用競爭型抑制物改用酵素受質亦可。另一種最常使用於細胞、組織與胞器之固定方法分為限入法(entrainment), 將生物辨識元件與水溶性高分子或高分子單體混合, 再將該溶液產生交聯結合(cross linking)成三度空間之網狀結構, 將生物辨識元件限入網狀結構中產生固定作用, 此法對生物辨識元件之處理最少, 最易保持生物辨識元之原有活性, 但三度空間之網狀結構可能造成分析物質傳之限制, 降低反應速度。使用簡易之吸附也可以固定生物辨識元件, 這種完全不必活化最少處理步驟之方法雖然也有效但因為結合力太弱, 使用時生物辨識元件易脫離, 僅限於短時間之應用。將生物辨識元件包在半透膜內, 再套上轉換元件是最早生物感測器分析血液葡萄糖之固定方法, 這種方法既不影響生物辨識元件生物活性, 也限制分析干擾物如使生物辨識元件活性之抑制物質或降低轉換元件汙染物之干擾, 此法與限入法一般有可

能因半透膜厚度造成分析物質傳之限制，降低反應速度，理論上使用愈薄之半透膜愈好。最後一種是直接使用有兩個或兩個官能基以上之試劑如 glutaraldehyde 將生物辨識元件與支持物或轉換元件產生交叉結合，此法因為產生交叉結合時不像限入法有高分子或高分子單體之骨架，所形成之結構機械強度較弱也易損害辨識元件生物活性，使用比例較低。圖 2 是生物辨識元件固定方法之簡圖。

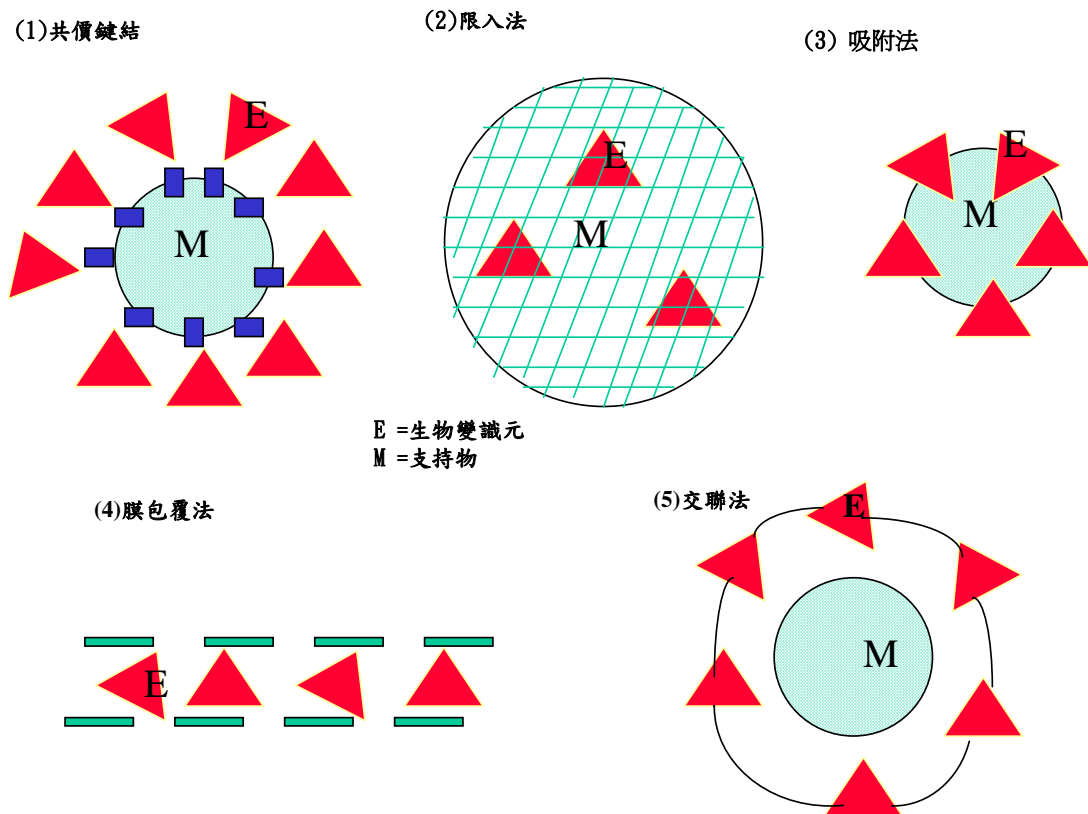


圖 2 是生物辨識元件固定方法之簡圖

四、 轉換元件

生物感測器所使用之轉換元件種類頗多，最常見的是電化學

轉換元件，包括電流計量(amperometric)、電壓計量(potenimetric)，光學轉換元件如光極(optrode)之類光學感測器，使用熱轉換元件之酵素熱感測器與使用壓電晶體(piezoelectric crystals)之壓電晶體生物感測器等將一一加以介紹。

(一)電化學轉換元件

(1)電流式電化學轉換元件

電流式電化學生物感測器是分析物在溶液與電極界面中進行氧化還原作用，分析其產生之電流，其電流濃度關係如下：

$$i = n F d N / dt$$

F是法拉第常數 96500 C mol^{-1} ；i是所測出之電流 ampere；dN/dt單位時間內所消耗之分析物濃度，由於氧化還原均在電極表面進行，所以電流大小也和電極表面積有關，通常電流再除以電極表面積以電流密度表示，這種分析方式由於分析物濃度直接與其產生之氧化還原電流成正比，即分析物濃度與電流大小為線性關係，可以簡易推算與反應分析物濃度，是最受歡迎之電化學感測器。最早由Clark與Lyons在1962年發展之電流式生物感測器即是屬於此類，利用葡萄糖氧化酵素結合溶氧電極，製成酵素電極，以測定電流方式分析溶液之溶氧量，再進一步推算溶液中葡萄糖含量，其反應式如(1)。另一種方式，是以金屬電極，碳類電極以固定之施加電壓(applied potential)分析葡

葡萄糖氧化酵素產物過氧化氫之陽極電流(anodic current)，其反應式也如(1)，只是直接分析酵素產物再推算溶液中葡萄糖含量。

電流式電化學轉換元件，因其偵測器形狀不同可分為薄層(thin-layer)、壁噴(wall-jet)與管狀(tubular)三種，如圖 3。薄層偵測器是在流體系統如液相層析(high performance liquid chromatography, HPLC)與流動注入分析(flow injection analysis, FIA)最受歡迎，因為與管柱與酵素反應器連接時，最方便。壁噴偵測器因為分析物直接流向工作電極表面，加大對工作電極表面質傳速度，由於氧化還原均在電極表面進行常是屬於質傳控制，因此可加快反應速度。管狀偵測器不像前二者受歡迎，但其結構更簡單，有更大電極表面積，但電極表面磨光與如何控制所有管狀表面有一致之電壓，以確保電化學感測器有好的重複性，將是此類偵測器主要問題。

