

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

光電化學脂質生化感測器

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2113-M-032-012-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：淡江大學化學系

計畫主持人：林孟山

計畫參與人員：葉秀炫, 吳奕慶, 陳信良, 陳繼浩, 林雅婷, 賴建宏, 蘇晟文

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 9 月 12 日

94 年度專題研究計畫

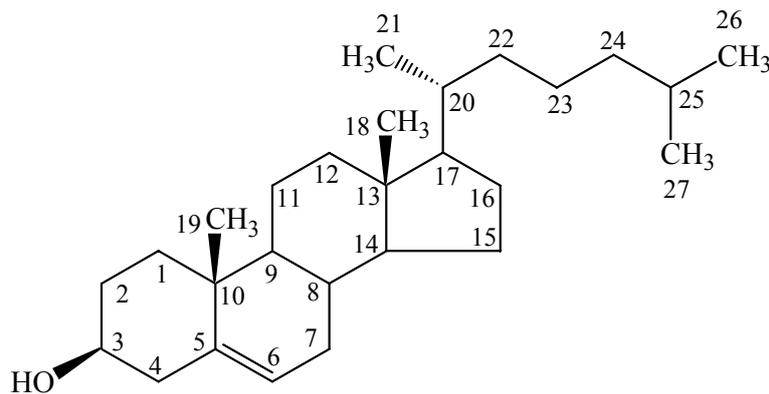
光電化學脂質生化感測器

成果報告

游離膽固醇感測器之研究

簡介

在偵測膽固醇前先從膽固醇化學性質的角度來瞭解其特性，從結構上來看膽固醇具有三個六元環、一個五元環，是一種steroid alcohol 具有 27 個碳原子，在第三個碳原子C₃上具有一個羥基，在第五個碳原子C₅上具有一個雙鍵，其學名為 5-cholestene-3-β-ol，分子量為 386 g/mol，結構如下所示。在三度空間中膽固醇的四個環幾乎是平面的，突出的兩個甲基和側鏈形成所謂的β結構(configuration)。C₃上若接上脂肪酸則稱為膽固醇酯(cholesteryl ester)，若為OH則稱為游離膽固醇(free cholesterol)



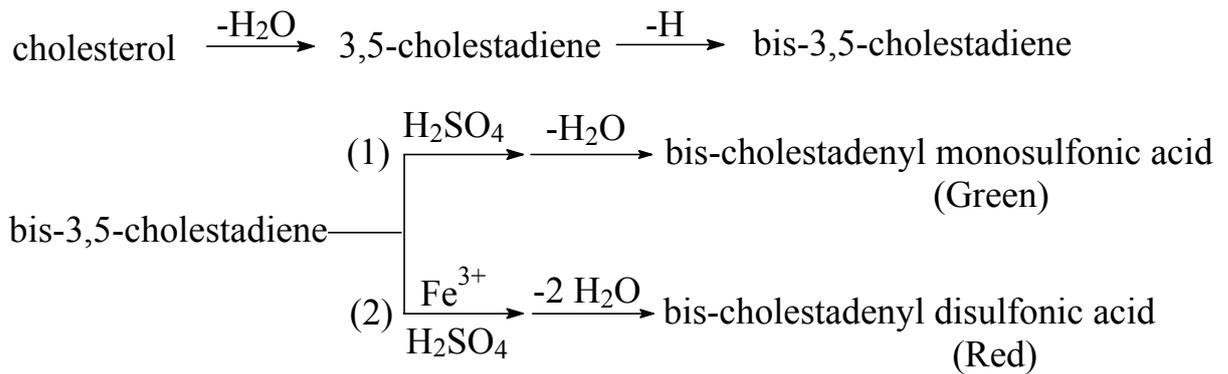
從結構式中可以瞭解游離膽固醇僅其上的羥基具親水性，因此本身難溶於水易溶於有機溶劑，如醇類等等。從化學反應性來看僅羥基及雙鍵具有較大的反應性。

游離膽固醇的偵測方法

游離膽固醇偵測方法由其反應原理可區分為兩大類一為化學顯色法、另一為酵素測定法，以下將針對其分析方法作一說明。

化學顯色法

化學顯色法是較早被開發出來的方法，它是利用比色計或光譜儀量測硫酸與膽固醇脫水磺化反應後，造成的顏色變化來偵測。主要之反應試劑分為產生綠色及紅色產物兩類，其化學反應如下列反應式所示。



第一類由 Liebermannz 在 1885 年首先發表，1890 年 Burchard 將其運用在血液樣品的量測，此法稱為 Liebermann- Burchard Method，其步驟是將血液離心後將血清樣品以氯仿(chloroform)萃取出所含的膽固醇，再與醋酸酐(acetic anhydride)、醋酸及濃硫酸反應形成綠色的產物，在波長 625 nm 處偵測產物顏色之變化以定量膽固醇濃度。而此法於 1922 年 Bloor、1950 年 Sperry-Webb 及 1952 年 Abell-Kendal 等人陸續發表過各式之修飾法。此外，Pearson 在 1952 年發表在 Liebermann- Burchard 法中加入對甲苯磺酸(p-toluene sulfonic acid)可使呈色更穩定，此修飾法在波長 550 nm 處做偵測。

第二類則是利用 Killianin-Sulkowski 反應來顯色，此法利用鐵鹽在強酸下與膽固醇反應產生紅色之產物來定量。1953 年 Zlatkis-Zak 利用 FeCl_3 和醋酸與膽固醇反應，1957 年 Zak-Henly 先將樣品中的蛋白質除去再以醋酸、硫酸和 FeCl_3 處理，其中所含的膽固醇會反應形成紅紫色產物，在波長 560nm 下定量膽固醇濃度。Rosenthal 於此反應中加入

磷酸，Parekh-Jung則以 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 取代 FeCl_3 在硫酸中反應。

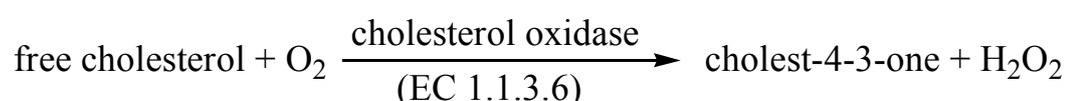
此外亦有利用其他物質來產生呈色的，如1964年Zurkowski直接利用 sulfosalicylic acid 發色，1969年Zlatkis-Zak以醋酸、硫酸和 o-fetardaldehyde 反應來呈色，於波長550nm下量測。

此種利用化學反應顯色的方式來量測膽固醇含量時，由於專一性較差且游離膽固醇及膽固醇酯在此反應中並無法產生相同的顏色變化量，因此在定量總膽固醇濃度上具有較大的誤差，再加上大量有機溶劑、腐蝕性及有害化學物質的使用目前已經很少用於臨床檢驗上了。

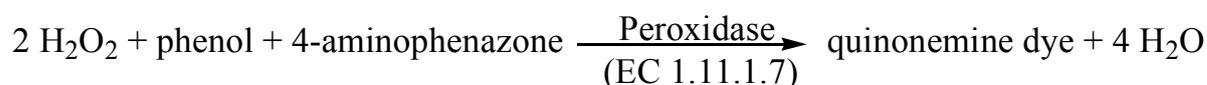
酵素測定法

利用酵素的催化反應及本身所具有的生物專一性，來測定分析物是量測學上的一個重大突破。膽固醇的偵測方式自發表以酵素法測定後，已取代了傳統的化學顯色法，成為目前臨床醫學上檢測膽固醇之標準偵測方式。酵素測定法基本上可分為下列三種偵測模式。第一種模式使用膽固醇氧化酶(cholesterol oxidase, ChOx) 和過氧化酶(peroxidase, POD)，第二種使用膽固醇氧化酶和catalase⁽ⁱ⁾，而第三種使用膽固醇去氫酶(cholesterol dehydrogenase)和 NAD^+ 來作為量測。

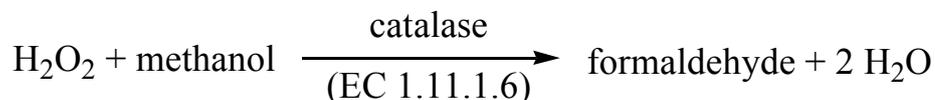
當膽固醇與膽固醇氧化酶反應後會生成 cholets-4-en-3-on 及過氧化氫兩種產物並伴隨氧氣的消耗；因此，在定量膽固醇濃度時可藉由偵測過氧化氫生成物的濃度；或是分析系統中氧氣濃度的消耗量，以間接方法定量其濃度。其反應式如下所示：



傳統上，分析過氧化氫濃度仍是利用顯色反應再以光譜儀來定量， Trinder 於 1969 年利用 4-aminoantipyine (4-AA)及 sodium p-hydroxy benzoate 在過氧化酶催化下與過氧化氫產生紅色 quinoneimine 產物，此產物可於波長 500nm 下吸收而作量測。1974 年 Allain 則使用 phenol、4-AA、過氧化酶與產生的過氧化氫反應，產生紅色 quinoneimine 化合物來定量過氧化氫，反應如下式表示。

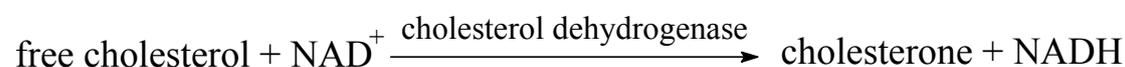


Roschlau 在 1974 年則發表了利用 catalase、methanol、acetylacetone 與過氧化氫反應產生黃色 dihydrolutidine 化合物，於波長 410nm 來偵測過氧化氫的濃度其反應如下式。



此外，利用膽固醇氧化酶與膽固醇反應時所消耗的氧氣含量來定量膽固醇的濃度⁽ⁱⁱ⁾。最早在 1976 年 A. Noma 和 K. Nakayama⁽ⁱⁱⁱ⁾即使用氧氣電極來量測氧氣濃度而計算出溶液中膽固醇含量。

酵素測定法除了利用膽固醇氧化酶外，尚可使用膽固醇去氫酶來做反應。當膽固醇去氫酶和其輔助因子(cofactor) NAD^+ 反應後將產生 NADH，因此藉由定量 NADH 濃度即可定量膽固醇濃度，其反應式如下所示：



游離膽固醇生化感測器

利用上述酵素反應的原理，並針對分析不同的產物或反應物種的變化量，結合各式訊號傳遞的機制，可發展成包括光、電、熱等等偵測形式的游離膽固醇生化感測器，以下將簡述近來在這方面的發展。

2-1-2-1 光化學游離膽固醇生化感測器

M. D. Marazuela利用化學發光發展光纖生化感測器^(iv)以偵測游離膽固醇，實驗是將對氧氣敏感的tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II)錯合物固定於矽樹脂(silicone)中來發展生化感測器；藉由膽固醇氧化酶反應造成氧氣含量下降所造成的化學發光變化來偵測，其線性範圍在 0.15~3 mM。

Z. Zhang使用lumino和ferricyanide化學發光系統^(v)，藉由膽固醇氧化酶反應產生之過氧化氫與其作用產生之放光反應定量膽固醇濃度。膽固醇氧化酶利用glutaraldehyde固定於經過amine修飾之矽膠(silica gel)上，lumino和ferricyanide則藉由靜電引力固定於陰離子交換樹脂上，此感測器之線性範圍在 0.5~10 mg/dL。此類應用光化學方式偵測之膽固醇感測器在發展上通常具有高靈敏度、低偵測極限之優點；但一般而言其偵測之線性範圍較低為其缺點。

電化學游離膽固醇生化感測器

目前常見的游離膽固醇生化感測器仍以電化學方式偵測居多，所使用的電化學技術包含電位法(potentiometry)^(vi)、安培法(amperometry)及計時安培法(chronoamperometry)等等，而偵測系統主要則包含穩定態(steady-state)及流動注入分析系統(flow injection analysis)兩大類。在發展電化學生化感測器的過程中兩個極為重要的問題便是膽固醇氧化酶的固定及干擾物的排除。

膽固醇氧化酶的固定

首先在文獻中可以發現一些固定膽固醇氧化酶的方法，包括固定於高分子物質如醋酸纖維、尼龍網(Nylon mesh)^(vii)、Kieselgel 100 beads^(viii)、Formvar 薄膜^(ix)、polyacrylonitrile hollow fiber^(x)等等，以及碳糊^(xi)、graphite-Teflon^(xii)、導電性高分子^(xiii)和溶膠凝膠(sol-gel)等等材料上。

在這些固定方法中戊二醛(glutaraldehyde)是最常被使用的一種交聯劑，戊二醛兩端具有醛基可與高分子及酵素上的胺基行Schiff Base反應，而將酵素共價鍵結於高分子表面。利用此法固定酵素時高分子上必須具有相當數量的胺基存在，因此通常必須作胺化處理。例如在尼龍網上固定膽固醇氧化酶時先以dimethyl sulphate^(xiv)活化Nylon，並以離胺酸(lysine)作為隔架(spacer)再以戊二醛與酵素交聯。使用polyacrylonitrile hollow fiber時，表面需先以NaOH和1,6-hexanediamine反應使其水解及胺化後，再以戊二醛與酵素交聯。利用Kieselgel 100 beads時也是需先經過胺化處理方能以戊二醛與酵素交聯。

而在一種聚乙烯(polyvinyl)樹脂—Formvar 上的固定，則是使用氯仿及 ethylene dichloride 等有機溶劑混和 1 %膽固醇氧化酶及 4 % Formvar，經聚合後而將膽固醇氧化酶固定於 Formvar 薄膜上，實驗顯示以此法製備之薄膜有 90 %的酵素可穩定的固定於薄膜上，且生命期可由 15 天延長為 30 天，酵素對溫度之穩定性亦增加。

利用導電性高分子來固定膽固醇氧化酶具有製備上單一步驟的方便性，目前使用最廣泛的物質是polypyrrole^(xv-xvi)和polyaniline^(xvii)。因為可方便的以電聚合的方式在電極面上形成一層含有膽固醇氧化

酶的導電性高分子薄膜，並可藉由電聚合時電量的控制形成所需的薄膜厚度。此外，J. C. Vidal^(xviii)除了在内層以+0.7 V形成polypyrrole以固定膽固醇氧化酶外，並於外層以+0.65 V定電位沈積一層非導電性但具有滲透選擇性之poly(o-phenylenediamine)薄膜^(xix)，藉此提高感測器之專一性。

此外尚可利用TEOS(tetraethyl orthosilicate)形成之溶膠凝膠(sol-gel)來固定酵素^(xx)。A. Kumar^(xxi)利用TEOS將膽固醇氧化酶和過氧化酶同時固定，並分別以物理吸附、三明治法及微包覆(microencapsulation)三種不同方式製備感測薄膜。並以光譜方法評估固定後酵素之活性。實驗發現酵素並沒有因修飾而造成明顯的活性下降，但這三種方法所製備之感測器其分析之響應時間很長，分別為10、30與100分鐘，此為其最主要之缺點。

