

中華民國第 51 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 化學科

第二名

最佳(鄉土)教材獎

040214

胺能辨魚新鮮否？

—金奈米之胺類分子檢測研究

學校名稱：國立臺中女子高級中學

作者： 高二 吳宜桓 高二 黃冠瑜 高二 王沂芊	指導老師： 陳鴻仁
-----------------------------------	--------------

關鍵詞：金奈米、魚類新鮮度、修飾劑

胺能辨魚新鮮否？—金奈米之胺類分子檢測研究

摘要

我們利用敏感度高的奈米級金粒子溶液檢測樣品中特定胺類分子。依據魚類在不同腐敗程度下會釋放不同濃度的胺類分子，且奈米金粒子與胺類分子結合後會因濃度高低改變而影響其粒徑大小，進而影響溶液的顏色，便可藉此檢測魚類的新鮮度。我們加入不同物質以試圖提高試液的靈敏度及準確度，並且發現魚肉隨時間放置愈久，在相同條件的奈米金液中出現明顯的顏色遞變。

壹、 研究動機

之前曾有幾次買到不新鮮的魚，食用後造成身體不適，於是上網搜尋有關判斷魚類是否新鮮的方法。然而卻發現魚類通常需死亡一段時間後才會有較明顯的變化指示是否已腐壞，且有些不肖商人會刻意維持魚類的外觀使人無法察覺，檢驗方法精確度也不高。新興的膠體溶液—奈米粒子溶液敏感度高，可以用於檢測細微變化，其中金奈米粒子被用於醫學檢測與藥物釋放，因此，我們選用此方法來檢測魚肉樣品，試圖找出能快速、準確又方便檢測新鮮度（腐敗程度）的方法，以確知魚類放置時間，避免誤食腐敗的魚肉。

貳、 研究目的

- 一、 探討何種金屬奈米粒子對胺類分子感測度較高
- 二、 探討何種結構之胺類分子較易被檢測
- 三、 探討干擾物質對胺類化合物偵測的影響
- 四、 探討修飾上何種分子能改進靈敏度
- 五、 探討何種測量方式變化較明顯
- 六、 探討魚類腐壞後使金粒聚集的機制
- 七、 找出檢測魚肉中胺類分子含量的最佳溶液與方法
- 八、 探討魚肉中胺類分子含量與離開冷凍狀態後放置時間的關係

參、 研究設備及器材

一、 實驗設備及器材

紫外光/可見光分光光譜儀	電子秤
電磁加熱攪拌器	洗滌瓶
錐形瓶	樣本瓶(盛裝用)
定量瓶	血清瓶(盛裝用)
微型吸量管	新鮮鱈魚
吸量管	新鮮鮭魚
滴管	鋁箔紙
保麗龍箱(冰盒)	

二、 實驗藥品

AgNO ₃	Acetic acid
sodium citrate	Succinic acid
HAuCl ₄	1-Butanol
Ethylamine	Ethylene glycol
Butylamine	4-Mercaptobenzoic acid(pMBA)
Ethylenediamine	4-Nitrothiophenol(pNTP)
1,6-hexanediamine	2-Aminothiophenol(pATP)
Melamine	4-Hydroxythiophenol(pHTP)
Tri(2-ethylamino)amine	

肆、 研究過程及方法

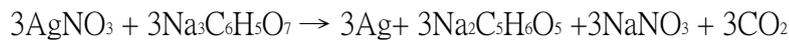
一、實驗原理

(一) 膠體溶液

1、合成原理：

舉銀為例，一般是利用 NaBH_4 ，將 Ag^+ 還原為銀的奈米粒子， BH_4^- 可同時做為奈米銀的保護劑。其中 BH_4^- 會包圍在奈米銀周圍，使奈米銀表面帶負電，並藉由負電荷間的排斥力防止其聚集。但膠體溶液短時間內不會聚集、沉澱，只要每次實驗前重新配置，即不需要添加保護劑。

(1) 銀奈米膠體溶液製備 反應式：



(2) 金奈米膠體溶液製備 反應式：



2、金屬奈米粒子的吸收光譜可以藉由古典物理的靜電場理論(Classical electrostatic model, Mie/Drude Formalism)預測，進而獲知奈米粒子在吸收光譜中有一特性吸收波帶，稱作表面電漿共振波帶*(surface-plasma resonance, SPR)，與粒子的形狀和大小有關。

(1)當金屬粒徑小至奈米等級時，會因為金屬表面的電子與特定波長的光能量產生集體式的偶極震盪，而產生吸收光譜的特定吸收波帶，顯現特定顏色。

(2)因粒徑大小不同，使奈米粒子的特定吸收波帶有位移的現象。

當金屬奈米粒子的吸收波帶出現在可見光的波長範圍，由於溶液對光的反射和吸收呈現互補色，即可用肉眼及 UV 光譜儀觀察溶液顏色的出現和改變。

※表面電漿共振吸收：對奈米粒子施加一適當的電磁場時，導帶電子受到激發而發生極化，並以一特定頻率隨入射的電磁波進行集體式振盪，因此產生共振現象，使一些特定波長的光被吸收或散射，此現象與粒徑相關，又稱粒子電漿共振 (Particle Plasmon Resonance)。

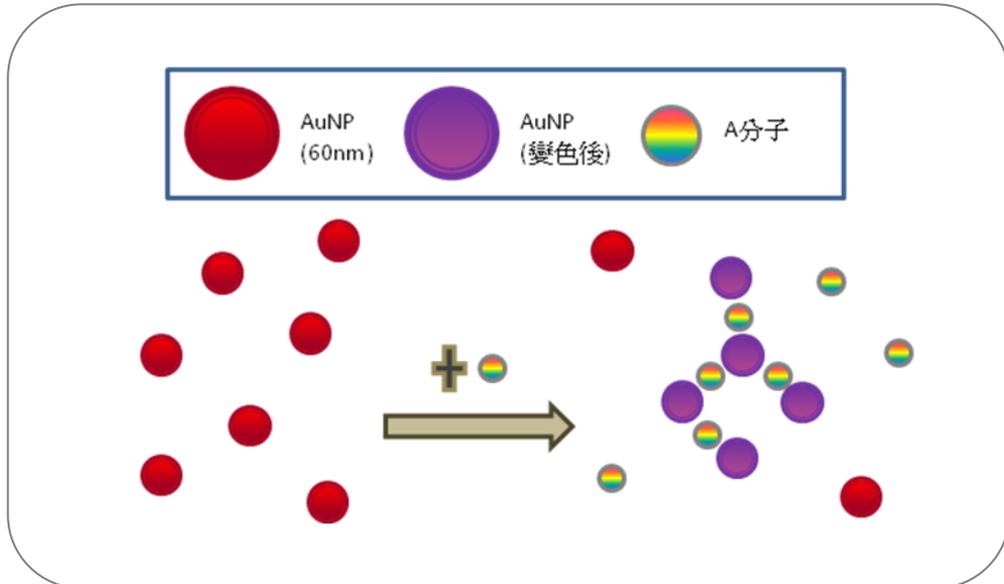
3、根據理論計算的結果可知，金奈米粒子的特定吸收波帶約在 520nm，溶液呈現紫紅色；銀奈米粒子的特定吸收波帶大約在 410nm，溶液呈現黃褐色。

(二) 檢測原理

定義：感測分子(即目標之胺類分子)為 A 分子

1、金屬奈米粒子未修飾：

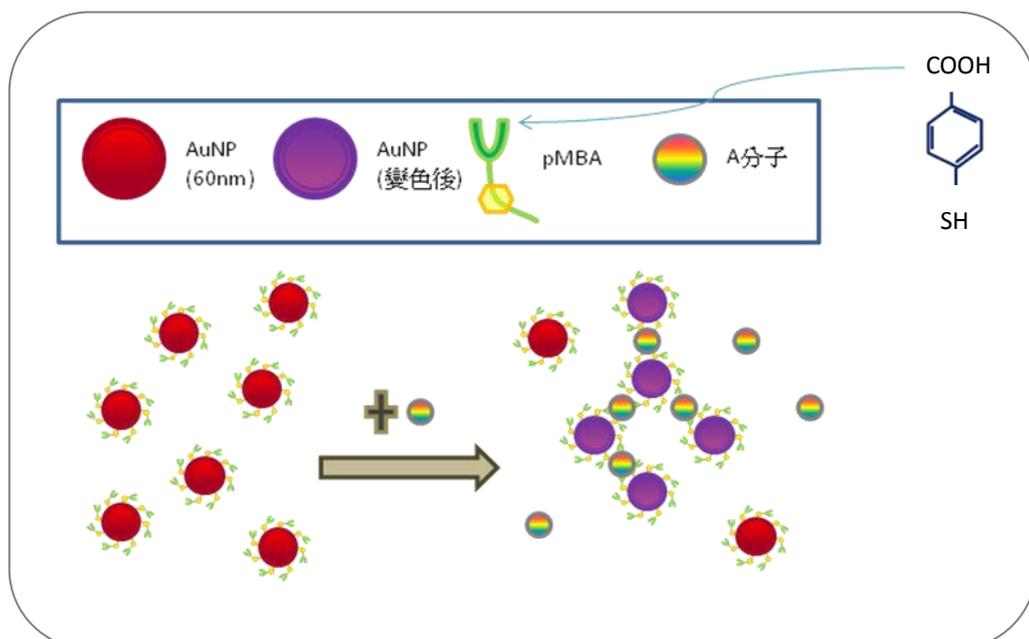
將金屬奈米粒子表面修飾上 A 分子，A 分子另一端與其他金屬粒子相接，產生聚集的效果。



