

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☐ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☐ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於一種農藥偵測方法及生物微感測器。

【先前技術】

為了增加產量及保持農作物的美觀，通常施用大量的農藥，其中有機磷農藥(organophosphorous compounds; OPCs)由於具有低生物累積性及高生物可分解性的優點，目前已取代有機氯農藥成為最普遍使用的農藥種類。有機磷農藥雖具有上述優點，但在大量使用的情況下，可能導致在土壤、作物、表面水及工業廢水中殘留，對人體健康與自然環境造成相當大的威脅。世界各國已對有機磷農藥的管制詳加注意，針對飲用水、食品及工業廢水中頒訂相當嚴格的管制標準。

一旦有機磷進入生物體內後，它會跟膽鹼酯酶(choline esterase; ChE)的活性位置形成不可逆的結合，進而抑制該酵素活性，延緩生物體內乙醯膽鹼(acetyl choline; ACh)的水解速率，干擾神經傳輸。根據農藥本身的毒性、劑量與接觸時間的差異，所導致的症狀包括：疲倦、噁心、想睡、視覺模糊，嚴重時甚至會死亡。

傳統上，農藥的分析主要採用化學方法(包括：HPLC、GC、GC-Mass、ICP-mass 等)。傳統的實驗室化學儀器分析方法雖可對環境樣本提供精確的檢測，但前處理及分析步驟極為冗長，加以儀器本身價格昂貴、體積龐大，且需要經過專業訓練的人員才能操作，導致檢測成本過高，基本上並不符合污染現地即時監測的要求。對即將上市的農產品而言，這些傳統的化學分析方法對於農藥的即時偵測與篩選並無法提供任何幫助。

有鑑於此，開發一個能夠快速篩檢污染物濃度，同時兼具可攜帶、操作簡便與廉價特性的微感測器(Micro-sensor)，成為當前檢測監測技術的研發重點。

生物感測器(biosensor)由於具有下列諸多的優點，可克服傳統分析方法的缺失，深具發展潛力：(1)經由固定化技術的應用，生物元件可重複使用，降低成本；(2)生物辨認元件專一性高，可避免非標的物干擾；(3)操作簡易；(4)靈敏度高，所需樣品量低；(5)應答快速，降低分析時間；(6)數位訊號輸出，達到微小化，易攜帶，可用於現場偵測。

由於訊號傳輸元件本身傳輸能力的差異，各生物感測器的可偵測範圍有所不同。傳統的電化學生物感測器的偵測極限只能達到 ppm 級，是所有訊號傳輸元件中最差的。然而電化學生物感測器由於操作簡便、設備成本與檢測成本低廉，同時針對有顏色及高濁度的樣品仍可做準確的偵測，因此仍是發展最早且最完善的，無論國內外均有相當多的研究結果提出。目前電化學生物微感測器之所以無法達到普遍使用的程度，主要的困難點包括：(1)操作時氧化電位過高，易同時氧化環境中的干擾物質，導致雜訊產生；(2)偵測時間相較其他形式的生物感測器為長；(3)偵測極限太高，無法針對低濃度的污染物做偵測，應用面過於狹窄。若能克服這些缺點，將可加速此類生物感測器商業化的速度，同時擴大其在環境污染偵測的應用面。

【發明內容】

有鑑於此，本發明之目的在於提供一種偵測農藥之方法，包括提供一樣本；使該樣本與至少一電極接觸；以及偵測產生的電流，其中該電極表面有酵素、金奈米顆粒及無機催化劑固

定其上。

本發明之另一目的在於提供一種生物微感測器，包括至少一電極，一溫度感應器，以及一數據處理顯示儀，其中該電極表面有酵素、金奈米顆粒及無機催化劑固定其上，用以檢測農藥。

本發明之另一目的進一步提供一種降低電流雜訊之方法，包括將金奈米顆粒及無機催化劑固定在一酵素固定的電極表面。

本發明在生物微感測器的開發上，除了需保有傳統生物感測器的優點之外，更要能克服環境因子干擾，保持生物辨認元件活性，縮短偵測時間，同時還要能降低偵測極限，才能擴大應用範圍。欲達到這些目標，整個微感測器開發需建立包括：電極製備、生物辨認元件固定、電流訊號放大、雜訊消除與訊號數位化、感測器微小化等平台技術。

在電極的製備方面，材質的選擇包括：玻璃、金、白金、鈦、石墨及碳黑，電極結構無論是平板電極、針狀電極(實心或鏤空)均可使用。電極表面處理可以酸、鹼、物理研磨或超音波處理，得到乾淨的電極表面。在生物辨認元件固定方面，可使用物理包埋或化學共價鍵結達到固定的目的，但在固定的過程中，需考量生物辨認元件流失與失活的問題。

此外，要縮短偵測時間，同時改善偵測極限，需藉由降低環境因子所產生的雜訊及放大輸出訊號加以達成。除了電子媒介物的使用之外，在固定的過程中採用導電聚合物(例如聚吡咯及丙二胺)進行生物辨認元件固定亦可適當降低偵測時所需的氧化電位值，避免環境樣本中的雜質同時被氧化，減低環境因子的干擾的程度。

另外，奈米材料的研究成果顯示物質一旦進入奈米規格，不論在強度、導電度與導熱能力等材料性質均會大幅提昇。在生物辨認元件的固定過程中使用奈米材料，將有助於感測器輸出訊號的放大，進而提升微感測器的檢測速度、準確性與靈敏度。

欲使使用者便於上手，同時可用於現場監測，除了儀器本身需輕薄短小之外，偵測的結果最好能直接顯示在感測器的面板上，此部分則有賴訊號數位化與感測器微小化來達成。

本發明嘗試將酵素生物感測器與奈米科技的概念結合，開發一種生物微感測器偵測水中之農藥，利用金奈米粒子所具有的高比表面積與高導電度之特殊性質並組合無機催化劑，用以降低氧化電位電子轉移，同時達到放大電流的輸出訊號與避免雜訊產生，提升本發明之生物微感測器的 S/N 值。因此，本發明之生物微感測器可降低生物感測器的偵測極限與環境中自然物質的干擾，同時縮短偵測時間，達到現地即時偵測的目的。

為讓本發明之上述目的、特徵和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

【實施方式】

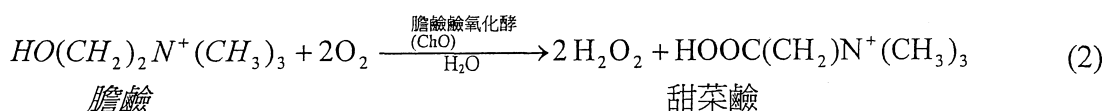
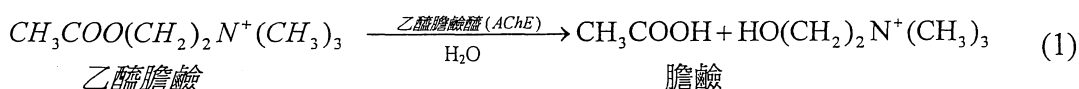
生物微感測器之構成

如第 1 圖所示，本發明之一具體實施態樣包括三個電極 101、103 及 105，分別為對電極、工作電極以及參考電極，各工作電極固定有酵素、金奈米顆粒以及普魯士藍($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$)，用以測量樣本中產生的電流訊號 S1，將所偵測的電流訊號輸出至一處理單元 120。

如第 1 圖所示，本發明之生物微感測器還包括一溫度感應器 110，用以偵測樣本溫度，並將偵測的溫度訊號 S2 輸入一處理單元 120。該處理單元 120 內依下列式(4)將偵測的電流訊號經過下述之溫度補償處理後轉成為一濃度數值，並輸入一顯示單元 122，在該顯示單元 122 上顯示樣本中所含之農藥濃度，即偵測出樣本中農藥含量。

電流輸出訊號偵測機制

本發明之生物微感測器的整個電化學偵測機制可分為三個步驟，首先利用乙醯膽鹼酯酶(AChE)(1000unit/mg solid; Sigma)對乙醯膽鹼(ACh)(99%, Sigam)行水解作用，所產生的膽鹼再藉由膽鹼氧化酵素(ChO)(100unit/mg solid, Sigma)作用，產生過氧化氫，最後再以外加電壓對過氧化氫進行氧化作用，使反應放出電子，如此藉由電位計可量測到酵素反應過程電流輸出訊號的變化。整個酵素反應與電流訊號偵測機制可以下列的方程式來加以表示：



由於有機磷與氨基甲酸鹽農藥均會與乙醯膽鹼酯酶上的活性位置相結合，造成酵素的活性抑制，進而降低上列式(1)、(2)及(3)的連續反應的反應速率，而使電流輸出訊號變小。

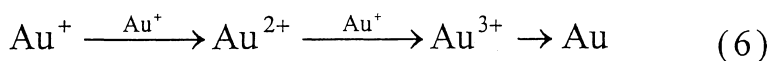
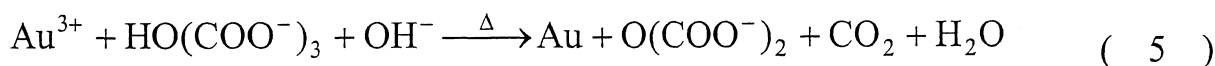
將電流輸出訊號與抑制劑(待測農藥)之濃度相對關係，定義如下式之電流抑制率(RI)，則可藉由電流輸出訊號，依式(4)確認分析水樣中有機磷的濃度。

$$RI(\%) = \frac{dI_t/dt - dI_1/dt}{dI_1/dt} \times 100\% \quad (4)$$

其中 dI_1/dt 為酵素未受抑制前之輸出電流變化速率(或靈敏度)； dI_t/dt 為酵素經過一定時間 t 抑制後之電流變化速率(或靈敏度)。

金奈米顆粒的生產方法

取 247.5ml 之去離子水煮沸後，加入 1% 的檸檬酸鈉溶液 15ml，煮沸 5 分鐘，加入 HAuCl_4 溶液 2.5ml，溶液逐漸由淡黃色轉變為灰色、深褐色後，持續 90°C 加熱攪拌 15 分鐘，將溶液置於室溫中冷卻，溶液相會還原出暗紅色的金奈米粒子，儲存於 4°C 冰箱。以檸檬酸鈉作為還原劑，其羧基(COO^-)會將三價金離子還原至一價金離子，同時生成二羧酸丙酮(acetone dicarboxylate)，再由一價金離子還原成金原子。整個反應式如下所示：



若欲製備不同粒徑大小之金奈米粒子，可藉由改變四氯金酸與檸檬酸鈉的比例來達成。調整檸檬酸鈉與四氯金酸的比例為 7、1.75、3.75 或 14，分別製備出平均粒徑為 25nm、36.3nm、16.5nm 或 19.4nm 之金奈米顆粒。

酵素固定方法

在酵素固定之前，電極表面分別以超音波震盪及濃硝酸清潔白金電極表面。以下分別以溶膠固定方法(sol-gel)及電聚合方法將酵素固定於白金電極表面。

(a) 溶膠固定方法(sol-gel immobilization)

取 10 μ L TEOS(tetraethyl orthosilicate ; Aldrich Chemicals), 200 μ L 去離子水、30 μ L 乙醇以及 1 μ L 0.1M 之 HCl 於塑膠小試管中，以超音波震盪一小時，在室溫放置 2-3 小時，溶膠(sol gel)溶液的 pH 值維持在 6。取 0.1mg 的 AChE 與 ChO 及金奈米粒子溶液 1 μ L(對照組則不添加)溶解於 100 μ L pH 值 7 的 PBS(phosphate buffer solution)溶液中。取 25 μ L 溶膠(sol gel)溶液加入前述之酵素溶液中，充分混合。取出 50 μ L，與白金電極一起置入另一小塑膠試管中，在 4 $^{\circ}$ C 風乾 24 小時，以 PBS 溶液充分洗淨再儲存於 4 $^{\circ}$ C 乾燥的環境。

(b) 電聚合固定方法(electropolymerization)-使用聚吡咯(polypyrrole)

利用循環伏安法(cyclic voltammerty; CV)在 0-1V 間，以 10mV/sec 的速度掃描，將酵素電聚合於白金電極表面。先於白金電極表面聚合上一層聚吡咯(polypyrrole)(如下式(7))，以避免酵素直接附著於電極表面。再以表 1 的條件進行酵素電聚合。在電極的保存方面，需先以去離子水沖洗後，在將其保存於 4 $^{\circ}$ C 的 0.1M PBS 中。

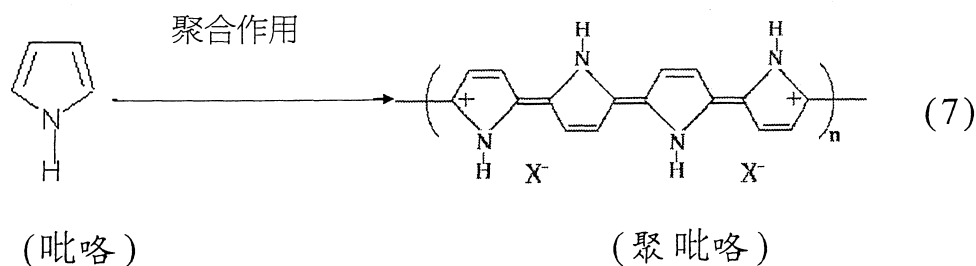


表 1 聚吡咯(polypyrrole)電聚合所採用之物質與條件

參數值	電聚合條件
電極材料	鉑(Pt)
掃描速度	10mV/sec
電解液條件	0.1M LiClO ₄
單體濃度	0.1 M 吡咯
酵素濃度	0.8g/L
膜厚：預備層 (Prelayer)	0 - 1.0V 兩次掃描週期 vs. Ag/AgCl
咯-酵素層	0 - 1.0V 兩次掃描週期 vs. Ag/AgCl: 膜 B
溫度	22°C

電位計電流輸出訊號初步測試

在實驗進行之初先以白金電極作為工作電極，經由外加電壓+700mV(亦即 H₂O₂ 之氧化電位)，測試電位計電流輸出訊號對 H₂O₂ 濃度變化的反應結果如第 2 圖所示。第 2 圖為系統之背景電流值變化，由圖可看出當測試樣本中未添加 H₂O₂ 時系統的背景電流值約在 300 秒之後達到穩定值 0。

第 3 圖為批次添加 2μM 的 H₂O₂ 溶液於測試瓶中，系統的電流訊號輸出變化圖。由第 3 圖可明顯看出隨著 H₂O₂ 溶液的添加，電流值呈批次下降，顯示電位計可對樣本中 H₂O₂ 的濃度作準確的偵測。

將每一區間 H₂O₂ 添加前後輸出電流值變化與 H₂O₂ 的濃度作圖結果如第 4 圖所示。由第 4 圖可看出本系統之電流輸出訊號與所添加的 H₂O₂ 的濃度成一正比關係，尤其在 H₂O₂ 濃度在 0.002~0.006M 之間時，因此可用於本實驗設計所產生的 H₂O₂

