

中華民國第 56 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 工程學科(二)科

第三名

052401

半胱氨酸修飾奈米金作為金屬離子的偵測與辨識

學校名稱：新北市立北大高級中學

作者： 高二 曾佩慈 高二 蔣仲安 高二 林秉賢	指導老師： 羅 葳
---	------------------

關鍵詞：奈米金、金屬離子探針、比色法

摘要

為了能快速且低成本地檢測工業廢水中有毒重金屬離子，本研究合成出修飾半胱胺酸的奈米金，成功地偵測出金屬離子且有好的偵測極限，特別是一些較毒的重金屬離子（ Cu^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} ）靈敏度甚至可達 $2 \mu\text{M}$ ；此外，再搭配 EDTA-4Na、 $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 、 $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$ 這些含有胺基和羧基的添加劑，因添加劑能夠增強或減弱奈米金顆粒的聚集，於是我們藉由比色陣列的方式，觀察它們的聚集、變色情形，可以肉眼辨識出十種不同的金屬離子（ Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} ），是非常迅速、簡便的偵測方式，期望能對環境污染的災害防治有所貢獻。

壹、 研究動機

近來經新聞得知依環保署和農委會農業試驗所的歷年資料，針對全國農地汙染完成第一期分析報告，台灣仍有過半數的汙染農地正在列管中。而依全國普測農地土壤重金屬的資料，全台有一千一百多個重金屬汙染超標的地點，其中又以銅汙染面積最大，高達百分之七十，其次為鎳、鋅、鉻，而這些土壤的汙染源自於台灣早期引水灌溉的河川遭受工業廢水汙染，致使土地受重金屬汙染。而之前在化學課上到生活中的化學時，提到工業廢水的重金屬離子會導致許多疾病，造成嚴重的環境和健康問題，如表一。因此，我們希望能結合在課程中學到奈米科技的知識來偵測重金屬離子，以降低風險並預防汙染災害。

表一、各種金屬離子造成的症狀與主要汙染源

重金屬	症狀	汙染主要來源
鉻	塵肺病、肺癌	電鍍業、電池業
銅	威爾森病、急性器官衰竭	電鍍業、半導體業、印刷業
汞	中樞神經受損、水喉症	電鍍業、電池業
鎳	免疫機能異常、肺癌	電鍍業、電池業
鉛	運動神經病變、腦病變	電鍍業、電池業
鋅	皮膚炎、呼吸窘迫症	金屬業、熔融業、電鍍業
鎘	痛痛病、肝功能異常	電池業、染料製造、塑膠製程
砷	溶血、烏腳病	硫酸製程，電子工業

為了增進人民健康並控制環境汙染，能夠研發出可信賴、有效、準確偵測重金屬離子的技術就顯得重要。常用於偵測金屬離子的方法包含原子吸收光譜(atomic absorption spectroscopy)、感應耦合電漿(ion-coupled-plasma)、感應耦合電漿質譜分析儀(inductively coupled plasma mass spectroscopies)等，然而這些檢測方法都需要經過嚴格的技術訓練，且儀器設備建置的費用也較為昂貴，其測量的過程也較繁複，是屬於門檻較高的測量方式。

近年來，金屬奈米粒子利用比色法對有毒的重金屬離子進行偵測，儼然已成為一個簡單、方便、低成本可替代傳統光譜的偵測方法。這些方法是先對奈米粒子的表面進行修飾，當加入金屬離子後，可以控制奈米粒子的聚集，進而使溶液的顏色改變。這成為一快速、靈敏偵測金屬離子的方法，只需要簡單的UV-Vis吸收光譜儀，甚至不需要任何儀器，即可透過肉眼觀察顏色的變化。雖然已有許多成功變色的探針已被開發，但通常只能偵測單一或特定的金屬離子，而透過比色陣列(colorimetric sensor arrays)同時偵測多種金屬離子則是相當少見，其中Gulsu senser等人^[1]以11-mercaptoundecanoic acid(MUA)修飾於金奈米粒子上，藉由MUA上的羧基來進行對金屬離子配位，並搭配離胺酸、半胱胺酸、組胺酸、酪胺酸、精胺酸，造成金奈米粒子的聚集，進而影響可見光吸收波長，該新穎奈米材料可以偵測 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Cr^{3+} 。

本研究嘗試以半胱胺酸(L-Cystein)修飾金奈米粒子，並藉由(L-Cystein)上兩個螯合點胺基及羧基，來進行對金屬離子配位，以提高對離子的選擇性，同時搭配乙二胺四乙酸四鈉、草酸鉀、乙二胺，探討對不同金屬離子的檢測效果，以期能研發出簡單、便宜的偵測方法，有效防治污染與災害。

貳、 研究目的

- 一、 合成出新型修飾的奈米金 Cys-AuNPs。
- 二、 探討最佳的 pH 值條件，來偵測金屬離子。
- 三、 探討 Cys-AuNPs 對不同金屬離子的感測度。
- 四、 探討 Cys-AuNPs 對不同金屬離子的偵測極限。
- 五、 探討不同添加劑對金屬離子辨識的效果。

參、 實驗藥品與儀器設備

一、 實驗藥品

藥品名稱	化學式	廠牌	純度
三水合四氯酸金 Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Acros	>99%
硫酸 Sulfuric Acid	H_2SO_4	CHONEYE	98.7%
半胱胺酸 L-Cysteine	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$		Extra pure
二水合檸檬酸三鈉 Citric acid, trisodium salt. dihydrate	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Acros	99%
氫氧化鈉 Sodium hydroxide	NaOH	SHIMAKYU'S	>95%
乙二胺四醋酸四鈉 EDTA 4Na	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 4\text{Na} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	CHONEYE	98.28%
鹽酸 Hydrochloric acid	HCl	CHONEYE	$\geq 32.4\%$
硝酸鈷 Cobalt nitrate	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	CHONEYE	$\geq 98\%$
硝酸鉛 Lead nitrate	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	CHONEYE	>98%
硝酸鋁 Aluminum nitrate	$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	CHONEYE	99%
硝酸鐵 Ferric nitrate	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	CHONEYE	>98%
硝酸鈣 Calcium nitrate	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	CHONEYE	$\geq 98\%$
硝酸銅 Cupric nitrate	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	CHONEYE	>98%
硝酸銀 Silver nitrate	AgNO_3	CHONEYE	Extra pure
硝酸鋅 Zinc nitrate	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Acros	98%
硝酸汞 Mercuric nitrate monohydrate	$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Acros	>98%
硝酸鉻	$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	CHONEYE	99.1%