↑圖一、金奈米粒子與 A 分子聚集示意圖

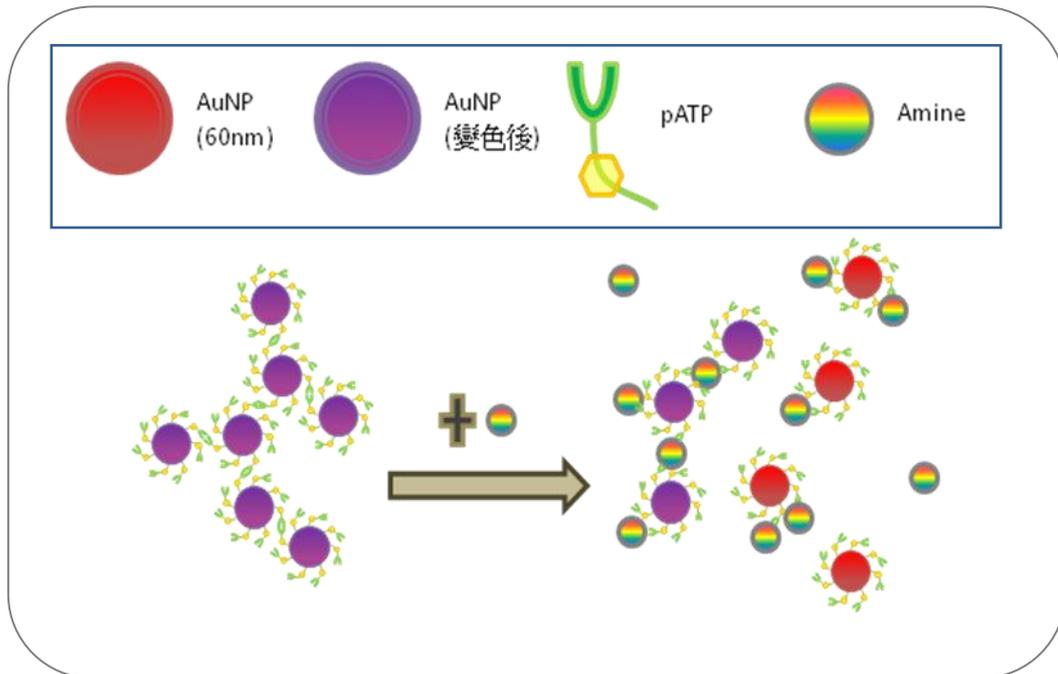
2、金屬奈米粒子有修飾：

(1) 先在奈米粒子修飾上與金結合力較弱之硫醇分子，其 SH 端接在奈米粒子上；再加入 A 分子，使另一端接在 A 分子，造成金粒聚集的效果。



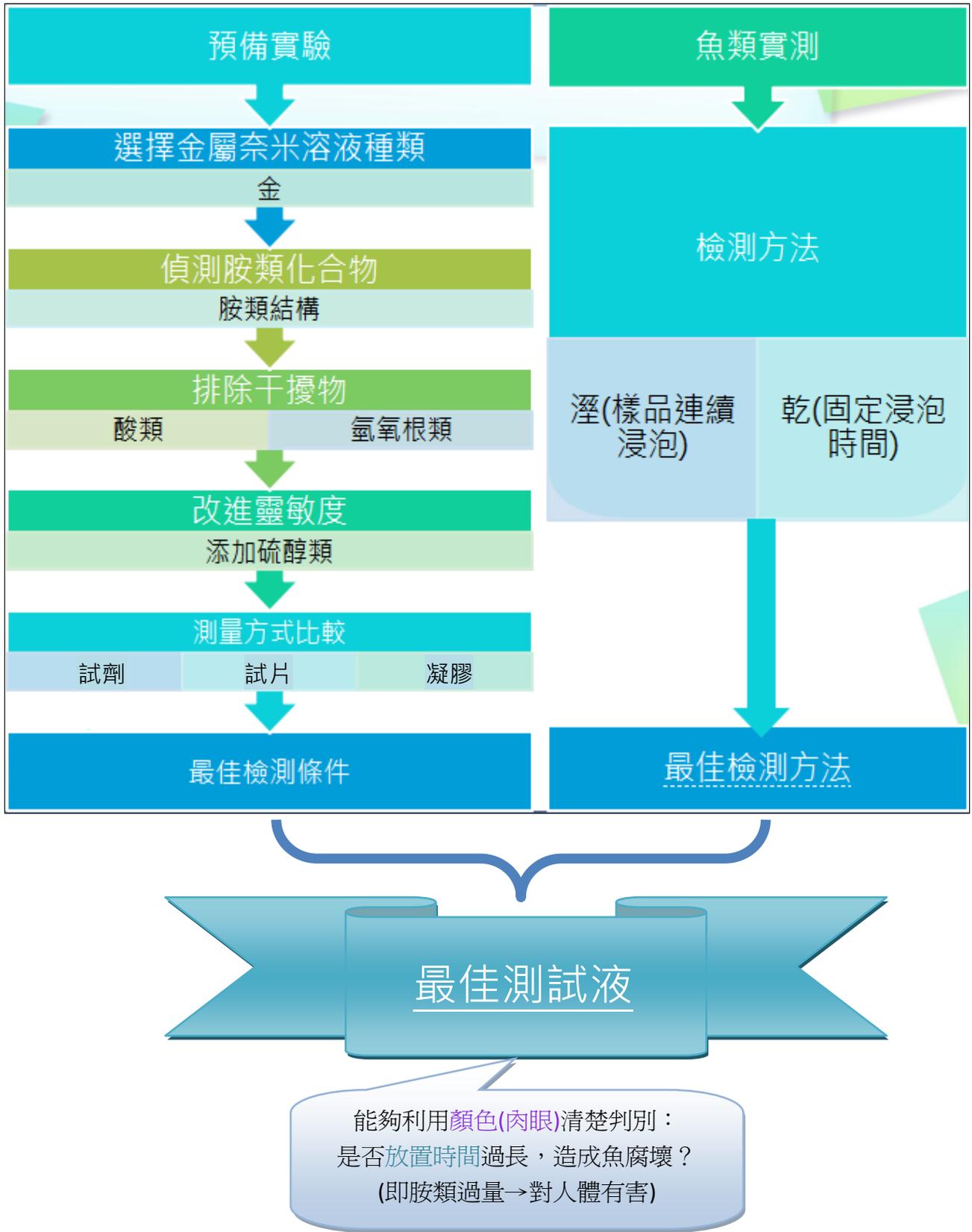
↑圖二、經 pMBA 修飾後之金奈米粒子與 A 分子聚集示意圖

- (2) 先在奈米粒子修飾上較強硫醇分子，其 SH 端接在奈米粒子上；而因硫醇分子間吸引力，彼此間會互相結合、聚集。再加入 A 分子，A 分子競爭金粒間結合位，造成金粒分離的效果。



↑圖三、經 pATP 修飾後之金奈米粒子與 A 分子聚集示意圖

二、實驗流程



圖四、實驗架構流程

三、實驗過程

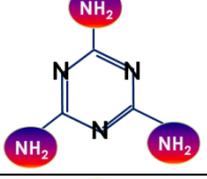
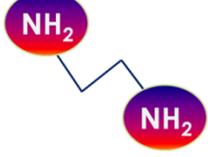
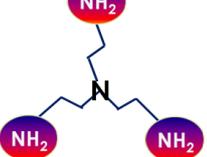
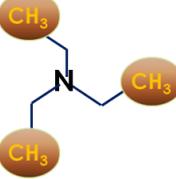
(一) 製備不同金屬奈米膠體溶液(並稀釋)

- | | |
|---|--|
| <p>1、 銀</p> <p>(1) 將 50mL AgNO_3 溶液以電磁加熱攪拌器加熱至沸騰(約 5~10 min)。</p> <p>(2) 加入還原劑：
至沸騰時(大量氣泡產生)，立刻加入 sodium citrate(檸檬酸鈉)，繼續加熱。</p> <p>(3) 生成銀奈米粒子：
加熱至 15 分鐘時立刻放入冰浴中，以停止反應(產生銀奈米粒子)。</p> <p>(4) 原液稀釋 10 倍</p> | <p>2、 金</p> <p>(1) 將 50mL HAuCl_4 溶液以電磁加熱攪拌器加熱至沸騰(約 5~10 min)。</p> <p>(2) 加入還原劑：
至沸騰時(大量氣泡產生)，立刻加入 citrate acid(檸檬酸)，繼續加熱。</p> <p>(3) 生成金奈米粒子：
加熱至 10 分鐘時立刻放入冷水中，以停止反應(產生金奈米粒子)。</p> <p>(4) 原液稀釋 3 倍</p> |
|---|--|

(二) 偵測胺類化合物

- 1、 製備金屬奈米膠體溶液(並稀釋)
- 2、 加入各種不同結構胺類
固定每種待測胺類之濃度為 2000ppm，每次滴加 100 μ L 之溶液。

↓表一、各胺類結構

Ethylamine		1,6-Hexandiamine	
Butylamine		Melamine	
Ethylenediamine		Tris(2-aminoethyl) amine	
Triethylamine			

3、靜置、觀察變化

(1) 肉眼→看顏色

(2) UV/visible→吸收波峰值

(三)添加常見干擾物以觀測其凝聚狀態

1、製備金屬奈米膠體溶液(並稀釋)

2、加入干擾物、調整溶液環境

(1) COOH 類

A. 單頭 - Acetic acid

B. 雙頭 - Succinic acid

C. 單頭+苯環 - Benzoic acid

D. 三頭+苯環 -

Benzene-1,3,5-tricarboxylic acid

(2) OH 類

A. 單頭 - 1-Butanol

B. 雙頭 - Ethylene glycol

C. 單頭+苯環 - Phenol

D. 雙頭+苯環 - Resorcinol

E. 三頭+苯環 - Benzene-1,3,5-triol

3、加入待測分子(A 分子)

4、靜置、觀察變化

(1) 肉眼→看顏色

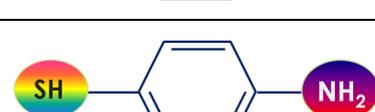
(2) UV/visible→吸收波峰值

(四)添加修飾分子

1、製備金屬奈米膠體溶液(並稀釋)

2、加入修飾分子(硫醇類)

↓表二、各硫醇類結構

pMBA (4-Mercaptobenzoic acid)	
pNTP (4-Nitrothiophenol)	
pHTP (4-Hydroxythiophenol)	
pATP (2-Aminothiophenol)	

3、加入待測分子(A 分子)

4、靜置、觀察變化

(1) 肉眼→看顏色

(2) UV/visible→吸收波峰值

(五)魚類實測之檢測方法

↓表三、檢測方法說明

**【魚類實測皆以離開冷凍為時間 0 點，
設定室溫中放置 4 小時後不可食用】**

1、實驗一：※樣品持續浸泡(溼)

- 分 2 組，①白肉(鱈魚)、②紅肉(鮭魚)
各切 2 塊(秤重 10g)，**持續浸泡**於 40mL 去離子水，
置於 [冷藏(4°C) / 室溫] 1hr/2h/3hr/4hr 後，
- ① 取過濾後的浸泡液 100uL 加入金膠中 觀察顏色變化&測 UV
 - ② 取過濾後的浸泡液先稀釋，找出**最佳濃度**
【使 3/4hr 間有明顯顏色差異】
取定量加入金膠中，觀察顏色變化&測 UV。



2、實驗二：※固定浸泡時間(乾)

- 分 2 組，
①白肉(鱈魚)、②紅肉(鮭魚)
各切 2 塊(秤重 5g)，
用鋁箔紙包好 置於 [冷藏(4°C) / 室溫] 1hr/2h/3hr/4hr 後，
浸泡於 20mL 去離子水，
固定皆 5 分鐘，取過濾後的浸泡液。
先稀釋後，找出**最佳濃度**【使 3/4hr 間有明顯顏色差異】
取定量加入金膠中，觀察顏色變化&測 UV。