的偵測，進而經由酵素活性抑制，確認樣本中有機磷農藥的濃度。

有機磷農藥對懸浮態酵素活性之抑制情況

先添加 0.1 ml 500mM 的乙醯膽鹼(acetylcholine; ACh)於含 0.1M PBS 與 0.1M KCl 的測試瓶中，而後在測試電流變化期間添加乙醯膽鹼酯酶(acetylcholinesterase; AChE) 3.75 unit 與膽鹼氧化酵素(choline oxidase; CHO) 2 unit，同時外加電壓 + 700mV，再添加不同濃度(0, 0.47, 4.7, 47 及 470ppm)的巴拉松(paraoxon，屬於有機磷農藥之一種)，觀察電流輸出訊號的變化，結果如第 5A-5E 圖所示。由第 5A-5E 圖可明顯看出一直到巴拉松濃度提升至 470ppm 時，電流輸出訊號才有較明顯的變化，推測其可能原因為實驗中乙醯膽鹼酯酶(AChE)添加量太多，以致於加入抑制劑巴拉松後，殘餘的酵素活性仍然可使乙醯膽鹼(ACh)反應，故電位變化並沒有減弱的現象。

修改酵素作用基質與酵素的添加量，AChE、ChE 與 ChO 添加量各為 1mM、0.004 unit 及 0.2 unit，可將偵測極限下降至 4.7ppm (如第 6 圖所示)。依此結果進行在固定巴拉松濃度 4.7ppm 下，不同巴拉松抑制時間對電流輸出訊號(抑制率)影響之實驗，結果如第 7 圖所示。由第 7 圖可明顯看出，隨著抑制時間延長，酵素受巴拉松抑制的程度越高，因此電流輸出訊號的抑制率越大，亦即電流輸出訊號除了受抑制劑(巴拉松)濃度的影響之外，亦與抑制時間密切相關。

酵素固定後之活性表現

根據上述酵素固定方法，分別以溶膠(sol gel)固定法及電聚合法將酵素固定於電極表面上。結果發現以溶膠(sol gel)法固定酵素具有膠化縮合過程不易掌控，脫水乾燥時間過長，膠體易脆酵素易流失，屏蔽效應阻礙分子擴散與電子傳遞等缺點，導致酵素固定後，電流輸出訊號較未固定前小甚多，感測靈敏度亦隨之下降。如第 8 圖所示，以溶膠(sol gel)法將酵素固定於白金電極表面(第 8 圖(a))，相較於直接將酵素懸浮於樣本(第 8 圖(b)、(c))中，電極靈敏度下降約 4-10 倍。同時若將酵素以溶膠(sol gel)包埋後，直接置於水樣中，而不將其固定於電極表面(第 8 圖(d))，則由於質傳阻力的存在，導致靈敏度較酵素直接固定於電極表面者更差，幾乎沒有電流訊號發生。

而以電聚合法-聚吡咯(polypyrrole)將酵素固定於白金電極表面，不僅可藉由導電單體與酵素比例調控，達到膜狀固定(film immobilization)，避免因酵素固定層太厚，造成質量傳輸阻力，同時由於電聚合單體本身為可導電的物質，以電聚合固定後電極的靈敏度反而較懸浮態酵素為高，而酵素活性在固定的過程中雖有些許失活，但活性殘餘率仍高達 90%。第 9 圖乃不同吡咯(pyrrole)單體/酵素量值電聚合完成後電流輸出訊號之變化。由第 9 圖可看出當吡咯(pyrrole)單體/AChE 酵素量為 0.013mg/1000U 時(第 9 圖(d))，酵素固定完成後的電極電流輸出訊號約為懸浮態酵素(第 9 圖(a))之兩倍。這種情況發生主要是因為吡咯(pyrrole)本身即為導電性物質。以 PTC(propionylthiocholine)套組(CACTA service srl.)測定酵素固定後之活性，發現酵素活性殘餘率仍高達未固定前(懸浮態)之 89%。

雜訊排除與電流輸出訊號放大

生物微感測器的靈敏度若要提升，則訊號與雜訊的比值(S/N)必須增大。要達到這個目的，可從兩個方向著手，(1)避免環境樣本中其他物質在偵測過程中被氧化，降低雜訊；(2)放大電流訊號。在開發的過程中，將無機催化劑普魯士藍 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 連同 AChE 及 CHO 酵素一起固定於白金電極表面，藉由普魯士藍(PB)與普魯士白(PW)的自催化反應，可將原本氧化 H_2O_2 所需的外加電壓由 700mV 降低至 0 左右(如第 10 圖所示)。能夠降低應用電位是由於普魯士藍(PB)提供一個很好的催化角色，使 H_2O_2 原本需較高電位(700mV)之氧化反應轉換成低電位之還原反應，此還原反應的驅動者為普魯士藍(PB)之還原態普魯士白(PW)所扮演。

首先普魯士白(PW)電催化(electrocatalytic) H_2O_2 之還原，之後再藉由電極提供之還原應用電位(0mV)，促使普魯士藍(PB)再度還原成普魯士白(PW)，因此得到一還原電流訊號。如此可使電極偵測到之訊號為表面修飾之普魯士藍(PB)自我氧化還原改變而非溶液中發生之 H_2O_2 氧化還原反應，進而增進電極對 H_2O_2 靈敏度。

因此在此幾乎不外加電壓的情況下，原本在現地偵測過程中可能會同時被氧化的物質(如：腐植酸、抗壞血酸、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 等)不再被氧化，可大幅降低電流雜訊的產生。第 11 圖表示抗壞血酸在不同外加電壓下被氧化的情況。由第 11 圖可知，隨著外加電壓上升，因抗壞血酸氧化所產生的電流值越大，而當外加電壓趨近於 0 時，氧化電流便消失，換句話說，此電流雜訊將不會產生。

另一方面，利用化學合成之金奈米粒子優良的導電及巨大

的比表面積特性(如第 12 圖之電子掃描顯微照相所示)，將其連同酵素與無機催化劑以電聚合的方法一起固定於白金電極表面上，發現由於電子傳輸阻力大幅下降及催化能力大幅上升，電流輸出訊號相對提昇甚多，亦即感測器的靈敏度提升，使得感測器整體偵測極限可下降至 ppb 級。若考量偵測時間與偵測極限的關係，則可在兩者之間作一折衷，使其不僅偵測的靈敏度可達到要求，同時偵測時間亦可縮短。有一個特別值得注意的地方，如第 13A 圖，當酵素與金奈米粒子均為懸浮狀態時，金奈米粒子添加越多，電極的靈敏度亦越高。然而在固定的狀態下，如第 13B 圖，感測器的靈敏度會先隨著金奈米粒子的添加而升高，而後若金奈米粒子過量添加，電極的靈敏度會隨之下降，較佳為電聚合溶液中含 0.5-2.0ppm 金奈米顆粒，最佳添加量為 0.7ppm。這種現象主要在於懸浮狀態下，金奈米顆粒添加量相較於測試樣本的體積可視為少量，添加越多，導電性理應越好；而當酵素與金奈米粒子呈膜固定的狀態下，酵素、無機催化劑、電聚合單體與金奈米粒子的量存在一最佳的配比，當金奈米粒子添加過量，不僅粒子容易凝集分散不易，且因為排擠效應，導致固定層當中酵素與無機催化劑的含量過低，使得電流輸出訊號下降。第 13A 圖中另外可看出，若適當添加金奈米粒子量，則固定態的感測器靈敏度將遠高(約 5 倍)於懸浮狀態下的靈敏度(固定狀態曲線的波峰)。

本發明中另以不同的四氯金酸/檸檬酸鈉配比合成不同體積的金奈米顆粒，將其固定於電極表面上，結果發現當所添加的金奈米粒子直徑小於 20nm(約 16.5-20nm)時，電流訊號放大效應才會出現(如第 14 圖所示)。

酵素再活化

AChE 受到有機磷農藥抑制後，可以 2-PAM (pyridine-2-aldoxime methochloride) 將其活性加以恢復。其作用機制是與乙醯膽鹼酯酵素表面磷酸化的磷酸結合，使乙醯膽鹼酯酵素恢復活性。氮上的正電荷與麩胺酸 (glutamate acid) 間有庫倫吸引力，使得具有很強親核力的氧原子可攻擊與絲胺酸 (serine) 結合的磷原子，酵素活性因而恢復。本發明中以不同濃度之 2-PAM 作用於受有機磷農藥抑制後的電極，測量酵素活性的恢復率及電流輸出訊號變化，結果如第 15 圖所示。由第 15 圖可看出經過 0.126ppm 巴拉松溶液抑制過後的電極，可在 30 分鐘之內藉由 2-PAM 的作用將其恢復約 70% 的活性，經過抑制-恢復連續五次的測試發現酵素活性並沒有明顯下降，顯示以 2-PAM 作為酵素活性劑是適當的，而電極有極大重複使用的潛力。

環境干擾因子探討

針對環境中可能存在的干擾因子可能造成酵素失活，或存在易被氧化的物質造成電流雜訊產生。本發明針對溫度、pH、重金屬及有機溶劑對酵素活性的影響加以探討。第 16 圖表示在不同溫度下酵素活性的變化，橫座標代表測量溫度與 25°C 的差 (T-25)，縱座標以電流變化表示抑制率。由第 16 圖可看出當測量溫度在 10-40°C 之間 (橫座標數值 -15~15) 時，酵素活性隨著溫度上升而提高，顯示當感測器在現地使用時，溫度補償是必須的。本研究針對不同溫度下的酵素活性表現作探討，選定 25°C 為基準點，測量不同溫度下抑制率的變化情形，在 10-40°C 的範圍之間，發現不同溫度下酵素活性表現呈一線性關係 (如第 16 圖所示)。

第 17 圖顯示不同 pH 值下電流輸出訊號之變化情形。由第 17 圖可看出在 pH8-9 間電流輸出訊號有明顯上升的情況發生。之所以有這種情況乃是因為當 pH 過高時，R-膽鹼(R-Choline)會自動被化學水解，導致電流輸出訊號急速變大，造成誤判。由此可知本電極的適用範圍只在 pH 趨近於中性的情況下。

第 18 圖及第 19 圖分別表示有機溶劑及重金屬對酵素活性之影響。由第 18A-18C 圖可看出不論哪種有機溶劑對酵素活性均或多或少有抑制性。針對在目前的放流水標準下(黑色長條所示之濃度)，各有機溶劑對酵素的活性抑制率均高。較幸運的是丙酮(第 18C 圖)最常的使用濃度僅約 0.2%，而在此情況下丙酮幾乎對酵素無任何活性抑制，顯示丙酮是農藥萃取量測較適合的有機溶劑。在第 19A-19C 圖中則可看出各種重金屬對酵素活性均有影響，其中以銅離子(第 19C 圖)對酵素活性的抑制最為嚴重，當水樣本中銅離子濃度達 1%時，酵素活性僅剩約一半。至於鉛(第 19D 圖)、鐵(第 19B 圖)、及鉻(第 19A 圖)離子對酵素活性的影響則明顯較小，影響程度的順序為銅>鉻>鐵>鉛。當電極在實場運用時，水中所含重金屬的情況是必須加以注意的。

至於 SO_4^{2-} 對酵素活性之影響可由第 20 圖來表示。由第 20 圖可看出在現行放流水標準之下，硫酸根的存在對酵素幾乎沒有任何影響。

固定測量時間下電流抑制率與有機磷濃度的關係式與可應用範圍

傳統上，電化學生物感測器的偵測極限往往落於 ppm 等級。如此高的偵測極限導致此類生物感測器僅能用於高濃度的量測，對於現場污染物的監控無法提供任何幫助。藉由上述

諸多平台技術的建立，本研究所開發的生物為感測器偵測極限可在極短的偵測時間上延伸至 ppb 等級。如此低的偵測極限遠小於現行法規管制標準，因而可用於現地污染物監控之用。第 21 圖為偵測時間 10 分鐘 25°C 下有機磷濃度與電流抑制率之關係圖。由第 21 圖可發現電流抑制率起初隨著有機磷濃度增加而呈線性上升，但當有機磷農藥濃度超過 130ppb，電流抑制率增至 70%附近便不再改變。此現象暗示(1)有機磷農藥可抑制的酵素(或有機磷農藥可接觸到的酵素活性位置)僅佔全部固定酵素的 70%；其餘的 30%的固定酵素可能由於太深或立體方位的影響導致有機磷農藥無法靠近；(2)130ppb 的有機磷農藥便足以抑制所有可接觸的酵素活性位置，因而導致電流抑制率在高有機磷濃度下也不再升高。

將第 21 圖中的線性範圍(畫圈處)重新繪圖示於第 22 圖中。由第 22 圖可看出本發明之生物微感測器的有機磷農藥可測定的範圍為 10-130ppb。此可應用範圍可藉由增加酵素固定量來加以擴大。然而此時無機催化劑、金奈米顆粒、吡咯(pyrrole)單體與酵素的最佳配比需針對不同電極大小(表面積)再次加以確認。

電極表現之溫度補償

針對電極於不同溫度下的表現進行溫度補償測試。以 25°C 為基準點，配合第 22 圖中所得之電流抑制率與有機磷農藥關係，選定已知有機磷濃度的標準溶液進行測量，以測量結果進行兩階段之溫度補償。第一階段為單一濃度之溫度補償；第二階段則為全濃度範圍(0-100ppb)之溫度補償。測量的有機磷濃度包括：20, 40, 60, 80 及 100ppb；溫度範圍則涵蓋：10, 18, 25, 32

及 40°C，結果如表 2 所示。表 2 中 P1 為藉由圖二十五關係式換算所得之原始(未經溫度補償)測量結果；P2 為經過單一濃度溫度補償後所得之結果；P3 則為經過全濃度範圍溫度補償所得之結果。以實際測量結果為基準，將針對各有機磷濃度及全範圍有機磷農藥所得之溫度補償方程式歸納於表 3。由表 2 可看出(比較標準溶液濃度與 P2)，除了高濃度有機磷(100ppb)之外，藉由單一濃度溫度補償方程式修正後的結果，無論環境溫度如何，其 SD(標準差)均可小於 2%；若藉由單一全濃度範圍方程式來進行溫度補償(比較標準溶液濃度與 P3)，可看出當環境溫度越偏離 25°C，補償效果越差。當環境溫度介於 18-32°C 時，全有機磷濃度補償後之結果，其 SD<7%；當環境溫度低至 10°C 或高至 40°C 時，其 SD 有時會高達 15%。當進行真實樣品真測試，可藉由電流抑制率與濃度關係式及全範圍溫度補償方程式，得到樣品中有機磷的含量。若樣品溫度過高或過低，超出溫度補償範圍，建議應回溫後再行測量。

表 2 各有機磷(巴拉松)濃度不同溫度條件下電極測量之原始數據與溫度補償後之結果

°C	20ppb paraoxon			40ppb paraoxon			60ppb paraoxon			80ppb paraoxon			100ppb paraoxon		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
10	17.6	20.2	23.8	29.2	40.2	40.9	36.5	59.6	51.8	55.1	80.0	79.5	59.4	87.7	85.9
18	19.1	20.3	21.6	35.2	40.3	40.6	51.1	61.9	59.4	68.7	80.3	80.2	84.1	97.3	98.4
25	20.0	20.0	20.0	40.2	40.2	40.2	59.5	59.6	59.6	80.8	80.8	80.8	100	100	100
32	21.5	20.3	19.3	45.5	40.3	40.1	69.2	58.5	60.7	91.7	80.0	80.2	105	92.7	92.6
40	22.7	20.2	18.4	51.2	40.2	39.8	84.2	61.1	64.7	105	80.1	80.4	118	89.9	90.3