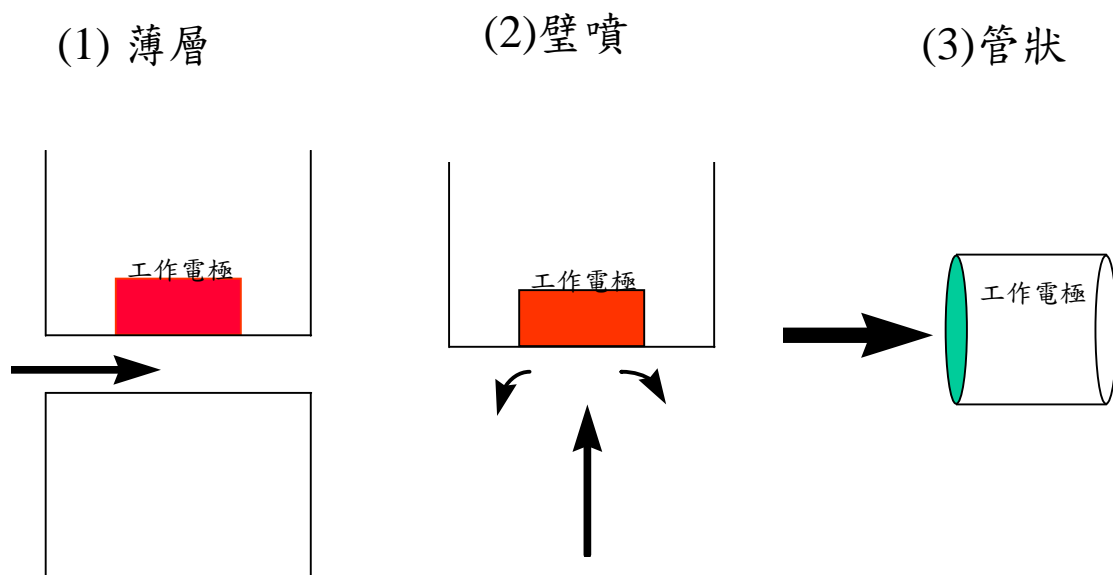


圖 3 電流式電化學轉換元件偵測器形狀(1)薄層、(2)壁噴與(3)管狀

電流計量式電化學生物感測器中以酵素電極應用最早也最廣。以使用傳遞電子介質不同 Scheller et. al. 將酵素電極簡分為三種世代，第一代是使用將生物辨識元件用半透膜包在電極上如是最早分析血液葡萄糖之葡萄糖氧化酵素電極即屬第一代。此類酵素電極最常使用氧化酵素與去氫酵素兩種氧化還原酵素，但不使用其他電子傳遞介質(mediator)協助電子傳遞。第二代不使用氧氣此類氧化酵素常用之天然電子傳遞物質，改用其他人造電子傳遞介質如 ferrocene 協助電子傳遞，最有名的例子是 Exac Tech 所發展之全血葡萄糖使用 ferrocene 人造電子傳遞介質之葡萄糖氧化酵素電極(筆型血糖計)，這是已知生物感測器中商業化最成功之例子。使用人造電子傳遞介質可有效降低施加電壓，減少生物樣品中易氧化之干擾物如維生素 C、尿酸、與常用退燒藥所含之 paracetamol，因為不使用人造電子傳遞物質，使用氧氣為電子傳遞物質，不但受樣品含氧量之影響，產生之過氧化氫會使酵素失去活性使生物感測器減低敏感性，除此之外，最大問題是，必須至少使用 600 mV 施加電壓才能氧化過氧化氫，在此狀況下血中維生素 C、尿酸、也有氧化電流，無法分辨是分析物葡萄糖被葡萄糖氧化酵素催化之電流還是生物樣品中易氧化之干擾物電流，徹底解決第一代酵素電極之問題，此外 Exac Tech 筆型血糖計以印刷電極，使用極低價之術碳粉墨水與塑膠片，製作可棄式印刷電

極，達到大量生產降低成本之優點，此外該生物感測器只有 15 公分長，1.5 公分寬，重量只有 30 克，可隨身攜帶，測量時只需將一滴血滴在印刷電極上，再將印刷電極放上筆型血糖計即可在三十秒鐘內由血糖計上之液晶顯示幕讀出血中葡萄糖濃度，此血糖計所得之結果與其他檢測血中葡萄糖之儀器有極為一致，有很好的準確度，由於全世界有約 2% 人口有糖尿病的疾病，大部分的患者需要每天檢測血中葡萄糖濃度，以適時適度使用胰島素，因此家用血中葡萄糖濃度檢測有 20 億美元之市場價值，且每年以 15% 成長，此筆型血糖計可方便患者旅行時使用，電流式電化學生物感測器提供方便、價廉、安全與快速之自行檢測之需求。圖 4 是 Exac Tech 使用 ferrocene 之筆型血糖計。

GOD: 葡萄糖氧化酵素
 Ferrocene: 人造電子傳遞介質

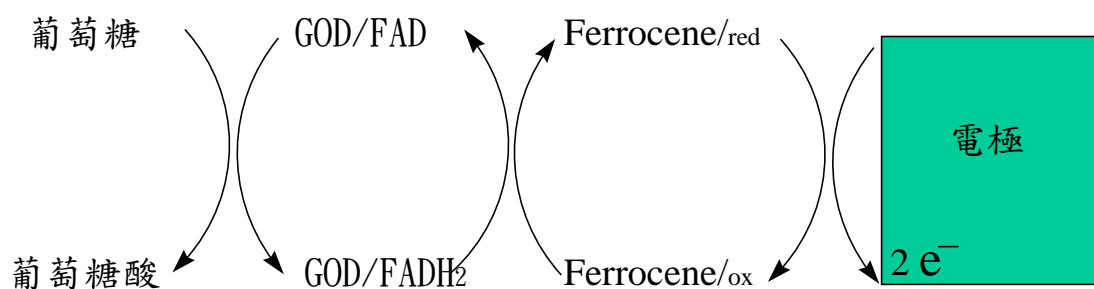


圖 4 是 Exac Tech 使用 ferrocene 之筆型血糖計

第三代酵素電極不使用如第二代酵素電極會擴散之人造電子傳遞物而將酵素、傳遞物、安定劑(stabilizer)與活化劑(activator)等直接

固定於電極表面或以限入法將上述酵素、傳遞物等生物化學分子以高分子固定於電極表面，最有名是使用碳粉酵素電極，與使用導電高分子之酵素電極，由於此類酵素電極無半透膜，酵素催化之反應直接傳到電極，有比較好的反應速度與敏感性，也沒有人造電子傳遞物流失影響反應之問題，是電流式電化學生物感測器目前最常用之型式。將電流式生物感測器即酵素電極微小化(miniaturization)以移植在體內直接進行工分析之 in situ 生物感測器為目標，目前雖然離完全成功尚有一大段距離，主要問題是目前感測器材料與人體相容性不好，與體內校正準確度與技術上還有困難，但以分析可靠性，感測器穩定性而言，微型感測器已有和傳統生物感測器相當之表現。電流式酵素電極唯一應用之限制是無法找到更多之氧化還原酵素，當新的酵素被分離純化時，就有更多之應用，對生物感測器發展而言，最大的限制還是在好的與新的生物辨識元件之發現，葡萄糖氧化酵素電極成功之因素不完全在有需求與好的酵素電極技術發展，葡萄糖氧化酵素本身對葡萄糖氧化酵素電極成功有極大之貢獻，該酵素被學者稱為一種理想酵素，有價廉、來源多、安定與催化性好等特質，葡萄糖氧化酵素電極成功其功不可沒。Exac Tech 公司後來利用相同之酵素電極技術，發展酵素電極分析乳酸、尿酸都因為選用酵素太昂貴或不安定，或需要兩三種酵素而告商業化失敗，找到適當之生物辨識元件是發展成功生

物感測器最重要的一步。

(2) 電壓式電化學轉換元件

電壓式電化學轉換元件可視為許多離子選擇性電極(ion selective electrode, ISE)，與適當之參考電極加上後就變成極有用之分析工具，最知名是氫離子選擇性電極即pH電極，其他選擇性電極如 NH_4^+ 、 CN^- 、 S^{2-} 、 F^- 等，將生物辨識元件與此類電極合併電壓式生物感測器即完成，此種生物感測器分析濃度從 10^{-1} 到 10^{-5} mol/L，有時可更低，此選擇性電極所測之電壓變化與分析物之對數(log)成正比，因此此電壓式生物感測器比電流式生物感測器有更大分析濃度範圍但準確性較電流式生物感測差，尤其選用pH電極轉換元件之電壓式生物感測器，易受樣品中緩衝量(buffer capacity)與pH值影響，使用之分析樣品用緩衝量大之緩衝液會使反應不敏感，使用之分析樣品用緩衝量小之緩衝液易受分析樣品pH值影響，與電流式生物感測器選擇，除非特別需求，以電流式生物感測器為優先考量。圖 5 使用 NH_4 選擇性電極之電壓式生物感測器。