干擾物的排除

此外，利用電化學方式量測膽固醇面臨的另一大問題便是干擾物的排除，一般利用電化學安培法在玻璃碳電極上偵測^(xxii)酵素反應後產生的過氧化氫，需大於+0.9 mV下方能將過氧化氫氧化，但是在定量過程中將面臨樣品中易氧化物質的干擾。因此，降低偵測電位將是排除干擾極為有效的方式之一，常使用降低偵測電位的方式便是於系統中加入電子傳遞介質或是催化劑。

加入電子傳遞介質可作為酵素活性中心的電子受體，達到電子傳遞的目的。膽固醇氧化酶與葡萄糖氧化酶相同，皆以FAD(flavin adenine dinucleotide)為其電子傳遞之活性中心，但是部分可作為葡萄糖氧化酶之良好電子傳遞介質之物質，如ferricyanide，2-aminoethylferrocene，1,1'-ferrocenedimethanol，

phenanthroline-Fe, hexaammine-Ru和數種quinone衍生物等等，並無法當作膽固醇氧化酶之良好電子受體^(xxiii)。

一般常見可應用於膽固醇生化感測器之電子傳遞介質有 ferrocene及其衍生物、phenazine和phenothiazine衍生物^(xxiii)以及flavin nucleotides^(xxiv)等等。利用natural flavin nucleotides 如FMN(flavin mononucleotide)、FAD可降低偵測電位至+0.5 V。使用 ferrocenemonocarboxylic acid^(xxiv)可將偵測電位降低至+0.4 V (vs. Ag/AgCl, 3 M NaCl)，而hydroxymethyl ferrocene若配合過氧化氫酶 HRP(peroxidase)^(xxv)則可將偵測電位降低至 0.0 V (vs. SCE)。另外修飾 phenothiazine衍生物如 1-methoxy-5-methylphenazinium methosulfate、thionin、azure C和azure A等亦可將偵測電位降低至 0.0 V (vs. SCE)，而這些phenothiazine衍生物中電子傳遞的效率以 1-methoxy-5-methylphenazinium methosulfate最好，但其光敏性為使用上之限制。

此外，使用催化劑亦是一有效降低電位的方式，例如使用白金電極可將偵測過氧化氫的氧化電位降至+0.6 V，若將電極在PtCl₆²⁻溶液中以-0.25 V處理還可在電極面上鍍上一層鉑黑以增加偵測之靈敏度，並可於0V下偵測過氧化氫之還原。其他應用於膽固醇生化感測器的催化劑如普魯氏藍(prussian blue)^(xxvi)，可降低偵測電位至-50 mV(Ag/AgCl, 1M KCl)。

另外一種新型偵測膽固醇的方式是藉由液態雙層薄膜^(xxvii) (liquid membrane bilayer)來達成。其偵測原理是藉由加入膽固醇時，造成親水性通道(hydrophilic pathway)的產生，增加了雙層薄膜間導電度的增加來定量膽固醇濃度。實驗使用之可形成雙層薄膜物質之分別為lecithin-prostaglandin及lecithin-nystatin，並以 0.2 μm孔徑之醋酸纖維

維膜隔開。兩邊分別放入等距之白金電極，並施加適當之電位(+600~+700mV)以量測電流變化。此方法不使用酵素因此其穩定性不受酵素的影響，但是實驗顯示十天後溶液將因細菌作用呈混濁狀態而無法使用。此偵測方法其響應時間短一般小於 60 秒，但此方法仍屬前期之研究僅有少數發表。

本實驗建立可攜式之定電位儀裝置及印刷式之游離膽固醇感測試片，配合電化學計時安培法來偵測游離膽固醇樣品之濃度。感測試片上修飾膽固醇氧化酶作為辨識元，並修飾 Fe_3O_4 作為催化劑來偵測酵素反應所產生之過氧化氫濃度。因此，可在低電位下偵測過氧化氫之還原反應，避免了樣品中易氧化干擾物的影響，而能有選擇性的定量出游離膽固醇之濃度。

實驗部分

儀器

實驗中計時安培法之電位控制使用自行組裝之定電儀位。儀器控制及訊號記錄使用個人電腦(CUP with Intel Celeron 300, Taiwan)配合 Labview 軟體(Version: 5.0, National Instrument, USA)、數據擷取卡(PCI-MIO-16E-4, National Instrument, USA)及接線盒(CB-50L, National Instrument, USA)來達成。感測電極試片印製使用半自動厚膜印刷機(SMTech 100MV, MPM, UK)、SMT 印刷鋼板(Faithful Printing Equipment, Taiwan)來製造。0.5-100 μl 微量吸量管(Eppendorf, German)作為微小體積的量取。循環恆溫槽(B402, Firstek, Taiwan)控制測量分析物時樣品溶液之溫度。其他儀器包括紫外光可見光光譜儀 UV-VIS(UV 1601, Shimadzu, Japan)、酸鹼度計(SP-701, Suntex,

Taiwan)、加熱攪拌器(721P, Dataplat, USA)、精密天平(AE200S, Mettler, Switzerland)、烘箱(RUO-602, Risen, Taiwan)、循環恆溫培養箱(LT-159, Shinchuan, Taiwan)、三用電表(75 series II multimeter, John Fluke MFG., USA)等。

藥品

溶液配製使用之超純水由 EASYpure™ RO/UV/UF(Mode: D7421, D8611, Barnstead, USA)系統製造。cholesterol oxidase(COO-311, EC 1.1.3.6, from Streptomyces sp.)購自 Toyobo 公司(Osaka, Japan)。cholesterol、ascorbic acid、uric acid、acetaminophen、dopamine、creatine、creatinine、lactic acid、aspirin、salicylic acid、hemoglobin 購自 Sigma 公司(Saint Louis, Missouri, USA)。D(+)-glucose 購自 Merck 公司(Darmstadt, Germany)。Triton X-100、Span 20、iron(II, III) oxide、ethanol 購自 Aldrich 公司(Millwaukee, Wisconsin, USA)。phosphoric acid 購自 Junsei 公司(Tokyo, Japan)。cyclohexanone 購自 Nacalai Tesque 公司(Kyoto, Japan)。urea、sodium chloride、hydrogen peroxide、sodium dihydrogen phosphate-2-hydrate、disodium hydrogen phosphate-2-hydrate 購自 Riedel-de Haën Brand 公司(Seelze, Germany)。PP 合成紙(Nan Ya Plastics, Taiwan)。導電碳膠(C10903D14, Gwent Electronic Materials, UK)、導電銀/氯化銀膠(C71105R5, Gwent Electronic Materials, UK)。

實驗步驟

實驗部分主要包含膽固醇感測系統之建立、分析時各項操作條件的探討以及感測器分析特性之評估。此感測系統建立包含電極試片之印製、膽固醇溶液之配製、定電位儀組裝、控溫裝置建立、電化學量

測及訊號擷取五項。以下將針對各項目進一步說明。

電極試片印製

電極試片之材質為厚度 0.4 mm 之 PP 合成紙，印製時分為三版套印做銅板厚膜印刷。第一版使用導電性碳膠印製工作電極之導線及相對電極，第二版使用銀/氯化銀膠(Ag/AgCl)印製參考電極，第三版使用含催化劑組成之導電性碳膠印製工作電極。每一版印刷後放入烘箱中於 40 °C 下乾燥 60 分鐘。印製時之印刷參數如表(2-1)所示。

表(1) 電極印刷參數

	刮刀壓力	刮刀速度	離版速度	印刷模式	間距
第一版	5 kg	50 mm/s	50%	單次印刷	0 mm
第二版	2 kg	70 mm/s	50%	單次印刷	0 mm
第三版	8 kg	10 mm/s	50%	單次印刷	0 mm

膽固醇溶液配製

樣品配置時先將膽固醇溶於乙醇中，再加入 Triton X-100 及 Span 20 界面活性劑混和，加熱攪拌至 60 °C 使其均勻溶解，最後於攪拌下加入緩衝溶液配至所需濃度。實驗以 10 % 乙醇加 1 % Triton X-100 及 1 % Span 20 配製的膽固醇樣品溶液呈白色微透明狀。

定電位儀組裝

實驗所需之定電位儀由實驗室自行組裝其電路為電化學三電極系統設計，基本電子線路如附錄一所示。依照線路焊接組裝後，固定於 9 cm × 6 cm × 5 cm 的鋁盒中；其中三電極之接頭以金手指插槽連接固定於鋁盒上，訊號輸出端連接兩條導線拉出盒外與數據擷取卡上

之連接盒相接。此外，由數據擷取卡提供一直流電壓，並連接至定電位儀做為操作放大器之電源。此定電位儀將所測得的電流訊號轉換為電壓訊號輸出，每產生 $2.5 \mu\text{A}$ 的電流則輸出 1.0V 之電壓。

控溫裝置建立

實驗中使用自製之簡易控溫裝置，利用一塊 $5 \text{cm} \times 5 \text{cm}$ 大小之致冷板(Peltier cooler)固定於 $9 \text{cm} \times 6 \text{cm} \times 5 \text{cm}$ 鋁盒側面，鋁盒另一側面開一 $1.5 \text{cm} \times 0.5 \text{cm}$ 之方形孔洞以利試片放入，正上方亦開一孔提供微量吸管滴入樣品之用。而藉由調整外加於致冷板上的電壓大小可控制鋁盒內的環境溫度，並放入一溫度計以指示溫度；盒內並裝置一 LED 燈提供照明以利實驗之進行。實驗時先利用電源供應器供應並調整電壓，使鋁盒內環境溫度達到所需之溫度要求，再將已插入定電位儀之試片對準控溫盒之開孔，並使試片伸入孔中；待溫度平衡後開始量測。

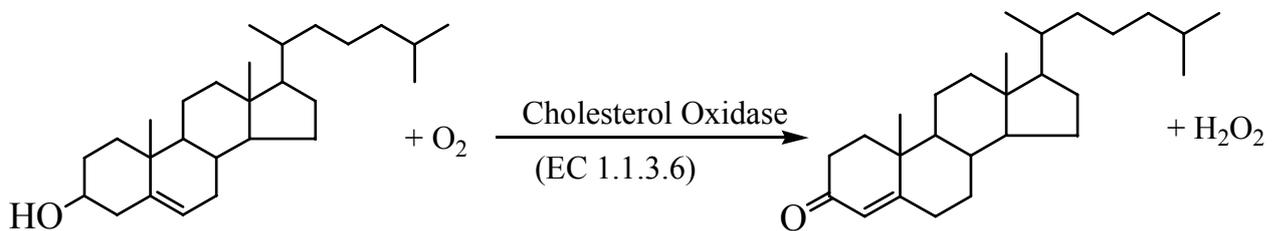
電化學量測及訊號擷取

實驗時將定電位儀產生之輸出訊號線及電源導線連接於 50 pin 接線盒上之正確腳位，接線盒連接個人電腦上之數據擷取卡上，並開啟 Labview 5.0 軟體設計程式來控制定電位儀，並紀錄及處理實驗所產生之數據，所使用之 Labview 程式詳見附錄三。測量樣品時使用計時安培法測量，將電極試片插入定電位儀之金手指位置，以微量吸量管取 $10 \mu\text{L}$ 膽固醇溶液滴於電極試片之工作電極上，然後執行 Labview 程式以控制前置之反應時間及電位的施加，並同時記錄數據，訊號每 50ms 記錄一次，。

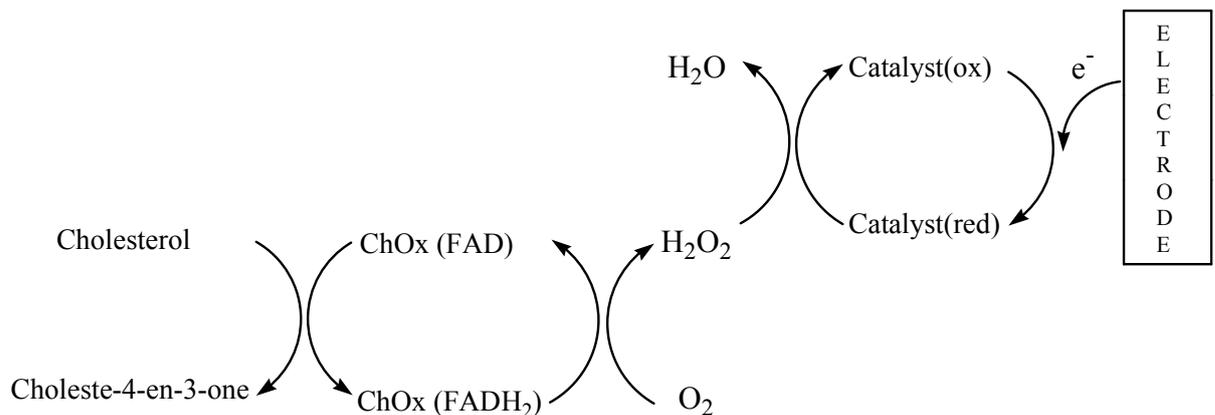
結果與討論

原理介紹

本實驗設計之游離膽固醇生化感測器其偵測原理，是以量測游離膽固醇與膽固醇氧化酶反應所產生的過氧化氫含量為基礎來定量膽固醇濃度。並且於電極試片上修飾 Fe_3O_4 為催化劑，以降低偵測過氧化氫之電位，提高此感測器之專一性，排除樣品中可能的電活性易氧化物質干擾。游離膽固醇與膽固醇氧化酶之酵素反應如下所示：