表 3 單一濃度與全濃度範圍之溫度補償方程式

修正方程式 濃度	測量值(P1)	溫度修正(P2)	溫度及濃度修正(P3)
20ppb	$P1=0.1703(T-25)+20.18$	$P2=P1-[0.1703(T-25)]$	$P3=P1-[Coeff.(T-25)]$ $Coeff.=0.0267P3-0.2927$
40 ppb	$P1=0.7338(T-25)+40.26$	$P2=P1-[0.7338(T-25)]$	$P3=P1+0.2927(T-25)/1+0.0267(T-25)$ (不含100ppm)
60 ppb	$P1=1.5369(T-25)+60.1$	$P2=P1-[1.5369(T-25)]$	$P3=P1-[Coeff.(T-25)]$ $Coeff.=0.0216P3-0.1039$
80ppb	$P1=1.6597(T-25)+80.26$	$P2=P1-[1.6597(T-25)]$	$P3=P1+0.1039(T-25)/1+0.0216(T-25)$ (含100ppm)
100ppb	$P1=1.871(T-25)+98.3$ $RC=0.947$	$P2=P1-[1.871(T-25)]$	

電流輸出訊號數位化

藉由一連串的實驗結果，建立固定測量時間下電流抑制率與有機磷濃度的關係式。將此相關式燒結於晶片上，建立訊號擷取系統之連結，完成訊號數位化，作為生物微感測器之數位訊號傳輸系統。基本上此數位訊號傳輸系統之開發，主要分為軟、硬體兩部分進行。硬體部分包括有：掌上型電位計、訊號傳輸線(RS232 排線)、訊號分析與計錄器(微處理器)等。而軟體主要是使用 LabVIEW (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench)套裝程式語言來控制硬體間的訊號擷取、傳輸、分析與計錄等工作。LabVIEW 是由 National Instrument 公司於 1986 年發展出的一種圖像式的程式語言，其主要用途是可以完全整合控制的通訊介面，例如 GPIB, VXI, PXI, RS232，以及支援資料呈現(data presentation),資料儲存(data storage),資料分析(data analysis)、資料擷取(data acquisition)、環境控制(serial instrument control)等功能。因為 LabVIEW 中模組化儀器 Express VIs 將使原型製作及測試混合訊號測設計及自動產生自動化測試程式碼；可確保 Real-Time Desktop PC 功能將在任何

PC-based 測試系統能最佳化系統穩定度及績效；快速 PDA 資料擷取效能及 DMM 支援,建立客製化之可攜式資料擷取系統；藍芽支援 - 運用無線藍芽科技與其他設備做溝通；50 全新數學函式功能 - 運用增大 LAPACK/BLAS 基礎函式庫，增加精準度及速度最高可達 200%；Hyper-Threading 科技來增加最高至 100%系統執行力。在偵測的過程中，除了可得到污染物的濃度之外，亦可針對偵測條件，包括：抑制時間、氧化電位、電流紀錄頻率作改變，可謂相當便利。

真實樣品偵測

為了確認本研究所開發的生物微感測器的實用性，針對市售蕃茄汁進行初步測試，結果如第 23 圖所示。在實驗過程中先行對蕃茄汁原液進行有機磷農藥之測量，而後在原液中 spike 30ppb 的巴拉松農藥，觀察感測器是否能對此做出準確的測量。在另一個實驗中，則先將蕃茄汁原液稀釋十倍，進行有機磷農藥測量，而後同樣地於此稀釋液中 spike 30ppb 的巴拉松農藥，觀察感測器的測量情況。實驗中整體農藥抑制時間為 10 分鐘。由第 23 圖可清楚看出，蕃茄汁原液的有機磷農藥濃度為 25.6ppb，當 spike 30ppb 巴拉松農藥後，測量值變為 54.9ppb，而在另一實驗中，稀釋十倍後，稀釋液中農藥濃度已低於可測量範圍，而後再 spike 30ppb 後，稀釋液中的有機磷農藥，又變成可測量其值為 39.6ppb。由此結果可知本研究所開發的生物微感測器可準確地測量果汁中有機磷農藥的殘留量，同時果汁中的干擾物質，舉凡：醣份、顏色、懸浮固體與抗氧化劑等，並不會對測量結果有任何的影響。顯示此系統可用於真實樣品之量測。

產業可利用性

本發明結合生物技術與奈米科技，開發以酵素反應為基礎之電化學生物微感測器，可針對現地水環境中之污染物作快速且靈敏的偵測，相對於傳統實驗室的化學分析方法，不僅可達到省時省錢的目的，同時在使用的方便性上更大幅提昇。

以電聚合固定方法將酵素，連同無機催化劑與金奈米粒子一起固定於電極表面上，由於無機催化劑的存在，可降低偵測進行時所需施加的電壓值，因而大幅縮小環境樣本中其他物質被氧化所產生的雜訊。另外，藉由金奈米粒子的高比表面積與高導電性的特質，可放大酵素反應所產生的電流訊號，因此可大幅提升生物微感測器的靈敏度，同時改善偵測極限，縮短偵測時間。依實驗的結果建立電流輸出訊號及分析物濃度二者之間的關係，配合電流訊號輸出數位化系統的建立，所開發出流的生物微感測器將兼具靈敏、快速、準確、成本低廉與易上手的特點。

本發明生產之生物微感測器重量小於 1 公斤，可在 10 分鐘的偵測時間內，準確偵測水樣本中的農藥至 10ppb 以下，與傳統的生物感測器相比，本發明之生物感測器不但體積及重量較小，偵測極限下降兩個數量級，偵測時間縮短，且偵測成本僅需約 10 元，在污染偵測的應用面上將大幅提昇。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此項技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為本發明之生物微感測器之一具體實施態樣。

第 2 圖說明本發明之電極系統的背景電流(未添加 H_2O_2)之變化。

第 3 圖說明系統中批次添加 $2\mu\text{M}$ 的 H_2O_2 溶液的電流訊號輸出變化。

第 4 圖說明 H_2O_2 添加前後輸出電流值變化與 H_2O_2 濃度之變化。

第 5 圖說明直接添加酵素(未固定酵素)前，有機磷農藥對酵素活性之抑制情形。第 5A 圖為未固定酵素以及無農藥添加之空白試驗；第 5B 圖為未固定酵素前，添加巴拉松濃度 0.47ppm 之電流變化；第 5C 圖為未固定酵素前，添加巴拉松濃度 4.7ppm 之電流變化；第 5D 圖為未固定酵素前，添加巴拉松濃度 47ppm 之電流變化；以及第 5E 圖為未固定酵素前，添加巴拉松濃度 470ppm 之電流變化。

第 6 圖說明當乙醯膽鹼酯酶(AChE)、膽鹼酯酶(ChE)與膽鹼氧化酵素(ChO)添加量(酵素未固定)為 1mM 、 0.004 unit 及 0.2 unit 時，對於不同巴拉松濃度(47ppm 、 4.7ppm 、 0.47ppm)及作用時間靈敏度的變化。

第 7 圖顯示在固定巴拉松濃度(0.47ppm)下，懸浮酵素(未固定酵素)在不同抑制時間與電流抑制率的關係。

第 8 圖顯示以溶膠(sol gel)法將酵素固定於白金電極表面前後的電極靈敏度。欄(a)使用以溶膠(sol gel)法固定酵素的白金電極表面；欄(b)為使用酵素未固定、懸浮於樣本中的標準白金電極；欄(c)為使用酵素未固定、懸浮於樣本中的 1公分 白金電極；及欄(d)為使用以溶膠(sol gel)包埋酵素後，直接置於水中，

不將其固定於電極表面之電極。

第 9 圖顯示酵素經電聚合固定前後的電流輸出訊號之關係。欄(a)使用未固定酵素之電極；欄(b)使用固定吡咯(pyrrole)單體/酵素乙醯膽鹼酯酶(AChE)與過氧化酶(HRP)為 20 μ l/1000U 之電極；欄(c)使用固定吡咯(pyrrole)單體/酵素 AChE 與 ferrocene 為 20 μ l/1000U 之電極；欄(d)使用固定吡咯(pyrrole)單體/酵素 AChE 為 0.013mg/1000U 之電極；及欄(e)使用固定吡咯(pyrrole)單體/酵素 AChE 為 20 μ l/1000U 之電極。

第 10 圖顯示在無機催化劑(普魯士藍 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$)有無存在下的氧化電位下降效應；實線表示無 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ；虛線表示 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 存在。

第 11 圖顯示不同外加電壓下抗壞血酸的氧化電流值。

第 12 圖為本發明使用之金奈米顆粒之電子掃描顯微照片。

第 13A 圖顯示固定或未固定酵素與奈米金顆粒之電極與電極靈敏度的關係；正方形標記代表使用未固定酵素與奈米金顆粒之電極；三角形標記代表使用固定酵素與奈米金顆粒之電極。第 13B 圖顯示使用固定酵素與奈米金顆粒之電極時，奈米金顆粒添加濃度與電極靈敏度的關係。

第 14 圖顯示奈米金顆粒的體積與電極敏感度的關係。

第 15 圖說明本發明生物微感測器使用之酵素活性回復性。

第 16 圖說明本發明生物微感測器在不同偵測溫度下電極靈敏度的變化。

第 17 圖顯示本發明生物微感測器在不同 pH 值下偵測，電流輸出訊號之變化情形。

第 18A 圖顯示甲醇與本發明生物微感測器的酵素活性的關係；第 18B 圖顯示乙醇與本發明生物微感測器的酵素活性的關係。

係；第 18C 圖顯示丙酮與本發明生物微感測器的酵素活性的關係。

第 19A 圖顯示鉻離子與本發明生物微感測器的酵素活性的關係；第 19B 圖顯示鐵離子與本發明生物微感測器的酵素活性的關係；第 19C 圖顯示銅離子與本發明生物微感測器的酵素活性的關係；第 19D 圖顯示鉛離子與本發明生物微感測器的酵素活性的關係。

第 20 圖顯示硫酸根 SO_4^{2-} 與本發明生物微感測器的酵素活性的關係。

第 21 圖說明偵測時間 10 分鐘 25°C 下巴拉松濃度與本發明生物微感測器的電流抑制率之關係。

第 22 圖說明本發明之生物微感測器電流抑制率與巴拉松的線性範圍。

第 23 圖顯示本發明之生物微感測器偵測番茄汁原液及添加巴拉松農藥之番茄汁之數據及比較。欄(a)使用番茄汁原液；欄(b)使用添加 spike 30ppb 巴拉松農藥的番茄汁液；欄(c)使用稀釋 10 倍的番茄汁原液；及欄(d)使用稀釋 10 倍的添加 spike 30ppb 巴拉松農藥的番茄汁原液。

【主要元件符號說明】

101~電極

120~處理單元

103~電極

122~顯示單元

105~電極

S1~電流訊號

I301541

110~溫度感應器

S2~溫度訊號

五、中文發明摘要：

本發明提供一種偵測農藥的方法及生物微感測器，係利用表面固定酵素、金奈米顆粒及無機催化劑的電極偵測樣本的電流變化，並利用溫度補償調整所偵測的數據。

六、英文發明摘要：

A method for detecting pesticides and a bio-microsensor are provided by using an electrode immobilized with enzymes, gold nanoparticles and inorganic catalysts thereto to detect current alteration accompanied by temperature compensation.

農藥為有機磷或氨基甲酸鹽。

12.如申請專利範圍第 9 項所述之偵測農藥之方法，其中該電極與溫度感應器設置在一平板上。

13.一種生物微感測器，包括：

至少一電極，用以偵測電流訊號；

一處理單元，用以接收處理該電流訊號，且轉換該電流訊號成為一濃度數據；以及

一顯示單元，用以顯示該濃度數據；

其中該電極表面以酵素、金奈米顆粒以及無機催化劑固定。

14.如申請專利範圍第 13 項所述之生物微感測器，其中該酵素為乙醯膽鹼酯酶或膽鹼氧化酵素。

15.如申請專利範圍第 13 項所述之生物微感測器，其中該無機催化劑為普魯士藍($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$)。

16.如申請專利範圍第 13、14 或 15 項任一項所述之生物微感測器，其中該電極表面係以電聚合方法固定。

17.如申請專利範圍第 16 項所述之生物微感測器，其中該電聚合固定方法係在電極表面聚合一層聚吡咯(polypyrrole)，固定酵素、金奈米顆粒及無機催化劑於聚吡咯層上。

18.如申請專利範圍第 17 項所述之生物微感測器，其中該金奈米顆粒濃度為 0.5-2.0ppm。

19.如申請專利範圍第 13 項所述之生物微感測器，其中該金奈米顆粒粒徑為 16.5-20nm。

20.如申請專利範圍第 13 項所述之生物微感測器，其中該電極為白金電極。

21.如申請專利範圍第 13 項所述之生物微感測器，更包含一溫度感應器，用以偵測溫度並傳送至該處理單元。

22.如申請專利範圍第 21 項所述之生物微感測器，其中該電流訊號以該偵測溫度進行溫度補償處理。

23.如申請專利範圍第 13 項所述之生物微感測器，係用於偵測農藥。

24.如申請專利範圍第 23 項所述之生物微感測器，其中該農藥為有機磷或氨基甲酸鹽。

25.如申請專利範圍第 21 項所述之生物微感測器，其中該電極與溫度感應器同時在一平板上。

26.一種降低電流雜訊之方法，包括將金奈米顆粒及無機催化劑固定在一電極表面，其中該電極表面有酵素固定。

27.如申請專利範圍第 26 項之降低電流雜訊之方法，其中該無機催化劑為普魯士藍($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$)。