伍、研究結果

UV 圖 →縱軸：吸收值(A)；橫軸：波長(nm)

一、 選擇金屬奈米溶液種類

(一)確認：加入固定胺類 (1,6-Hexandiamine)

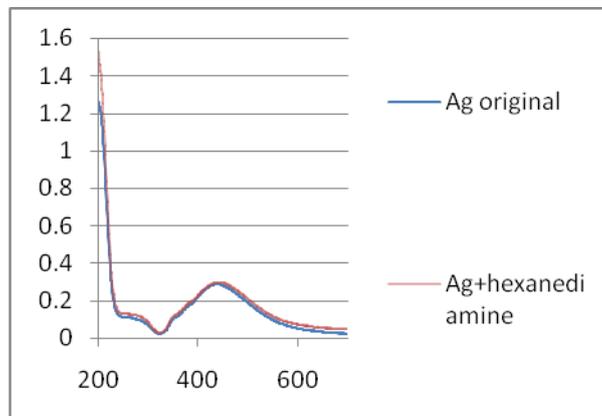
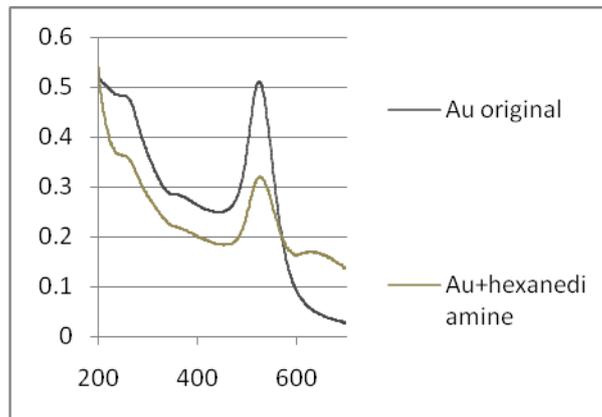
1. 顏色變化



↑圖五、(左)金膠+hexanediamine(右)金膠原溶液；

圖六、(左)銀膠+hexnediamine(右)銀膠原溶液

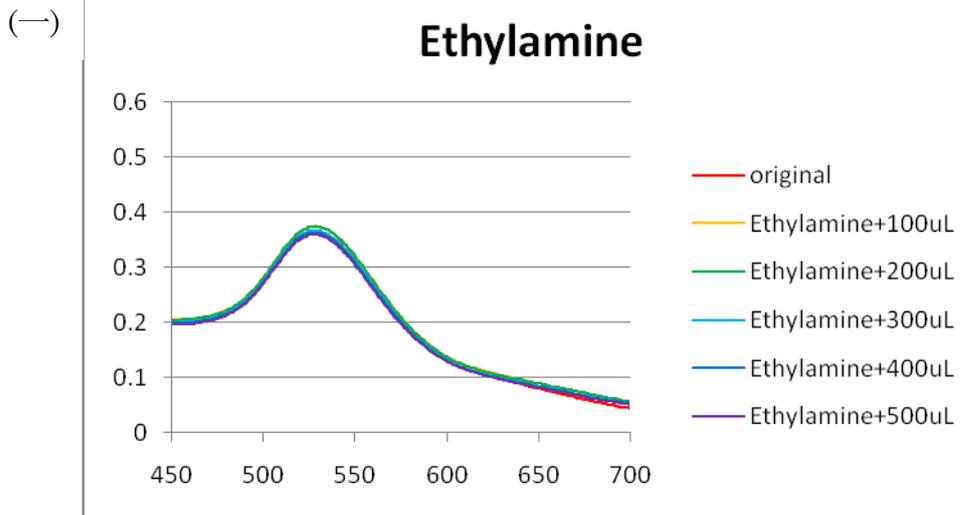
2. UV 吸收峰圖線條之位移



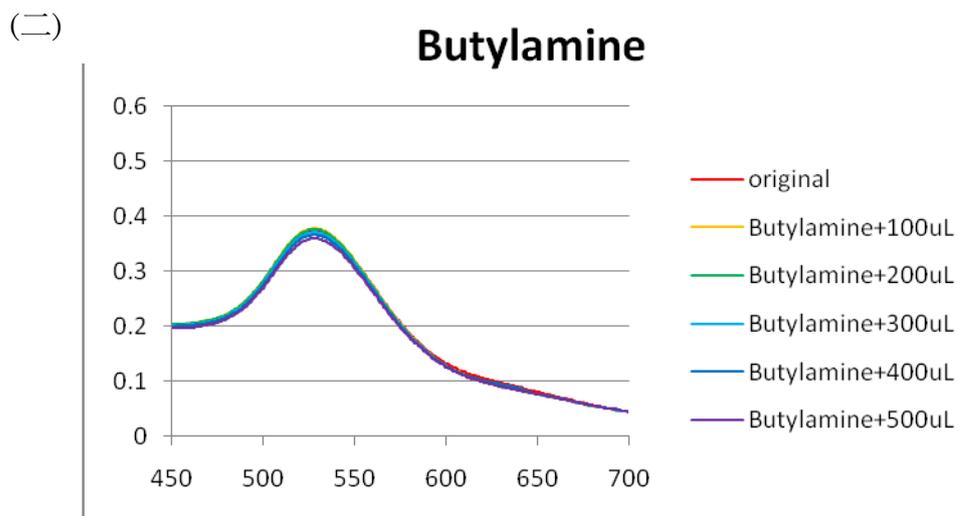
↑圖七、金膠 UV 圖；圖八、銀膠 UV 圖

二、偵測胺類化合物

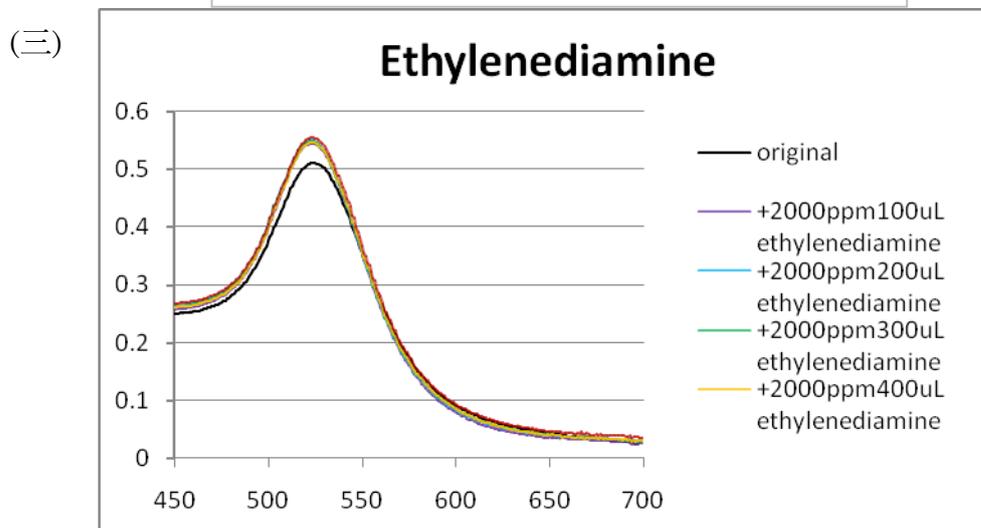
(以下圖表皆為加入金奈米溶液中)



↑圖九、Au 膠體溶液+ 2000ppm ethylamine

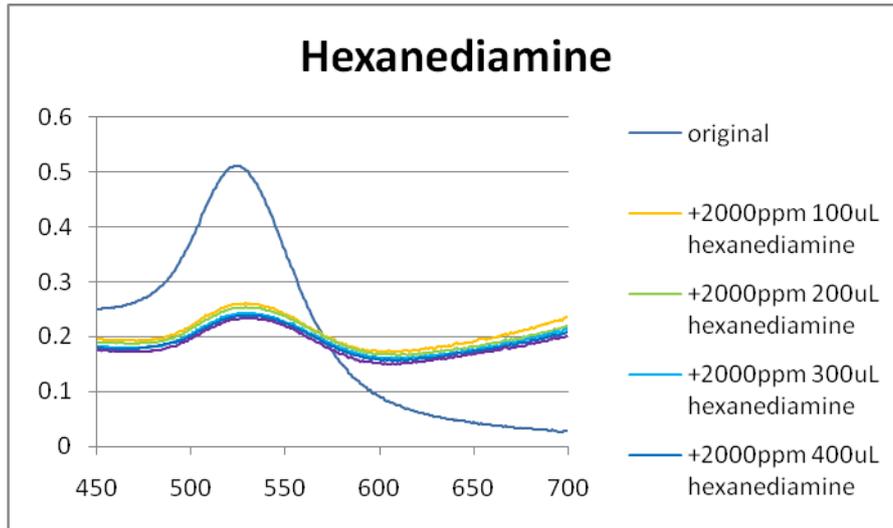


↑圖十、Au 膠體溶液+ 2000ppm butylamine

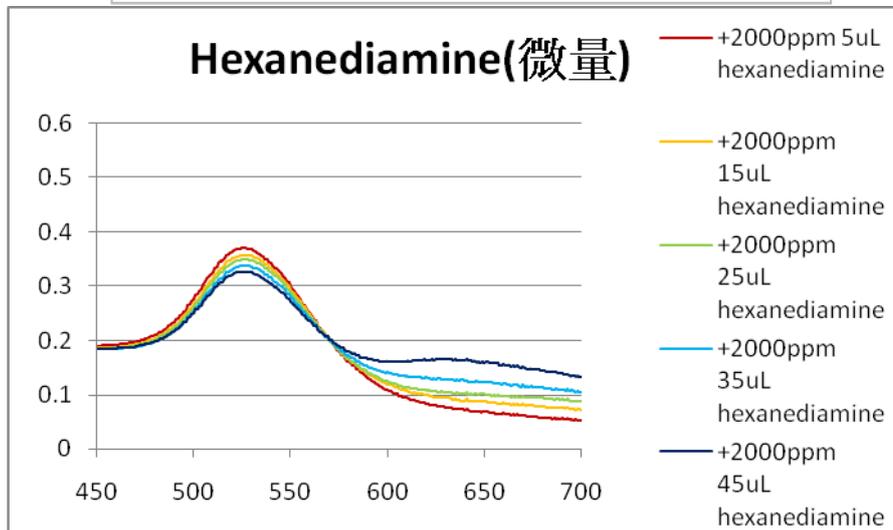


↑圖十一、Au 膠體溶液+ 2000ppm butylamine

(四)