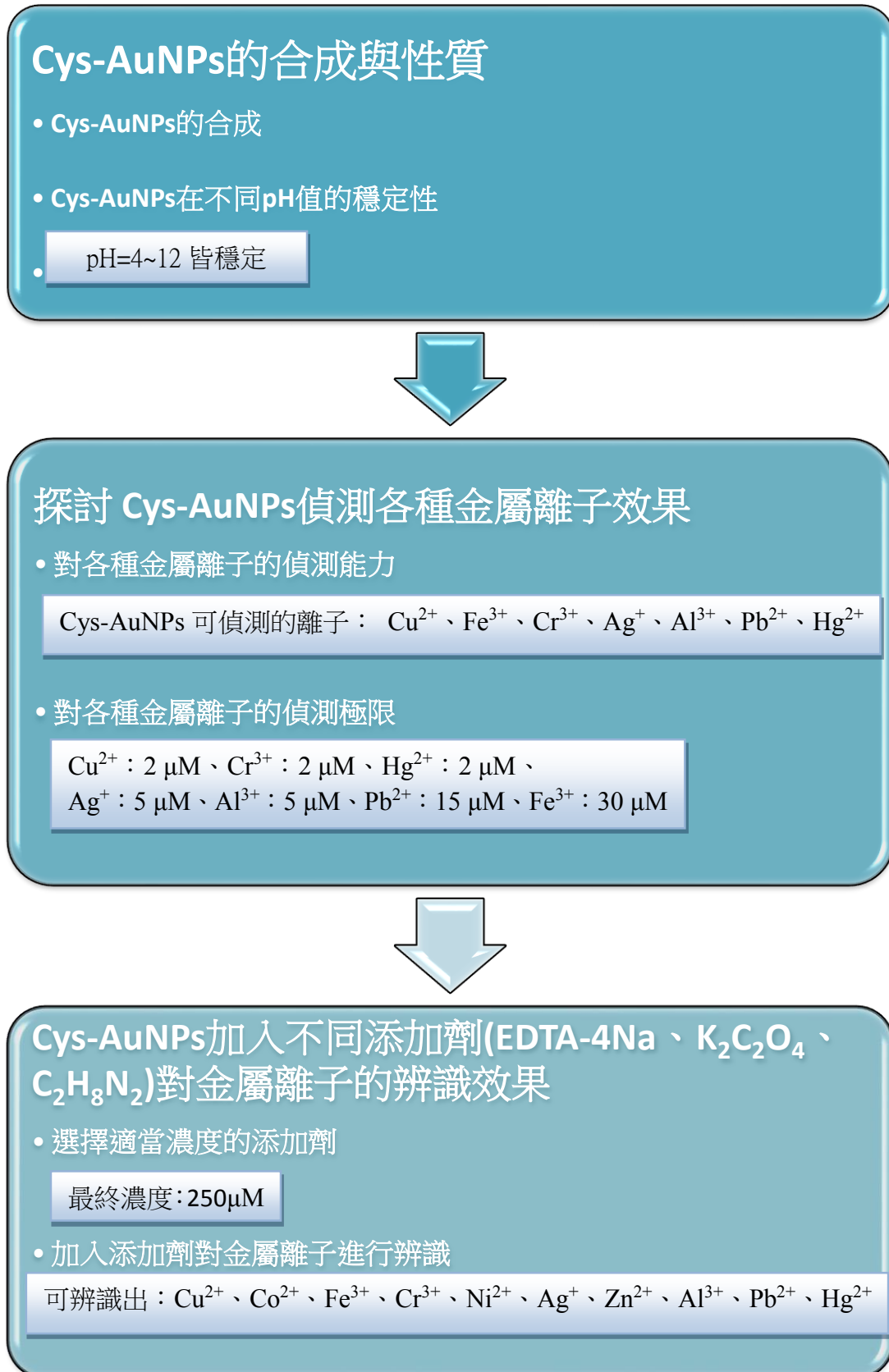
Chromium nitrate			
硝酸鎳 Nickel(II) nitrate hexahydrate	$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Acros	98%
氯化鉀 Potassium chloride	KCl	Fisher Chemical	>99%
氯化銫 Cesium chloride	CsCl	Acros	>99%
氯化鋰 Lithium chloride	LiCl	Acros	99%
草酸鉀 Potassium oxalate	$\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	CHONEYE	99%
乙二胺 Ethylenediamine	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	CHONEYE	Extra pure
緩衝液(pH=4) Buffer solution	pH 4.00[Phthalate]	CHONEYE	4.00±0.02
緩衝液(pH=7) Buffer solution	pH 7.00[Phosphate]	CHONEYE	7.00±0.02

二、 儀器設備

儀器名稱	廠牌與型號	目的
紫外光－可見光光譜儀 (UV-Vis Absorption Spectroscopy)	Vernier, UV-Vis Absorption Spectroscopy	測量奈米金的表面電漿共振吸收峰
pH 儀感測器 (pH Meter)	Vernier pH Sensor	檢測溶液 pH 值
離心機 (Centrifuge)	Digisystem DSC-101SD	分離水與奈米金
超純水製造機 (Ultrapure Millipore water(18.2 MΩ))	Merck Millipore, Direct-Q3	過濾水中的雜質

肆、 研究過程與方法

實驗流程圖：



一、Cys-AuNPs 的合成與性質

(一)、 Cys-AuNPs 的合成

1. 利用檸檬酸鈉穩定奈米金的合成方式是參考 Turkevich^[2]的方法首先將圓底雙頸瓶及磁石先用王水(鹽酸:硝酸:水=3:1:1)清洗，去除所含之金屬。
2. 將 0.215 mM、100 mL 四氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)溶液以加熱迴流系統加熱攪拌(110 °C，400 rpm)至沸騰。
3. 沸騰時，立刻加入 12 mL、1%(w/w)的檸檬酸鈉($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)溶液，持續加熱攪拌(110 °C，400 rpm)25 分鐘，直到溶液變為酒紅色，即合成出奈米粒子。
4. 在奈米金上修飾半胱胺酸：
奈米金上修飾半胱胺酸，是參考 Sener^[1]的方法加入已混合的 0.744 mM、20 mL 半胱氨酸(cysteine)和 0.5 M、60 μL 氫氧化鈉(NaOH)溶液，再持續加熱攪拌(110°C，400rpm)1 小時，使奈米金粒子與半胱氨酸產生金—硫鍵，合成出 Cys-AuNPs。
5. 將 Cys-AuNPs 溶液放置冷卻後，以 12000 rpm 的離心速度離心 15 分鐘，並以超純水清洗兩次，除去未結合的半胱氨酸分子，即可得到產物 Cys-AuNPs。