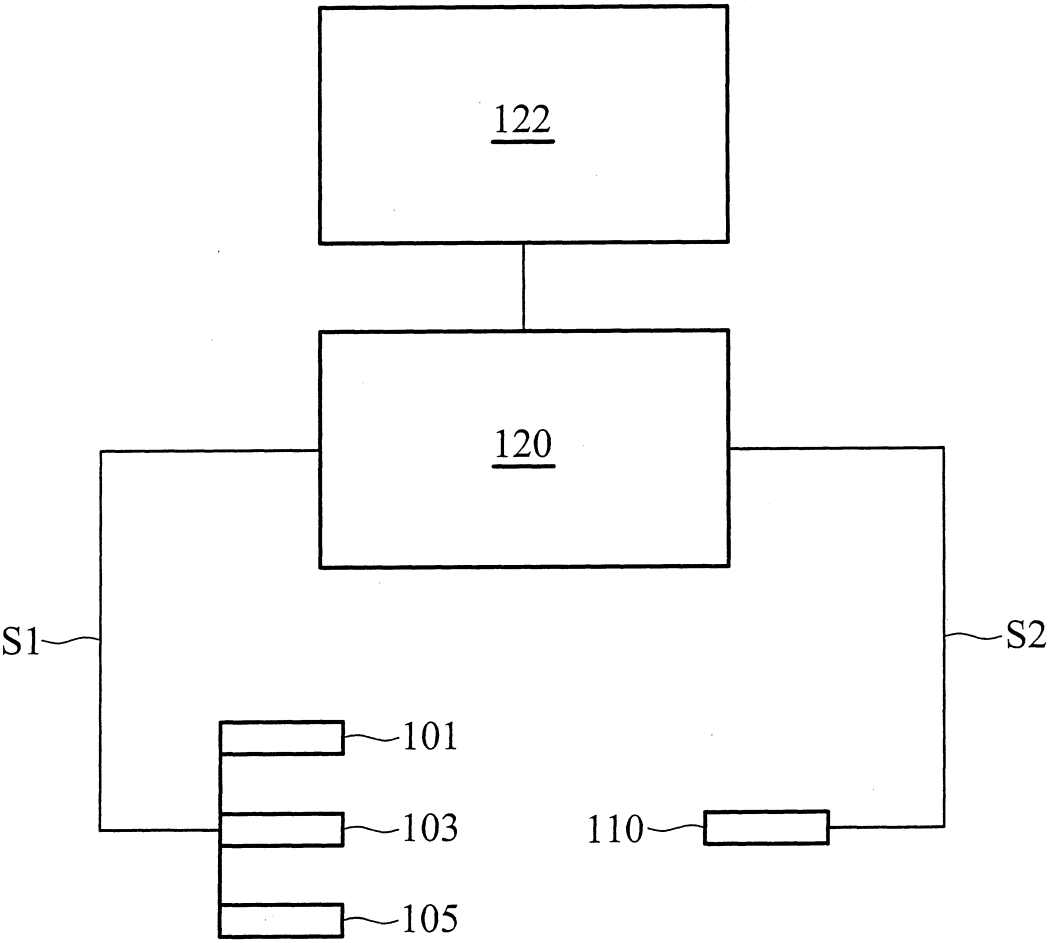
28.如申請專利範圍第 26 項之降低電流雜訊之方法，其中該金奈米顆粒粒徑為 16.5-20nm。

29.如申請專利範圍第 26 項所述之降低電流雜訊之方法，其中該金奈米顆粒濃度為 0.5-2.0ppm。

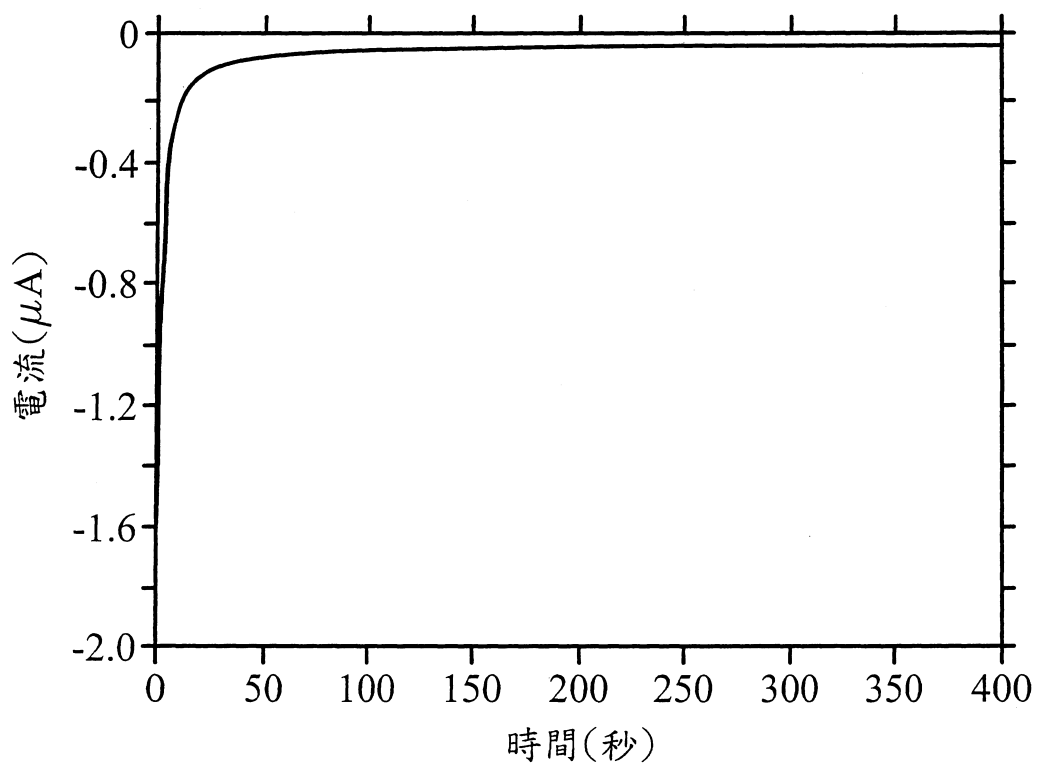
30.如申請專利範圍第 26 項之降低電流雜訊之方法，其中該電極表面係以電聚合方法固定金奈米顆粒及無機催化劑。

31.如申請專利範圍第 30 項所述之降低電流雜訊之方法，其中該電聚合固定方法係在電極表面聚合一層聚吡咯(polypyrrole)，使金奈米顆粒及無機催化劑固定於聚吡咯層上。

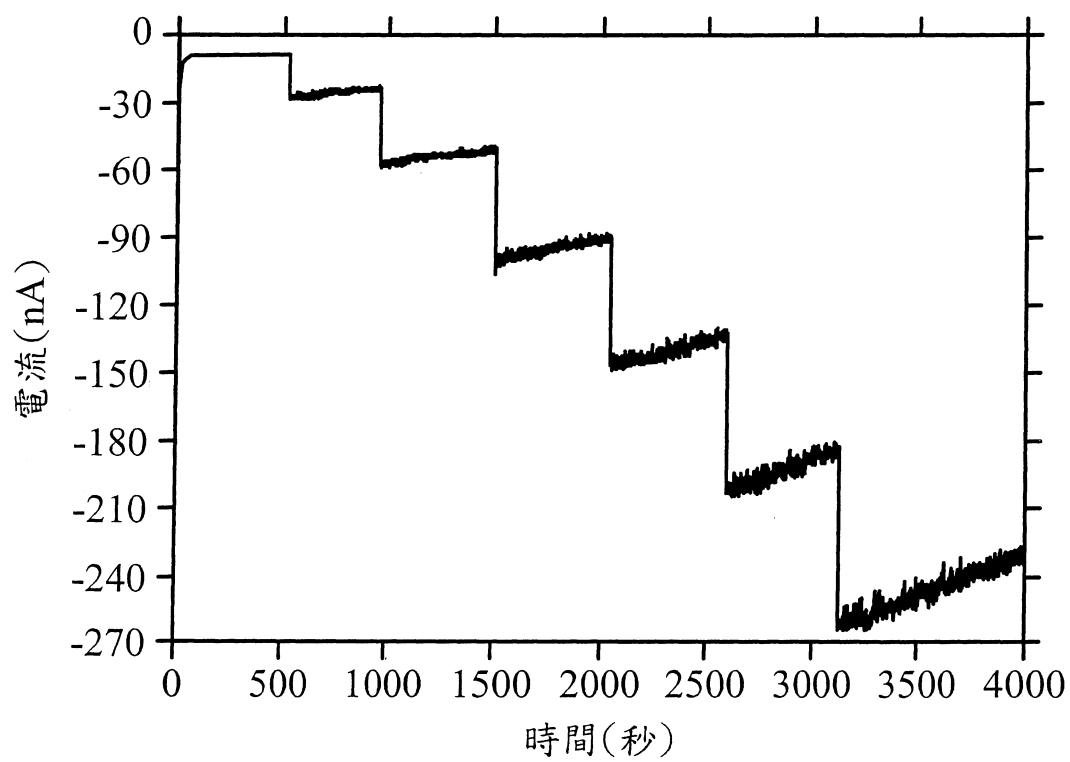
32.如申請專利範圍第 26 項所述之降低電流雜訊之方法，其中該酵素為乙醯膽鹼酯酶或膽鹼氧化酵素。