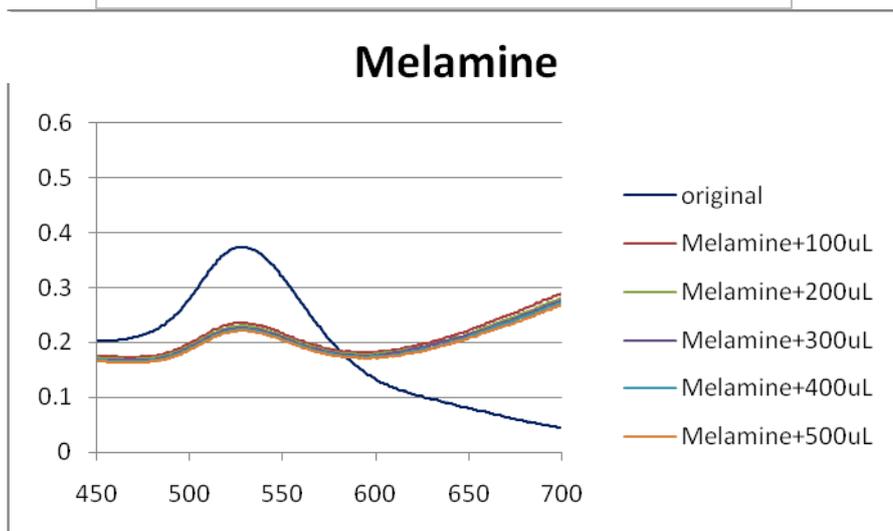


△圖十二、Au 膠體溶液+ 2000ppm hexanediamine



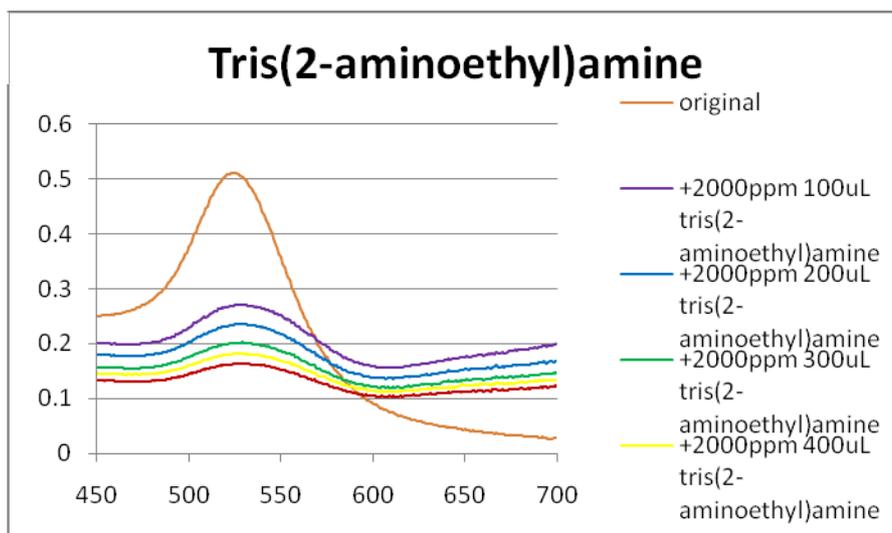
△圖十三、Au 膠體溶液+ 2000ppm hexanediamine

(五)



△圖十、Au 膠體溶液+ 2000ppm ethylenediamine

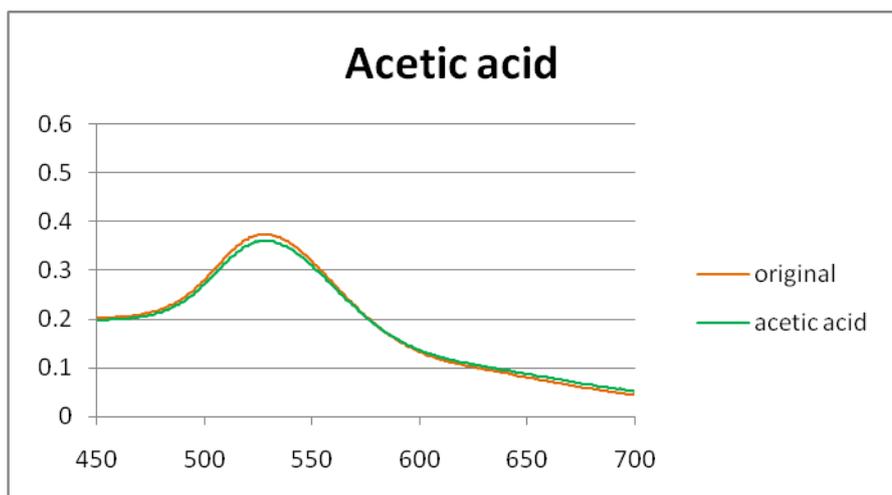
(六)



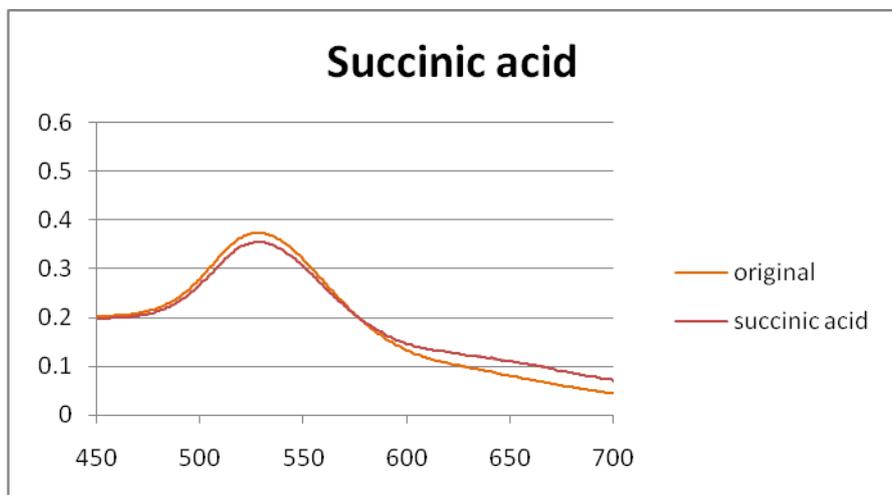
圖十五、Au 膠體溶液+ 2000ppm tris(2-aminoethyl)amine