(二)、 Cys-AuNPs 在不同 pH 值的穩定性

1. 以硫酸(H_2SO_4)配製 pH=1~13 的水溶液。
2. 各取 1800 μL 、pH=1~13 的水溶液加入比色槽內，再分別加入 200 μL Cys-AuNPs 溶液。
3. 觀察 Cys-AuNPs 在不同 pH 值下的穩定性，每 15 分鐘用 UV-Vis 吸收光譜儀測量一次，共一小時。

二、探討 Cys-AuNPs 偵測各種金屬離子效果

(一)、 探討 Cys-AuNPs 對不同金屬離子的偵測能力

1. 取 1800 μL 、pH=4~5 水溶液和 200 μL 、Cys-AuNPs 溶液裝入比色槽中當作對照組。
2. 各取 1780 μL 、pH=4~5 水溶液和 200 μL Cys-AuNPs 溶液裝入 14 管比色槽

中。

3. 配製 5 mM 金屬離子溶液(Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 K^+ 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Li^+ 、 Cs^+ 、 Hg^{2+})。
4. 取 20 μL 、5 mM 不同金屬溶液，分別加入 14 管裝有 1780 μL 、 $\text{pH}=4\sim 5$ 水溶液和 200 μL Cys-AuNPs 溶液的比色槽中(最終金屬離子濃度為 50 μM)。
5. 每 15 分鐘用 UV-Vis 光譜儀測量一次，共兩小時。

(二)、 探討 Cys-AuNPs 對各種不同濃度金屬離子的偵測極限

1. 分別配製 200 μM ~5 mM 的 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 等金屬離子溶液。
2. 取 1800 μL 、 $\text{pH}=4\sim 5$ 水溶液和 200 μL Cys-AuNPs 溶液裝入比色槽中當作對照組。
3. 各取 1780 μL 、 $\text{pH}=4\sim 5$ 水溶液和 200 μL Cys-AuNPs 溶液裝入 11 管比色槽中。
4. 取 20 μL 不同濃度的銅離子溶液，分別加入 11 管裝有 1780 μL 、 $\text{pH}=4\sim 5$ 水溶液和 200 μL Cys-AuNPs 溶液的比色槽中。(最終銅離子濃度為 2 μM ~50 μM)。
5. 每 15 分鐘用 UV-Vis 光譜儀測量一次，共兩小時。
6. 重複步驟 2，將銅離子溶液改為 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 作為金屬離子溶液。

三、Cys-AuNPs 加入不同種的添加劑對金屬離子的辨識效果

(一)、 選擇適當的添加劑(乙二胺四乙酸四鈉、草酸鉀、乙二胺)的濃度

1. 分別配製 5~50 mM 的添加劑(EDTA-4Na、 $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 、 $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$)溶液
2. 取 1800 μL 、 $\text{pH}=4\sim 5$ 水溶液和 200 μL Cys-AuNPs 溶液裝入比色槽中當作對照組。
3. 各取 1780 μL 、 $\text{pH}=4\sim 5$ 水溶液和 200 μL Cys-AuNPs 溶液裝入 10 管比色槽中。
4. 再分別加入 20 μL 、5~50 mM 不同濃度的 EDTA-4Na 於比色槽中(最終添加劑濃度為 50~500 μM)。

5. 每 15 分鐘用 UV-Vis 光譜儀測量一次，共一小時。
6. 重複步驟 2，將 EDTA-4Na 改為 $K_2C_2O_4$ 、 $C_2H_8N_2$ 作為添加劑。

(二)、 探討加入乙二胺四乙酸四鈉(EDTA-4Na)、草酸鉀($K_2C_2O_4$)、乙二胺($C_2H_8N_2$)，對金屬離子辨識效果的影響

1. 這個實驗是在 24 孔板(well plate)下進行。
2. 分別配製 25 mM 的添加劑(EDTA-4Na、 $K_2C_2O_4$ 、 $C_2H_8N_2$)溶液。
3. 取 1780 μ L、pH=4~5 水溶液、20 μ L、25 mM 的 EDTA-4Na 和 200 μ L Cys-AuNPs 溶液裝入比色槽中當作對照組。
4. 各取 1760 μ L、pH=4~5 水溶液、20 μ L、25 mM 的 EDTA-4Na 和 200 μ L Cys-AuNPs 溶液裝入比色槽中。再分別加入 20 μ L、5 mM 不同金屬離子溶液於比色槽中(最終金屬離子濃度為 50 μ M)。
5. 重複步驟 3，將 EDTA-4Na 改為 $K_2C_2O_4$ 、 $C_2H_8N_2$ 作為添加劑。

(三)、 探討加入乙二胺四乙酸四鈉(EDTA-4Na)、草酸鉀($K_2C_2O_4$)、乙二胺($C_2H_8N_2$)，對二或三種金屬離子(Hg^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{2+})混合後辨識效果的影響

1. 這個實驗是在 24 孔板(well plate)下進行。
2. 分別配製 25 mM 的添加劑(EDTA-4Na、 $K_2C_2O_4$ 、 $C_2H_8N_2$)溶液。
3. 各取 1760 μ L、pH=4~5 水溶液、20 μ L、25 mM 的 EDTA-4Na 和 200 μ L Cys-AuNPs 溶液裝入比色槽中。再分別加入 20 μ L、5 mM 汞離子溶液、鉻離子溶液、鈷離子溶液於比色槽中(最終金屬離子濃度為 50 μ M)，作為對照組。
4. 各取 1740 μ L、pH=4~5 水溶液、20 μ L、25 mM 的 EDTA-4Na 和 200 μ L Cys-AuNPs 溶液裝入比色槽中。再分別加入 20 μ L、5 mM 汞離子與鉻離子溶液、汞離子與鈷離子溶液、鉻離子與鈷離子溶液於比色槽中。
5. 取 1720 μ L、pH=4~5 水溶液、20 μ L、25 mM 的 EDTA-4Na 和 200 μ L Cys-AuNPs 溶液裝入比色槽中。再分別加入 20 μ L、5 mM 汞離子溶液+鉻離子溶液+鈷離子溶液於比色槽中。
6. 重複步驟 3，將 EDTA-4Na 改為 $K_2C_2O_4$ 、 $C_2H_8N_2$ 作為添加劑。