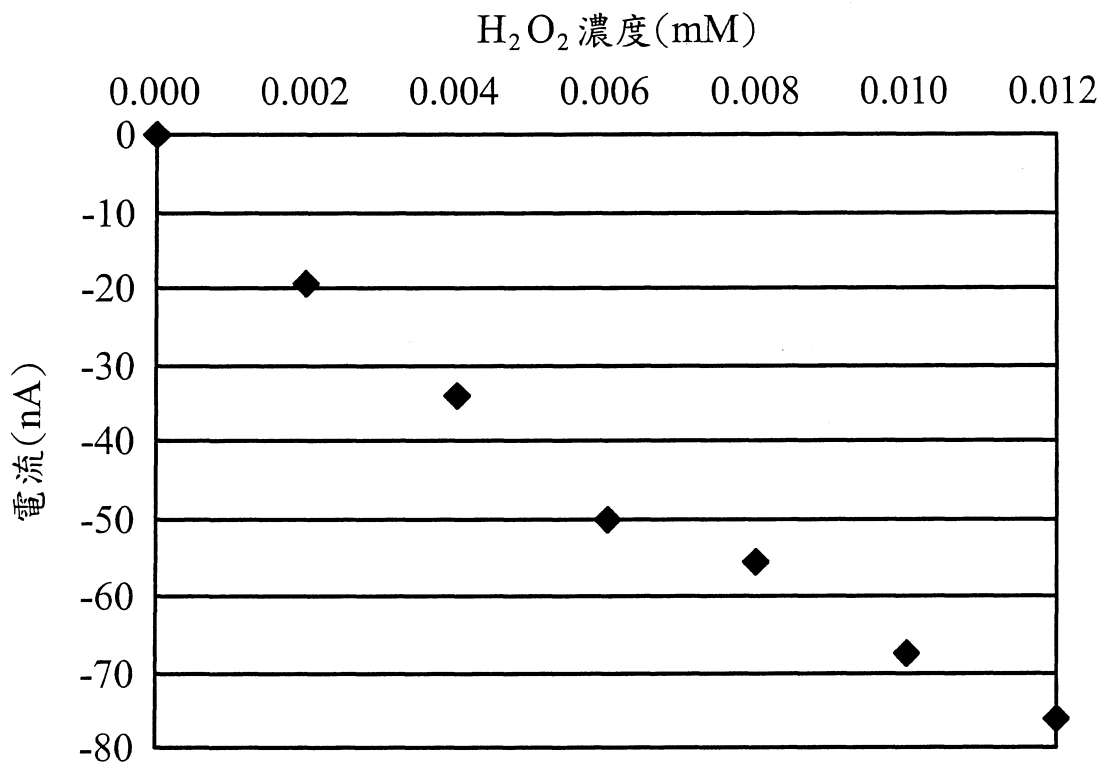
第 1 圖



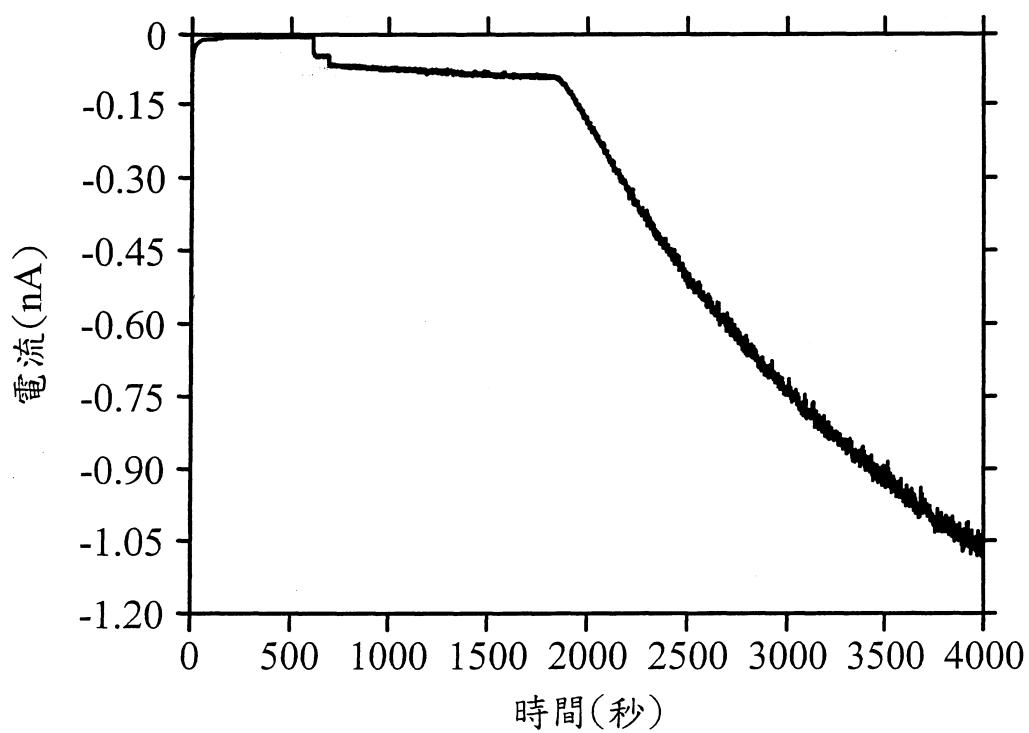
第 2 圖



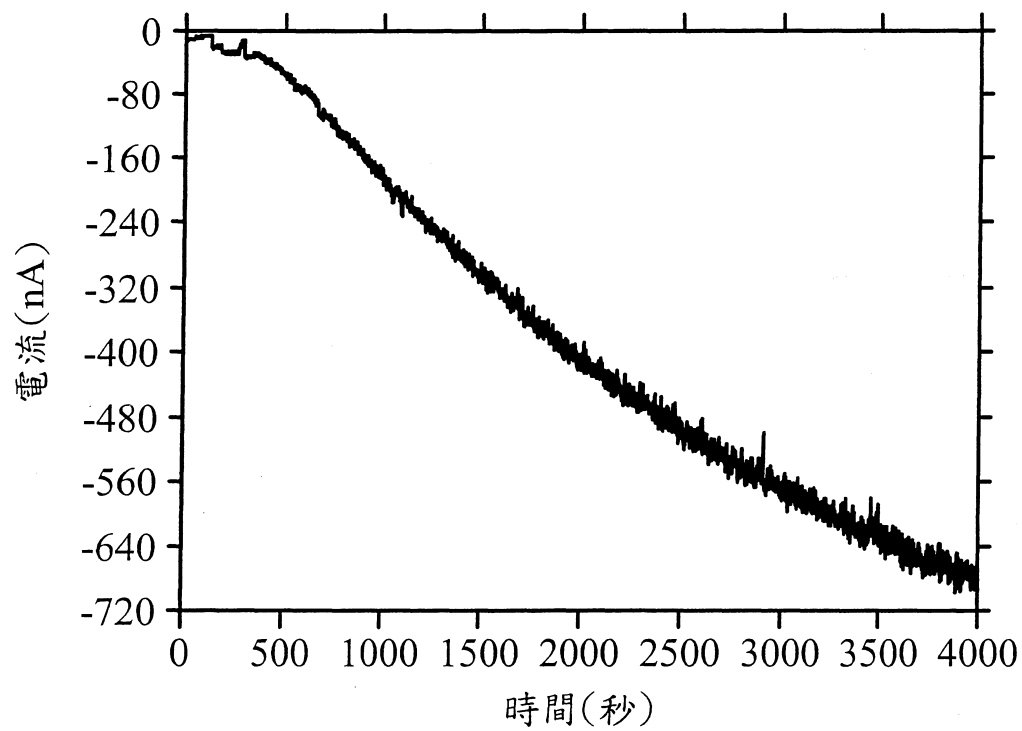
第 3 圖



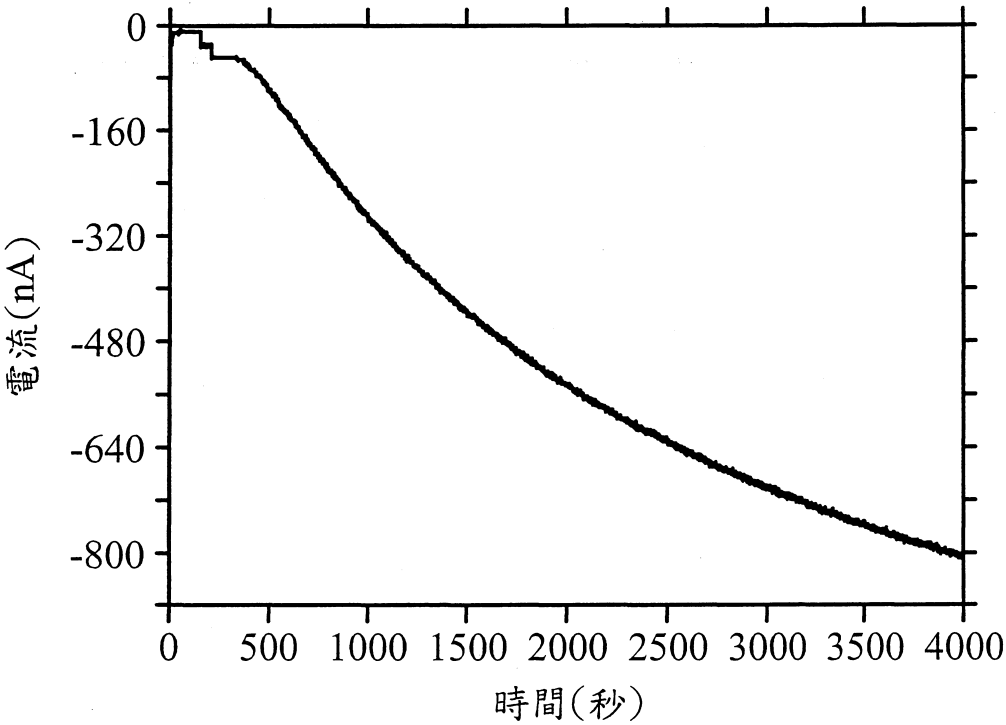
第 4 圖



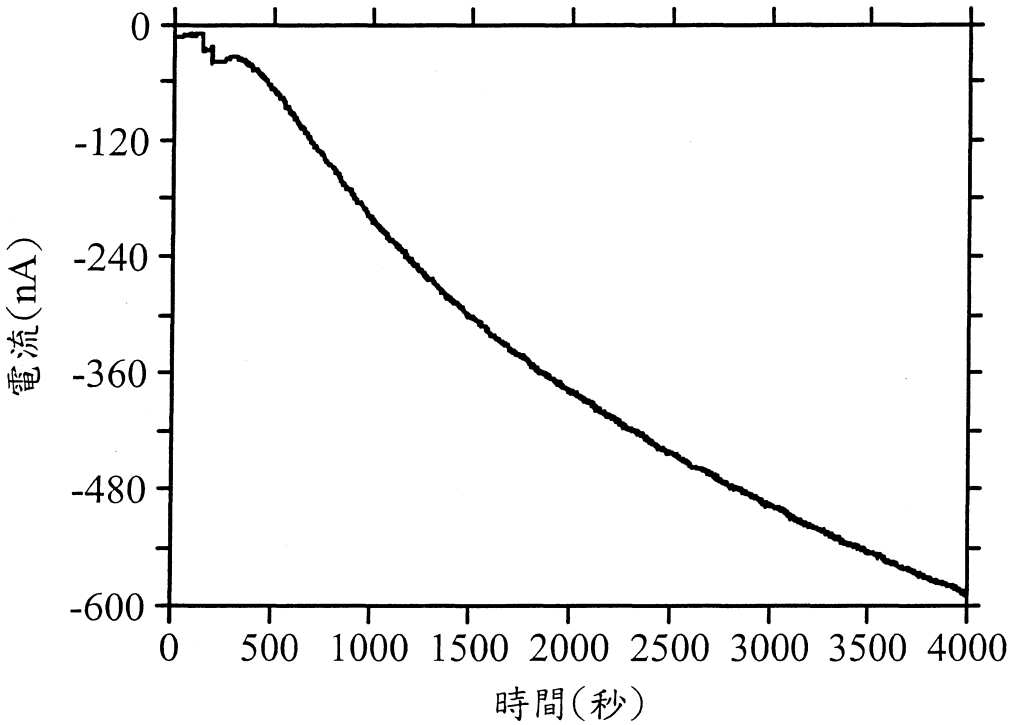
第 5A 圖



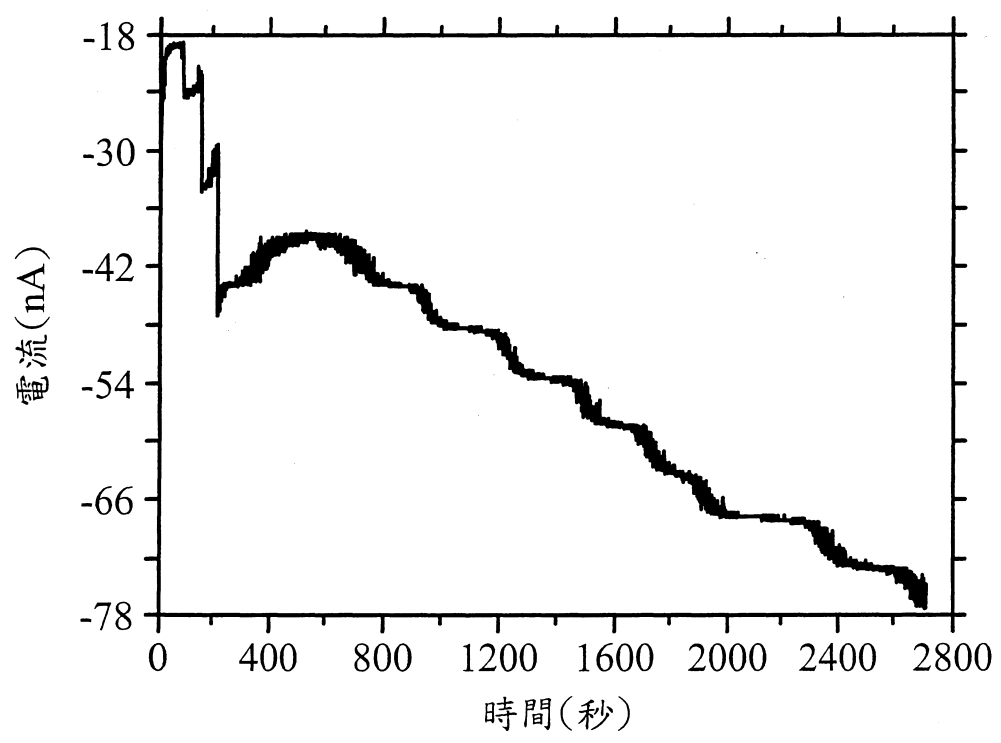
第 5B 圖



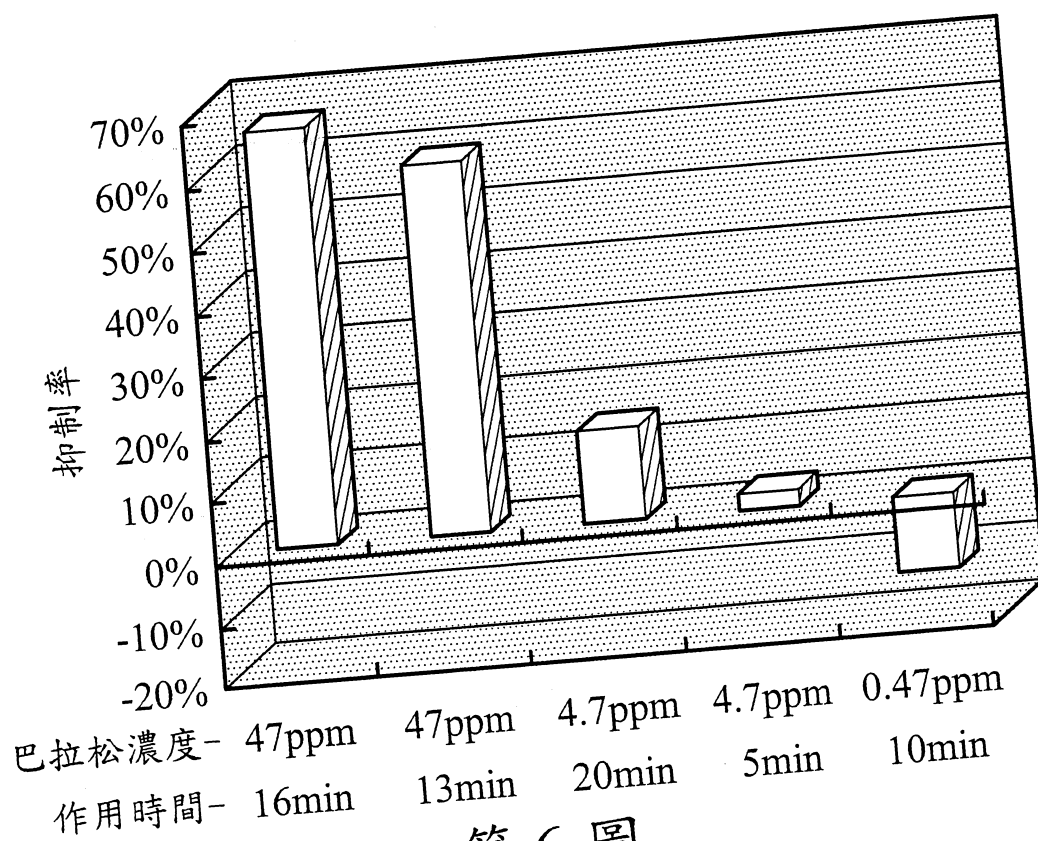
第 5C 圖



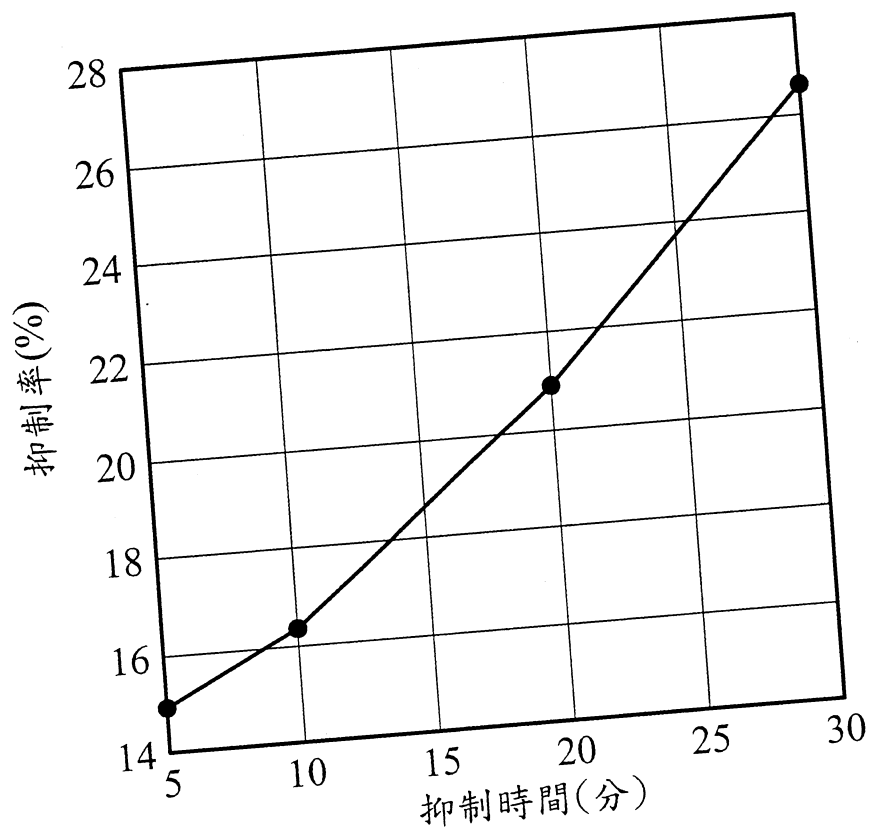
第 5D 圖



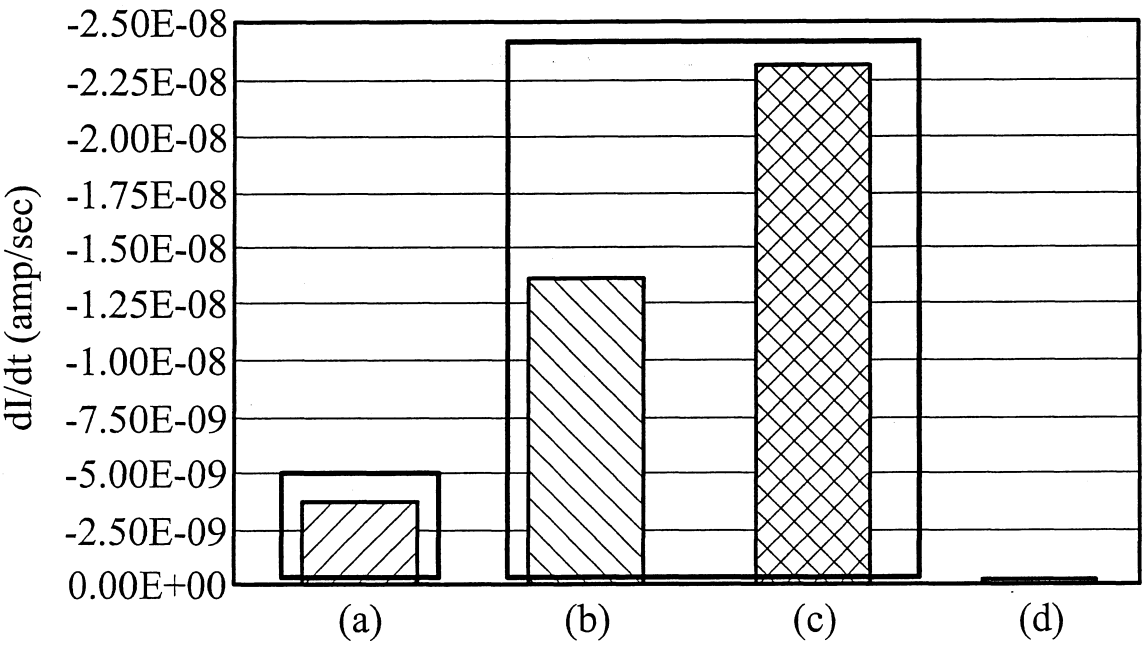
第 5E 圖



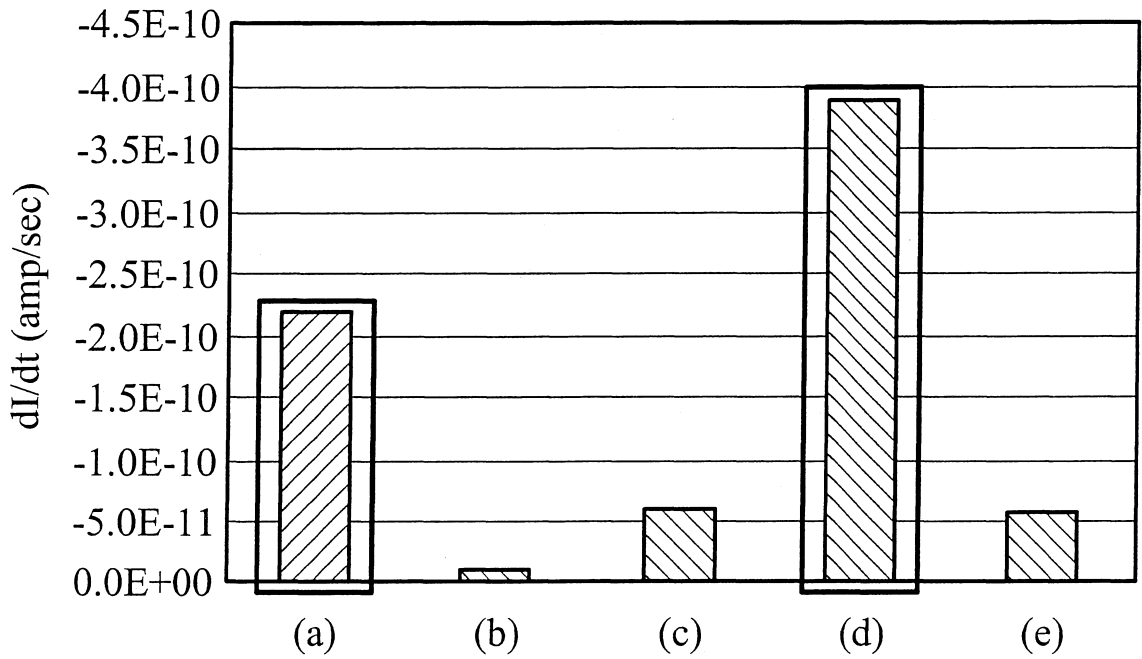
第 6 圖



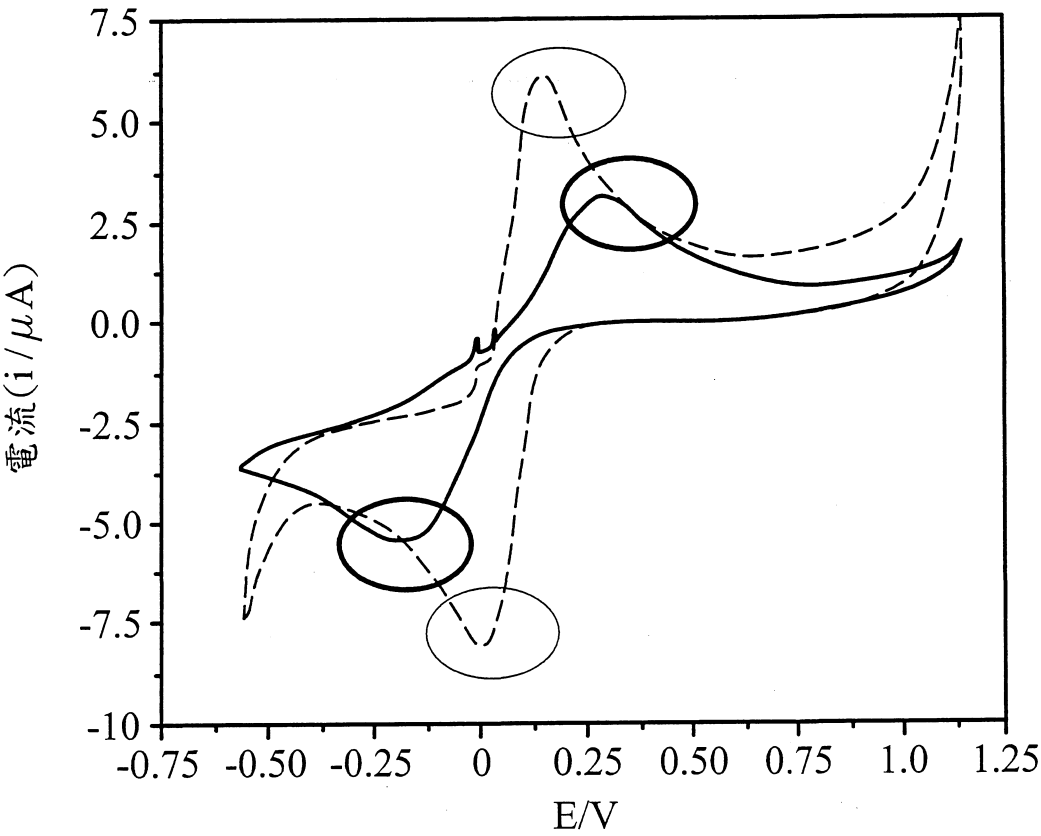
第 7 圖



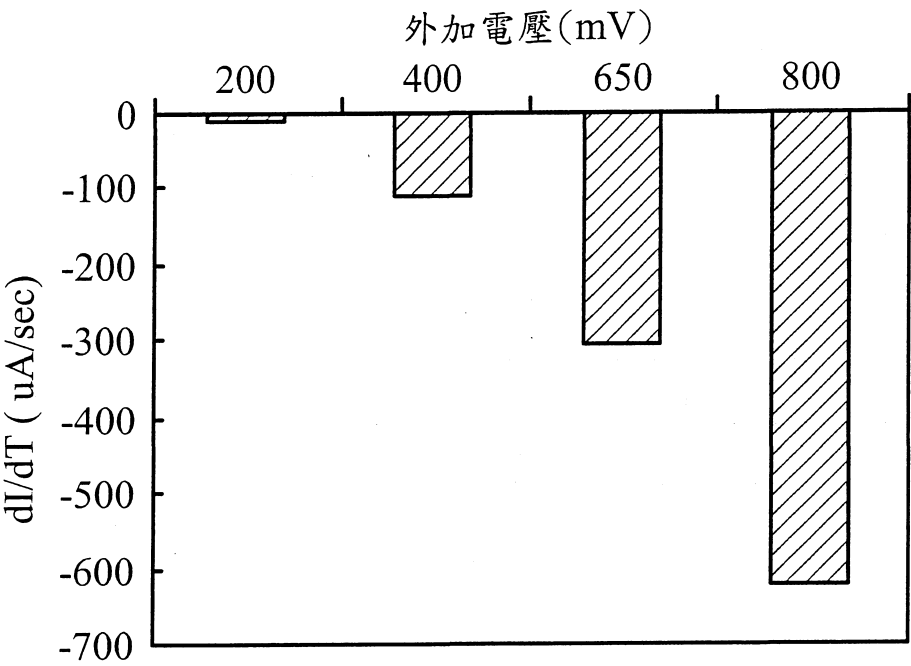
第 8 圖



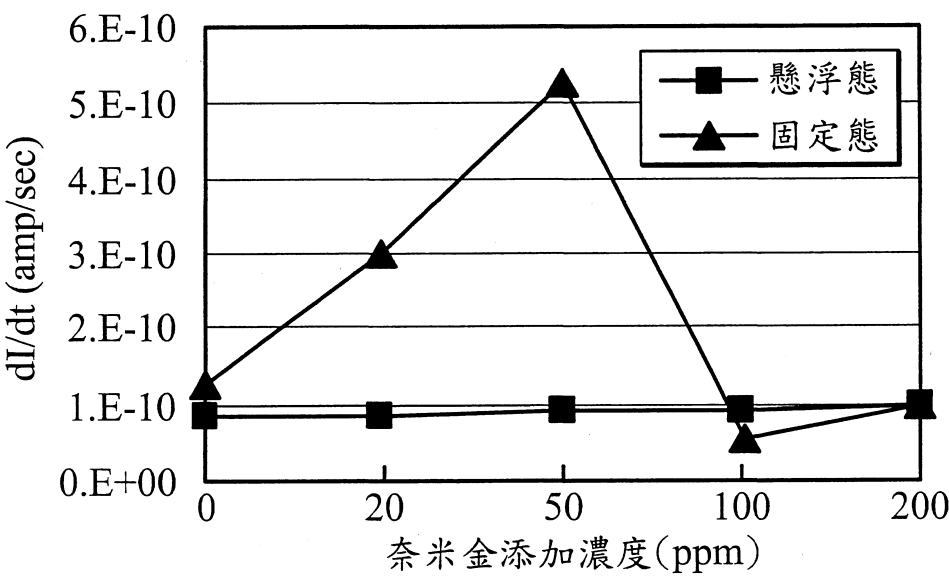
第 9 圖



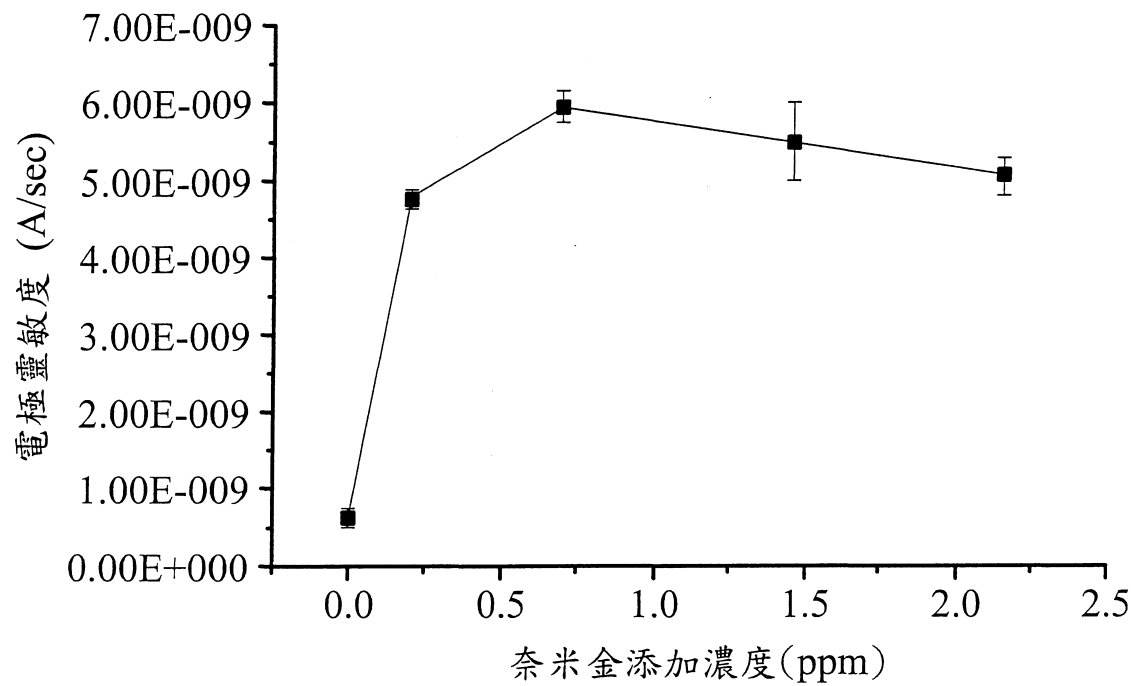
第 10 圖



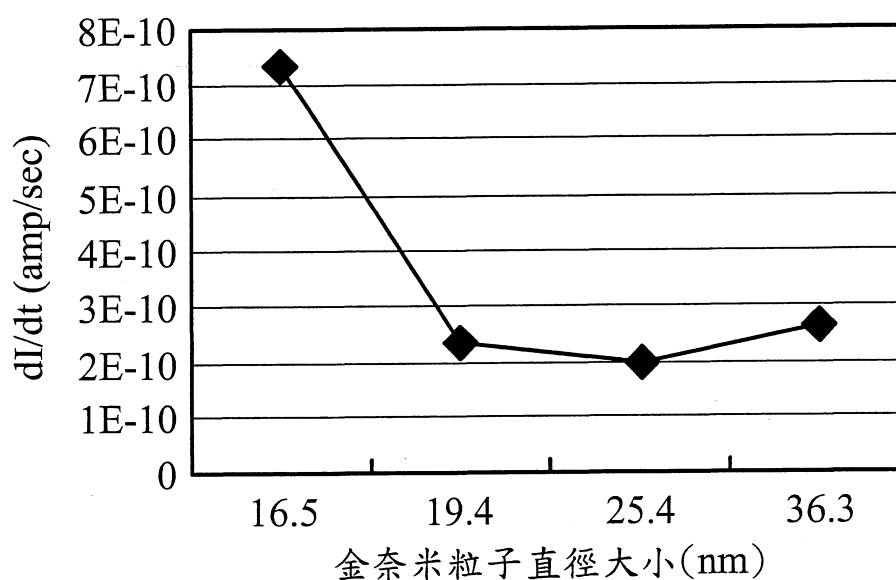
第 11 圖



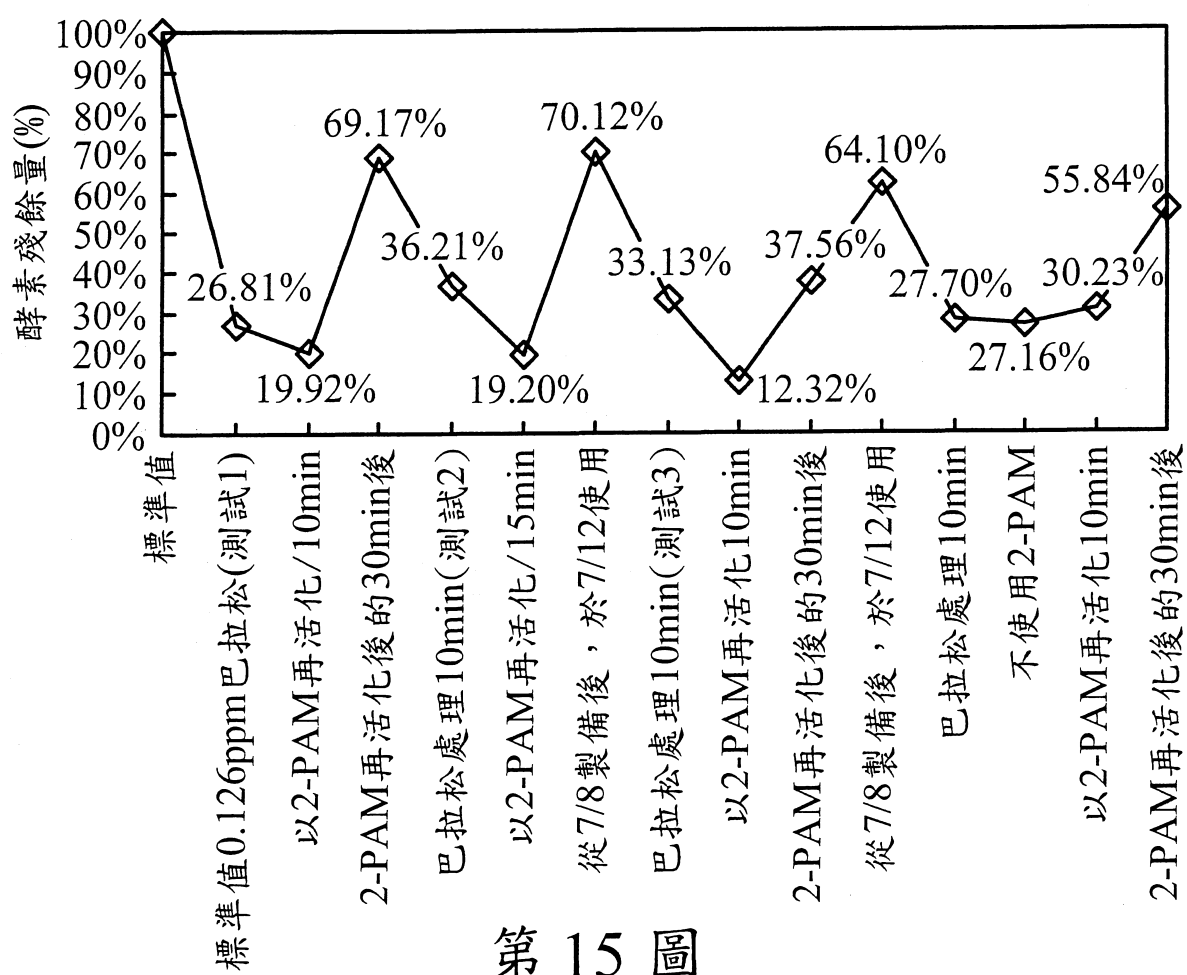