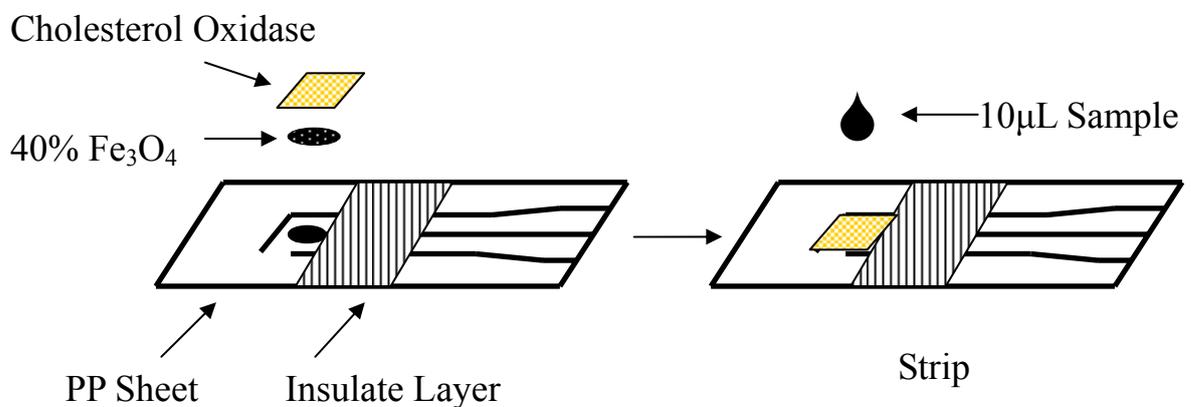


結合酵素反應及催化劑後，此膽固醇生化感測電極之電子傳遞機制可以圖(1)表示。在整個電子傳遞的過程中膽固醇氧化酶將膽固醇氧化後膽固醇氧化酶的活性中心由氧化態的 FAD^{2+} 變為還原態的 FADH_2 ，溶液中的氧氣再將其氧化回 FAD^{2+} ，而氧氣本身被還原成過氧化氫；然後藉由電極上的催化劑在施加還原電位下將過氧化氫還原為水，此時氧化態的催化劑藉由電極提供電子回到還原態而完成整個電子傳遞的過程。經由量測流入電極的電流大小，並建立電流訊號對膽固醇濃度的相關性，便可達成定量膽固醇濃度的目的。



圖(1) 膽固醇生化感測電極之電子傳遞機制

實驗以厚膜印刷技術印製之電化學感測試片，印製於 PP 合成紙上，而化學物質之修飾及整個游離膽固醇感測試片之設計可以圖(2)來表示。其中絕緣層的修飾可控制電化學反應時之電極面積，減少誤差的產生。



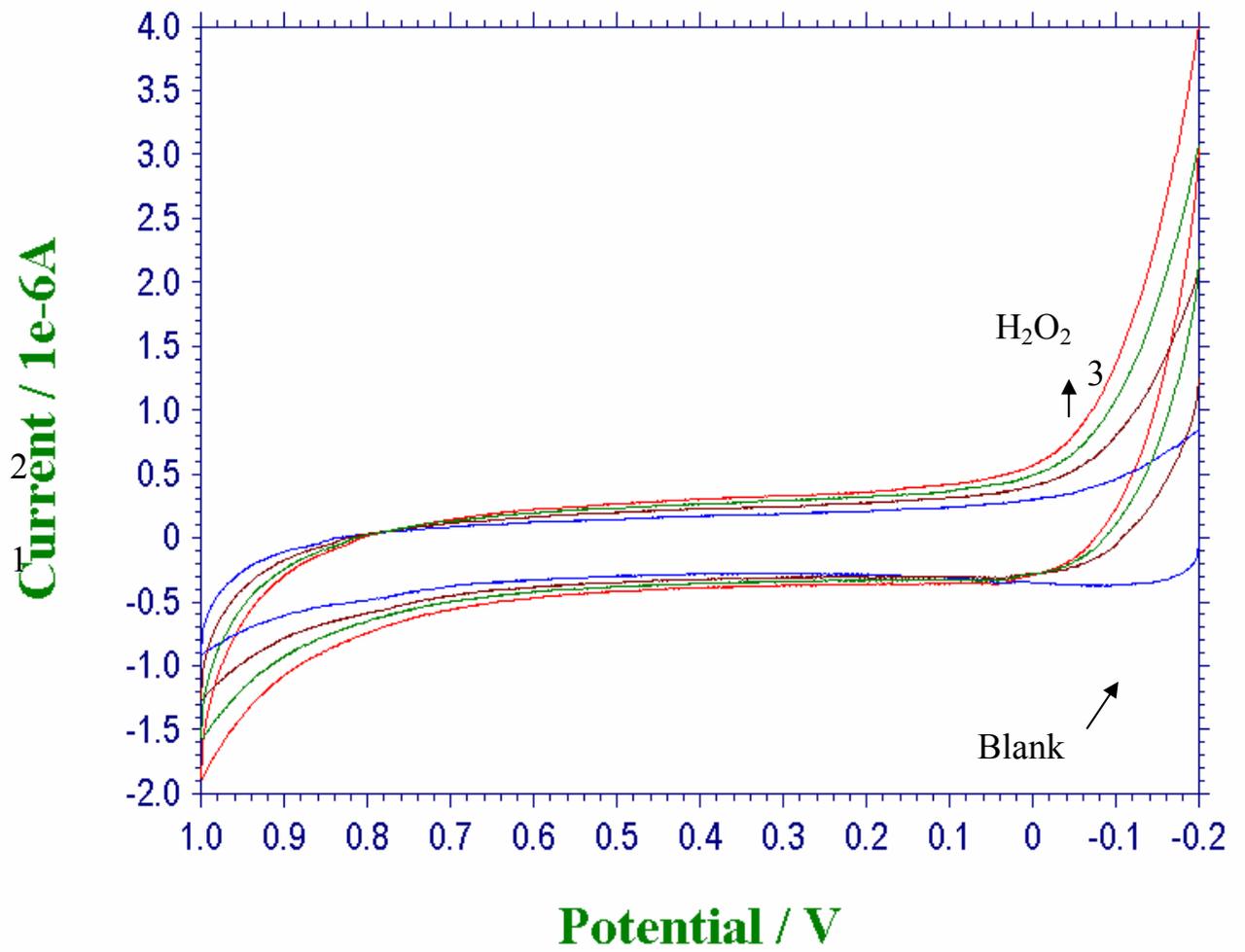
圖(2) 拋棄式游離膽固醇電化學感測試片之設計。

催化劑可行性評估

在整個偵測的過程中催化劑扮演一個極為重要的角色，當修飾於電極試片上的 Fe_3O_4 在電位施加的輔助下，改變了電極表面的軌域能量；因而降低了過氧化氫還原的活化能，使得過氧化氫與電極間的電子傳遞能在低電位下達成。如此，藉由電位的選擇提昇了此感測器之專一性，並避免了使用阻隔性薄膜來排除干擾所造成靈敏度下降的缺點。

實驗首先針對催化劑催化過氧化氫的可行性作評估，實驗利用循

環伏安法(cyclic voltammetry) 觀察 Fe_3O_4 修飾電極於不同過氧化氫濃度下之循環伏安圖，結果如圖(3)所示。從圖中可以明顯觀察到，當加入過氧化氫後在 0.0 V(vs Ag/AgCl, 0.1M NaCl)開始有明顯的還原電流產生，且還原電流隨過氧化氫之濃度增加成線性上升。由此證明了 Fe_3O_4 在還原電位下可催化過氧化氫之還原反應。



圖(3) Fe₃O₄修飾電極於不同過氧化氫濃度下之循環伏安法圖。連續添加 1 mM過氧化氫濃度至 3 mM。

膽固醇樣品配製探討

由於膽固醇為難溶於水之脂質化合物，在水中的溶解度極低僅有 0.2 mg/dL，在 20 °C 下於乙醇中之溶解度為 1.29 % (w/w)。其分析溶液之配製必須加入適當之有機溶劑或介面活性劑方能將其均勻溶於水溶液中。但是所使用的有機溶劑及介面活性劑的種類及含量將直接影響到膽固醇氧化酶的活性。若是種類選擇錯誤或是含量過高有可能會使酵素結構產生變化，明顯改變與受質反應時結合位置(binding site)的立體結構；甚至使破壞(denature)整個酵素結構而使酵素活性迅速下降。實驗初步結果顯示極性強之有機溶劑以及離子型的介面活性劑如 SDS(sodium dodecyl sulfate)，對膽固醇氧化酶的活性有極大的影響，在 SDS 含量為 0.1 % 下其殘餘活性將趨近於零。因此，配製高濃度的膽固醇水溶液將是一大挑戰。

實驗配製樣品時先將膽固醇固體粉末溶於乙醇中，再加入非離子型介面活性劑 Triton X-100 混和均勻，加熱至 60 °C 使其完全溶解，最後加入緩衝溶液配至所需濃度。實驗若以 10 % 乙醇加 2 % Triton X-100 配製的膽固醇樣品於靜置後，僅 150 mg/dL 濃度以下的溶液可維持澄清。濃度大於 150 mg/dL 的膽固醇溶液於冷卻過程中溶液將逐漸產生白色混濁，當靜置過夜後白色混濁將會沈澱而觀察到分層的現象。若將此溶液加熱至 90 °C 於冷卻過程中溶液可回復至透明，但靜置降至室溫後白色混濁會再度產生。以此方法配製的膽固醇溶液作測試發現濃度達 150 mg/dL 時訊號即明顯下降，並不適合用來評估較高濃度之樣品。

若樣品配置時將膽固醇溶於乙醇中，再加入等重量比例的 Triton X-100 及 Span 20 介面活性劑混和均勻，加熱至 60 °C 溶解，最後加入緩衝溶液配至所需濃度。以 10 % 乙醇加 1 % Triton X-100 及 1 %