伍、研究結果與討論

一、Cys-AuNPs 的合成與性質

(一)、Cys-AuNPs 的合成

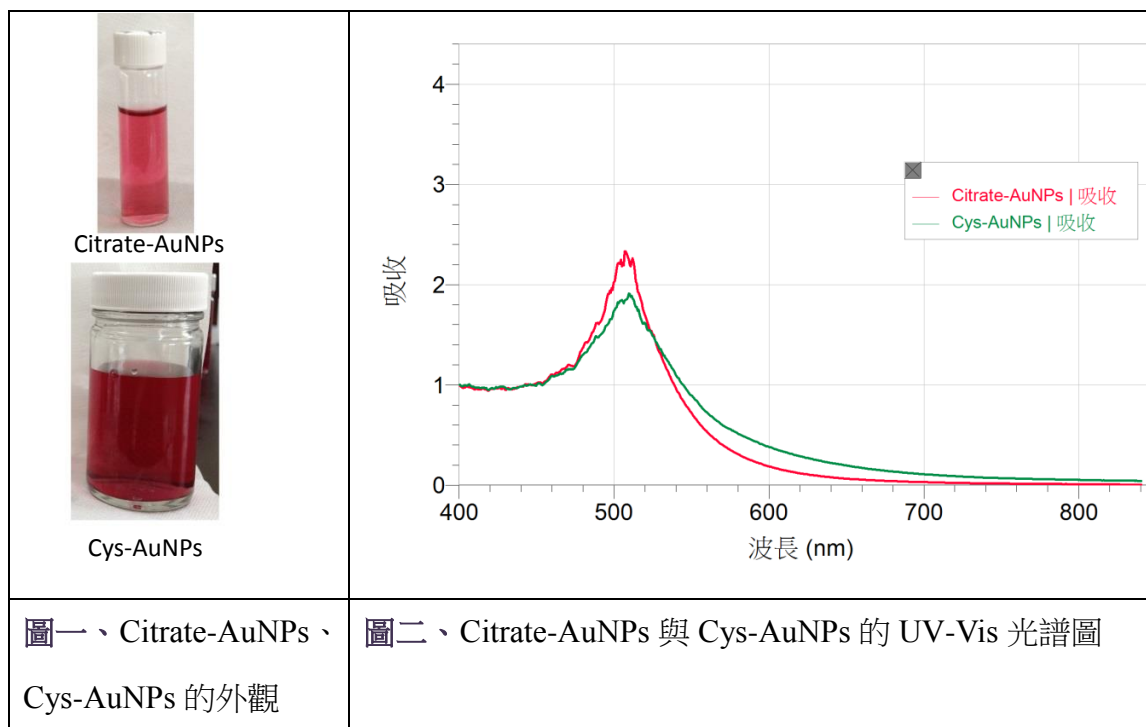
1. 實驗結果：

(1). 外觀：

由實驗結果可發現，利用檸檬酸鈉還原並穩定的奈米金粒子(Citrate-AuNPs)，與修飾上半胱胺酸分子的奈米金粒子(Cys-AuNPs)，二者溶液的顏色皆為酒紅色，如圖一。