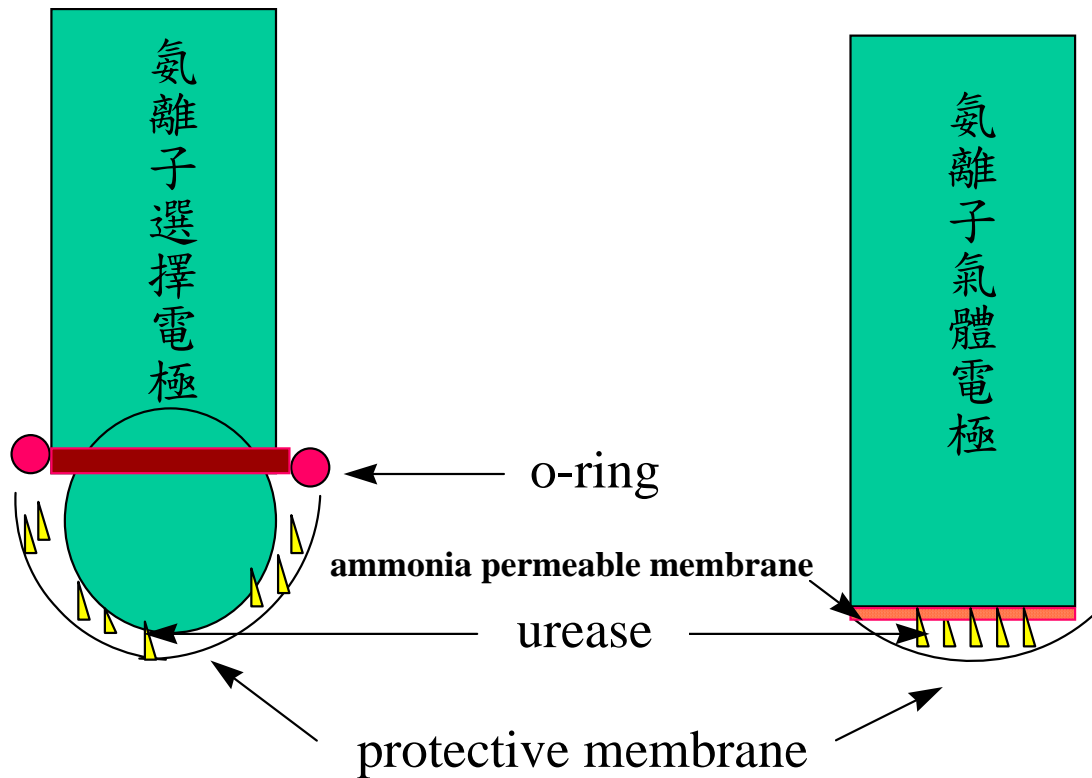


圖 5 使用 NH_4 選擇性電極之電壓式生物感測器

半導體離子選擇性場效應型電晶體 (ion selective field effect transistor, IsFET) 如圖 6，係使用半導體材料場效應型電晶體之微型電壓式感測器改良而成，此類感測器是由絕緣匣電晶體 (insulated gate field effect transistor, IgFET) 主要結構是在 p-型矽以二氧化矽絕緣與 n-型矽形成場效應型電晶體，以絕緣性更好，水份離子較不易通透之氮化矽膜取代原有之金屬膜，在氮化矽膜上固定生物辨識元件加上離子選擇性場效應型電晶體以選擇離子，與參考電極連接後可在溶液中測定分析物，其反應與離子選擇性電極相同，都是電壓式生物感測器。目前文獻上有尿素、盤尼西林、葡萄糖、乙醯膽鹼等生物感測器，使

用此類 IsFET 感測器有可利用半導體技術製作微小電極或陣列(array) 生物感測器同時分析多種分析物與說縮短反應時間說加快分析速度之優點，市面上已有使用 IsFET 之 pH 電極，但價格並不便宜。

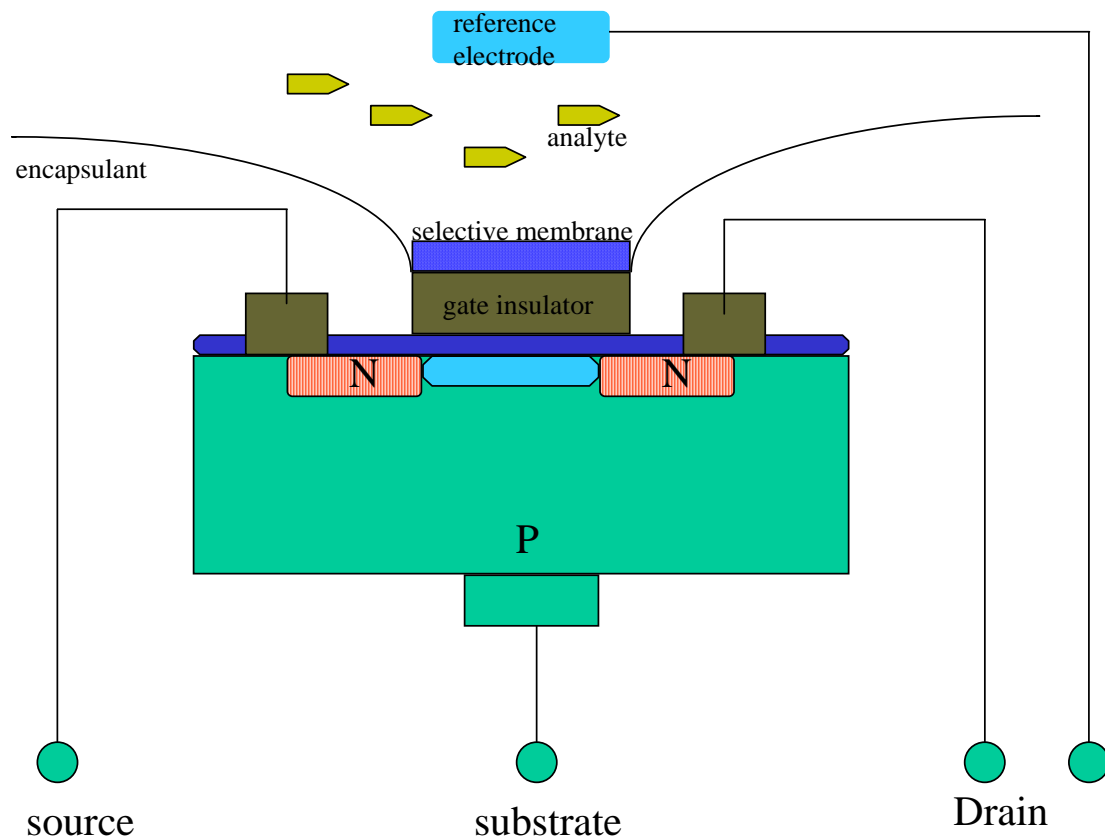
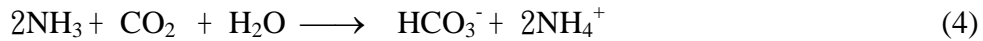


圖 6 半導體離子選擇性場效應型電晶體

(3) 導電式電化學轉換元件

導電度(conductivity)是電阻大小之倒數，由於許多酵素催化反應後有更多離子產生，因此使用導電度計為轉換元件也可以與酵素等辨識物形成生物感測器，文獻常見是使用尿素酵素分析血液中尿素，其反應式如下：

urease



其導電度在尿素酵素催化因離子增加三倍而顯著上升，其他酵素如去氫酵素、激酵素(kinase)、酯酵素等都有氫離子轉移或電荷分離等效果引起導電度變化，可以使用導電式電化學轉換元件，但由於導電度計只能分析全部之導電度變化，無法針對單一分析物分析，因此即使有酵素幫助催化分析物還是易受其他具導電性之離子影響，使用時通常使用酵素反應器，置放在導電度計前，利用分析物通過酵素反應器與略過(by-pass)酵素反應器之差別，避免其他導電物干擾，使用此法可線上偵測洗腎病人在洗腎過程中血液中尿素濃度，可使病人在最適當之時間完成洗腎，減少目前因無線上偵測血液中尿素濃度，每人都洗腎固定時間有人太長佔用洗腎機時間，或洗腎時間太短致效果不好之缺失，生物感測器因有線上偵測之優點很適合需要連續分析之使用。圖 7 為線上導電度式尿素生物感測器之簡圖。