Span 20 配製的膽固醇樣品溶液皆呈白色微透明狀，濃度可配至 500 mg/dL，因此實驗便以此比例作為配製膽固醇溶液之依據。

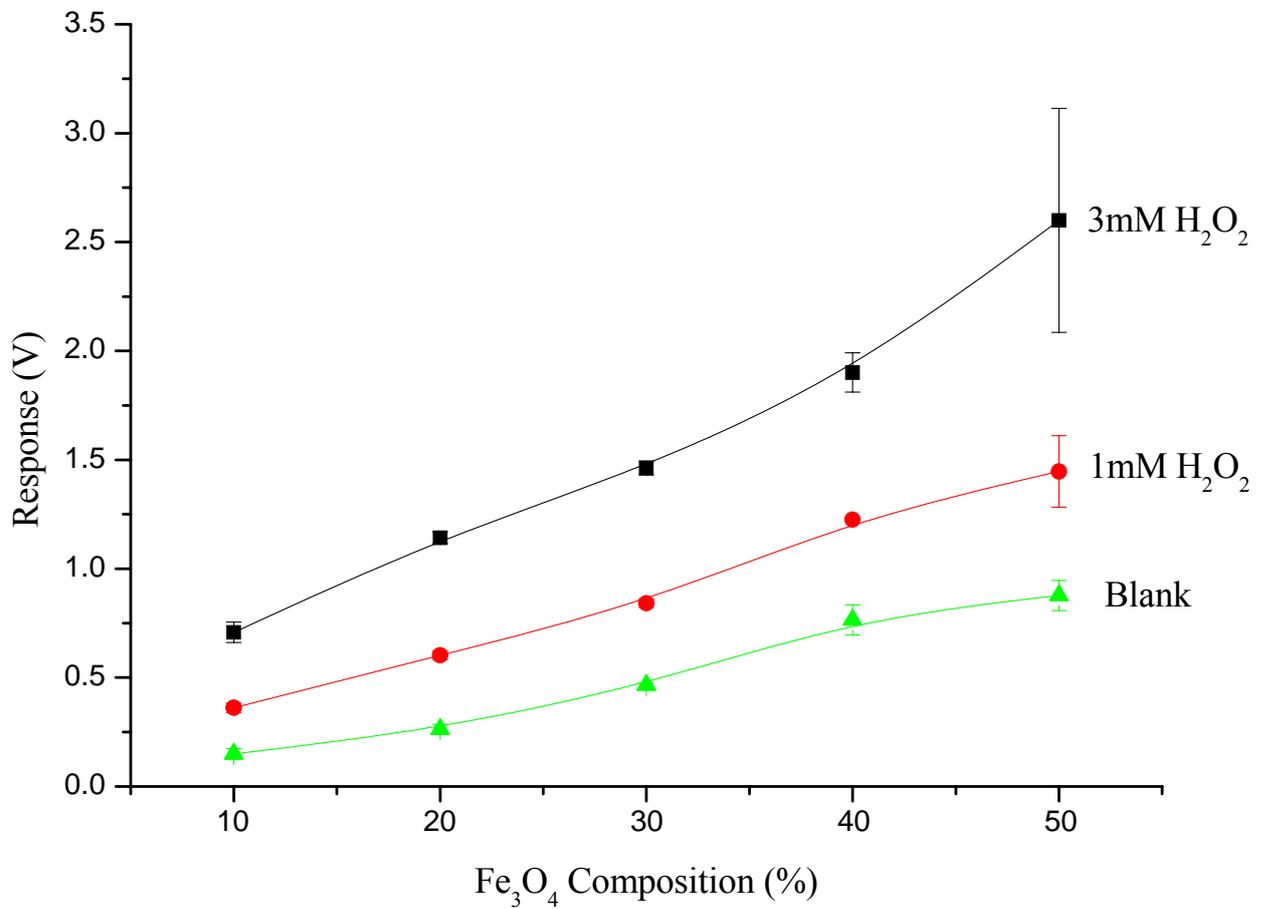
最佳化操作條件探討

催化劑含量探討

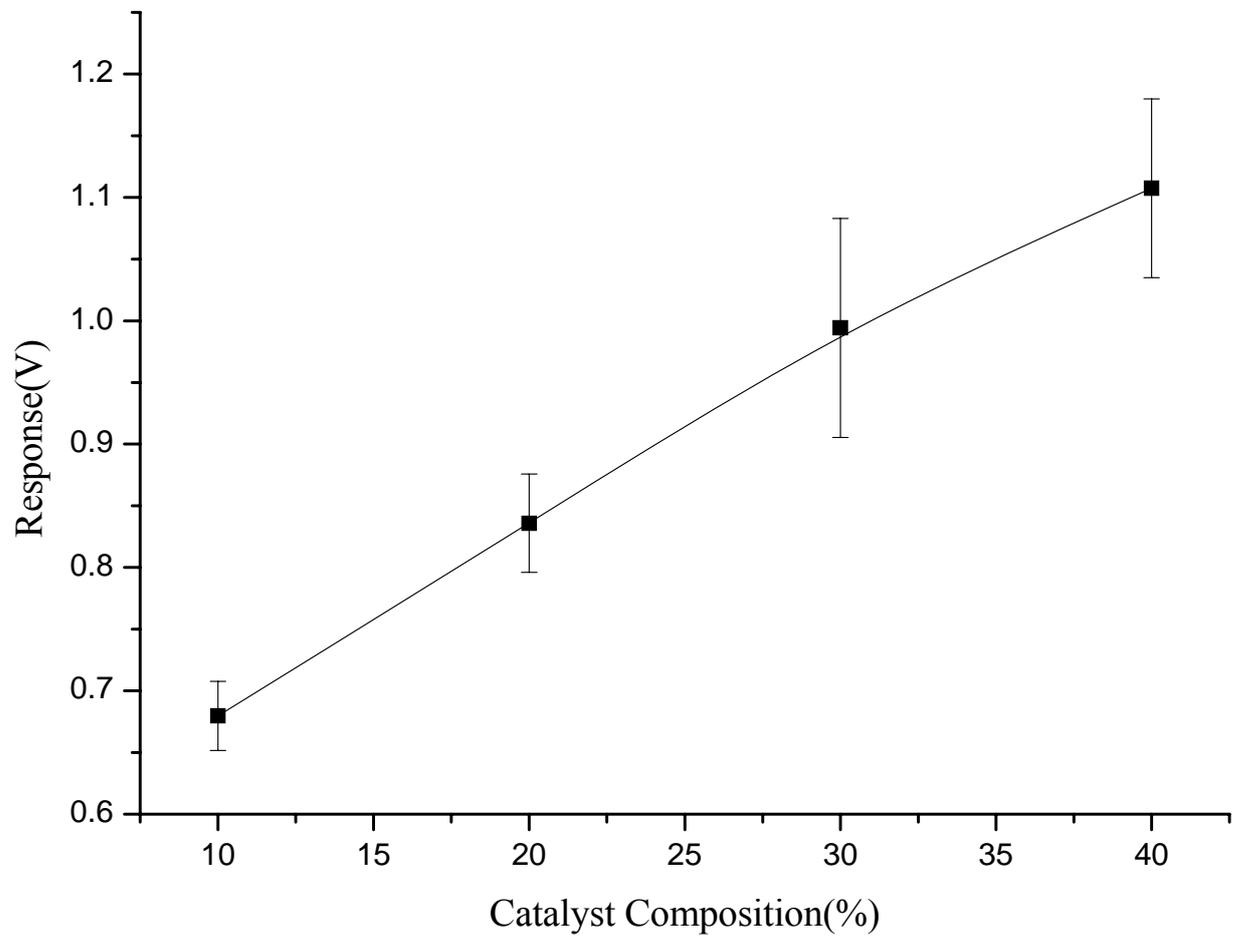
實驗中工作電極利用厚膜印刷技術印製，利用電化學方式偵測時訊號大小與與工作電極面積大小相關，而工作電極上催化劑含量多寡更直接影響到反應時反應物與電極面接觸時有效催化面積的大小。實驗分別印製含催化劑 10%~50% 之試片，以 0~3 mM 過氧化氫溶液作測試。圖(4)顯示催化劑含量在 10~40% 間隨過氧化氫濃度增加其響應電流幾乎成線性增加，當催化劑含量大於 40% 後訊號之變異明顯上升。同時可發現催化劑含量不僅影響催化電流大小亦影響偵測空白樣品時背景電流的大小，由圖上顯示偵測不含膽固醇之緩衝溶液時其電流響應亦隨催化劑之含量上升而上升。

在印製工作電極時若碳膠中催化劑含量大幅增加將會造成混合碳膠黏稠度的上升使得印製無法順利完成。因此，在印製前必須加入適當量之 cyclohexanone 作為稀釋劑以調整其黏稠度，稀釋劑的含量影響到印製電極試片的良率及完整性。實驗結果亦發現當催化劑濃度上升至 50% 以上時，會因為碳膠相對含量的減少使其固定催化劑的效果下降，在印製後工作電極上的催化劑比較容易在操作過程中有部份脫落的現象產生，此現象將使得分析之變異快速增加。

因此，在進一步偵測膽固醇樣品時僅選擇 10%~40% 之催化劑含量作為探討。實驗在試片印製後於工作電極上修飾膽固醇氧化酶，含量為 0.5 U/strip，並針對及 100 mg/dL 之膽固醇溶液作偵測，其結果如圖(5)所示。其訊號響應隨催化劑之含量上升亦成線性上升。因此綜合上述因素，實驗選擇催化劑組成 40% 為其最佳化之操作條件。



圖(4) 催化劑含量對過氧化氫響應之影響。樣品體積 10 μ L，外加電位為 -200 mV，0.05 M pH6 之磷酸鹽緩衝溶液中含 0.1 M NaCl，操作溫度 25 $^{\circ}$ C，取樣時間 5 秒。

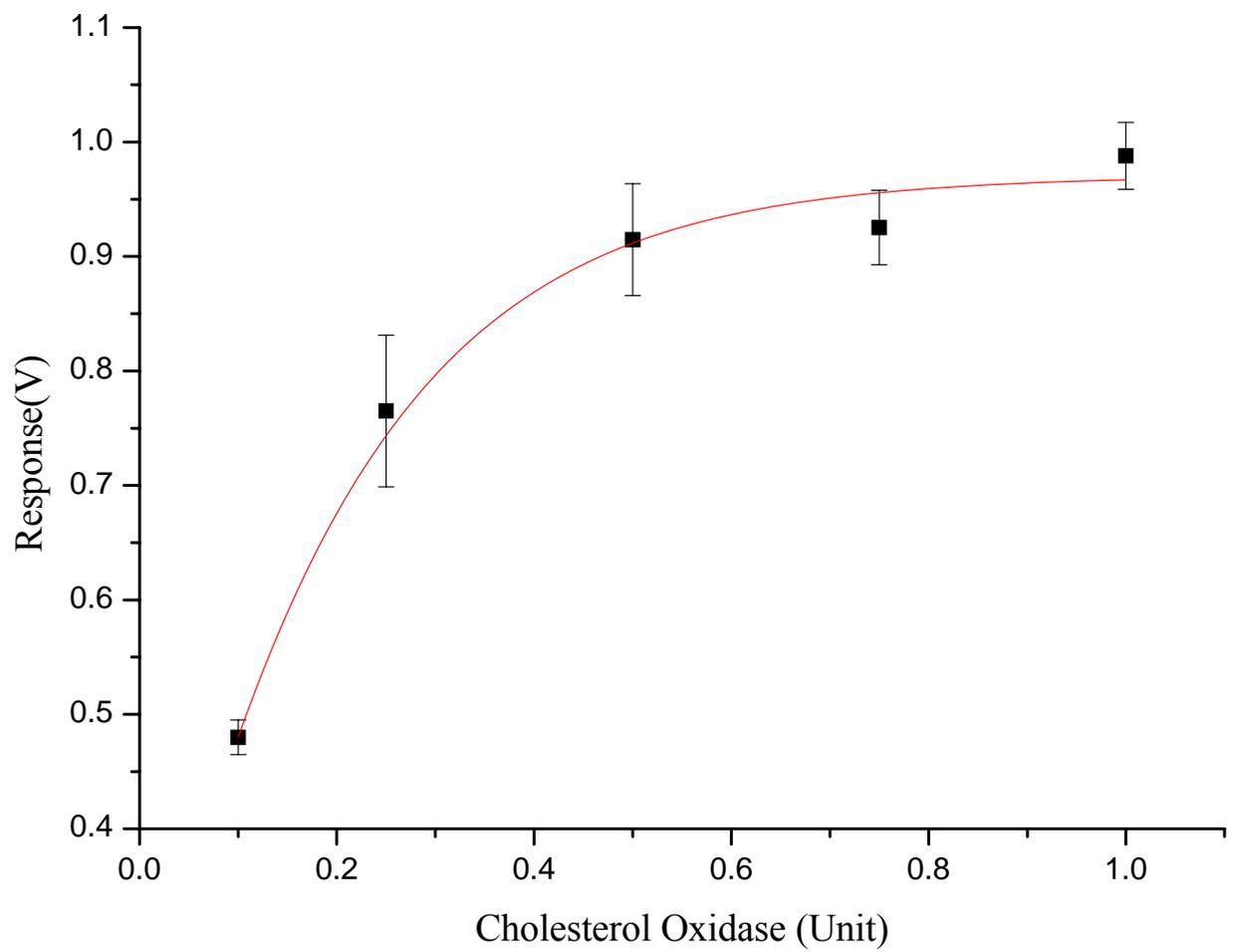


圖(5) 催化劑含量對膽固醇溶液之響應。膽固醇濃度 100 mg/dL、膽固醇氧化酶含量 0.5 U/strip，其餘操作條件如圖(4)。

酵素含量探討

膽固醇氧化酶含量直接影響此酵素反應時產生過氧化氫的速率，酵素含量的增加勢必增加反應的靈敏度。但是且酵素為大分子量之蛋白質分子，過量修飾於電極面上時遮蔽的效應並無法使所有酵素的活性位置充分與受質反應，反而會影響到反應物及產物在電極面上的質傳行為。此外，酵素本身並非良好之導體，過量將使電極表面阻抗增加影響電子的傳遞。另一方面由於測試溶液體積僅 10 μL 其中所含受質的含量勢必受到一定的限制。因此，綜合上述可能之影響因素，實驗探討酵素含量多寡對反應訊號的影響。

實驗固定膽固醇氧化酶含量在 0.1~1 U/strip 作探討，對 100 mg/dL 的膽固醇溶液作量測所得結果如圖(6)所示，由圖中顯示當酵素含量達 0.5 U/strip 之後訊號響應漸趨飽和。因此，本實驗選擇 0.5 U/strip 為酵素含量之最佳化操作條件。



圖(6) 酵素含量對膽固醇溶液之響應。膽固醇濃度 100 mg/dL、催化劑組成為 40%，反應時間 20 s，其餘操作條件如圖(4)。

電位探討

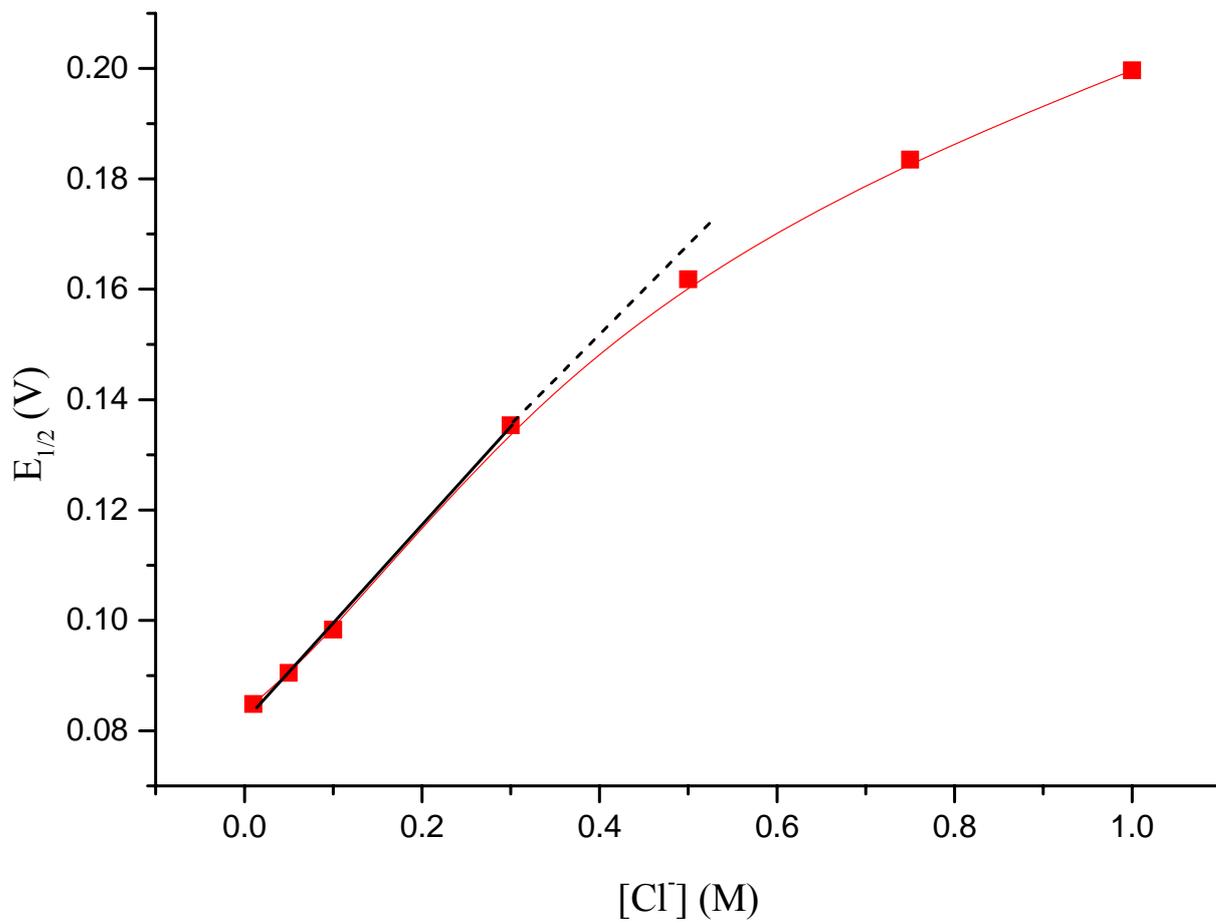
利用銀-氯化銀膠印製在試片上之Ag/AgCl作為參考電極作量測時，參考電極之電位將受到樣品溶液中氯離子濃度的影響，為了進一步瞭解電位的變化以控制參考電極的電位，探討了溶液中氯離子濃度對電位的影響，實驗以循環伏安法偵測 1mM $K_3Fe(CN)_6$ 在不同氯離子濃度下其氧化還原峰電位之變化，結果如圖(6)所示。由圖中發現氯離子濃度對電位之影響並不完全遵循Nernst方程式。