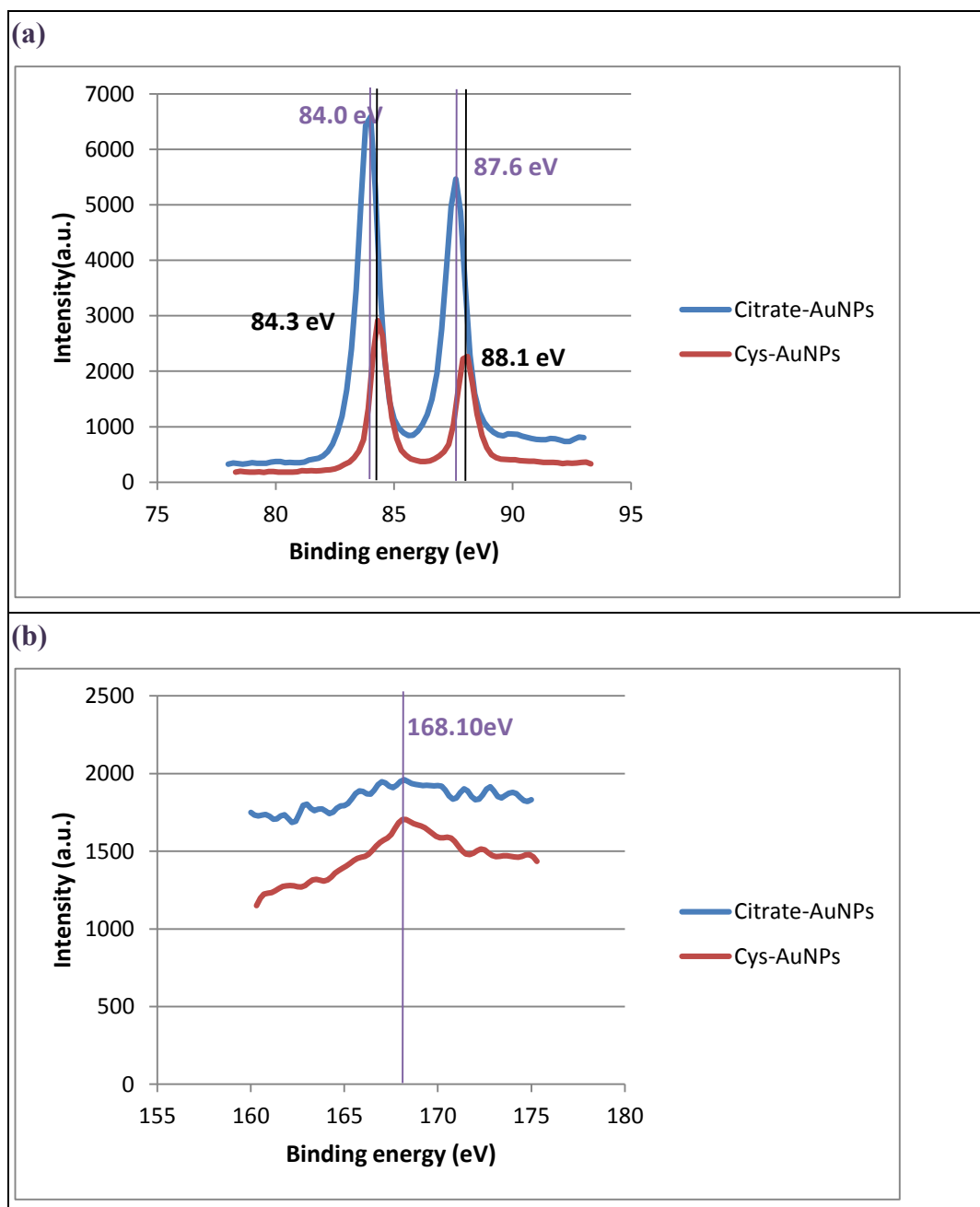
(2). UV-Vis 吸收光譜：

當分別測 Citrate-AuNPs 與 Cys-AuNPs 的 UV-Vis 吸收光譜時，其最大吸收峰的波長有位移，從原來 Citrate-AuNPs 的波長 507.5 nm 位移至 Cys-AuNPs 509.4 nm，且波形改變，如圖二。



(3). X-ray 光電子光譜(XPS)：

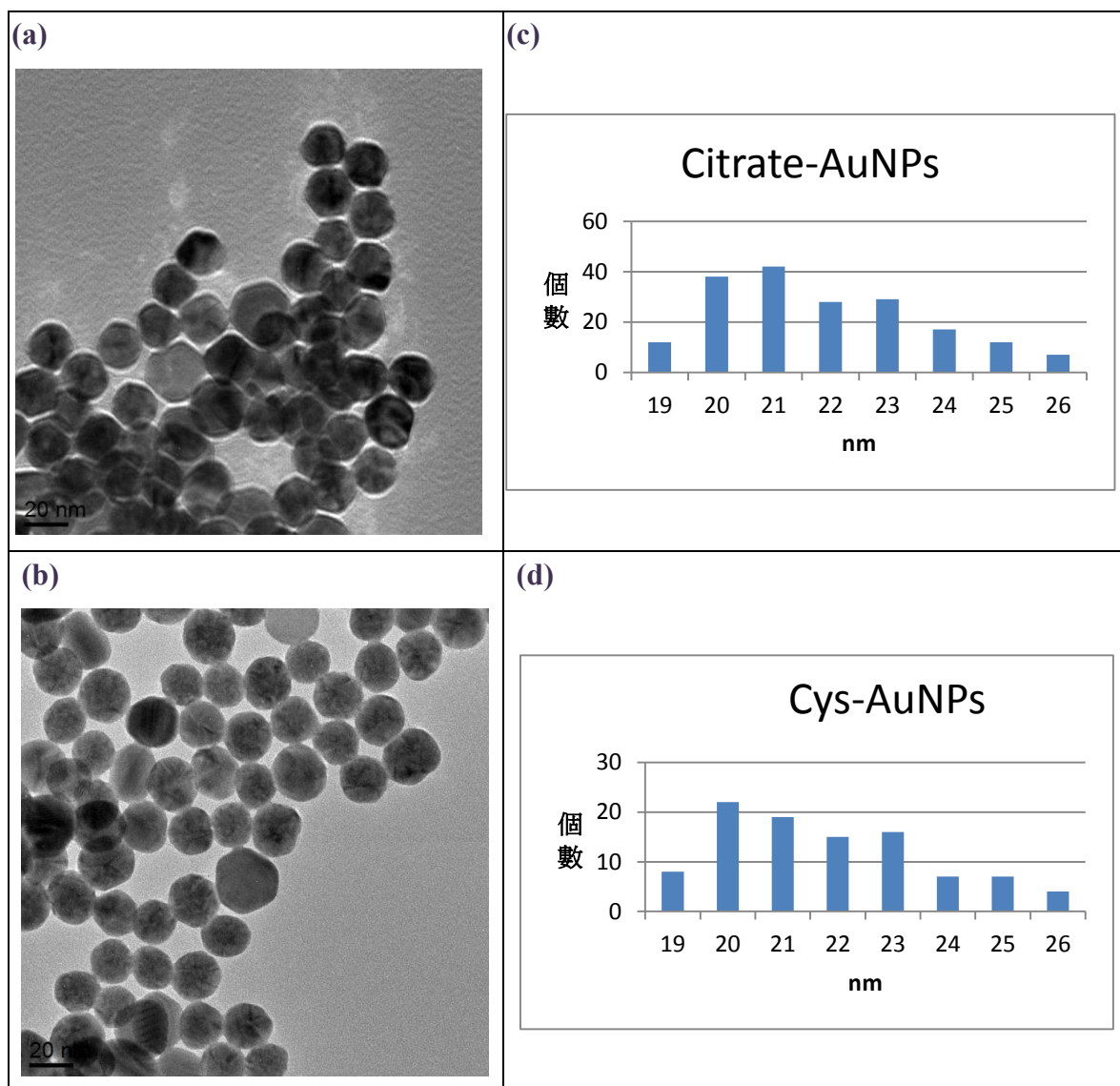
分別測 Citrate-AuNPs 與 Cys-AuNPs 的 X-ray 光電子光譜(XPS)時，Citrate-AuNPs 金的 $4f_{7/2}$ 和 $4f_{5/2}$ 訊號分別為 84.0 eV、87.6 eV；而當半胱胺酸取代檸檬酸鈉形成 Cys-AuNPs 時，金的 $4f_{7/2}$ 和 $4f_{5/2}$ 訊號分別位移至 84.3 eV、88.1 eV，如圖三(a)。在 Citrate-AuNPs 的樣品中看不到硫的 $2p_{3/2}$ 的訊號，反之 Cys-AuNPs 中能清楚看見硫的 $2p_{3/2}$ 的訊號，位置在 168.10 eV，如圖三(b)。



圖三、Citrate-AuNPs 與 Cys-AuNPs 的 X-ray 光電子光譜 (a) Citrate-AuNPs 與 Cys-AuNPs 金元素的訊號 (b) Citrate-AuNPs 與 Cys-AuNPs 硫元素的訊號