三、 排除常見干擾物

(一)COOH

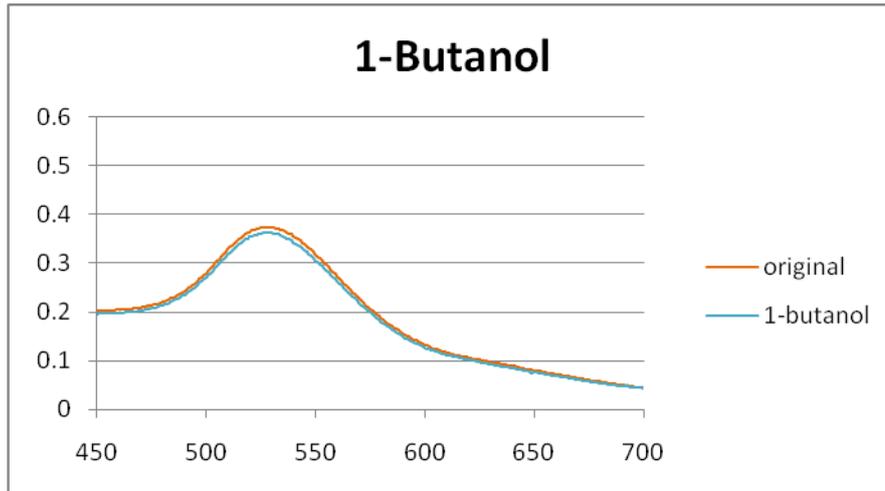


圖十六、Au 膠體溶液+2000ppm acetic acid

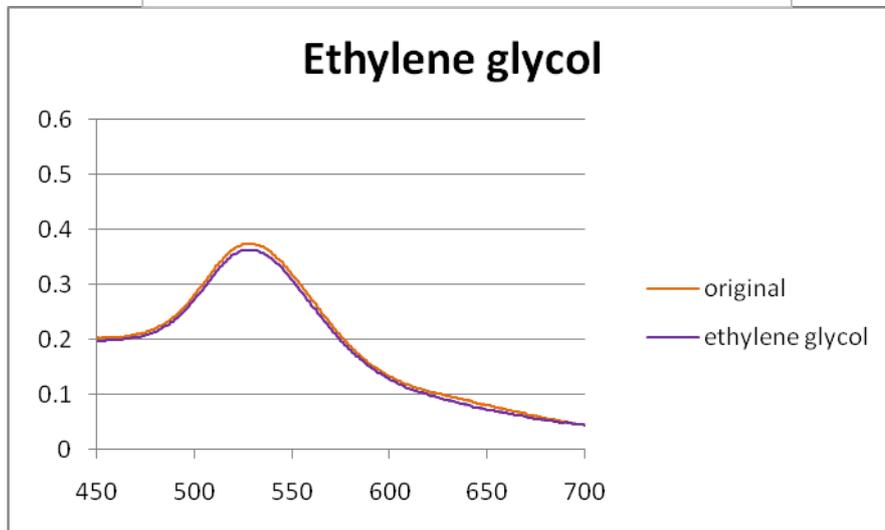


圖十七、Au 膠體溶液+2000ppm succinic acid

(二)OH



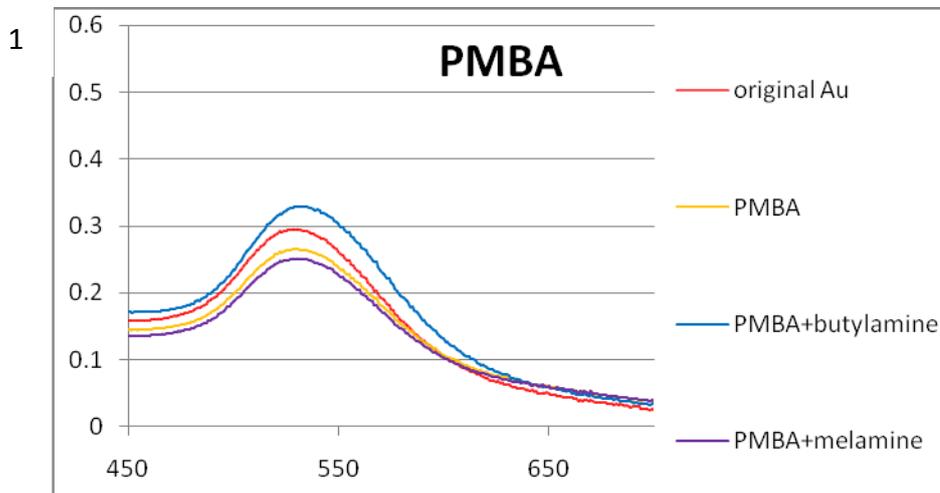
圖十八、Au 膠體溶液+2000ppm 1-butanol



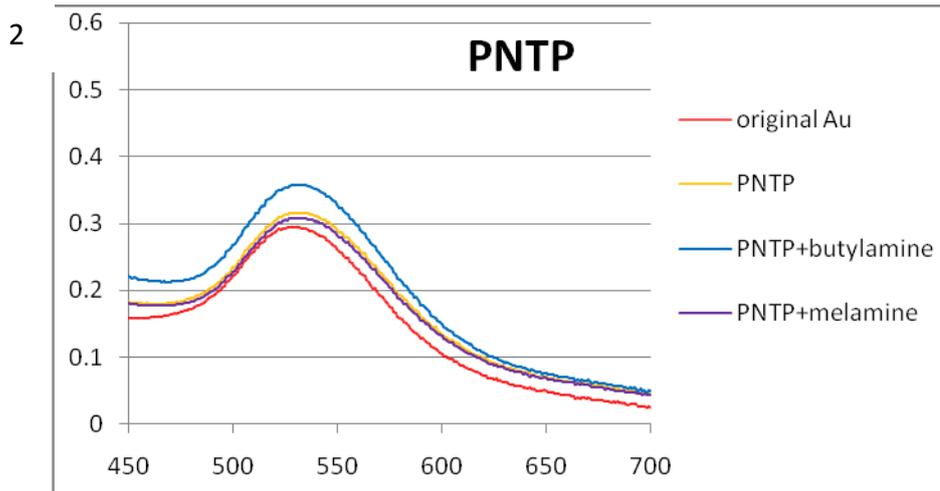
圖十九、Au 膠體溶液+2000ppm ethylene glycol

四、改進靈敏度

(一)添加與金結合力較弱之硫醇類 <以下皆為添加 200ppm100uL>

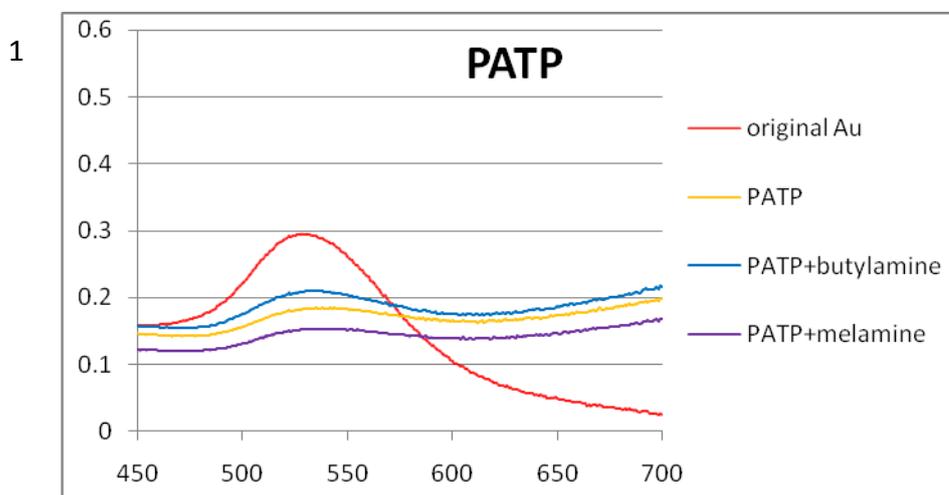


圖二十、Au 膠體溶液+2000ppm pMBA+胺

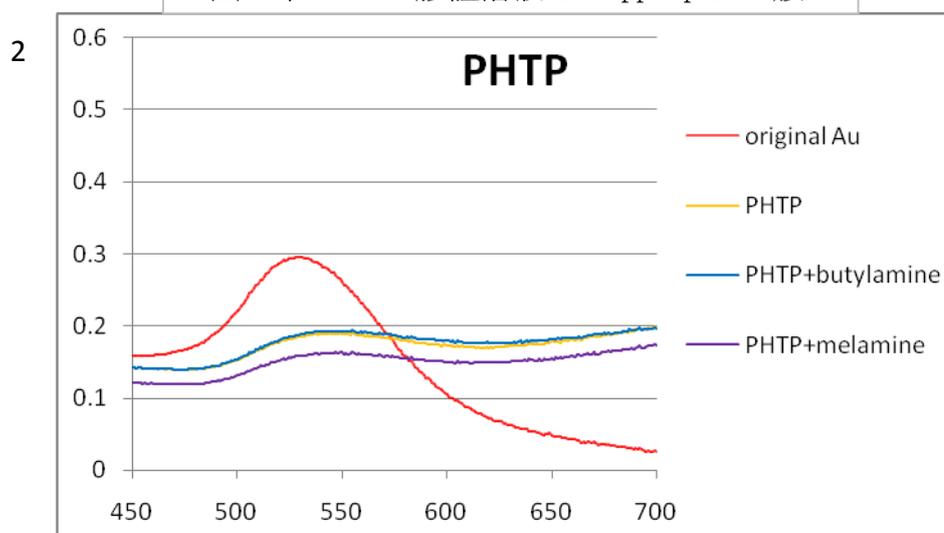


圖二十一、Au 膠體溶液+2000ppm pNTP+胺

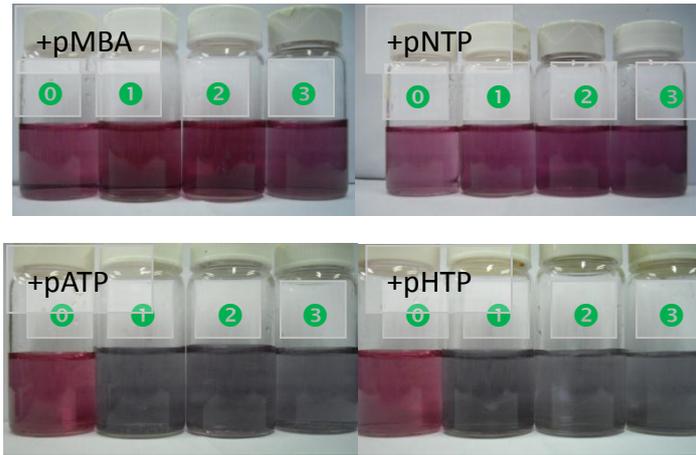
(二) 添加與金結合力較強之硫醇類



圖二十二、Au 膠體溶液+2000ppm pATP+胺



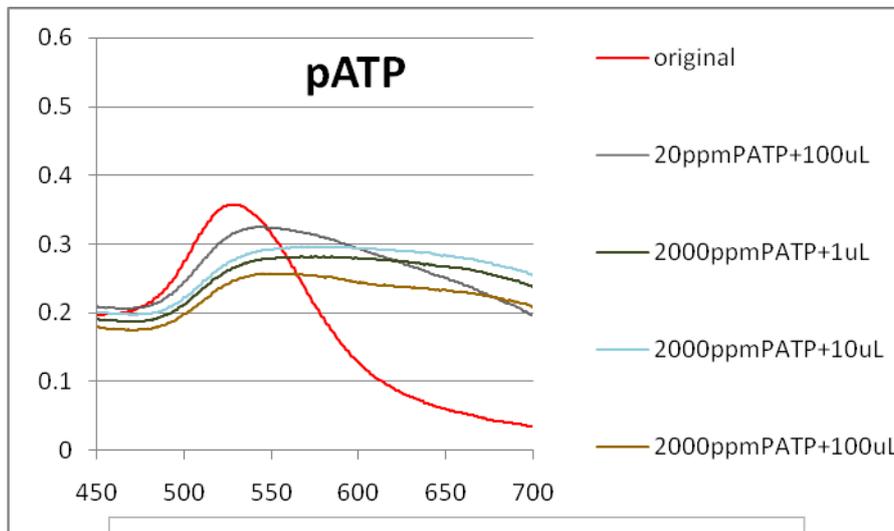
圖二十三、Au 膠體溶液+2000ppm pHTP+胺



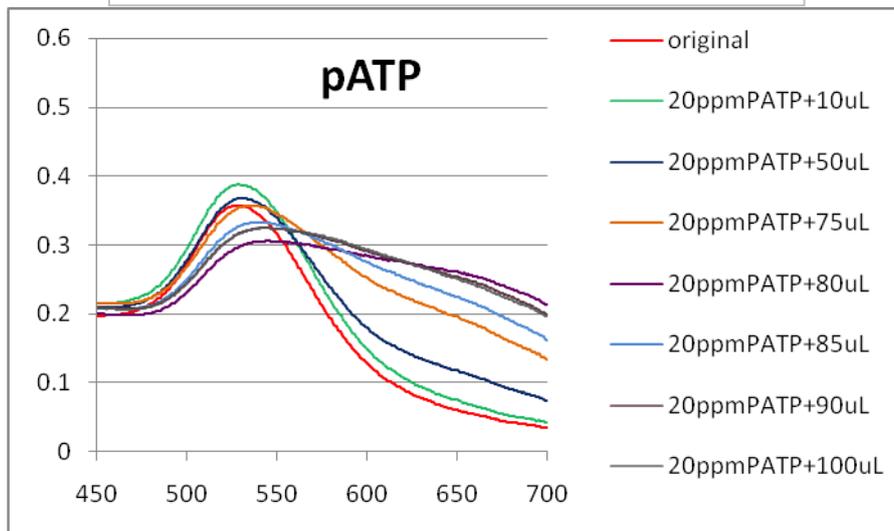
<①: Au+各硫醇類，②: ①+butylamine，③: ①+triethylamine，④: ①+melamine>