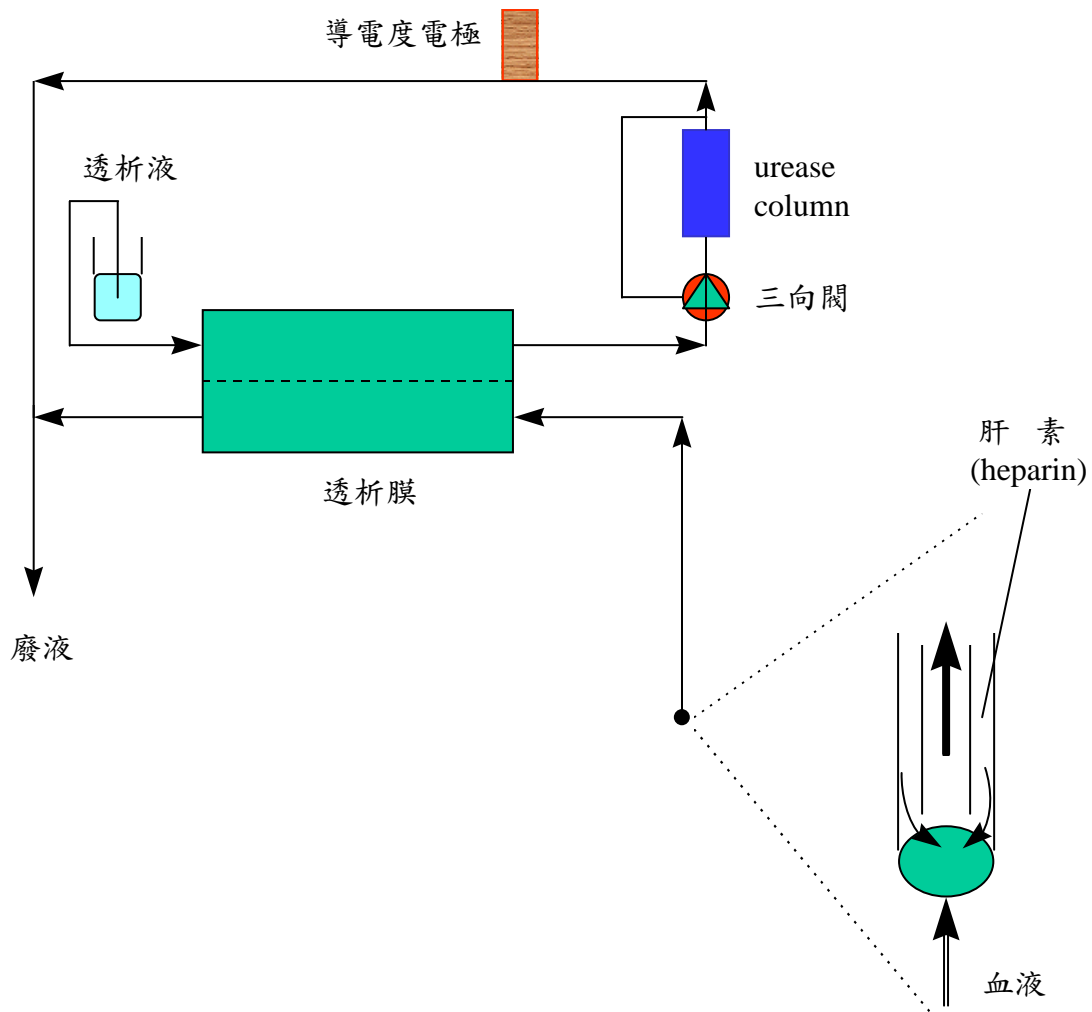


圖 7 線上導電度式尿素生物感測器

(4) 燃料電池

大部分生物感測器均以轉換元件將生物反應轉換為電子訊號，但生物燃料電池則由生物辨識元件直接得電子訊號，最顯著的例子是以細菌(*Clostridium butyricum*)在燃料電池上分析生化需仰量(biological oxygen demand, BOD)，傳統 BOD 分析需要五天，現在以此生物感測器直接分析廢水之有機物由細菌分解為氫由燃料電池所得到之總電量即可推出 BOD，此法大量減少分析 BOD 所需時間。

(二)光學轉換元件

大部分之生物分析(bioassay)都起源於光學儀器，最為人熟知是使用去氫酵素時所需要之 NAD^+/NADH 輔因子(cofactor)，特別是 NADH 在 340nm有較大的吸光值，最常為生物分析所使用，這也是相對說來發展較早的領域，尤其使用分光光度計配合小的分光光度計(flow cell)，使用固定化酵素反應器與流動注入分析(flow injection analysis, FIA)，在線上連續分析特別是發酵等生物程序監控，有許多應用例子，所得結果以Beer-Lamber定律如下：

$$A = \varepsilon C l \quad (5)$$

A 是吸光值，C 是濃度，l 是光徑(light path)， ε 是莫耳吸光系數(molar absorptivity) 即可得知 NADH 之濃度，而分析物濃度與 NADH 之濃度成正比，可推出分析物之量。由於生物感測器需要小且輕便之轉換元件，傳統之分光光度計與分光光度計並不適用，光纖(optical fiber)技術在近二十年來，有突飛猛進之進展，對資訊傳輸，長距離信號品質確保，扮演極重要之角色，已大量取代金屬電話線，光纖感測器之基本結構如圖 8。

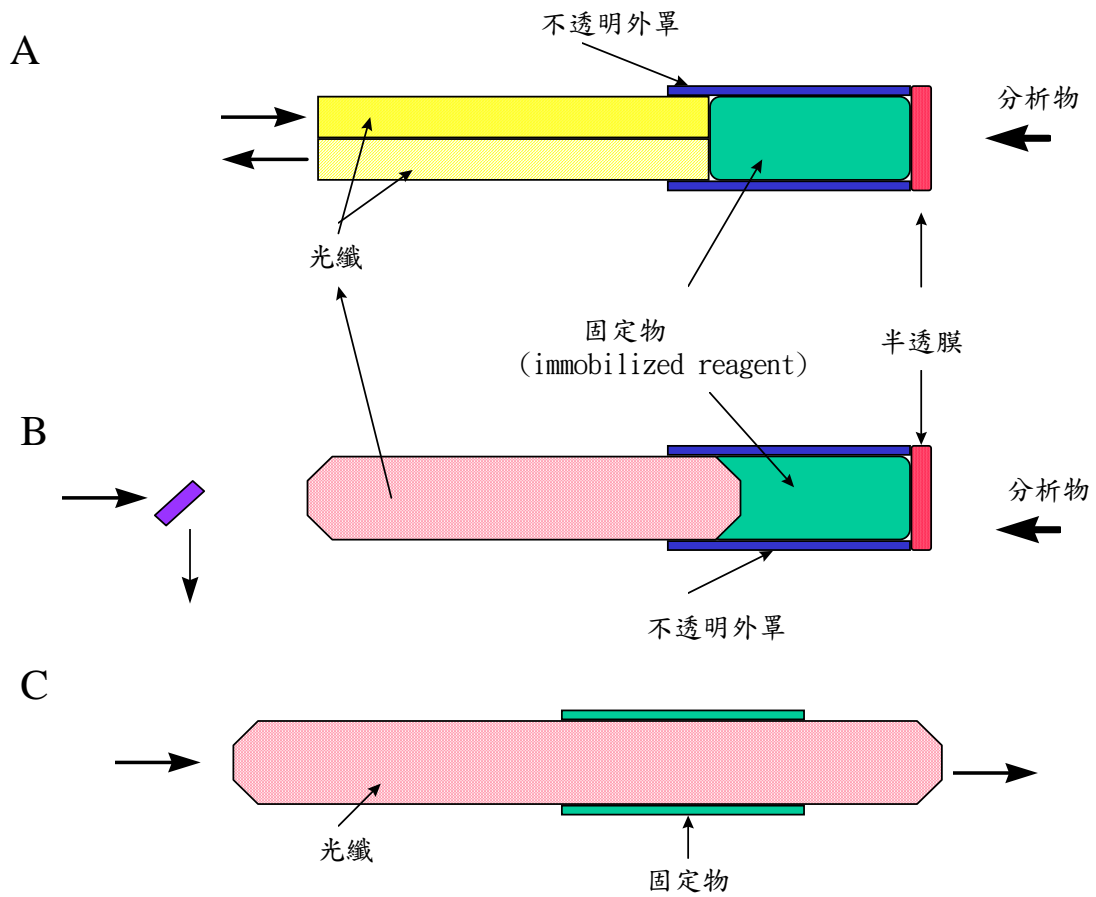


圖 8 光纖感測器之基本結構

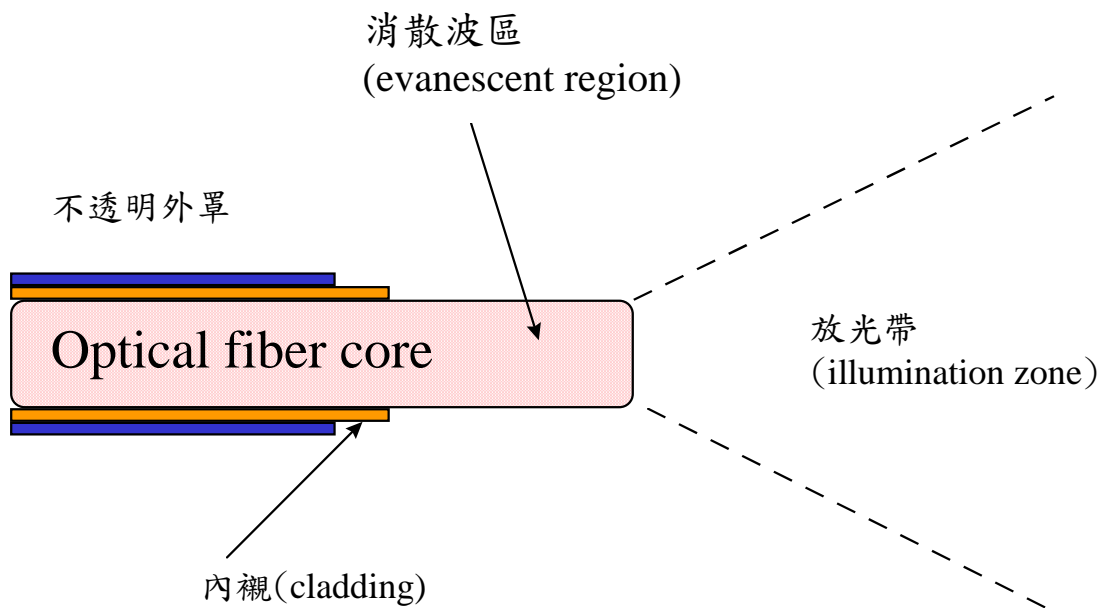


圖 9 消散波光纖感測器之簡圖

光纖利用其內層反射來光，不受電氣雜訊影響亦不失真，體積小非常適合生物感測器需要，光纖感測器有兩種型式，第一種是將入射與反射光集中於一端如圖 8 (a), (b)，另一種是消散波(evanescent wave)由光纖裸露端如圖 9，光纖一般來說都有不透明材料包裹在外部，分析時樣品由半透膜進入光纖與固定其中之生物辨識元件反應，但第一種是消散波式則光纖直接與樣品溶液接觸，光纖感測器可以利用對氫離子、氧、二氧化碳等有反應之染料分析如 pH、pCO₂、pO₂ 與金屬離子等分析物，將葡萄糖氧化酵素結合氧光纖感測器，製成酵素光極(enzyme optrode)，以測定溶液之溶氧量，再進一步推算溶液中葡萄糖含量，將生物辨識元件與光纖感測器結合有極大之潛力，尤其光纖感測器不像電化學感測器需要參考電極也不必在體內施加電壓電流對活體內(in vivo)分析有極大益處，加上不受電氣雜訊影響，與價格越來越便宜，因此許多生物感測器專家預測，光纖生物感測器將是二十一世紀研究發展之主流。