(4). 穿透式電子顯微鏡(TEM)：

- I. 將 Citrate-AuNPs 與 Cys-AuNPs，分別測 TEM 的影像，其奈米金的形狀皆為球形，如圖四(a)、(b)。
- II. 從奈米金粒徑的散佈圖中可發現，奈米金的尺度幾乎為鐘型分佈，如圖四(c)、(d)。並進一步計算 TEM 圖形中，奈米粒子的粒徑大小，Citrate-AuNPs 的奈米粒徑約為 23.73 nm；Cys-AuNPs 的奈米粒徑約為 22.54 nm。由此實驗結果可知平均粒徑大小，沒有隨接上半胱胺酸而明顯改變。

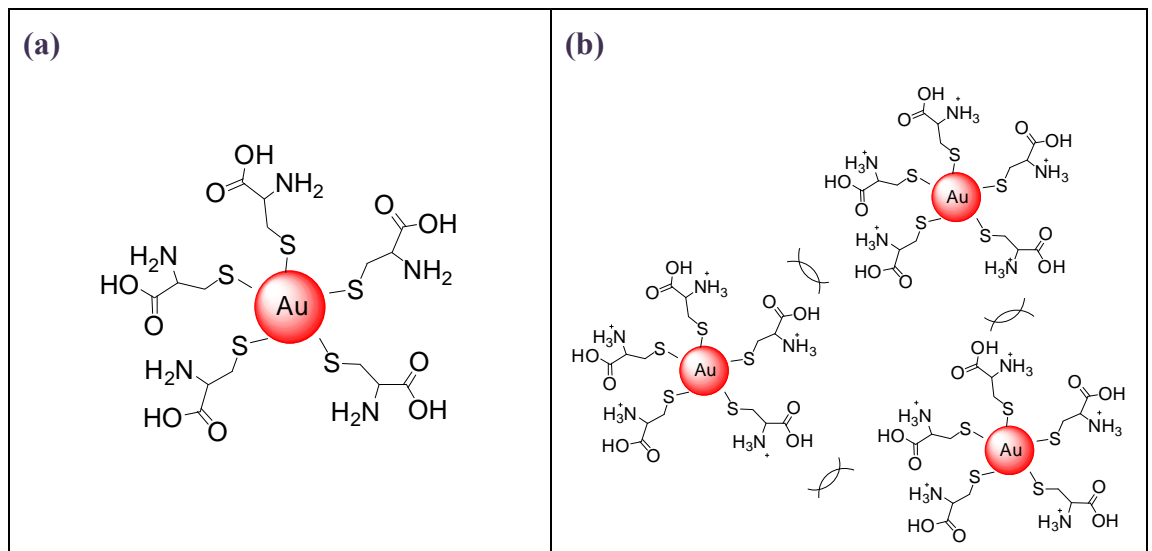


圖四、Citrate-AuNPs 與 Cys-AuNPs 的 TEM 光譜 (a)Citrate-AuNPs、(b)Cys-AuNPs，以及其對應的奈米金粒徑大小分布圖(c)、(d)。

2. 討論：

- (1). 由於硫醇類是高度可極化(polarizability)、提供電子非常強的配位基 (electron-releasing ligand)，當我們將具有硫醇基的半胱胺酸加入金的膠體溶液中，硫醇基與金會形成非常強的金－硫鍵(鍵能約： 184 kJ mol^{-1})，取代原先穩定奈米金的檸檬酸根(citrate)離子。而當金－硫鍵形成時，奈米金的表面電漿共振改變，使吸收波長位移，並且 XPS 中金原子的鍵結能量也發生位移。我們推測出 Cys-AuNPs 接上半胱胺酸後，其可能的結構圖形，如圖五(a)。
- (2). 合成出 Cys-AuNPs 後，調整溶液的 pH 值時，即可調整奈米金上半胱胺酸分子所帶的電荷量，進而穩定 Cys-AuNPs。若將溶液調整至酸性時，半胱

胺酸上的胺基應會被質子化，使整個奈米金粒子帶正電，即可藉由靜電斥力穩定分散奈米金粒子，如圖五(b)。



圖五、修飾半胱胺酸的奈米金 Cys-AuNPs 的可能結構(a)；在酸性溶液中，Cys-AuNPs 的可能結構(b)

(二)、Cys-AuNPs 在不同 pH 值的穩定性

1. 實驗結果：

(1). 外觀：

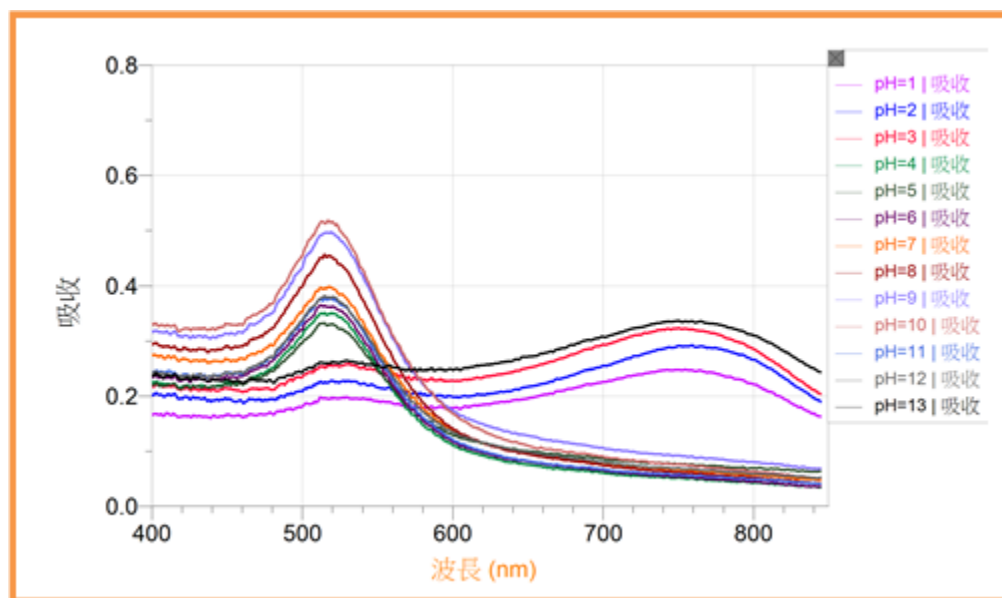
Cys-AuNPs 會因 pH 值不同，而有不同程度的聚集，如圖六。當 pH=4~12 時，Cys-AuNPs 可以穩定分散不聚集；而當 pH=1、2、3、13 時，Cys-AuNPs 會因聚集而使顏色從紅色變為藍紫色，如圖六。