$$E_{ref} = E^0_{AgCl} - 0.0592 \log a_{Cl^-}$$

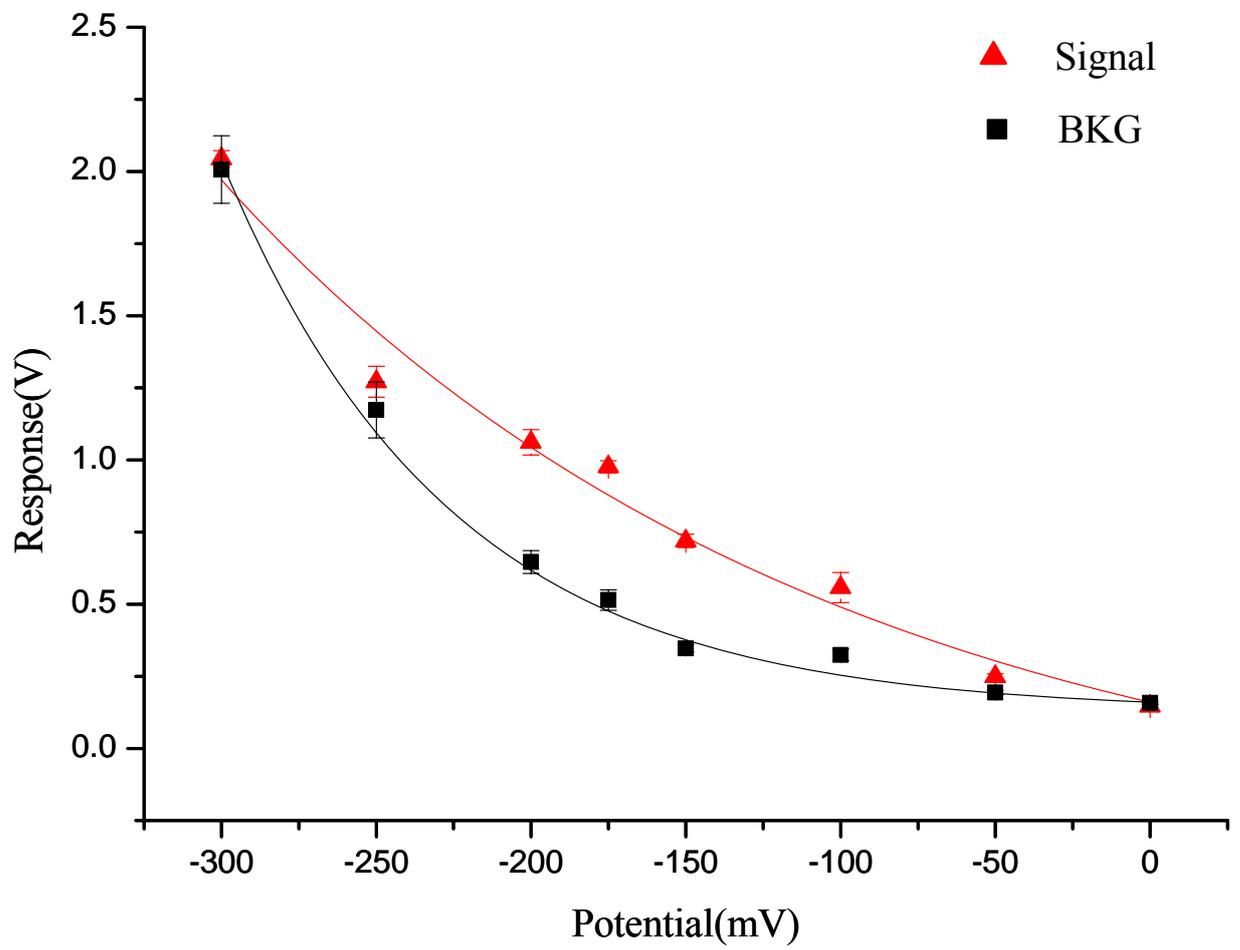
理論上參考電極之電位 E_{ref} 與氯離子活性 a_{Cl^-} 之關係可以由上式來表示，其電位隨氯離子活性之增加而減少。在溫度 25 °C 下當增加一個數量級之氯離子濃度時將可使電位往負方向移動 59.2 mV；相對的將使得 $K_3Fe(CN)_6$ 之氧化還原峰往正電位方向移動 59.2 mV。然而實驗發現 $K_3Fe(CN)_6$ 氧化還原之峰電位雖如預測般隨氯離子濃度增加往正電位方向移動，但是其變化值明顯大於原本之預測值。當氯離子濃度在 0.01 M~0.3 M範圍下，每改變一個數量級之濃度將造成 161 mV之電位變化。濃度在超過 0.3M後，由於活性與濃度間的差異明顯增加而使得此變化明顯偏離線性，結果如圖(7)所示。

由於血液樣品中之氯離子含量約在 0.1 M，因此考量未來感測器在實際臨床之應用，在製備游離膽固醇溶液樣品時添加 0.1 M NaCl 來控制氯離子之濃度。因此，實驗比較了在含有 0.1 M氯離子濃度之 0.05 M磷酸緩衝溶液中，使用銀-氯化銀膠印製之參考電極與商品化標準之 3 M $[Cl^-]$ 之Ag/AgCl參考電極在偵測 $K_3Fe(CN)_6$ 所得到循環伏安圖中之峰電位所產生差異。其 $E_{1/2}$ 分別為 98.3 mV及 207 mV，印製之參考電極使外加電位往負方向偏移了 108.7 mV。

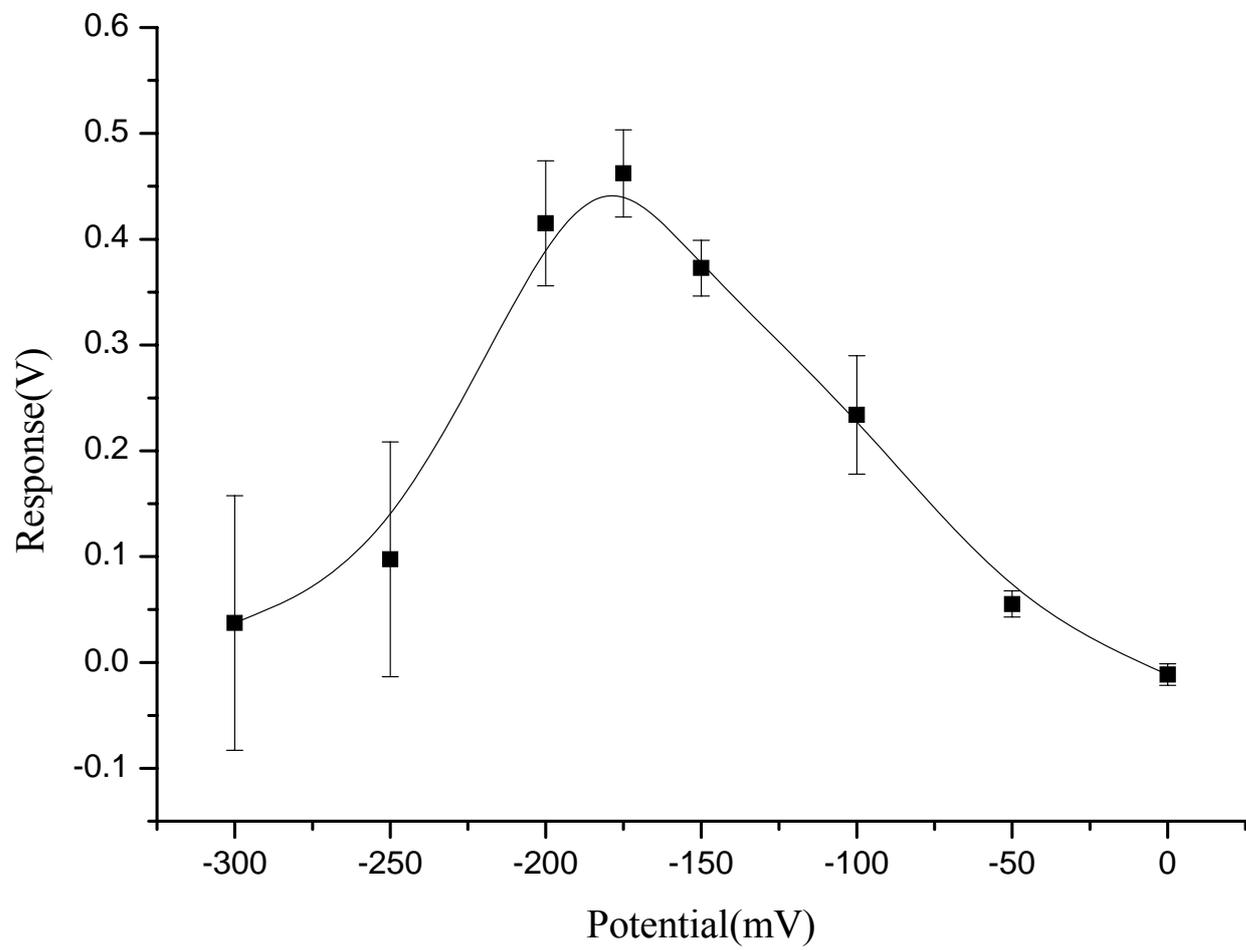


圖(7) 氯離子濃度對電位影響之探討。以印刷式Ag/AgCl為參考電極，1 mM $K_3Fe(CN)_6$ 、0.05 M磷酸鹽緩衝溶液。

以熱力學的角度來看，外加電位是為了提供化學反應適當的活化能以克服反應的能量障壁，它影響到催化反應的進行與否；但同時亦影響其動力(kinetic)反應，亦即反應物與催化劑之間電子的傳遞速率。實驗探討外加電位在 0 mV ~ -300 mV (vs. Ag/AgCl, 0.1 M NaCl) 間偵測游離膽固醇溶液之響應。由圖(8)可以發現訊號響應隨施加電位往負電位移動而增加；但是相對的背景電流亦隨施加電位往負電位移動而增加。因此，將背景電流的影響扣除後，電位對靈敏度的影響如圖(9)所示，當外加電位於 0 ~ -175 mV 間隨電位往負電位移動而增加，於 -175 mV 時達最大值；但是當電位再往負方向移動時訊號卻明顯下降，於 -300 mV 時幾乎趨近於零，且測量之標準偏差亦隨之增加。造成此現象之原因是由於外加電位超過 -200 mV 之後，氧氣的還原反應明顯產生，不僅造成背景電流的增加而且消耗樣品中的氧氣所造成。



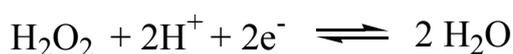
圖(8) 背景電流與訊號響應在不同電位下之比較。膽固醇氧化酶含量為 0.5 U/strip，其餘操作條件如圖(5)。



圖(9) 外加電位對訊號響應的影響。其餘操作條件如圖(8)。

酸鹼值探討

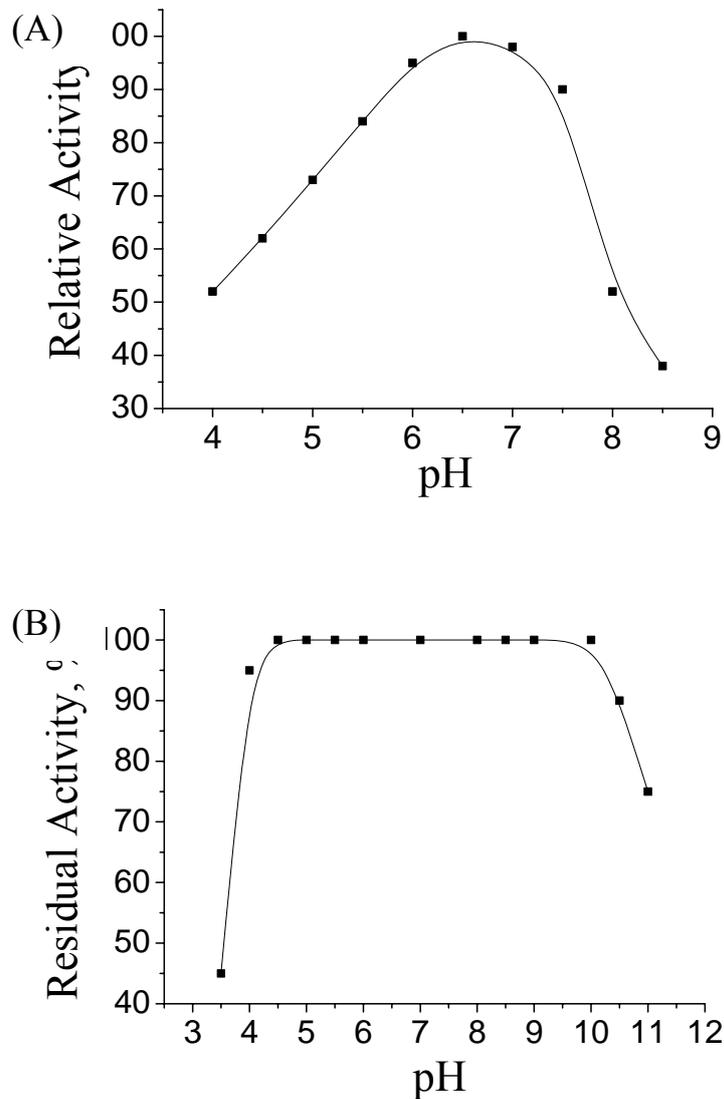
酸鹼度對偵測系統的影響可分為兩部分來探討，一是催化劑催化過氧化氫還原的特性受pH值之影響；另一是修飾於試片上的酵素活性受pH值的影響。由下列過氧化氫還原之化學反應式可以發現，當一個過氧化氫分子還原為水的過程中將伴隨著兩個氫離子及兩個電子參與反應。因此，預期催化反應的電流將隨著溶液pH值的降低而相對的增加。實驗結果顯示以Fe₃O₄修飾之感測試片於偵測過氧化氫還原時其響應電流將隨著溶液酸鹼值的下降而明顯增加，此結果顯示Fe₃O₄催化過氧化氫還原的特性符合上述之推論。



此外，在此感測系統中另一個受溶液酸鹼性影響的便是修飾於試片上當作辨識元的酵素。酵素為一胺基酸鏈所構成之蛋白質結構，其上胺基酸側鏈具有弱酸或弱鹼之特性，此特性常對酵素之活性扮演重要之角色。溶液的酸鹼值會改變活性位置(activity site)其離子化(ionization)的狀態，甚至在此影響下改變蛋白質之結構，此變化將影響酵素對受質反應時之活性表現。因此，實驗探討修飾於電極試片上的膽固醇氧化酶其活性受溶液酸鹼值之影響，由圖(10)可以發現^(xxviii)，在pH6.5~pH7.0之間膽固醇氧化酶存有最大的酵素活性。在pH5.0~pH7.0之間膽固醇氧化酶具有最大的酵素穩定性。