(三)熱轉換元件

大部分生物反應都會產生或消耗部分熱，因此理論上可以使用熱

感測器偵測生物反應，但是由於熱轉換元件缺乏選擇性並無法分辨分析物與干擾物所產生之熱，因此加上生物辨識元件以提升分析之準確性。最常見之熱轉換元件是測溫計(thermistor)，這是一種使用因溫度改變之電阻組成之半導體儀器，利用惠斯登電橋(wheatstone bridge)可以分析生物反應之電阻變化，在轉換為溫度差異。測溫計必需分析微小之溫度變化到 10^{-2} °C，轉換成酵素濃度可達 10^{-6} mol/L，其分析物濃度與熱及溫度變化關係如下：

$$Q = - nP \times \Delta H \quad (6)$$

$$Q = C_s \times \Delta T \quad (7)$$

$$\text{由(9.6) = (9.7)} \Rightarrow \Delta T = - nP \times \Delta H / C_s \quad (8)$$

Q 是總熱量，P 是產物，n 所含莫耳數， ΔH 是莫耳商變化(molar enthalpy change)， C_s (heat capacity)， ΔT 溫度變化，由 9.8 式子可知當分析時，分析系統中之 ΔH 越大 ΔT 溫度變化也越大，反之 C_s 越小時 ΔT 溫度變化也越大。一些酵素催化反應之 ΔH 如表 4。

表 4 酵素催化反應之莫耳商變化(ΔH)

酵素	分析物	莫耳商變化($-\Delta H$, kJ mol^{-1})
catalase	H_2O_2	100
膽固醇氧化酵素	膽固醇	53
葡萄糖氧化酵素	葡萄糖	80
乳酸去氫酵素	乳酸	62

NADH 去氫酵素	NADH	225
β -lactamase	青黴素 G	67
胰蛋白酵素(trypsin)	benzoyl-L-arginineamide	29
urease	尿素	61

酵素測溫計如圖 10，採取分流模式，減少因混合熱之影響，增加準確度，許多分析物如葡萄糖、尿素、乳酸、青黴素等。以往人們總認為酵素在有機溶劑中即會變性且失去活性，因此有關酵素在有機溶劑之變化並不為人所熟知，近幾年來，使用酵素在非水性如有機溶劑從事新的化學合成與應用則形成一種風潮，有一些分析物如膽固醇，酚等不易溶於水，因此有些酵素如過氧化氫酵素，膽固醇氧化酵素，等都被應用於在有機溶劑測定之酵素生物感測器，由於有機溶劑之 C_s 遠較水溶液小，因此可得更高之溫度變化，分析之敏感度可增加十倍以上，例如以過氧化氫酵素測溫計分析酚類有機物時，在甲苯溶液即比在 Tris 緩衝液下有 70 倍之敏感性。

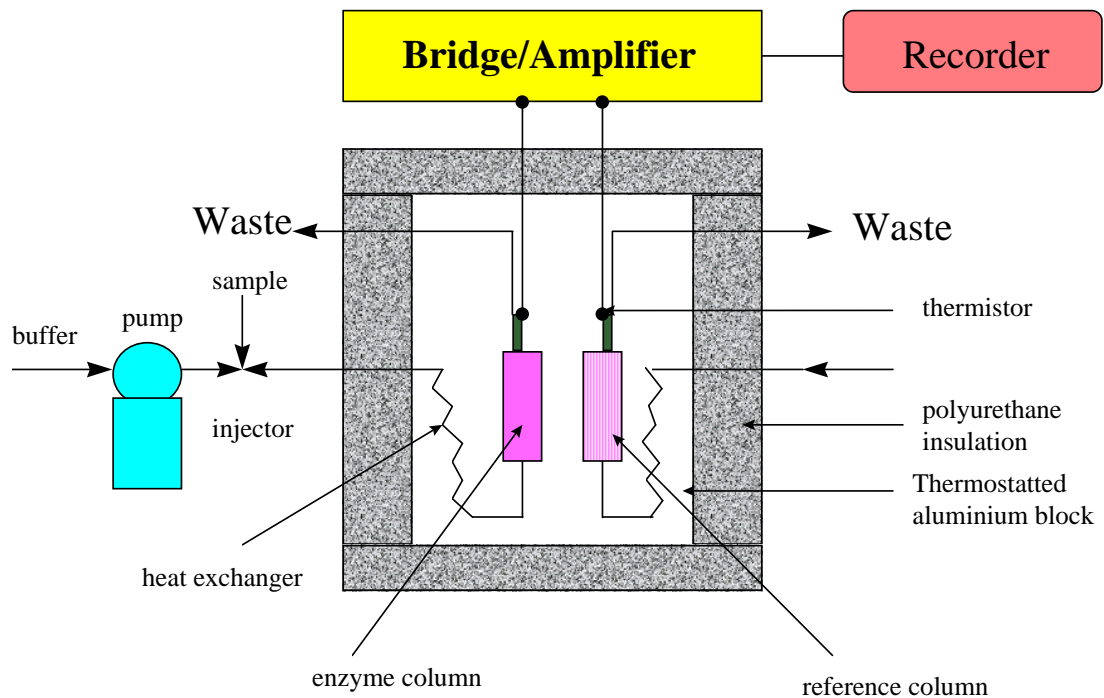


圖 10 酵素測溫計簡圖

(四) 壓電晶體轉換元件

壓電晶體轉換元件是一種以 AT 特殊切割型態的晶體，將壓電晶體在電場中產生機械性的振盪，加以記錄，當晶體表面有極微小量物質吸附或形成薄膜時，壓電晶體振盪頻率下降程度與晶體表面吸附物質增加之重量成比例，其關係以 Sauerbrey equation 表示如下：

$$\Delta f = -2.3 \times 10^{-6} f^2 \Delta m / A \quad (9)$$

Δm 晶體表面重量變化(g)， f 是振盪頻率， A 是晶體表面積(cm^2)，以一個以一萬五千赫茲(15kHz) 振盪頻率壓電晶體感測器而言，約有每

2500 Hz / μg 之解析度，因此其偵測極限可低到 10^{-12} 克，壓電晶體感測器剖面圖如圖 11。

具有壓電性質之材料除石英(quartz)電石(tourmaline)與羅雪鹽(Rochelle salt)外其他陶瓷材料如(barium titanate)與 lead zirconium titanates 與一些有機高分子如 poly(vinylidene fluoride, PVDF)等皆有壓電性質，最常作為生物感測器壓電轉換元件材料為石英，因此類壓電晶體感測器通稱為石英晶體微天平(quartz crystal microbalance, QCM)。石英晶體微天平作為生物感測器電轉換元件的主要優點在高靈敏性與結構簡單，而其選擇性主要仰賴生物辨識元件與好的固定技術。最早期石英晶體微天平用於真空鍍膜中薄膜重量測量，並有商用化膜厚監測系統生產。近幾年來，將 QCM 應用於解決液相中之電化學問題，即電化學石英晶體微天平(electrochemical QCM, EQCM)也有所突破，EQCM 如圖 12，此法大多使用 10MHz AT 特殊切割型態之石英，可偵測每平方公分 4ng/Hz 之敏感度。另外將石英晶體微天平應用於免疫感測器作為生化免疫探針之研究，也是此研究領域中的熱門主題。使用壓電晶體轉換元件之生物感測器如表 5。