圖六、Cys-AuNPs 在 pH=1~13 下的聚集程度的顏色變化

(2). UV-Vis 吸收光譜：

比較不同 pH 值時，Cys-AuNPs 的 UV-Vis 吸收波長，發現當 pH=4~12 時，其最大吸收值的波長約為 515 nm，而當 pH=1、2、3、13 時，其最大吸收值的波長約為 755 nm，如圖七。



圖七、Cys-AuNPs 在 pH=1~13 時的 UV-Vis 吸收光譜圖

2. 討論：

在進行金屬離子的偵測實驗之前，我們先對 Cys-AuNPs 在不同 pH 值時的穩定性進行測試。發現，當 pH=1、2、3、13 時，UV-Vis 吸收光譜有明顯的紅位移，顯示 Cys-AuNPs 有聚集現象。於是我們選用 pH=4~5 的實驗條件，因在此條件下 Cys-AuNPs 非常穩定，可作為後續金屬離子偵測的條件。

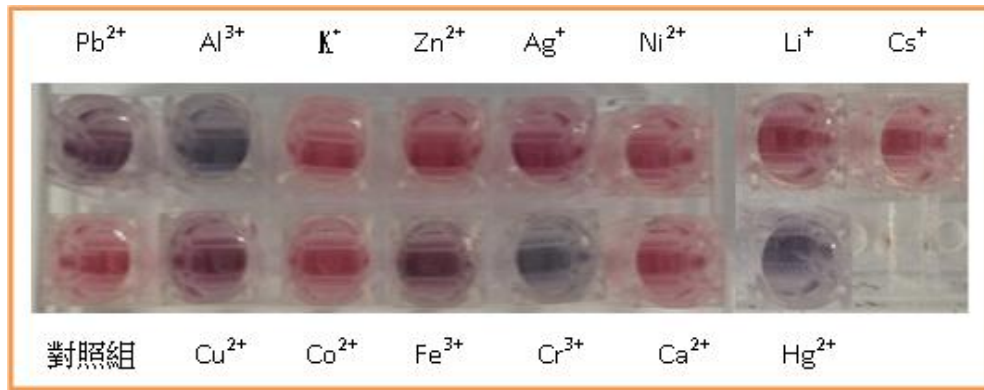
二、探討 Cys-AuNPs 偵測各種金屬離子的效果

(一)、 探討 Cys-AuNPs 對不同金屬離子的偵測能力

1. 實驗結果：

(1). 外觀：

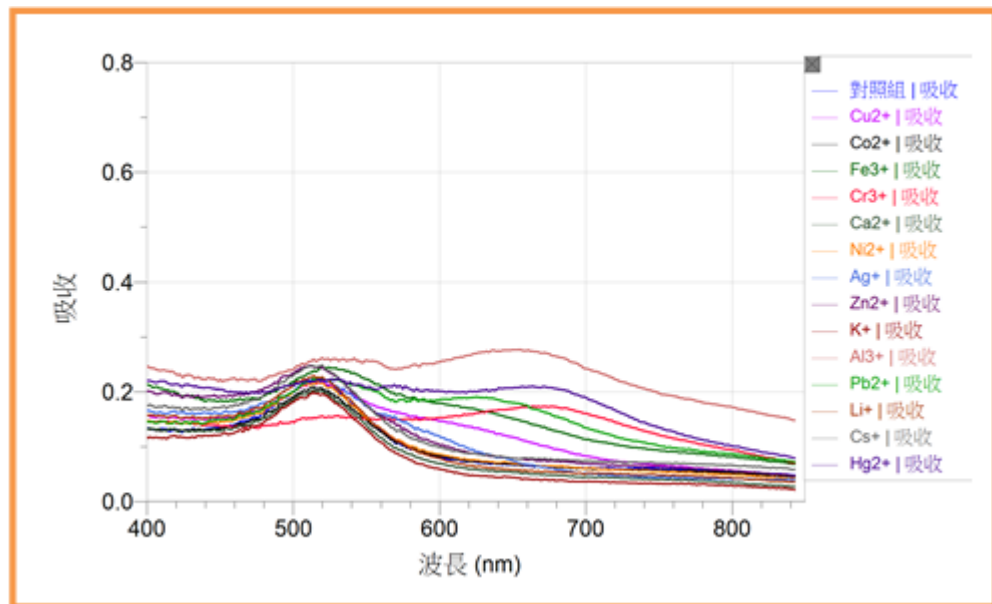
由實驗結果可發現 Cys-AuNPs 加入 5 mM 的鉛、鋁、銀、銅、鐵、鉻、汞等離子會產生聚集、變色的現象，如圖八。



圖八、Cys-AuNPs 加入 5mM 不同金屬離子(Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 K^+ 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Li^+ 、 Cs^+ 、 Hg^{2+})的聚集情形。

(2). UV-Vis 吸收光譜：

比較當 Cys-AuNPs 的溶液中，加入 5 mM 不同金屬離子時的 UV-Vis 光譜。其中，鉛、鋁、銀、銅、鐵、鉻、汞等離子，最大吸收值的波長有明顯位移，從原來的大約 515 nm 位移至大約 680 nm，如圖九。



圖九、Cys-AuNPs 加入 5 mM 不同金屬離子(Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 K^+ 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Li^+ 、 Cs^+ 、 Hg^{2+})的 UV-Vis 吸收光譜圖。

2. 討論：

當 Cys-AuNPs 的溶液，加入金屬離子，產生不同的顏色變化。可能是因 Cys-AuNPs 上的胺基、羧酸基和金屬離子間有不同的螯合方式，與不同的螯合程度，造成 Cys-AuNPs 的聚集。針對聚集的金屬離子，我們再進行偵測極限的實驗。