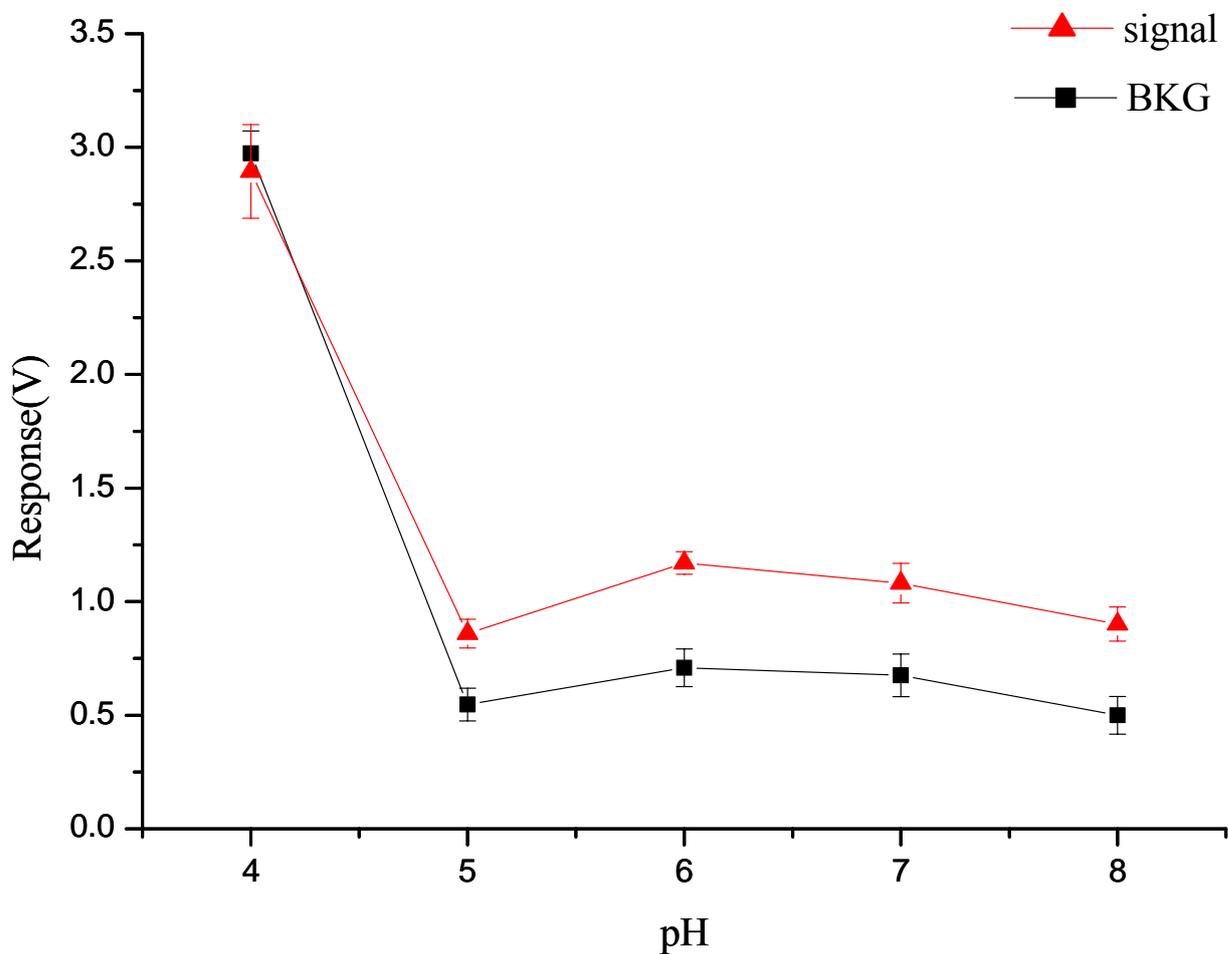
綜合催化劑及酵素兩項因素對溶液酸鹼度的影響，實驗探討游離膽固醇溶液在pH4~pH8之影響其結果如圖(11)所示。在pH5~8之溶液其訊號響應的變化隨著pH的下降訊號響應上升，至pH6之後訊開始下降；低於pH5後訊後極劇上升。進一步探討發現於低pH值下此感測試片之背景電流將急遽升高。因此，扣除背景電流之影響後100

mg/dL 之游離膽固醇溶液在不同 pH 值下所產生之電流響應如圖(12)所示，於 pH6 有最大的靈敏度。因此，溶液之酸鹼值以 pH6 為最佳化之操作條件。

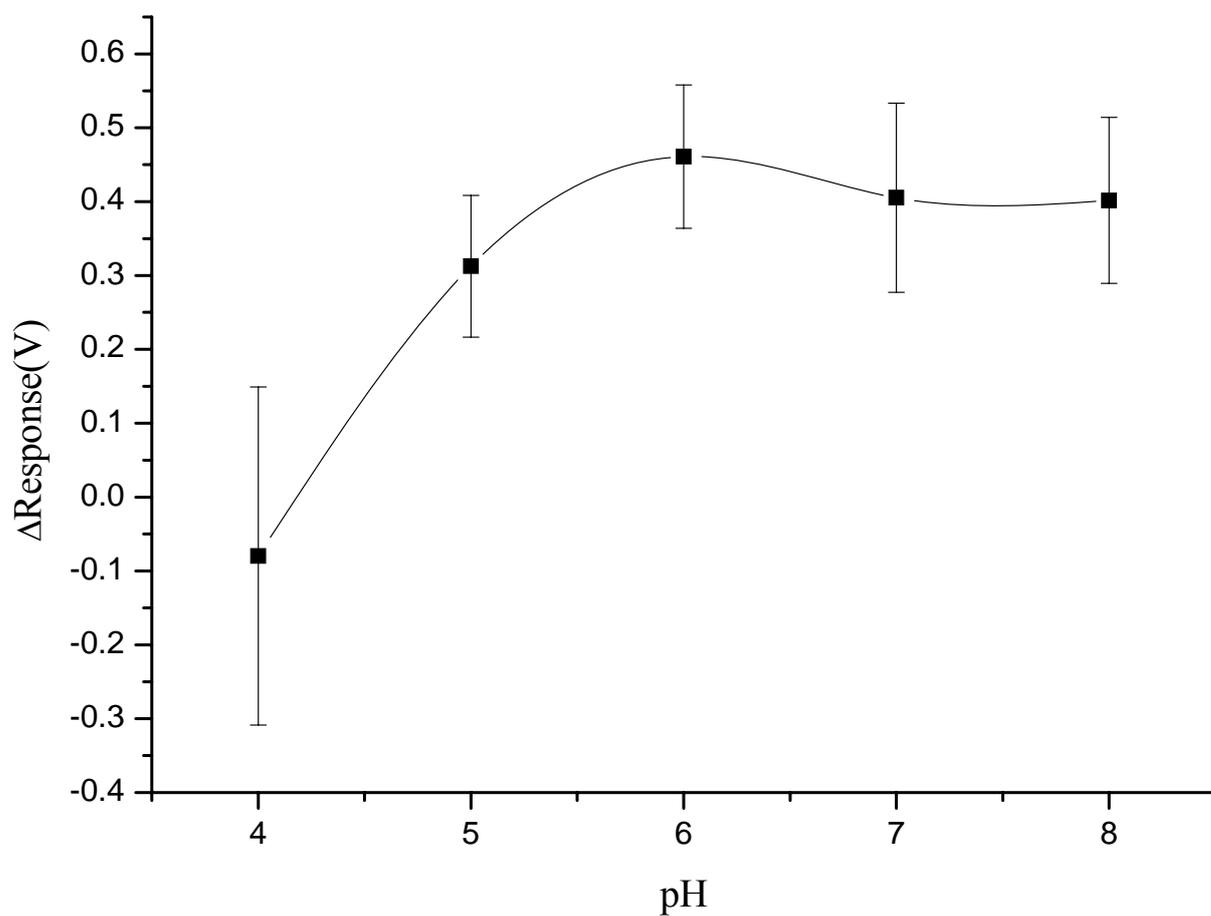


圖(10) 膽固醇氧化酶活性與酸鹼值之關係圖。(A)pH 與酵素活性之關係；(B)pH 與酵素穩定性之關係。

資料來源：Toyobo enzymes 2002-2003, TOYOBO CO., LTD. Japan.



圖(11) 背景電流與訊號響應在不同酸鹼值緩衝溶液下之比較圖，外加電位為 -175 mV ，其餘條件如圖(9)。

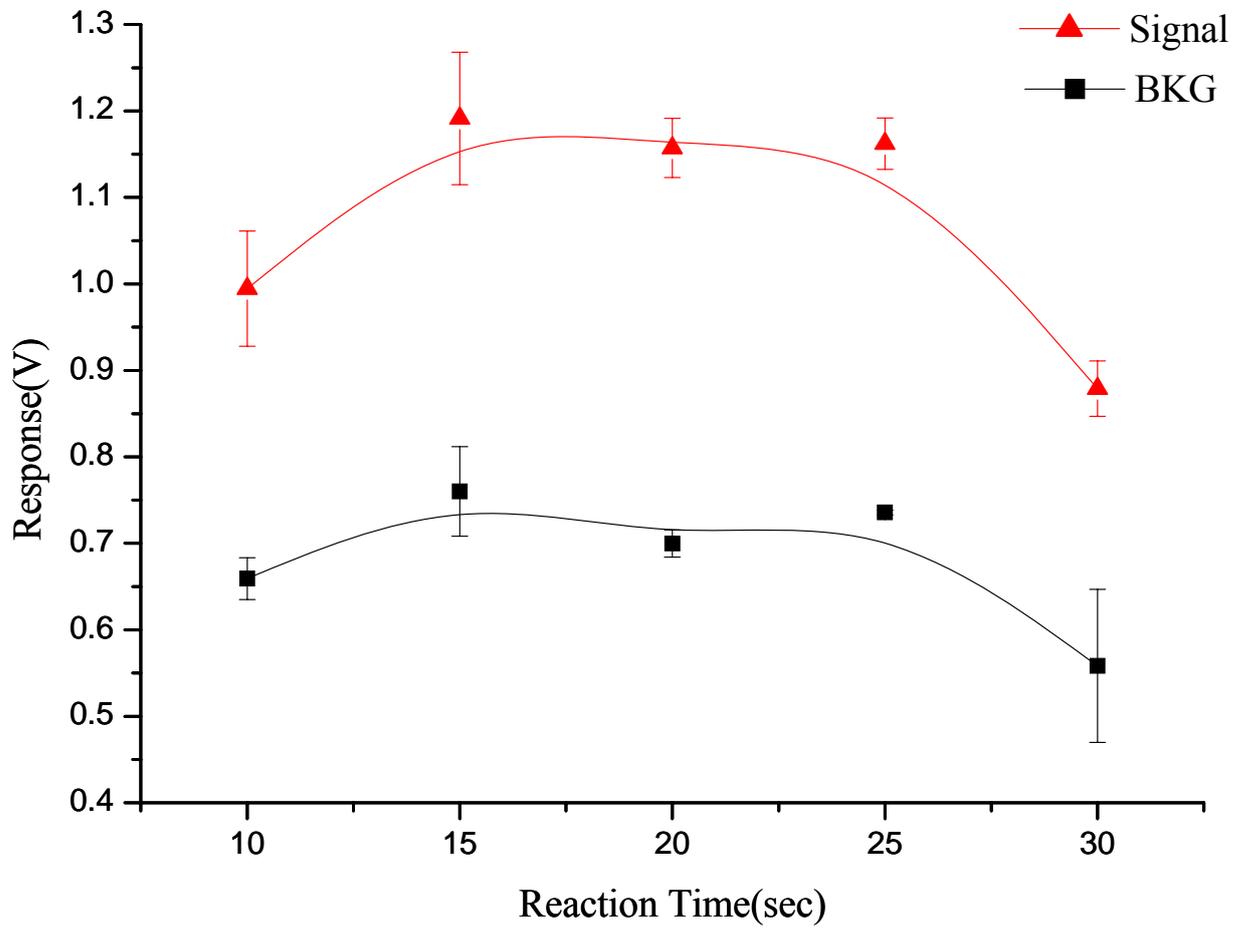


圖(12) 緩衝溶液酸鹼值對訊號之影響。訊號響應扣除背景電流之結果，偵測條件如圖(11)。

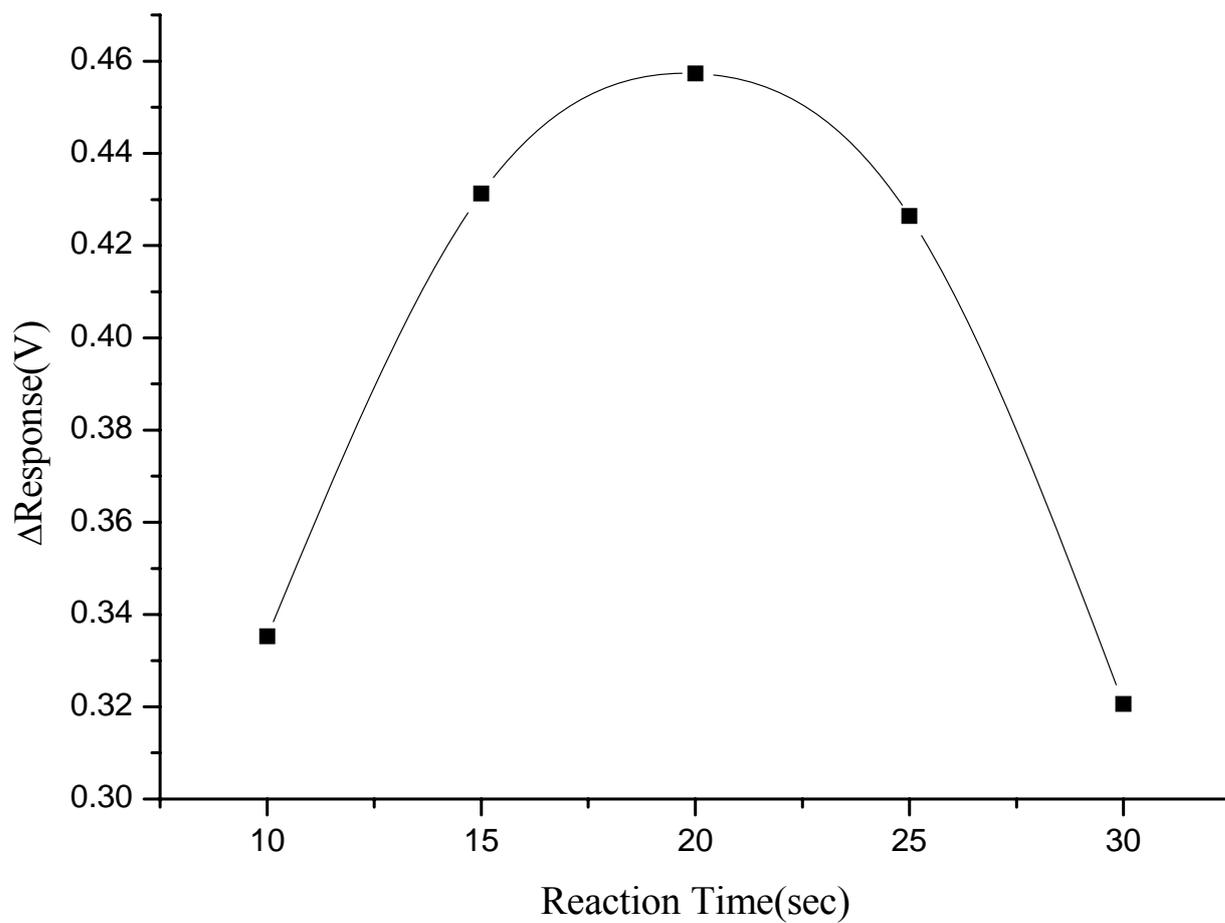
反應時間探討：

實驗時之操作步驟是先將分析溶液滴於感測試片之工作電極上，然後執行 Labview 程式控制前置之反應時間後再施加還原電位做量測。所設定的前置反應時間長短與訊號響應的表現有直接的關係。此變因牽涉到修飾於電極面上的酵素於乾燥狀態下接觸分析溶液回潮後活性回復的速度，以及酵素與膽固醇反應後所產生過氧化氫的濃度含量有關。此外試片電極其背景電流的大小亦與其與溶液接觸後的時間有關，當溶液與乾燥之試片電極接觸後部分溶液將滲入電極表面孔隙中而改變其電極表面積之大小及其表面之性質而造成背景電流的改變。