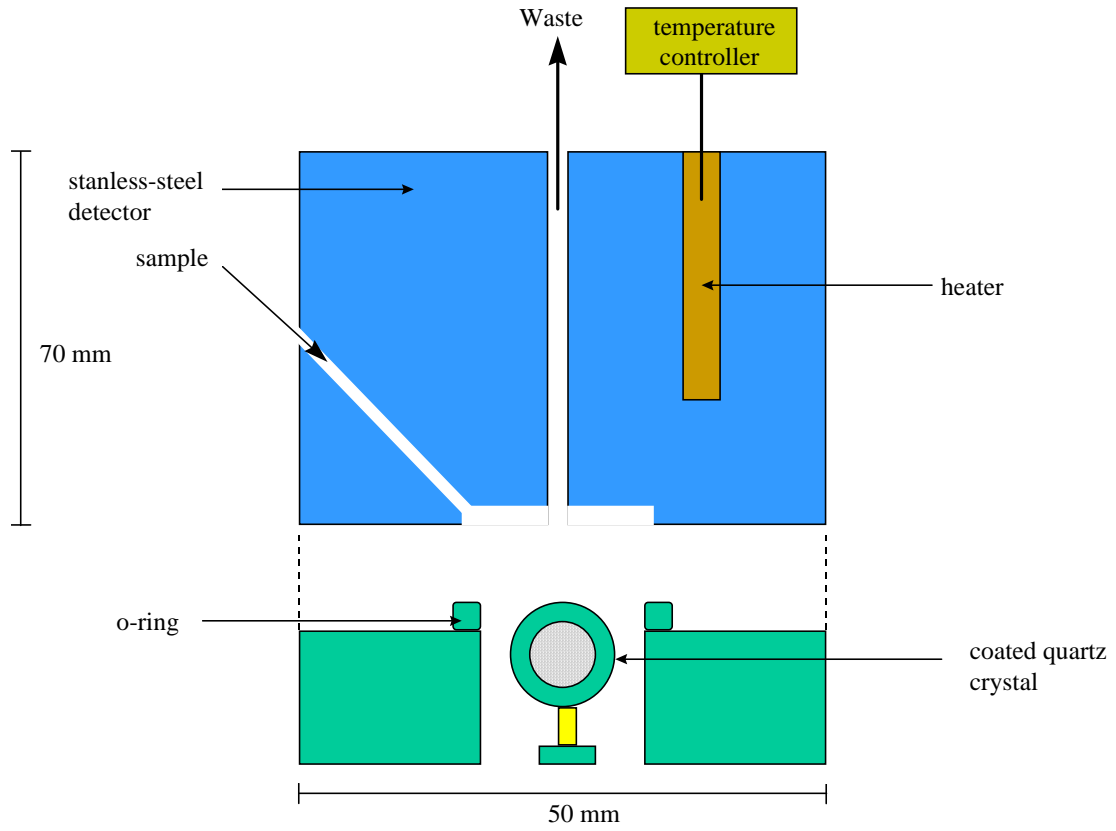


圖 11 壓電晶體感測器剖面圖

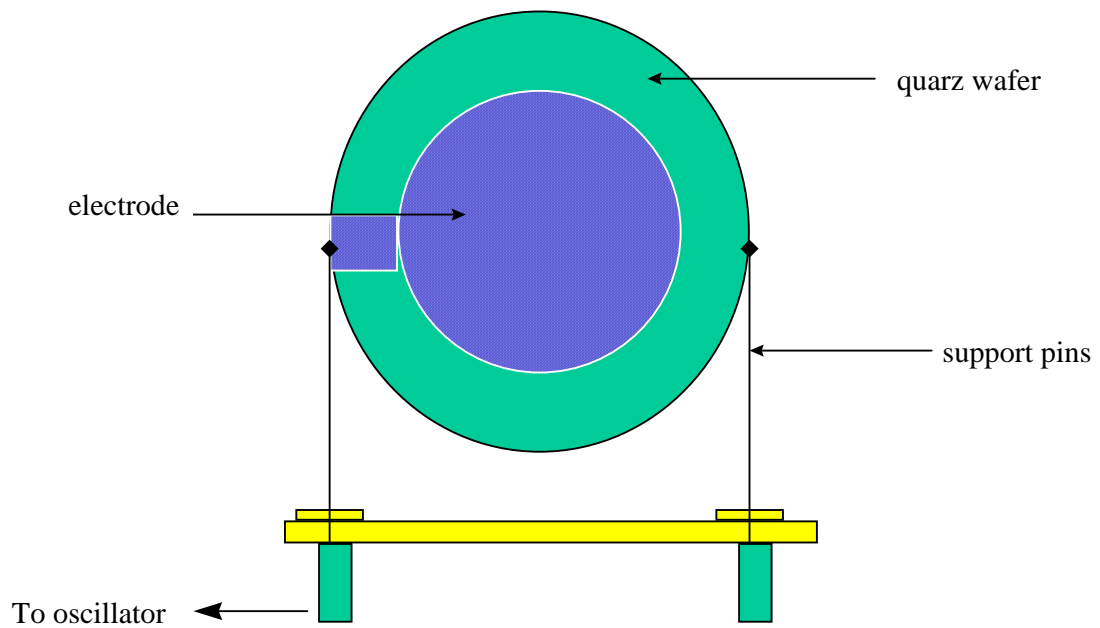


圖 12 電化學石英晶體微天平

表 5 使用壓電晶體轉換元件之生物感測器

分析物	轉換元件(振盪頻率)	備注
血清白蛋白	QCM (6 MHz)	單株抗體
腸菌屬(<i>Enterobacteriaceae</i>)	QCM	單株抗體
殺草劑(atrazine)	QCM (10 MHz)	多價抗體
人類免疫球蛋白(Ig G)	QCM (9 MHz)	多價抗體
沙門桿菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	QCM (14 MHz)	多價抗體
<i>Proteus vulgaris</i>	QCM (9 MHz)	單株抗體
甲醛氣體	QCM (9 MHz)	甲醛去氫酵素
有機磷農藥	QCM	乙醯膽鹼酯酵素

(五)Surface plasmon resonance 轉換元件

嚴格來說，Surface plasmon resonance(SPR)所使用的方法應屬於光學轉換元件範疇，但是由於此法是近十年來，使用無標示免疫分析方法中，最成功的例子，因此特在此另外加以介紹。

SPR 是一種物理現象，發生在極薄(60 nm)之金屬或半導體固體

上，如圖 13。

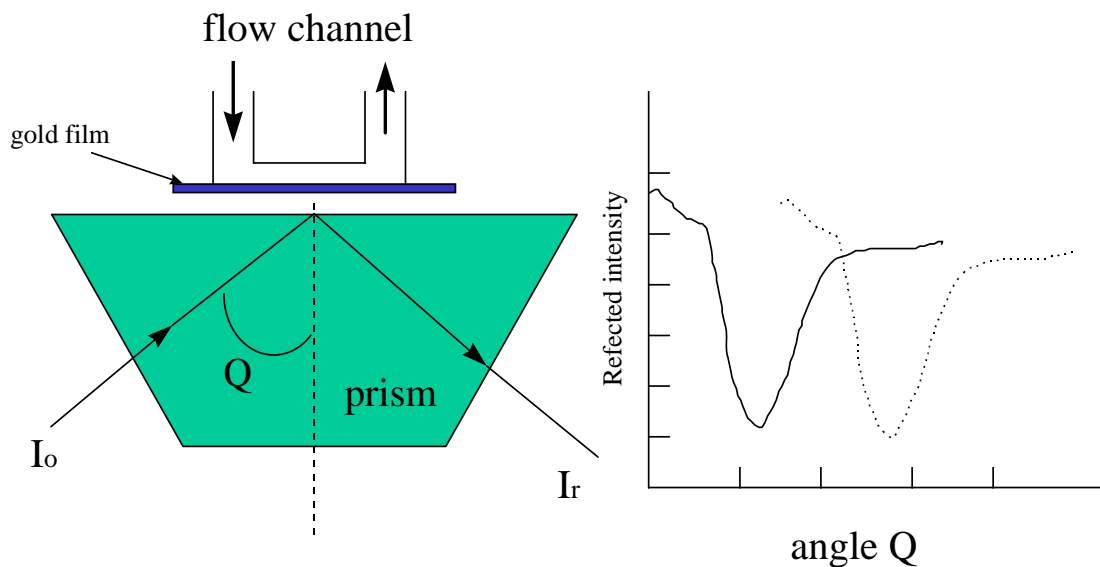


圖 13 Surface plasmon resonance 與反射角度(Q)變化簡圖

當入射光透過菱鏡(prism)接觸金屬固體上時因入射光產生消散波 (evanescent wave)，此波在金屬背面造成之反射角度(Q)增加稱為 surface plasmon resonance 現象，此 resonance 角度隨金屬背面薄膜之結構成份而改變，因此瑞典 Pharmacia 公司便依此原理發展出 BIAcore 儀器，可以即時(real time)分析具親合性之反應，尤其對抗體性質結構，動力學分析上有許多優點，加上無需使用標示之緣故，使用上更方便。BIAcore 儀器唯一之缺點是儀器非常昂貴，且使用之黃金 chip 也不便宜，目前已經有較便宜之儀器推出，使用 Surface plasmon resonance 分析之文獻越來越多，此方法被認為是使用新分析技術並商業化成功最佳之例子。