第 13A 圖



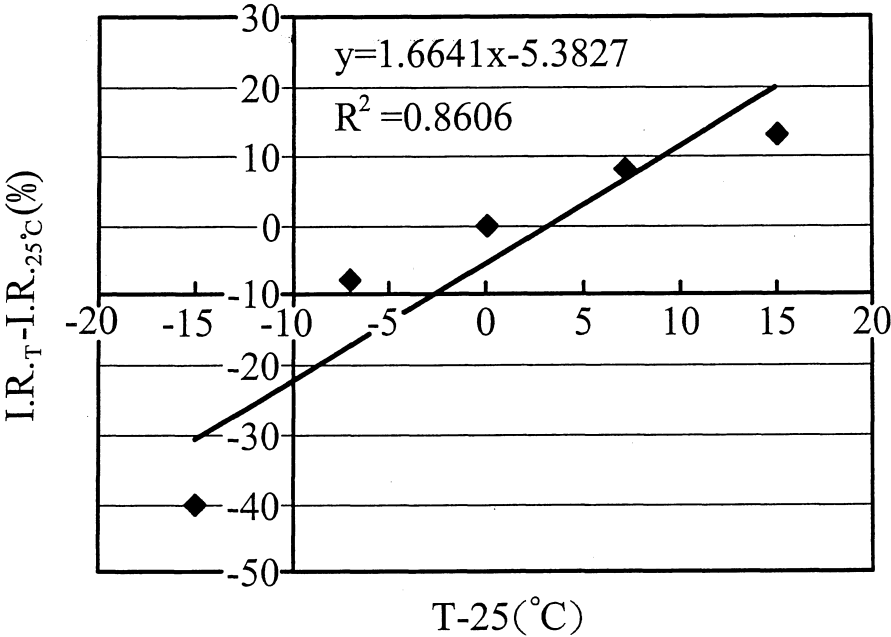
第 13B 圖



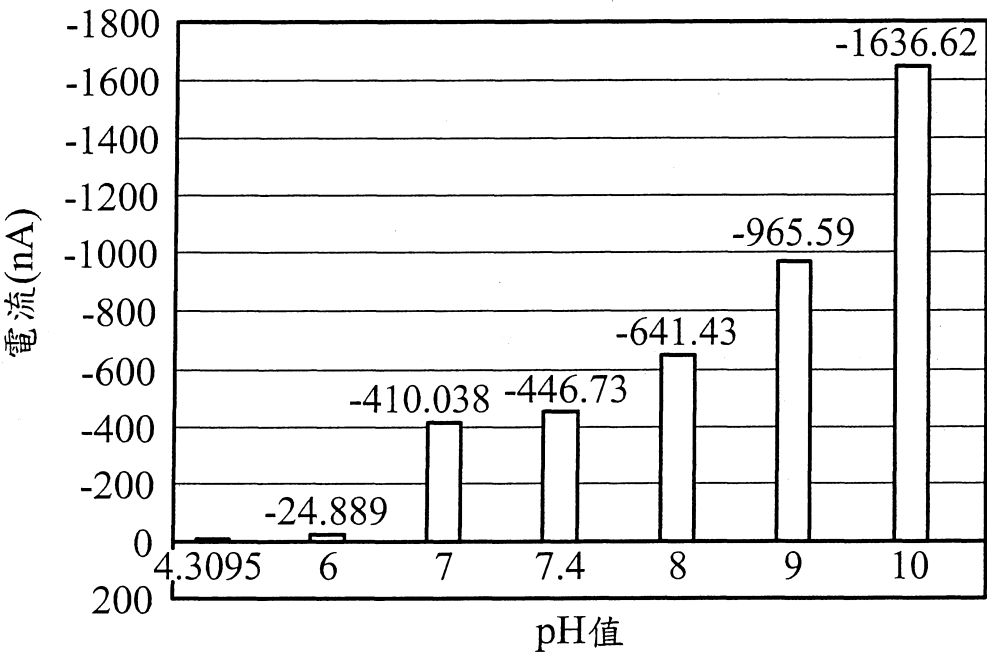
第 14 圖



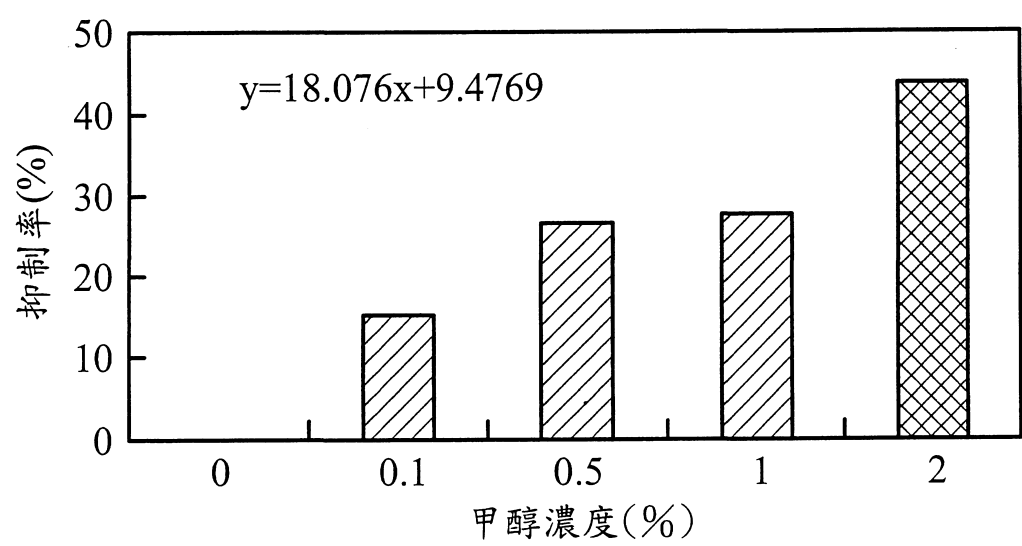
第 15 圖



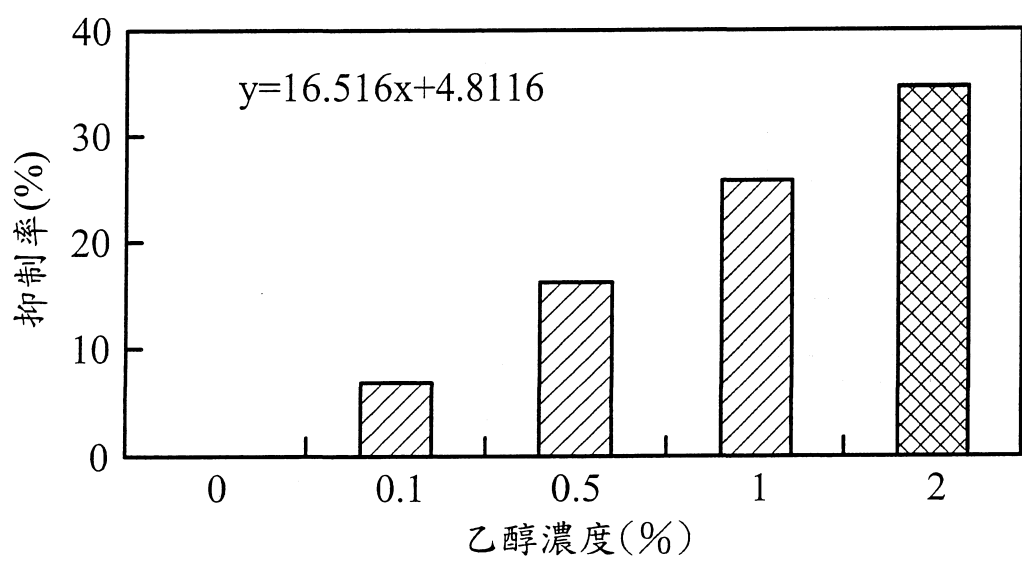
第 16 圖



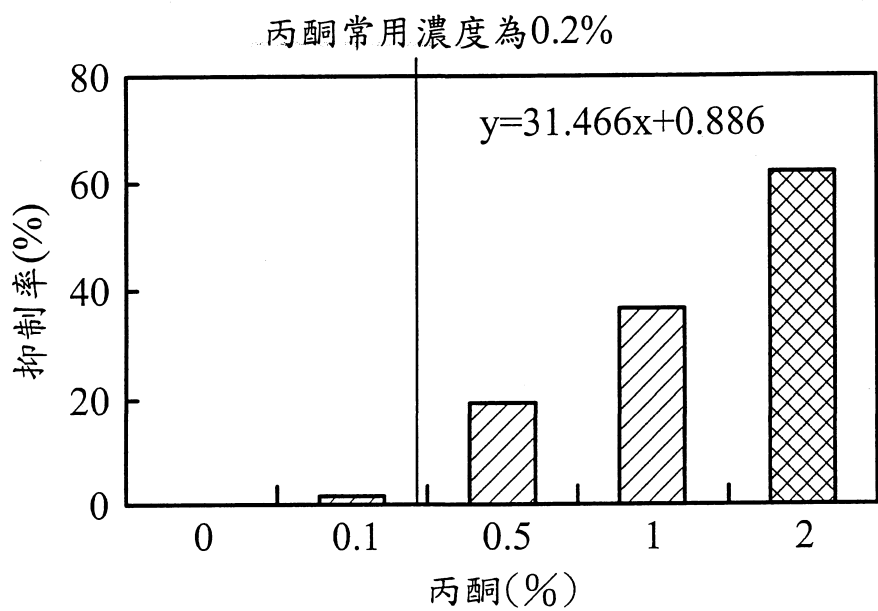
第 17 圖



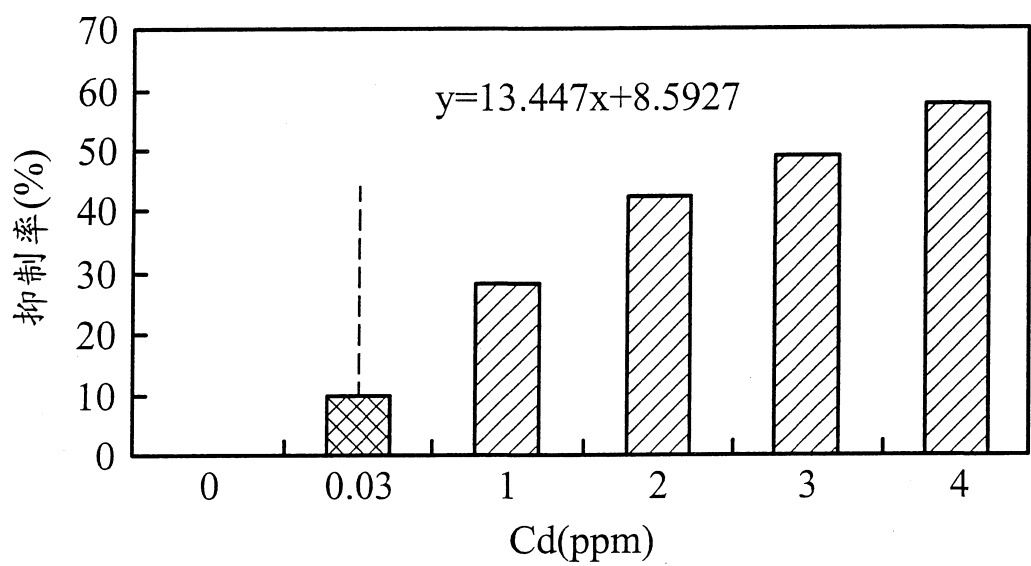
第 18A 圖



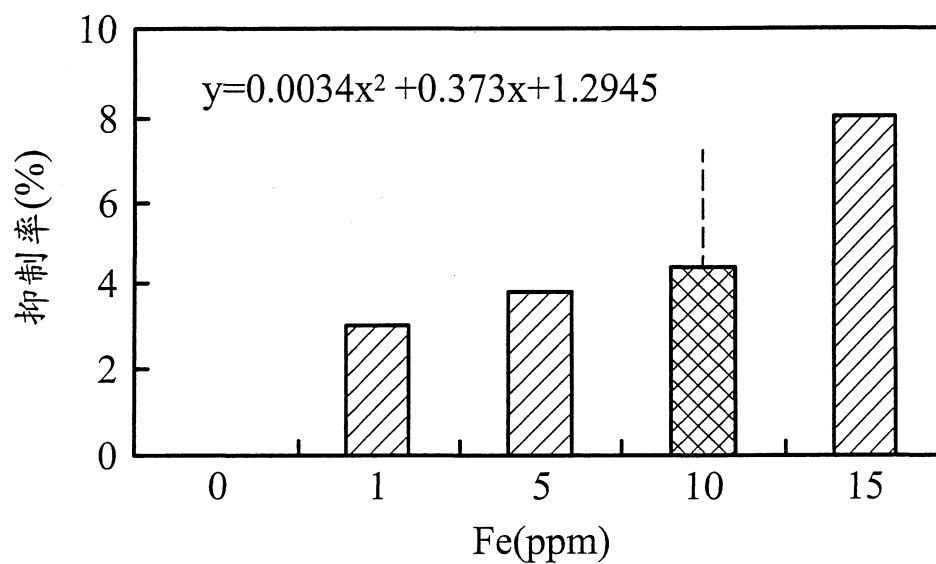
第 18B 圖



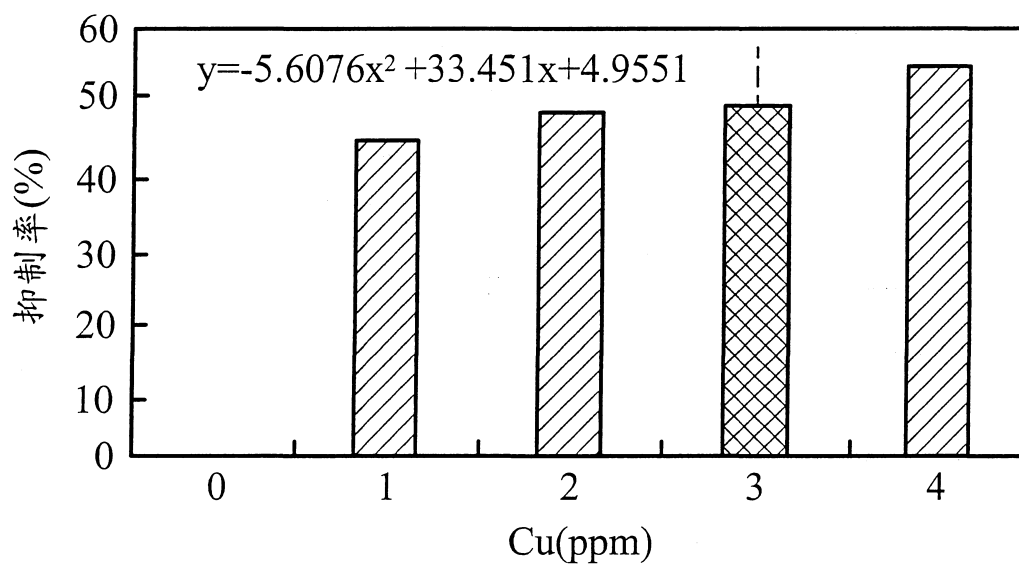
第 18C 圖



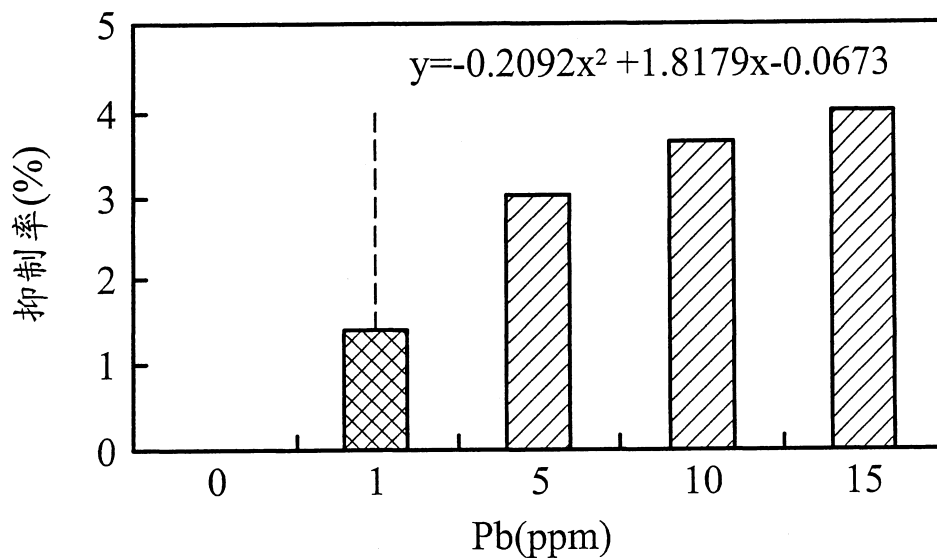
第 19A 圖



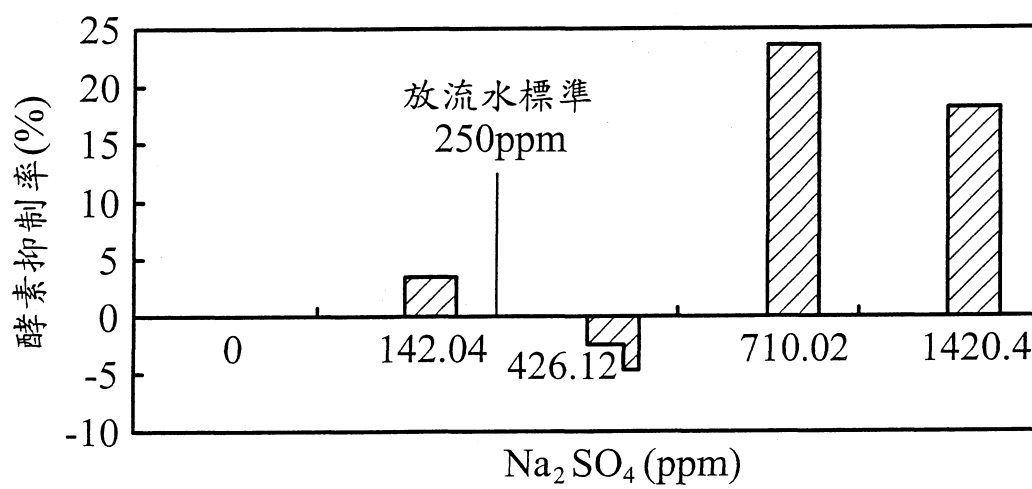
第 19B 圖



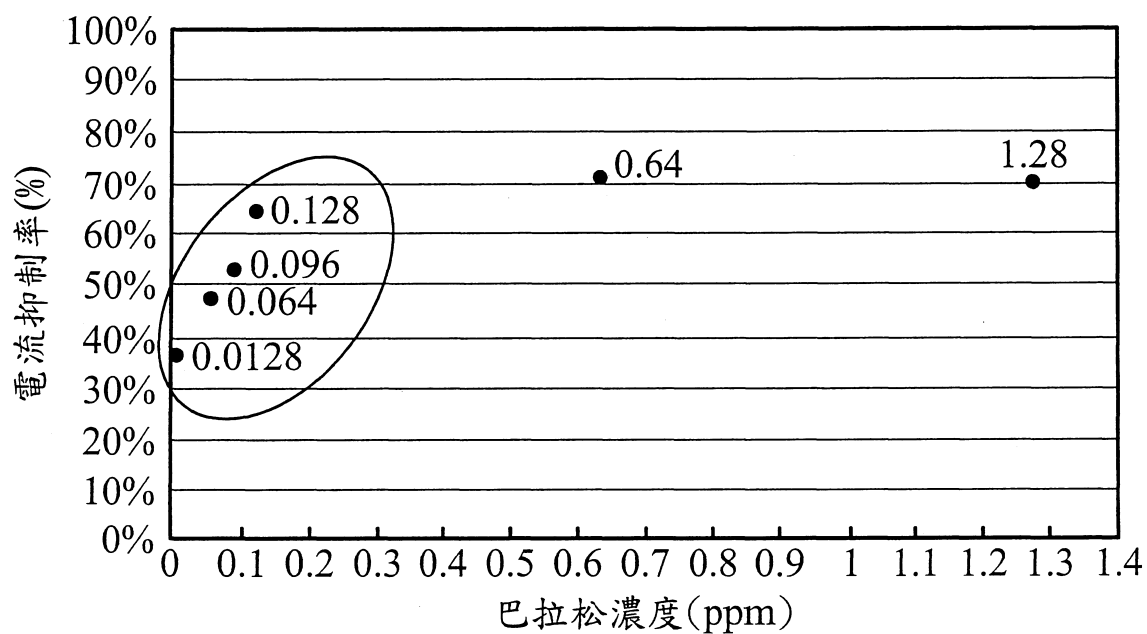
第 19C 圖



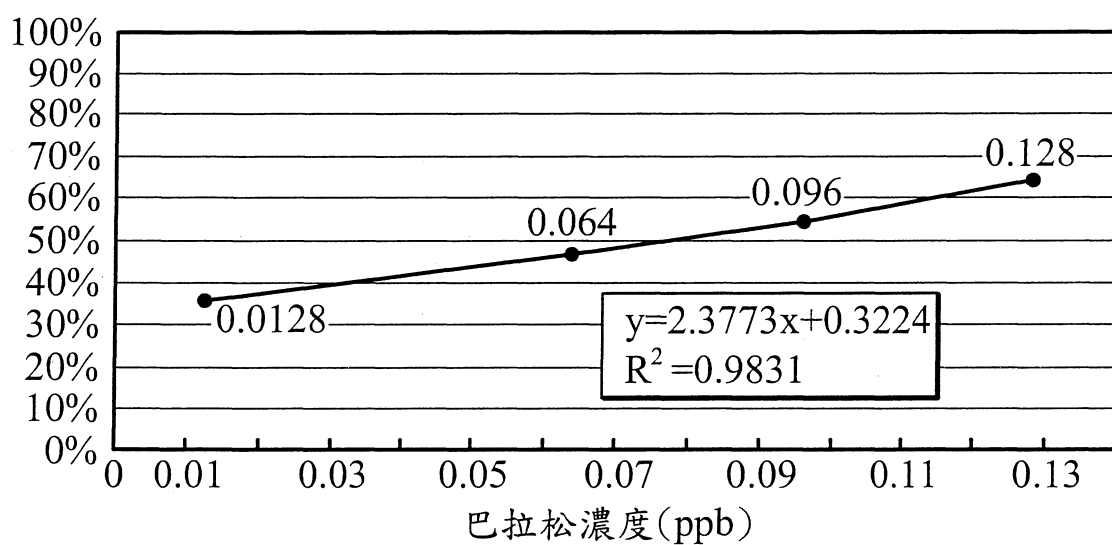
第 19D 圖



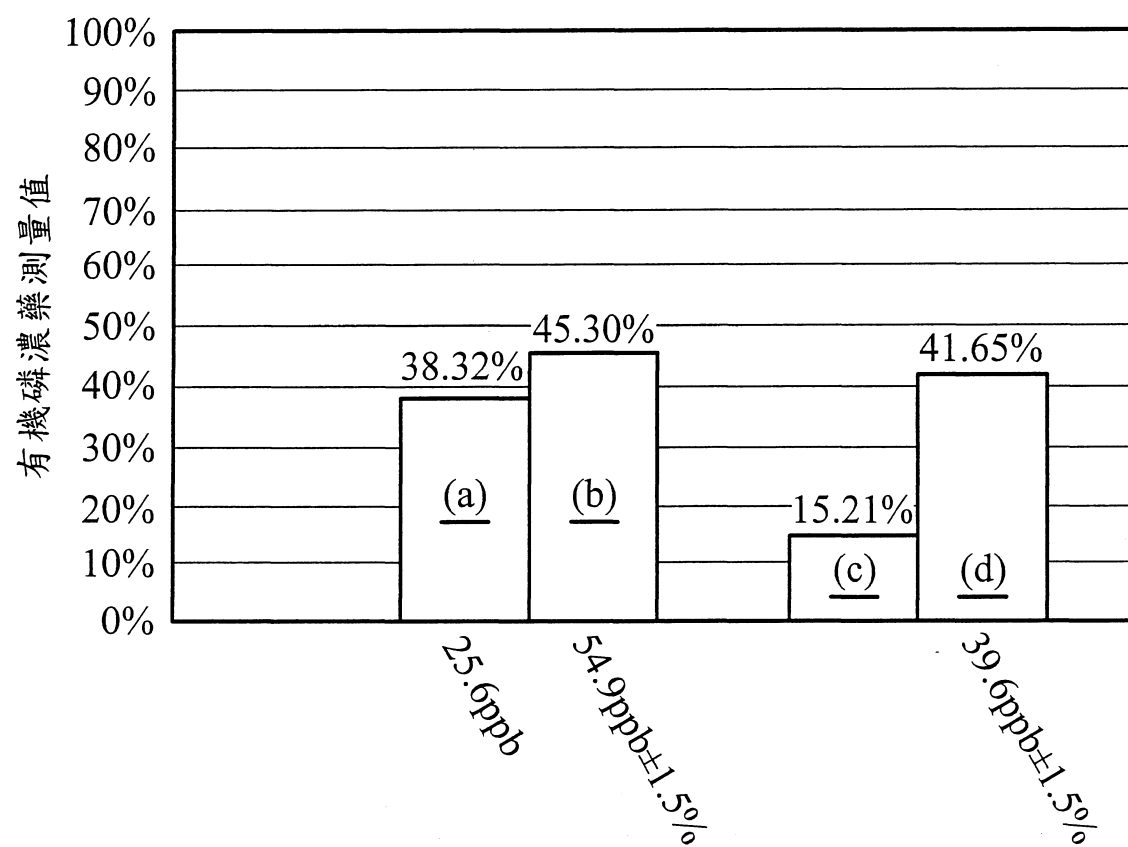
第 20 圖



第 21 圖



第 22 圖



第 23 圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