實驗探討前置反應時間在 10~30 秒之間對訊號響應的影響，結果如圖(13)所示。訊號響應在 15 秒之前隨前置反應時間增加而上升，在 15~25 秒之間訊號趨於穩定，超過 25 秒後訊號下降；背景電流亦有相同之變化趨勢。當扣除背景電流之影響後，結果如圖(14)所示，於 20 秒處具有最大之靈敏度。因此，實驗選擇前置反應時間 20 秒為最佳化之操作條件。



圖(13) 背景電流與訊號響應在不同前置反應時間下之比較。其餘操作條件同圖(11)。



圖(14) 反應時間之探討。訊號響應扣除背景電流之結果，偵測條件如圖(13)。

表(2) 游離膽固醇生化感測器之最佳化操作條件

探討項目	最佳化條件
催化劑組成	40 % Fe ₃ O ₄
酵素組成	0.5 U/strip
緩衝溶液	0.05 M pH6 磷酸緩衝溶液，含 0.1 M NaCl
施加電位	-175 mV (vs. Ag/AgCl, 0.1M NaCl)
反應時間	20 s
※ 膽固醇樣品濃度 100 mg/dL，體積 10 μ L，溫度 25 $^{\circ}$ C。 ※ 樣品以含有 10 % EtOH、1 % Triton X-100、1 % Span20、0.1 M NaCl、0.05 M pH6 之磷酸緩衝溶液配製。	

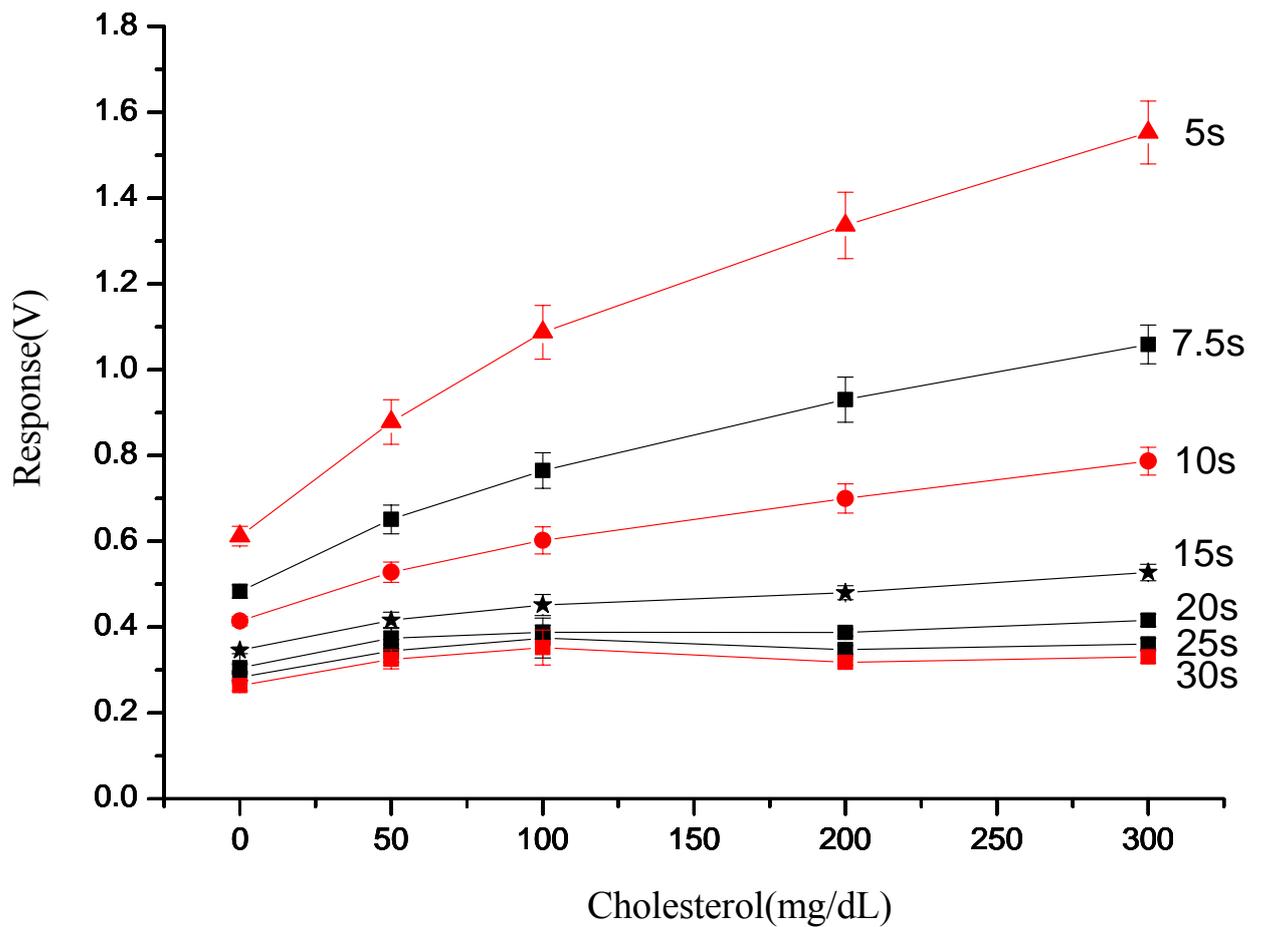
分析特性評估

取樣時間探討：

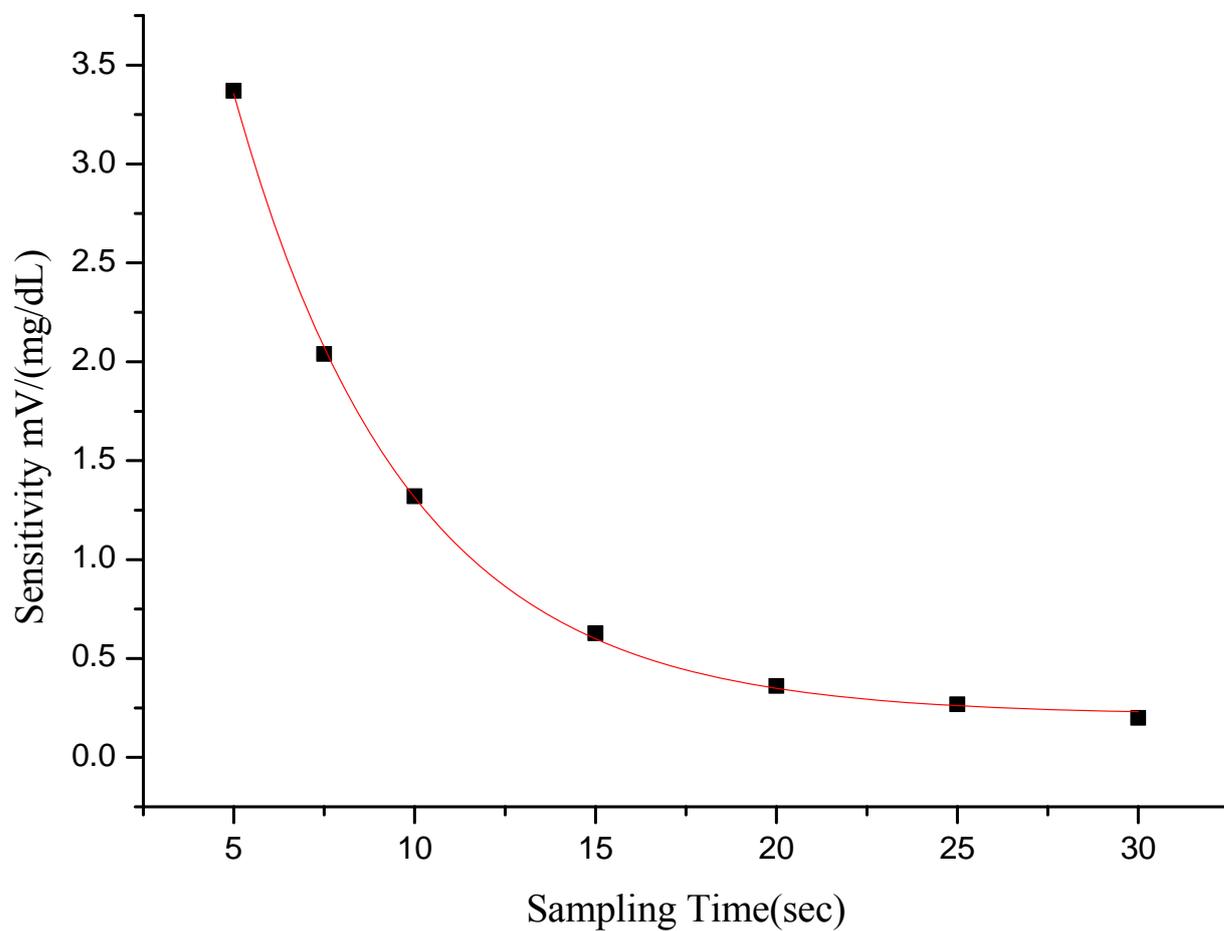
實驗分析在膽固醇濃度 0~300 mg/dL，及取樣時間在 5~30 秒間訊號響應的差異，結果如圖(15)所示。此處之取樣時間為量測時訊號擷取之時間。由數據中發現靈敏度隨取樣時間增加而下降，且線性範圍之關係亦會隨取樣時間增加而減小。實驗顯示取樣時間超過 20 秒後，濃度在 100 mg/dL 以上之樣品其響應訊號已經明顯之差異。將靈敏度對取樣時間作圖，結果如圖(16)所示。因此，實驗選擇取樣時間在 5 秒鐘作分析，此時有最短的時間及最好的靈敏度且有較長之線性範圍。

在計時安培法中響應電流基本上應遵循 Cottrell equation， $i_t = nFAC^{\circ} D_0^{1/2} \pi^{-1/2} t^{-1/2}$ 之描述，在其他條件固定的狀態下響應電流應僅為分析物濃度及時間之函數， $i_t = K C^{\circ} t^{-1/2}$ 。因此，在相同分析物濃度下，響應電流勢必隨著時間的增加而逐漸下降，相對的靈敏度亦會

隨之降低。此外，由於此感測器偵測樣品之體積僅 $10 \mu\text{L}$ ，在較長時間的反應下，樣品中分析物濃度將逐漸下降而無法提供足夠之受質與酵素反應，這是可能導致偵測線性無法延長的另一重要原因。



圖(15) 取樣時間對訊號響應之影響。反應時間 20 秒，其他偵測條件如圖(13)。



圖(16) 不同取樣時間下之靈敏度探討。反應時間 20 秒，其他偵測條件如圖(13)。

校正曲線與再現性之評估

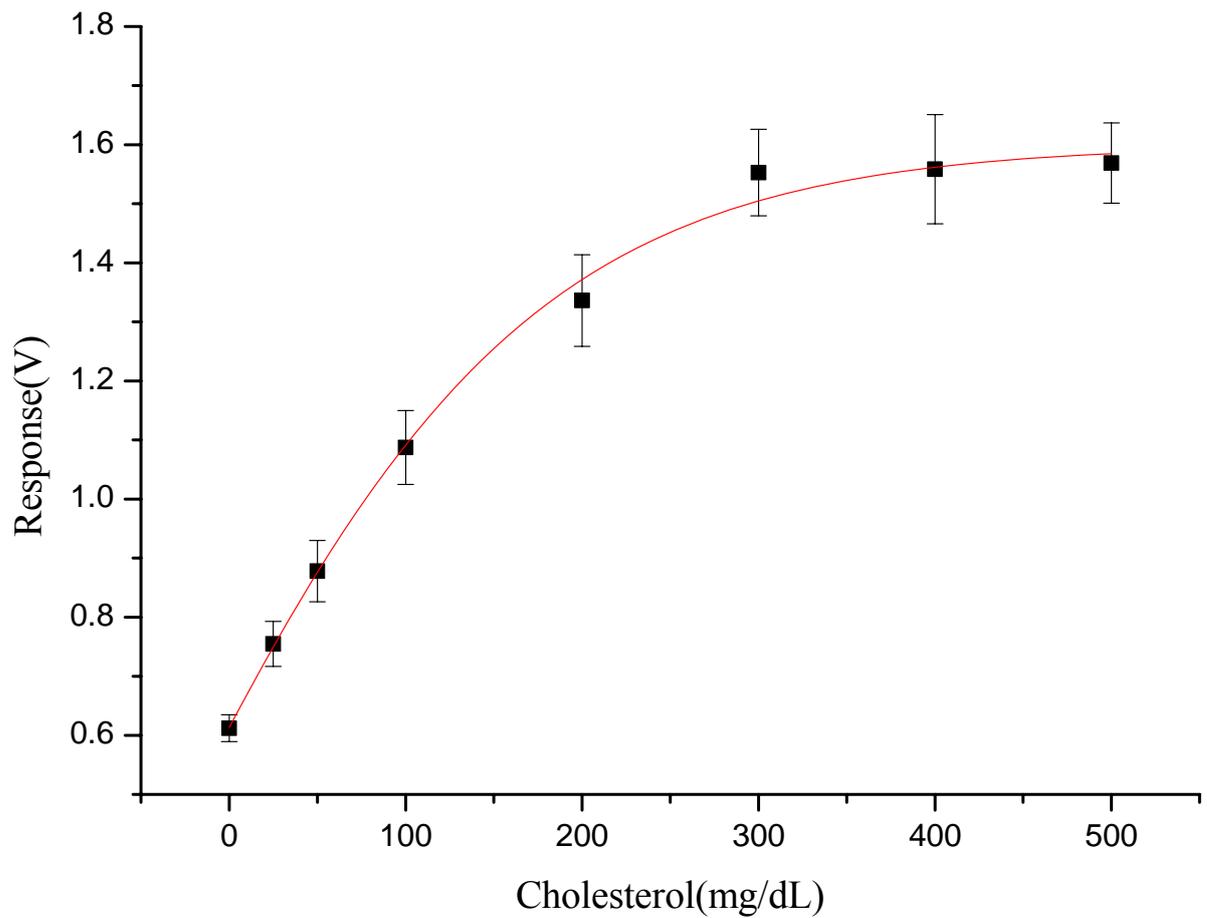
在最佳化操作條件下偵測不同濃度之游離膽固醇溶液，所得游離膽固醇濃度對訊號響應之關係如圖(17)所示，其可偵測之濃度範圍達 300 mg/dL，濃度超過 300 mg/dL則訊號幾乎完全趨於飽和。分析訊號在濃度為 25 mg/dL~100 mg/dL範圍內之線性關係，其相關係數R為 0.998，靈敏度為 4.45 mV/(mg/dL)；在濃度 100 mg/dL~300 mg/dL範圍內之線性關係，其相關係數R為 0.999，靈敏度為 2.33 mV/(mg/dL)。在濃度 300 mg/dL範圍內以二項式fit得到訊號Y與濃度X之關係為 $Y = 0.61658 + 0.00536X - 7.65475 \times 10^{-6}X^2$ 。若將響應訊號與膽固醇濃度皆取對數計算則作圖後可得到如圖(18)之線性關係，線性範圍達 300 mg/dL其相關係數為 0.999。