↑圖二十四、Au 膠體溶液+各硫醇類+各胺類

(三) 調降硫醇類濃度



↑圖二十五、Au 膠體溶液+20/ 2000ppm pATP

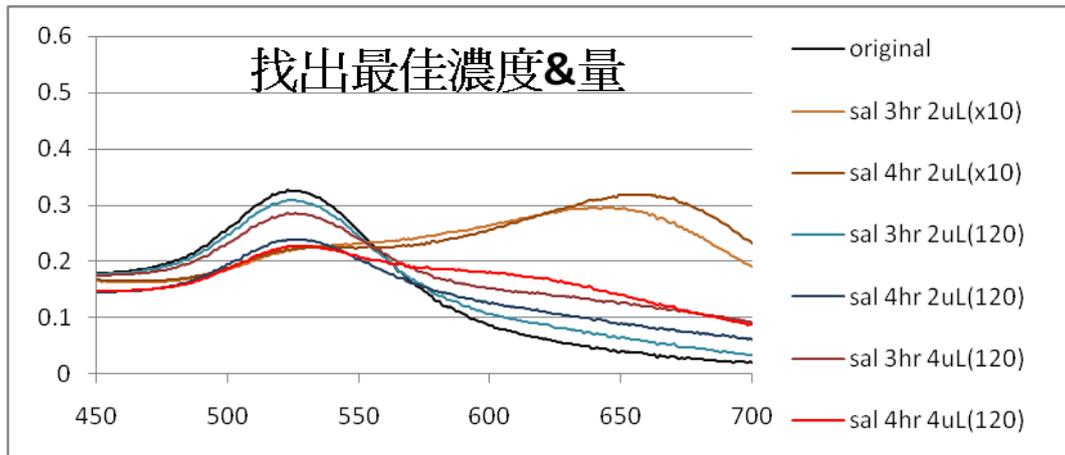


↑圖二十六、Au 膠體溶液+ 20ppm pATP

五、 魚類實測之檢測方法

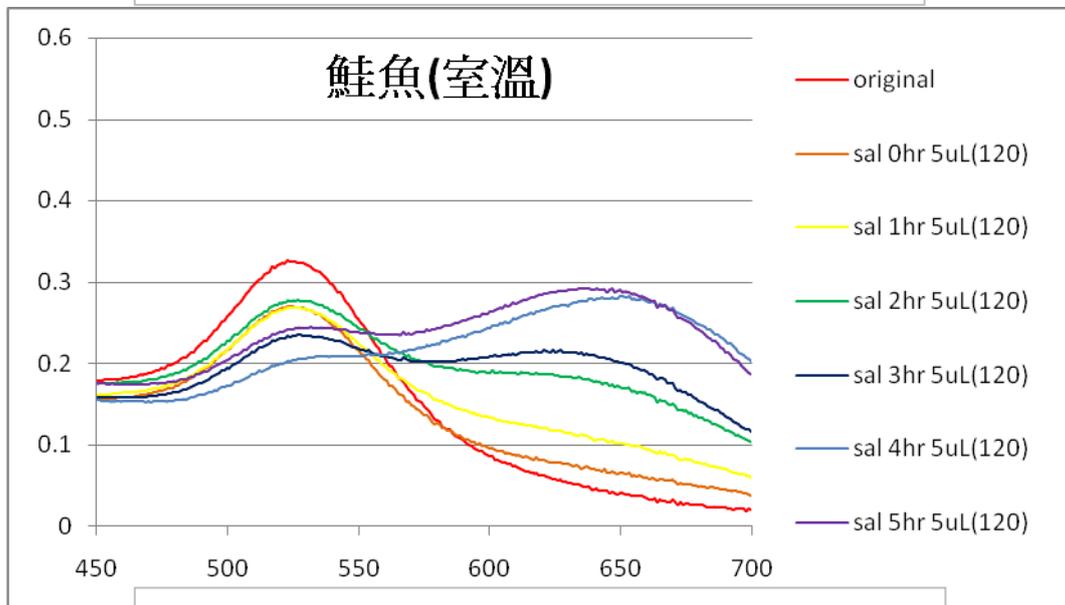
(一)樣品持續浸泡(溼)