101~電極

120~處理單元

103~電極

122~顯示單元

105~電極

S1~電流訊號

110~溫度感應器

S2~溫度訊號

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：
無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

公告本

※ 申請案號：94138240

※ 申請日期：94.11.01

※IPC 分類：G01N 27/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

偵測農藥之方法、生物微感測器以及降低電流雜訊之方法

Method for detecting pesticides, bio-microsensor, and
method for reducing current noise

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

財團法人生物技術開發中心/

Development Center for Biotechnology

代表人：(中文/英文) 黃瑞蓮/ Jui-Lien Huang

住居所或營業所地址：(中文/英文)

台北縣汐止市康寧街 169 巷 101 號

No. 101, Lane 169, Kangning St., Xizhi City, Taipei County 221,
Taiwan R.O.C.

國 籍：(中文/英文) 中華民國 TW

三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 巫鴻章/ Wu Hong-Zhang

2. 李宜忠/ Lee Yi-Chung

3. 施錫璋/ Shih Hsi-Chang

4. 張富龍/ Chang Fuh-Long

5. 林畢修平/ Lin Pearl Hsui-Ping

國 籍：(中文/英文)

1. 2. 3. 4. 5. 中華民國 TW

十、申請專利範圍：

1.一種偵測農藥之方法，包括：

提供一液體樣品；

使該樣品與至少一電極接觸，其中該電極表面有酵素、金奈米顆粒及無機催化劑固定其上；以及

偵測由該電極輸出的電流訊號。

2.如申請專利範圍第 1 項所述之偵測農藥之方法，其中該酵素為乙醯膽鹼酯酶或膽鹼氧化酵素。

3.如申請專利範圍第 1 項所述之偵測農藥之方法，其中該無機催化劑為普魯士藍($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$)。

4.如申請專利範圍第 1、2 或 3 項任一項所述之偵測農藥之方法，其中該電極表面係以電聚合方法固定。

5.如申請專利範圍第 4 項所述之偵測農藥之方法，其中該電聚合固定方法係在電極表面聚合一層聚吡咯(polypyrrole)，固定酵素、金奈米顆粒及無機催化劑於聚吡咯層上。

6.如申請專利範圍第 5 項所述之偵測農藥之方法，其中該金奈米顆粒的濃度為 0.5-2.0ppm。

7.如申請專利範圍第 1 項所述之偵測農藥之方法，其中該金奈米顆粒粒徑為 16.5-20nm。

8.如申請專利範圍第 1 項所述之偵測農藥之方法，其中該電極為白金電極。

9.如申請專利範圍第 1 項所述之偵測農藥之方法，更包括使該樣品與一溫度感應器接觸，偵測該樣品溫度。

10.如申請專利範圍第 9 項所述之偵測農藥之方法，其中該電流訊號以樣品溫度進行溫度補償處理。

11.如申請專利範圍第 1 項所述之偵測農藥之方法，其中該