五、 生物感測器之優缺點與特性

(一)優點

生物感測器與傳統分析方法比較有以下之優點：

- (1) 因使用具特異性之生物辨識元件，可減少甚至避免其他非分析物之干擾，可減少樣品分離淨化等前處理步驟。
- (2) 使用固定化技術，可重複使用高價之生物辨識元件，將分析成本大幅降低
- (3) 操作簡易減少人為誤差
- (4) 分析需要之時間短，適用於大量樣品分析
- (5) 敏感度高
- (6) 測量結果以電子訊號顯示，結果易處理且適用於自動化操作

(二)缺點

生物感測器之缺點主要是生物辨識元件安定性較差，易受分析環境之限制，無法使用於嚴刻環境之樣品分析例如在高溫、強酸、強鹼或高滲透壓下，生物辨識元件無法發揮正常功能，此外物感測器校正與測試尤其是植入式體內(in vivo)生物感測器，雖然有四五個美國英國公司已進入小規模人體試驗階段，但以皮下植入式三天與血管植入式一週之穩定性，與生體與感測器之相容性及感測器再校正等，仍然有

許多問題待解決。基本上生物感測器與傳統分析方法各有特色，可以互補其短，應視實際需求與分析特性加以選擇，使用化學方法製作具有生物辨識能力之化學分子如分子嵌印高分子、冠狀醚、導電高分子等與轉換元件所組成化學感測器或許可以稍補生物感測器之缺點。

(三)生物感測器之特性

生物感測器之特性如圖 14 即包含上述優點與使用生物辨識元件之高選擇性、快速、便宜方便、小體積、不需前處理、連續分析與電子訊號顯示等特性之生物感測器。

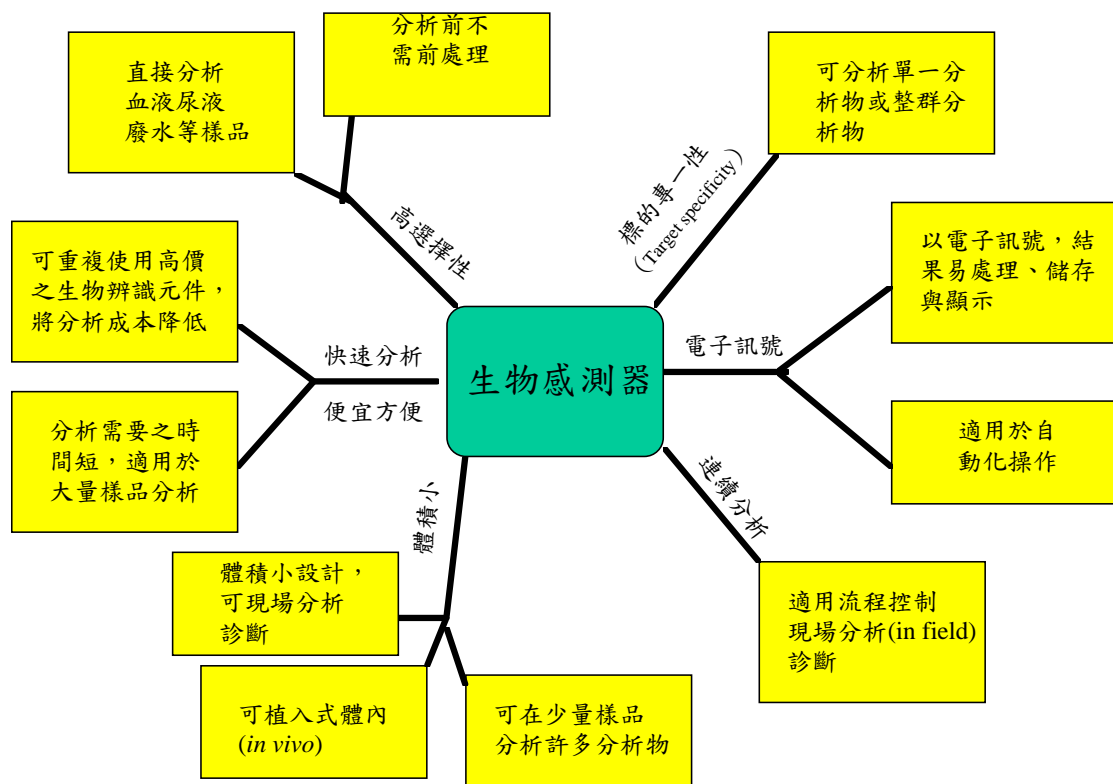


圖 14 生物感測器之特性

六、生物感測器發展之歷史、現況與未來展望

(一)發展歷史

生物感測器之發展始自 1962 年 Clark 與 Lyons 二人將溶氧電極與酵素結合，提出所謂酵素電極之觀念，隨後 1967 年 Updike 與 Hicks 正式將葡萄糖氧化酵素固定於薄膜上與溶氧電極製成葡萄糖生物感測器如圖 15。

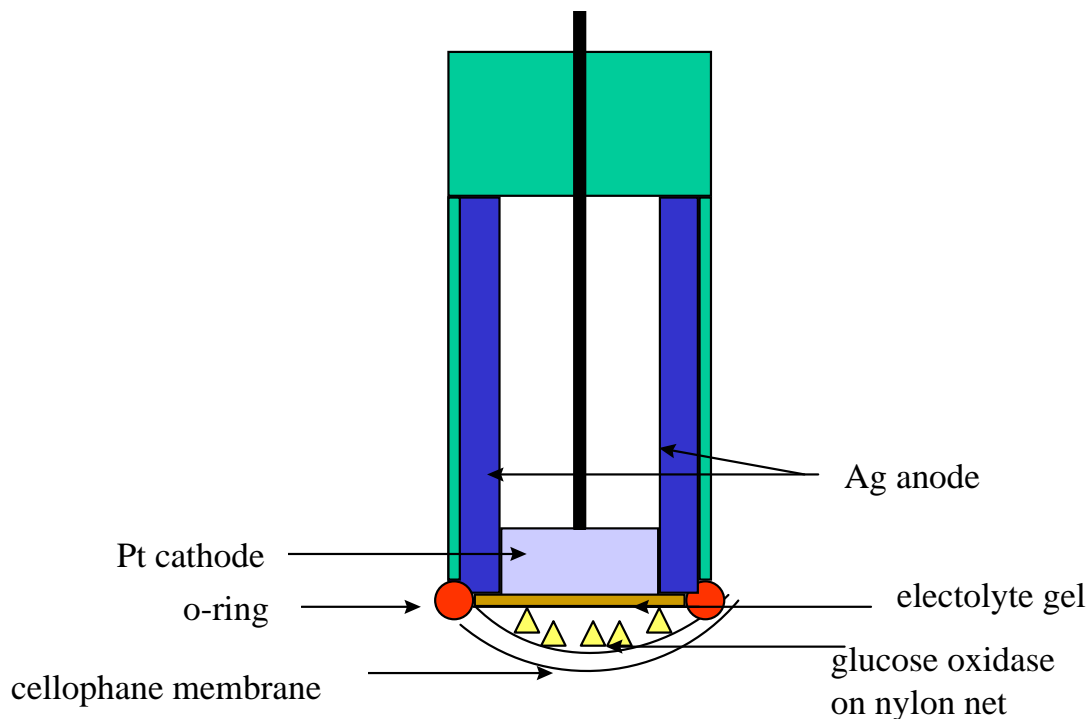


圖 15 第一個生物感測器—使用 Clark 溶氧電極之葡萄糖酵素電極

自從第一個生物感測器發表後，生物感測器研究開始蓬勃發展，

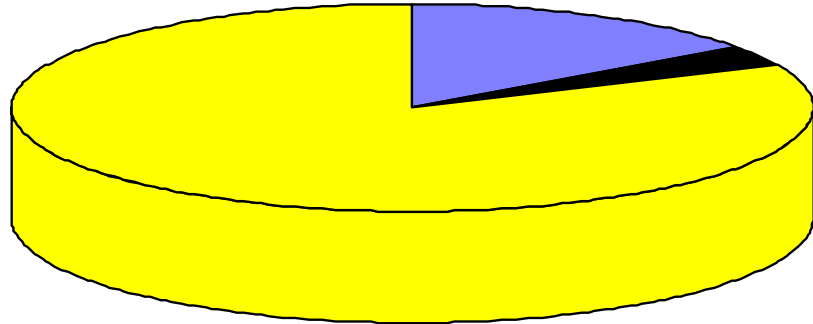
當時即有人樂觀表示生物感測器將可以在醫藥檢驗上大放異彩，許多傳統醫檢分析將被大量取代，簡言之生物感測器當時被視為明日之星，前(錢)途無量，可是事實卻非如此，由於對生物辨識元特性之掌握不易，初期加上學術研究之生物感測器與商業化成功必須具備之簡單、自動化，與長有效性(long shelf-life)差異頗大，簡單說即商業化必須讓消費者只做極少之步驟，最好像傻瓜相機般，只要按下按鈕，其他都不必擔心，只需讀出結果或等結果印出即可，像在實驗室所做之樣品稀釋，轉移，校正，計算等工作，在商業化生物感測器而言都是致命傷，因此在 1967 年製成葡萄糖生物感測器後，大量酵素電極分析葡萄糖、尿素、乳酸、甲醇、乙醇與乳糖等生物感測器研究，如雨後春筍般分分出爐，但所使用之轉換元件仍然以電化學轉換元件，如電流計量、電壓計量與熱轉換元件為主。一直到 1970s 年早期商業化血糖生物感測器開始進入醫藥檢驗市場，以美國 Yellow Springs Instrument Co.之酵素電極，此儀器主要使用與第一個生物感測器相似，但將葡萄糖酵素電極放於流動注入分析(FIA)儀器上，只需將樣品放於樣品瓶中即可自動分析，此種生物感測器適用於醫院檢驗室需要分析大量樣品之用，雖然該儀器並未銷售極多數量(每部約八千美元，太昂貴了)，但從商業化角度而言算是相當成功，帶動了生物感測器研發之熱潮。上述使用氧化酵素(oxidase)之生物感測器都有因為