1

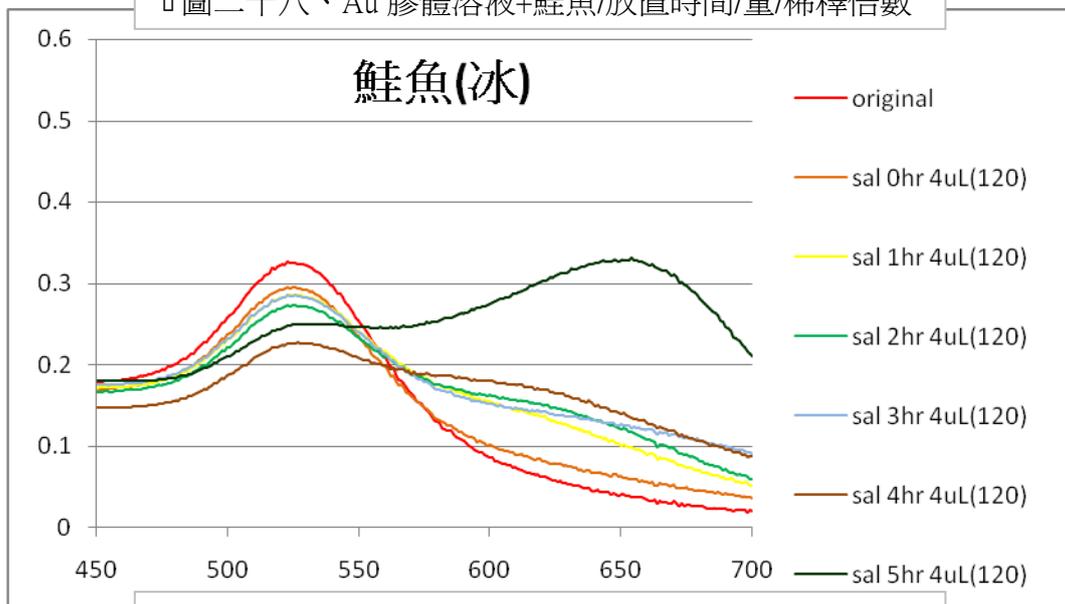


圖二十七、Au 膠體溶液+鮭魚/放置時間/量/稀釋倍數

2

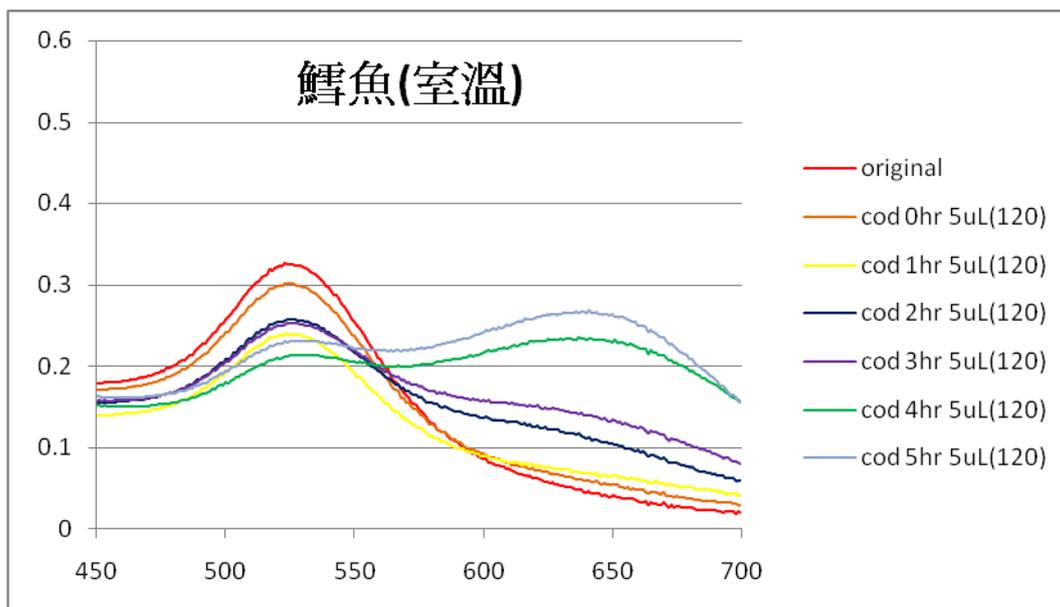


圖二十八、Au 膠體溶液+鮭魚/放置時間/量/稀釋倍數

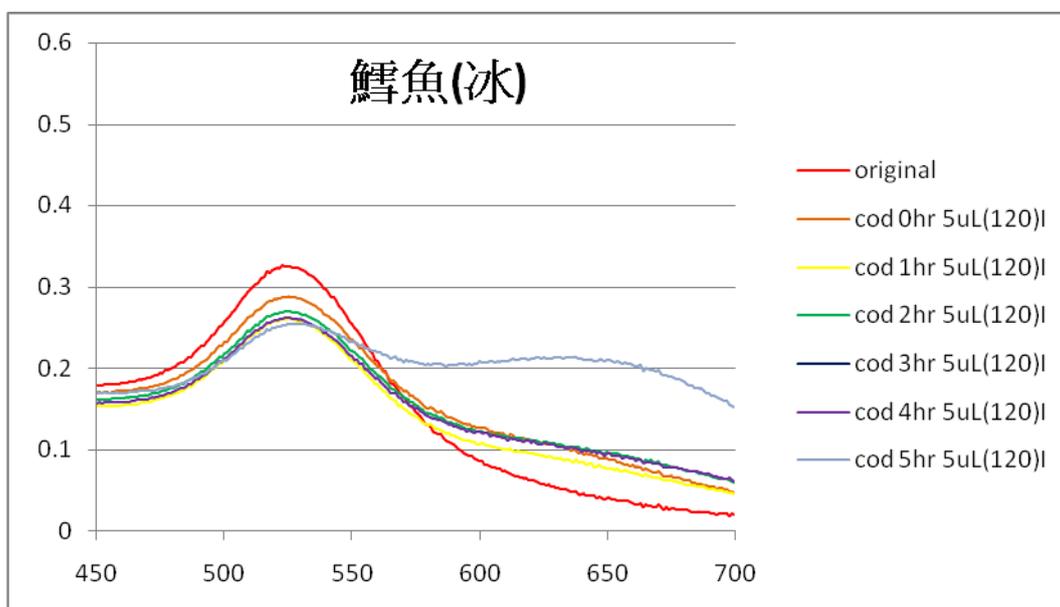


圖二十九、Au 膠體溶液+鮭魚/放置時間/量/稀釋倍數

3



圖三十、Au 膠體溶液+鱈魚/放置時間/量/稀釋倍數



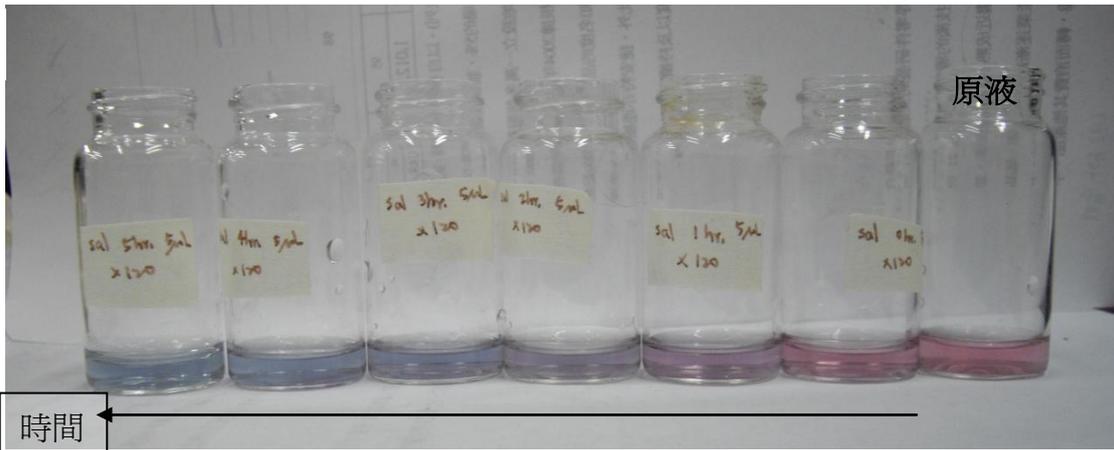
圖三十一、Au 膠體溶液+鱈魚/放置時間/量/稀釋倍數

1



圖三十二、Au 膠體溶液+鱈魚(室溫) 依時間之顏色變化

2



圖三十三、Au 膠體溶液+鮭魚(冰) 依時間之顏色變化

3



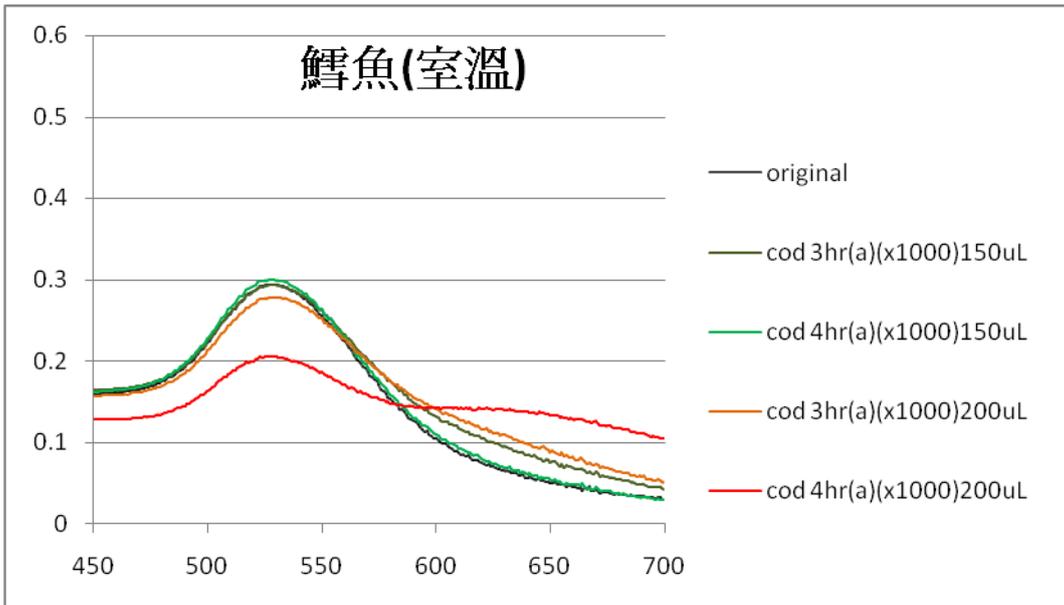
圖三十四、Au 膠體溶液+鱈魚(室溫) 依時間之顏色變化

4

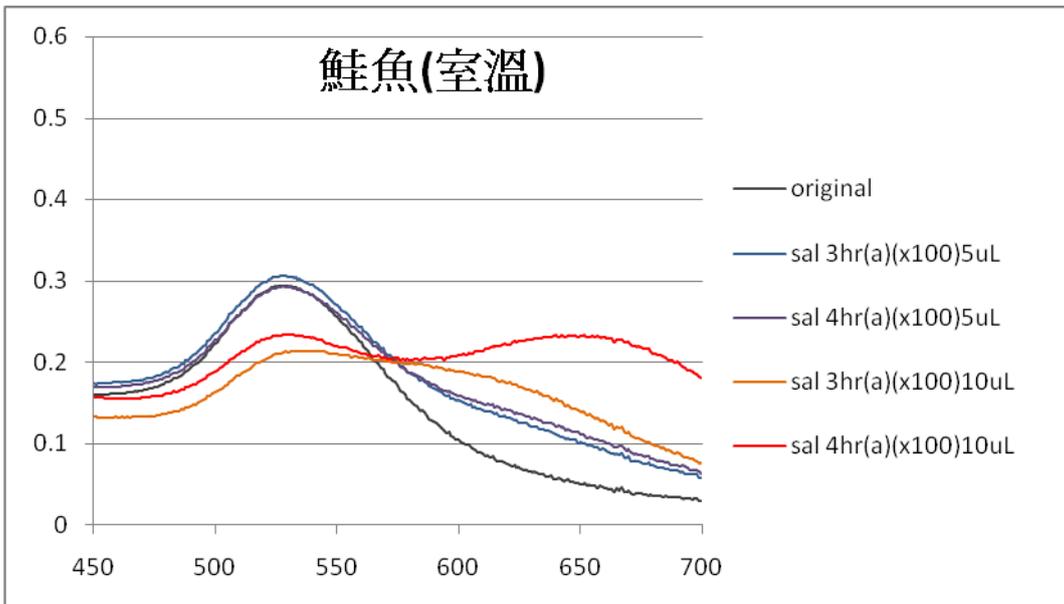


圖三十五、Au 膠體溶液+鱈魚(冰) 依時間之顏色變化

(二)固定浸泡時間(乾)



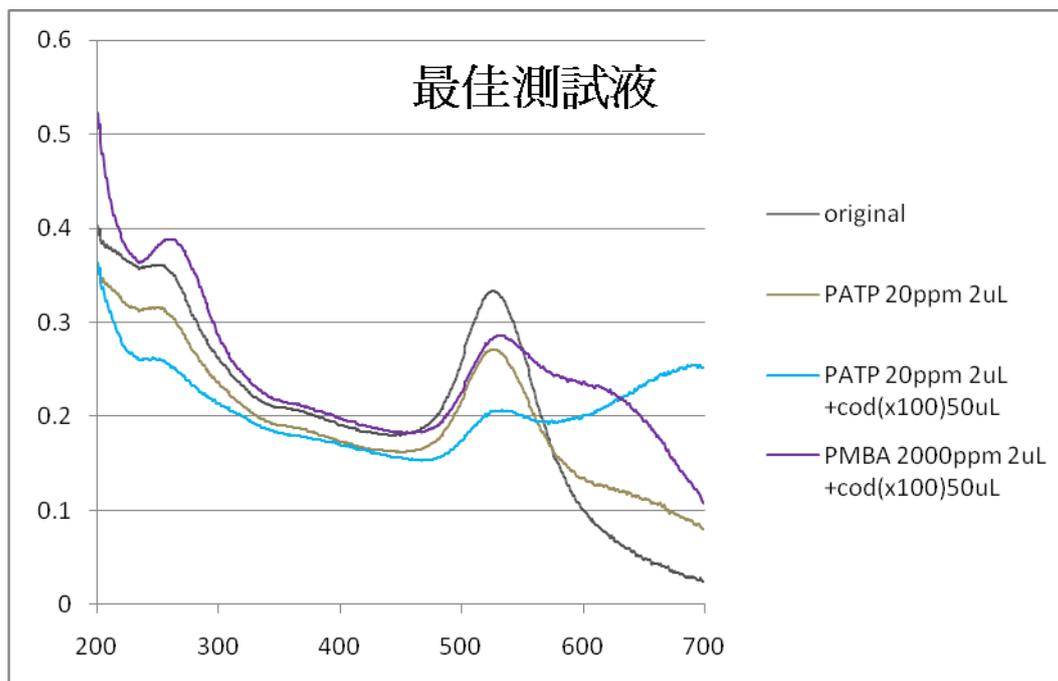
↑圖三十六、Au 膠體溶液+鱈魚/時間/稀釋被數/量



↑圖三十七、Au 膠體溶液+鮭魚/時間/稀釋被數/量

六、最佳測試液

→ <修飾物：pATP 20ppm 2uL> + <固定浸泡時間>



圖三十八、最佳測試液



圖三十九、最佳測試液

陸、討論

- 一、 本實驗之奈米膠體溶液沒有添加凝聚劑，每次都要重新製備。因製作過程中，需將封好的瓶口打洞後，才能添加還原劑檸檬酸鈉，而此時溶液尚在沸騰狀態，水蒸氣會流失，即每次製作都會有偏差值。所以加水調整其濃度，穩定其溶液品質。
- 二、 金膠體溶液加入單頭胺類(如 ethylamine、butylamine) 時，隨濃度改變吸收度無顯著變化，推測因其 NH_2 基數較少，結合力較弱，較容易被原液中所含的奈米粒子表面分布的電荷影響。
- 三、 金膠體溶液加入雙頭及三頭胺類分子(如 hexanediamine、tri(2-aminoethyl)amine) 時，濃度越高，聚集效果越好，顏色越偏紫，吸收峰有紅位移的現象。其中 melamine 對金奈米結合力尤佳，在紅光區有較其他胺類明顯的吸收峰。



圖四十、各類胺加入奈米金中

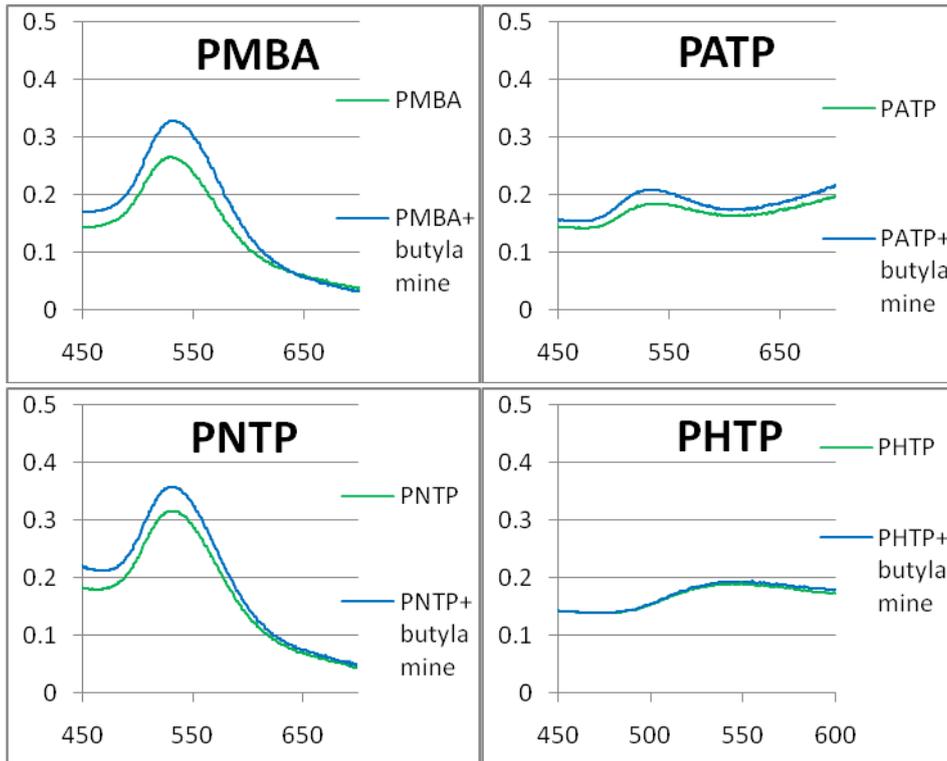
- 四、 實驗結果顯示偵測胺類分子所含 NH_2 基的數目越多，與金粒的結合力越強，造成的聚集效果越好，越容易被感測到。
- 五、 加入待測物後膠體溶液的變化情形，隔 1 小時後固定觀察一天，發現不會因時間而改變。比較未加入待測物的原液，發現過幾天後有凝聚的現象。所以推測溶液中粒子所含電荷使其穩定存在。