實驗針對 20 支游離膽固醇電極試片作再現性之評估，以濃度 100 mg/dL之游離膽固醇溶液偵測，所得訊號響應之平均值為 1.026 V，其相對標準偏差為 4.60 %。此外，藉由分析不含游離膽固醇之空白樣品 20 次所得之訊號，其平均訊號響應為 0.605 V，標準偏差為 28.75 mV，由下列算式估計在S/N=3 下其偵測極限為 17.6 mg/dL。式中 S_m 為最小可分析之訊號、 C_m 為最小可分析之濃度、 S_{bl} 為空白測試之平均訊號、 s_{bl} 為空白測試之標準偏差、 m 為分析之靈敏度。

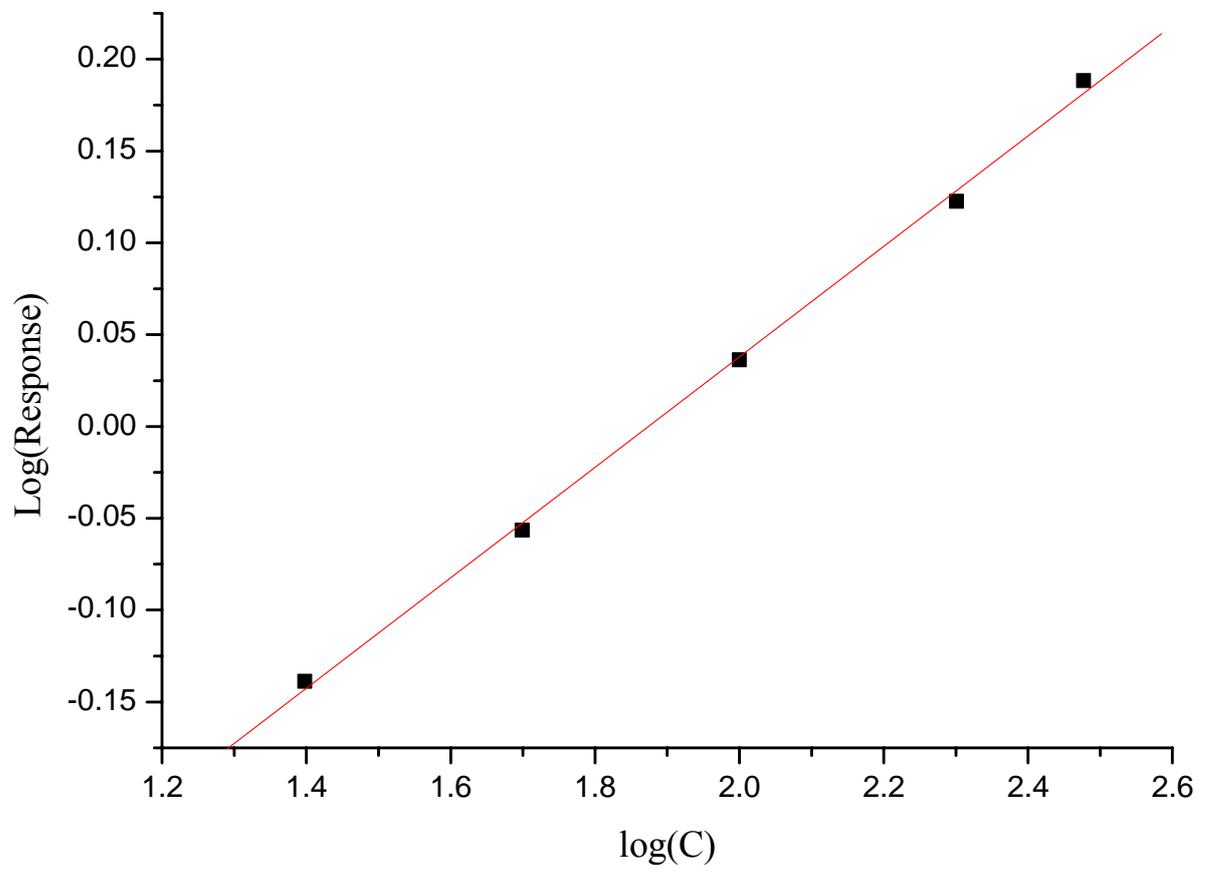
$$S_m = S_{bl} + k s_{bl}$$

$$C_m = (S_m - S_{bl}) / m = (S_{bl} + k s_{bl} - S_{bl}) / m = k s_{bl} / m$$

$$\text{當 } S/N=3 \text{ 時 } k=3, C_m = 3 s_{bl} / m$$



圖(17) 游離膽固醇濃度對訊號響應之關係圖。電位-175 mV，含 0.1 M NaCl 之 0.05 M pH6 磷酸緩衝溶液，反應時間 20 秒，取樣時間 5 秒，溫度 25 °C。



圖(18) 校正曲線，膽固醇濃度之訊號響應取對數作圖。偵測條件如圖(17)。

干擾物探討

在干擾物測試中，實驗以膽固醇感測試片分別針對人體中可能存在的電活性物種及一般生化樣品中所含有之物質來作分析，選擇的干擾物包括 glucose 500 mg/dL， uric acid、urea、creatine、creatinine、lactic acid、dopamine、ascorbic acid 各 20 mg/dL 以及三種常見的藥物 aspirin、salicylic acid、acetaminophen 各 20 mg/dL。測試中並沒觀察到這些物種有明顯的干擾產生。

表(3)之干擾比例為干擾物之響應訊號，相對於 100 mg/dL 膽固醇溶液訊號差異之比值，由實驗結果顯示其差異皆小於 $\pm 3.2\%$ 。然而 1% (w/w) 血紅素(hemoglobin)對系統會造成嚴重的干擾，干擾可達 35.2%。血紅素本身具有電活性，在 -175 mV (vs. Ag/AgCl, 0.1M NaCl) 之操作電位下會產生還原反應之訊號而觀察到干擾的現象。但是血液中血紅素存在於紅血球細胞中，因此，未來在應用於血液樣品偵測時，樣品若沒有紅血球破裂的情況下，將不會有明顯的干擾產生。詳細之分析數據如表(3)所示。

結論

本實驗成功利用厚膜印刷技術製備拋棄式之膽固醇感測試片，並建立可攜式之自製電化學感測儀，配合Labview程式作儀器之控制及數據之擷取，完成此一游離膽固醇之感測系統。此系統可分析濃度範圍在 300 mg/dL以下之膽固醇溶液樣品，已可符合臨床檢測上大部分濃度的需求；並具有良好之再現性。而試片中 Fe_3O_4 催化劑的修飾使得偵測電位下降至 -175 mV (vs. Ag/AgCl, 0.1M NaCl)；在干擾物測試中除hemoglobin外幾乎無明顯之干擾產生，而具有良好之選擇性。未來將可進一步發展以運用於生化樣品的分析。

表(3) 干擾物之探討

分析項目	濃度	干擾比例
glucose	500 mg/dL	+1.15 %
uric acid	20 mg/dL	+1.25 %
urea	20 mg/dL	-1.35 %
creatine	20 mg/dL	-0.55 %
creatinine	20 mg/dL	-2.20 %
lactic acid	20 mg/dL	-1.20 %
dopamine	20 mg/dL	+1.88 %
ascorbic acid	20 mg/dL	+3.08 %
aspirin	20 mg/dL	+2.82 %
salicylic acid	20 mg/dL	+3.18 %
acetaminophen	20 mg/dL	+2.20 %
hemoglobin	1 %	+35.2 %

ⁱ A.M.C.F. O. Brett, M.H. Gil, A.P. Piedade, An electrochemical bienzyme membrane sensor for free cholesterol, *Bioelectrochem. Bioenergetics* 28 (1992) 105-115.

ⁱⁱ A. Kumar, G. D. Christian, Enzymatic assay of total cholesterol in serum or plasma by amperometric measurement of rate of oxygen depletion following sAponification, *Clin. Chim. Acta* 74 (1977) 101-108.

ⁱⁱⁱ A. Noma, K. Nakayama, Polarographic method for rapid microdetermination of cholesterol with cholesterol esterase and cholesterol oxidase, *Clin. Chem.* 22 (1976) 336-340.

-
- ^{iv} M.D. Marazuela, B. Cuesta, M.C. Moreno-Bondi, A. Quwjido, Free cholesterol fiber-optic biosensor for serum samples with simplex optimization, *Biosen. Bioelectro.* 12 (1997) 233-240.
- ^v Y. Hung, C. Zhang, Z. Zhang, Chemiluminescence flow biosensor system for cholesterol with immobilized reagents, *Anal. Sci.* 15 (1999) 867-870.
- ^{vi} M. Situmorang, P. W. Alexander, D. B. Hibbert, Flow injection potentiometry for enzymatic assay of cholesterol with a tungsten electrode sensor, *Talanta* 49 (1999) 639-649.
- ^{vii} M. Mascini, M. Ianello, G. Palleschi, Enzyme electrodes with improved mechanical and analytical characteristics obtained by binding enzymes to nylon nets, *Anal. Chim. Acta* 146 (1983) 135-148.
- ^{viii} O. Baticz, S. Tomoskozi, Determination of total cholesterol content in food by flow injection analysis with immobilized cholesterol oxidase enzyme reactor, *Nahrung/Food*, 1 (2002) 46-50.
- ^{ix} H. Kumar, A. Kumar, P. Kumar, S. Jyotirmai and N. B. Tulsani, Immobilization of cholesterol oxidase on formvar using organic solvents, *Biotech. Appl. Biochem.* 30 (1999) 231-233.
- ^x C. C. Lin and M. C. Yang, Cholesterol oxidation using hollow fiber dialyzer immobilized with cholesterol oxidase: preparation and properties, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 361-364.
- ^{xi} M.A.T. Gilmartin, J.P. Hart, Fabrication and characterization of a screen-printed, disposable, amperometric cholesterol biosensor, *Analyst* 119 (1994) 2331-2336.
- ^{xii} N. Pena, G. Ruiz, A. J. Reviejo, and J. M. Pingarron, Graphite-teflon composite bienzyme electrodes for the determination of cholesterol in reversed micelles Application to food samples, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1190-1195.

-
- ^{xiii} J.C. Vidal, E. Garcia, J.R. Castillo, Development of a platinized and ferrocene-mediated cholesterol amperometric biosensor based on electropolymerization of polypyrrole in a flow system, *Anal. Sci.* 18 (2002) 537-542.
- ^{xiv} G.J. Moody, G.S. Sanghera, J.D.R. Thomas, Amperometric enzyme electrode system for the flow injection analysis of glucose, *Analyst* 111 (1986) 605.
- ^{xv} J.C. Vidal, E. Garcia, J.R. Castillo, In situ preparation of a cholesterol biosensor: entrapment of cholesterol oxidase in an overoxidized polypyrrole film electrodeposited in a flow system- Determination of total cholesterol in serum, *Anal. Chim. Acta* 385 (1999) 213-222.
- ^{xvi} J.C. Vidal, E. Garcia-Ruiz, J.R. Castillo, Design of a multilayer cholesterol amperometric biosensor for preparation and use in flow systems, *Electroanalysis* 13 (2001) 229-235.
- ^{xvii} H. Wang, S. Mu, Bioelectrochemical characteristics of cholesterol oxidase immobilized in a polyaniline film, *Sens. Actuators B* 56 (1999) 22-30.
- ^{xviii} J.C. Vidal, E. Garcia, J.R. Castillo, In situ preparation of overoxidized PPy/oPPD bilayer biosensors for the determination of glucose and cholesterol in serum, *Sens. Actuators B* 57 (1999) 219-226.
- ^{xix} D. Centonze, C. Malitesta, F. Palmisano and P. G. Zambonin, *Electroanalysis* 6 (1994) 423.
- ^{xx} T. Yao, K. Takashima, Amperometric biosensor with a composite membrane of sol-gel derived enzyme film and electrochemically generated poly(1,2-diaminobenzene)film, *Biosens. Bioelectron* 13 (1998) 67-73.
- ^{xxi} A. Kumar, R. Malhotra, B.D. Malhotra, S.K. Grover, Co-immobilization of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase in a

sol-gel film, *Anal. Chim. Acta* 414 (2000) 43-50.

^{xxii} G. J. Moody, G. S. Sanghera, J. D. R. Thomas, Factor concerning the design and calibration of an amperometric enzyme electrode system for the flow injection analysis of cholesterol, *Analyst* 113 (1988) 1419-1422.

^{xxiii} T. Nakaminami, S. Kuwabata, H. Yoneyama, Electrochemical oxidation of cholesterol catalyzed by cholesterol oxidase with use of an artificial electron mediator, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2367-2372.

^{xxiv} J.C. Vidal, E. Garcia-Ruiz, J.R. Castillo, Strategies for the improvement of an amperometric cholesterol biosensor based on electropolymerization in flow systems: use of charge-transfer mediators and platinization of the electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2000) 51-63.

^{xxv} L. Charpentier, N. E. Murr, Amperometric determination of cholesterol in serum with use of a renewable surface peroxidase electrode, *Anal. Chim. Acta* 318 (1995) 89-93.

^{xxvi} J. Li, T. Peng, Y. Peng, A cholesterol biosensor based on entrapment of cholesterol oxidase in a silicic sol-gel matrix at a prussian blue modified electrode, *Electroanalysis* 15 (2003) 1031-1037.

^{xxvii} R.C. Srivastava, R. Sahney, S. Upadhyay, R.L. Gupta, Membrane permeability based cholesterol sensor –A new possibility, *J. Membr. Sci.* 164 (2000) 45-49.

^{xxviii} Toyobo enzymes 2002-2003 catalog , TOYOBO CO., LTD. Japan.