使用氧氣為電子傳遞物質，不但易受樣品含氧量之影響，反應產生之過氧化氫對許多酵素有害，會使酵素失去活性使生物感測器減低敏感性，以葡萄糖氧化酵素之血糖生物感測器為例，在分析剛開始進行時，並未觀察出任何葡萄糖氧化酵素失去活性之變化，以為葡萄糖氧化酵素非常安定，過氧化氫對葡萄糖氧化酵素並無顯著影響，可是如果連續以過氧化氫樣品以此生物感測器加以分析時，葡萄糖氧化酵素活性即快速下降，這種現象可歸因於過氧化氫之強氧化能力與自由基 (free radicals) 形成有關，最簡單解決方法是將葡萄糖氧化酵素與 catalase 共固定 (co-immobilization)，catalase 可將有害之過氧化氫催化成水與氧，如果再加上使用 superoxide dismutase 時連自由基形成之問題也全部解決。然而使用此類酵素電極最大的問題還是分析時血中維生素 C、尿酸之干擾，最好的解決方法使用人造電子傳遞介質取代氧，Cass 等人在 1984 年發現 ferrocene 衍生物是葡萄糖氧化酵素取代氧之最佳人造電子傳遞介質，前述介紹之筆型血糖計即使用之人造電子傳遞介質之生物感測器，此成功例證更加快生物感測器之研發，許多生物辨識元件如抗體、核酸、受體與更新之轉換元件如 IsFET、光纖、壓電晶體等，生物感測器之發展真正再度被肯定，以往許多商業化過程中技術問題才漸漸被克服。

(二)現況

生物感測器在 30 年來不斷之研究發展下，現在已經有許多進展，除了每年數以百計之新研究報告文獻外，也有討論生物感測器之專門期刊”Biosensors & Bioelectronics”出版，有關生物感測器之書籍更是越來越多，生物感測器之應用也由原來之醫藥檢驗擴大到食品飲料等工業與環境監測保護上，根據統計物感測器在 1996 年有 3 億 6 千萬美元之市場，估計到 2000 年可成長到 7 億美元，在各別領域上，1996 年以醫藥檢驗為主，佔七成以上之市場，其中食品飲料等工業約佔 20%，環境監測保護上則少於百分之 5，這幾年環境保護越來越受重視，環境監測上生物感測器之應用越來越多，估計估計到 2000 年環境監測保護會超過食品飲料之應用，生物感測器之應用領域比率如圖

1996
Total market \$ 360 million



- 醫藥檢驗
- 食品飲料
- 環境監測
- 其他

2000
Total Market \$ 700 million

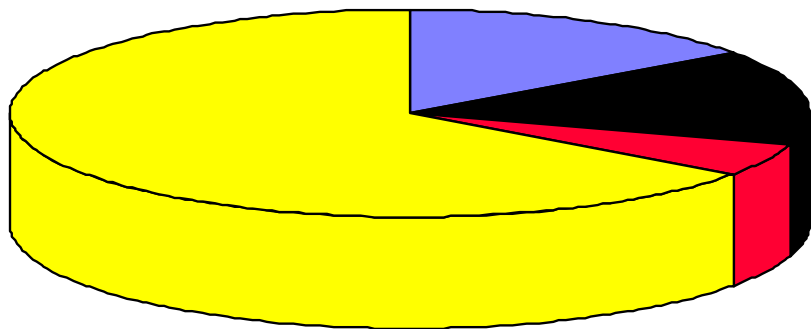


圖 16 生物感測器之應用領域

就地區而言，商業化生物感測器以美國、歐洲與日本為主所佔比例以美國最高，歐洲次之，日本居末，台灣目前只有少數一兩家公司生產商業化生物感測器，國內生物技術發展中心曾輔導廠商進行商業化生物感測器發展，但並無著名新商業化產品發表，國內生物感測器發展

在近幾年內，許多學術界與工業界生物感測器研究人力回國後，才開始萌芽，學術研究剛剛漸入佳境，商業化生物感測器發展仍然落後美國、歐洲與日本許多，需要政府輔導與工業界參與。主要成功商業化之生物感測器與應用如表 6，產品項目醫藥檢驗為主，其他如食品飲料、環境監測保護、生物技術、製藥等，台灣只有一家公司，其他公司產品因正研發中，或屬於財團法人需技術轉移後才能上市販售，故未列入。

(三)未來展望

生物感測器到目前為止，雖然已在臨床醫藥檢驗、食品飲料與環境監測有許多應用，但是仍然有許多地方需要再加強，如增加生物感測器之穩定性，減少前處理等，以應用而言，因應未來老人人口增加所需之居家健診生物感測器如日本東京大學 Karube 教授所提出之健診化妝室感測器(health-checking toilet sensor)，利用光纖網路將在化妝室感測之基本資料送到醫院處理，提早預防疾病產生，與多功能、更微型化之生物感測器也是未來該努力之方向，尤其發展植入式體內(*in vivo*)生物感測器，降低或改善生物感測器校正與測試之缺點，更是將來最重大之突破，生物感測器是典型多領域科學整合之研究，需要化學、生物、生化、電機、資訊、材料等各種專家合力發展之研究，

此外產業界、政府之投入也是成功之關鍵，希望臺灣之生物感測器研究發展，能夠在產學界與政府之大力支持下有傑出之表現。

表 6 主要成功商業化之生物感測器與應用

公司	儀器	分析物	原理	應用領域
Genetic International UK	ExacTech	血糖	可棄式介質 酵素電極	醫藥檢驗
Prufgeratewerk medingen GmbH Freital, Germany	ESAT 6660-2	葡萄糖 乳酸	酵素電極	醫藥檢驗
Metertech Inc., 南港台北	Model 5000	葡萄糖	葡萄糖 strip	醫藥檢驗
Yellow Springs Instrument Co., USA	2700 Select	葡萄糖 乳酸、乳糖 乙醇、甲醇	酵素電極	生物技術 製藥食品
	2300 Stat	葡萄糖、乳酸		醫藥檢驗
	1500 G	葡萄糖		醫藥檢驗
TOA Electronics Ltd. Tokyo, Japan	FGA-1	葡萄糖	酵素電極與	生物技術
	Glu-11	葡萄糖	酵素電極	醫藥檢驗
Kalger GmbH Neuberg, Germany	Microzym-L	乳酸	酵素電極	生物技術 食品
Electrolux Fermentation Getinge AB,	Electrolux	葡萄糖	酵素反應器與 FIA	生物技術

Getinge, Sweden					
Sigma, Russia	EXAN	葡萄糖	酵素電極		
Dosivit, Nantes, France	MC2 Multisensor	葡萄糖 蔗糖、乳酸 乳糖、乙醇	電化學感測器	農業食品	
La Roche, Switzerland	LA 640	乳酸	酵素電極		
Aucoteam GmbH Berlin, Germany	BODyPoint	生化需氧量 (BOD)	微生物電極	環境監測	
Central Kagaku Corp., Tokyo Japan	BOD-2000	生化需氧量	微生物電極	環境監測	
Kelma, Niel, Belgium	RODToX	生化需氧量 與毒素	微生物反應器與 溶氧電極	環境監測	
Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden	BIAcore		SPR	生物分子 反應	

參考資料

1. Frieda Scheller & Florian Schubert
Biosensor , Elsevier , 1992.
 2. Biosensors : A New Realism , A comercial report
from Cranfield , Biotechnology , UK , 1991.
 3. A 、 E 、 G Cass , Biosensor , a practical Approach ,
, Oxford , University press , 1990.
 4. Brian Eggins, Biosensors an introduction, John Wiley & son
1996.
 5. Bo mattiasson, Biosensors, in Biotechnology vol 4 edited H.-J
Rehm, VCH, 1991
 6. Alvarez-Icaza, M and Bilitewski, U, Mass production of
biosensors, Anal. Chem. 1993, 65(11)525A-533A
-