圖四十一、放置一週後之奈米金

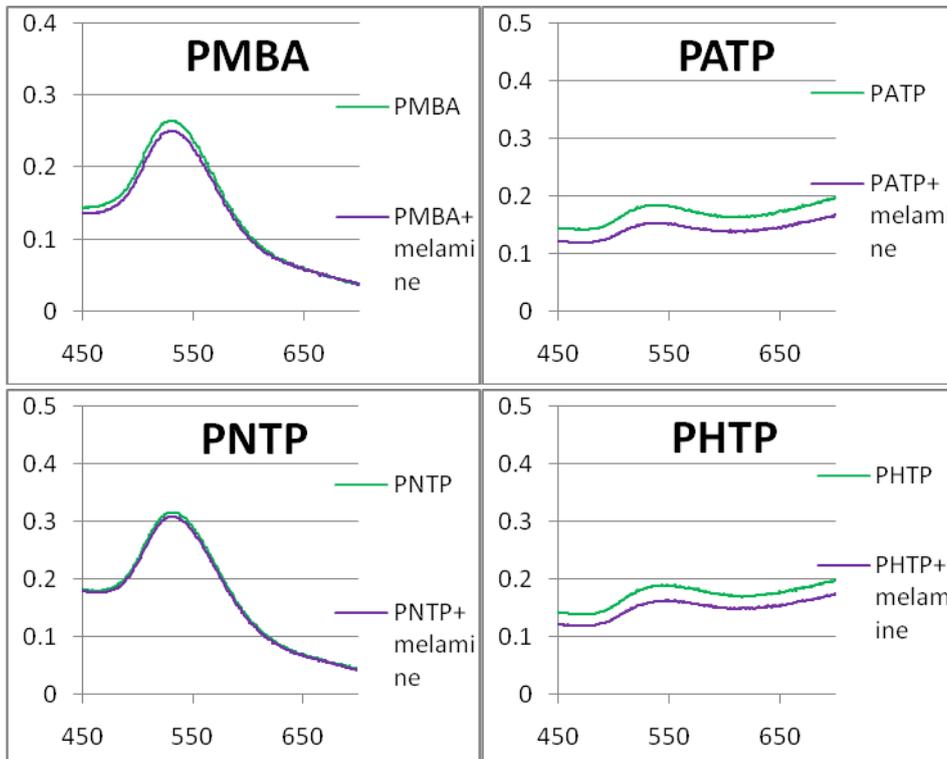
- 六、 加入常見干擾物，如單頭及雙頭的 COOH 及 OH 類後，發現吸收度雖有些微的下降，但影響很小，因此實際測量時可忽略干擾物的影響。
- 七、 加入硫醇類修飾物後，會造成吸收峰向右偏移，其中 pATP 及 pHTP 較明顯，外觀已變為半透明紫色(吸收峰明顯降低而趨勢變平)，推測可能因膠體粒子凝聚而沉澱。

八、加入硫醇類修飾物再加入 butylamine 後，外觀無明顯變化，而由 UV 圖觀察，發現其吸收值比原來的高。



圖四十二、Au 膠體液+硫醇類有無加入 butylamine 之差別比較

九、加入硫醇類修飾物再加入 melamine 後，外觀無明顯變化，而由 UV 圖觀察，發現其吸收值皆比原來的低，其中以 pATP 的變化量最大。然而曲線形狀不變，所以得出硫醇類影響較胺類大，且加入 2000ppm100uL 為過量。



圖四十三、Au 膠體液+硫醇類有無加入 melamine 之差別比較

- 十、 由上述八、九可得：加入硫醇類確實能增加金奈米膠體溶液的靈敏度。
- 十一、 因 pATP 加入 2000ppm100uL 以上皆為過量，使金奈米溶液過度聚集產生沉澱，導致無法測出其幫助聚集的真正效率，因此將其濃度稀釋 100 倍後再加入胺類分子 (濃度不變)，發現隨著 pATP 量的增加，聚集程度確實明顯有上升的趨勢。
- 十二、 魚肉置於室溫時，UV 圖的吸收值在波長 600~700nm 間有明顯上升，且隨放置時間增長有逐漸升高的趨勢；由顏色變化也可直接觀察出放置 4hr 後變為藍紫色，代表胺類分子含量較高。



圖四十四、三與四小時間之顏色變化

- 十三、 比較置於室溫與置於冰箱中，發現置於室溫者皆隨時間有等差上升且有較大的吸收值變化；而置於冰箱中者皆前幾小時吸收值變化量較小且在 4hr 後有明顯上升。且同時間室溫之吸收值都較冰者高，因冷藏的魚腐壞速度較慢。
- 十四、 當魚塊連續浸泡於水中時，有可能溶出也能使奈米金輕微聚集的其他分子，而隨時間增長其溶出量越多，進而影響胺類分子本身使金粒子聚集的能力，因此固定浸泡時間會較佳。

柒、結論

- 一、本實驗選擇以金製作膠體溶液，因為其加入待測物後外觀顏色變化度較明顯，且吸收值變化量也較銀奈米膠體溶液大。
- 二、偵測胺類分子所含 NH_2 基的數目越多，能跟越多的金粒結合，造成的聚集效果越好，顏色變動越明顯，越容易被感測到。
- 三、加入硫醇類修飾物能增加金奈米膠體溶液對偵測胺類時的靈敏度，且對奈米金結合力強之硫醇類較佳(如 pATP)。
- 四、凝聚現象會使顏色呈半透明，原因為：
 - (一)金奈米粒子電荷包覆不均，造成數天後金奈米間互相聚集。
 - (二)過量的胺類分子或是過量結合力強之修飾物。
- 五、當溶液顏色變為藍紫色，代表魚肉放置時間過長(超過設定時間)，其內胺類分子含量高，代表魚肉已有一定程度的腐敗。
- 六、固定魚塊的浸泡時間較能準確檢測出胺類分子含量的變化，因此選用其為較佳檢測方法。
- 七、溶液顏色遞變為紅→紫紅→藍紫→藍，可製簡易比色表分辨大約放置時間。
- 八、只要能確知魚肉中胺類分子的含量與相對應的放置時間的關係，得出放置多久後胺類的量到達魚類不可食用之標準，再找出最佳濃度，即可製出簡易分辨魚類是否新鮮(可食用)的試劑。

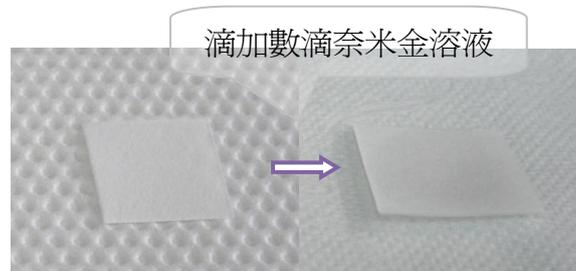
九、我們也嘗試將溶液改成試片及凝膠，目前還在尋找可循辦法。但目前的問題是奈米膠體溶液滴加在試紙上後會變得較透明，難以分辨顏色變化；製成凝膠變色速度慢且不易分辨顏色是否變化。

(一) 試液



圖四十五、Au 膠體溶液顏色變化示意

(二) 試片



圖四十六、Au 膠體溶液滴加在濾紙

(三) 凝膠



圖四十七、Au 膠體溶液製成凝膠之顏色變化示意

捌、參考資料

- 一、東華大學化學系羅幼旭實驗室。銀奈米粒子之製備與 UV-vis 光譜測定。取自：
http://www.nanoedu.ndhu.edu.tw/labtext/94_Lo_UV.pdf
- 二、張菊香。水產品中組織胺的生成及檢測方法之探討。取自：
http://coa.cpc.org.tw/edu/Class/doc/95/%E8%AC%9B%E7%BE%A9/95%E6%B0%B4%E7%94%A2%E5%93%81/%E7%B5%84%E7%B9%94%E8%83%BA_%E5%BC%B5%E8%8F%8A%E9%A6%99%E6%8A%80%E6%AD%A3.pdf
- 三、彭清勇、聶方珮、蘇平貴（民國 93）。魚類即時鮮度感測器技術開發。九十二學年度中國海事商業專科學校學報，第 47～60 頁。
- 四、劉鎮宇、邱泰嘉、張志聰、胡焯淳（民 98）。鉛離子之金奈米粒子感測器。科學教育月刊，第 323 期。
- 五、Fang Wei, Robert Lam, Stacy Cheng, Steven Lu, Dean Ho, Na Li. Rapid detection of melamine in whole milk mediated by unmodified gold nanoparticles. Applied Physics Letters, 2010; 96 (13): 133702 DOI: 10.1063/1.3373325
- 六、Sigma aldrich(<http://www.sigmaaldrich.com/taiwan.html>)
- 七、Suresh K. Balasubramanian, Liming Yang, Lin-Yue L. Yung, Choon-Nam Ong, Wei-Yi Ong, Liya E. Yu. 2010. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. Biomaterials 31 (2010) 9023e9030
- 八、Tingjian Jia, Tingchao He, Pengwei Li, Yujun Mo, Yuting Cui. 2008. A study of the thermal-induced nonlinearity of Au and Ag colloids. Optics & LaserTechnology 40 (2008) 936 – 940

【評語】 040214

本作品製備奈米金粒子，以硫醇分子進行修飾，觀察對胺類化合物的作用，作者對硫醇分子在奈米粒子表面作用以及胺分子對奈米粒子的集聚效應，若能有進一步的結果，頗有前瞻性，用來檢測魚的新鮮度有頗合乎本土的生活應用。