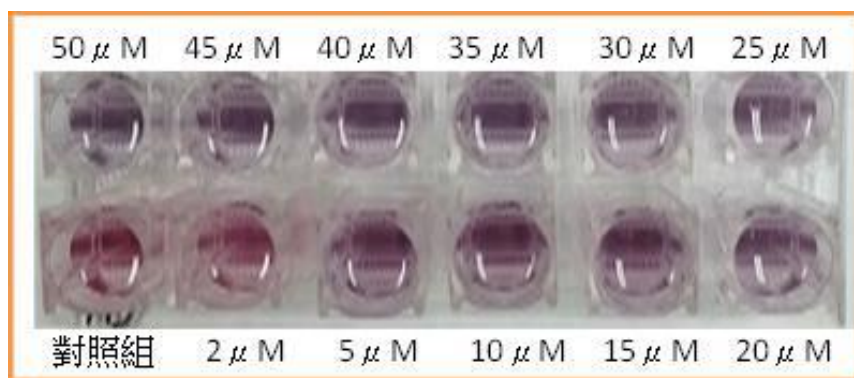
(二)、探討 Cys-AuNPs 對各種不同濃度金屬離子的偵測極限

1. 銀離子(Ag^+)

(1). 實驗結果：

I. 外觀：

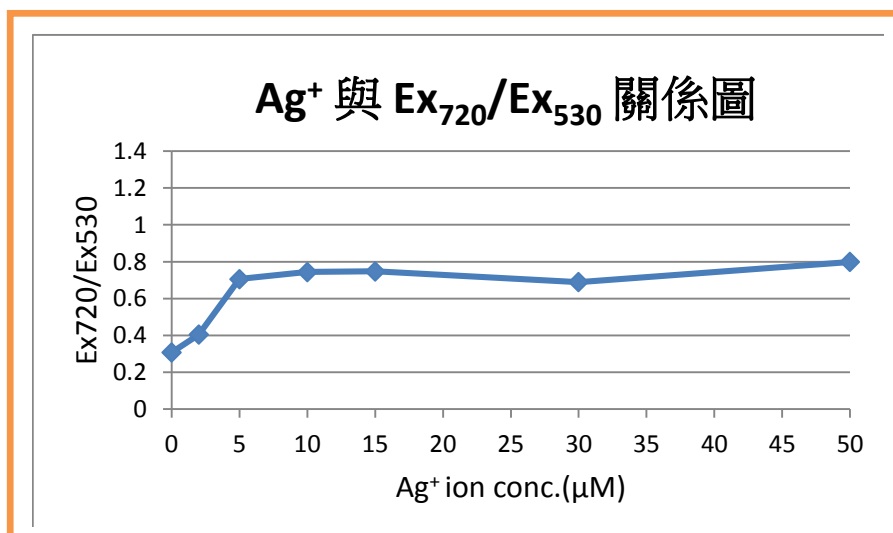
由實驗結果可發現當 Ag^+ 濃度大於 5 μM 時，Cys-AuNPs 即產生聚集、變色的現象，如圖十。



圖十、Cys-AuNPs 加入不同濃度銀離子的顏色變化、聚集情形。

II. UV-Vis 吸收光譜：

測量 Cys-AuNPs 溶液在不同銀離子濃度下(0 μM ~50 μM)，波長為 720 nm 以及 530 nm 時的消光係數。因為波長為 720 nm 以及 530 nm 時的消光係數，與奈米金粒子的聚集和分散的數量有關，因此利用 $\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$ 的比值，即可代表奈米金聚集與分散的莫耳分率，當 $\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$ 數值越大，則代表 Cys-AuNPs 聚集程度越明顯，如圖十一。



圖十一、銀離子濃度對 Cys-AuNPs 消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖

(2). 討論：

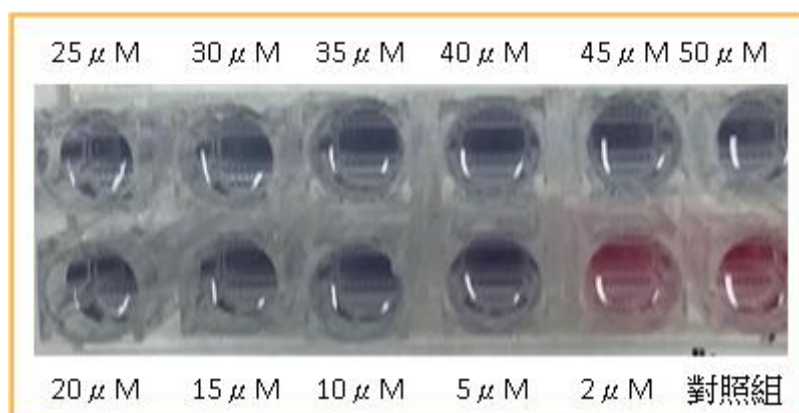
由圖十一的關係圖中，可以發現當銀離子的濃度為 $5 \mu\text{M}$ 時，消光係數比值 ($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$) 突然上升，代表 Cys-AuNPs 有明顯的聚集現象發生，由此可知銀離子的偵測極限約為 $5 \mu\text{M}$ 。

2. 鋁離子(Al^{3+})

(1). 實驗結果：

I. 外觀：

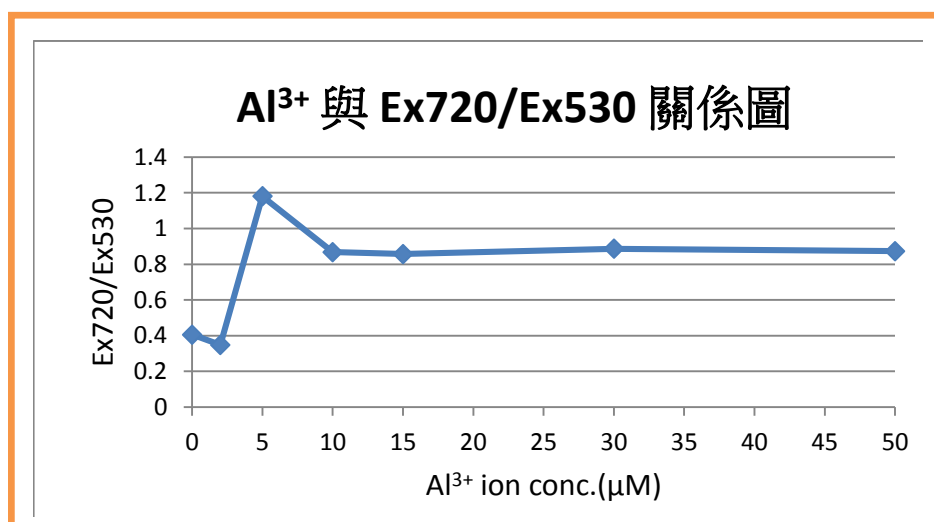
由實驗結果可發現當 Al^{3+} 濃度大於 $5 \mu\text{M}$ 時，Cys-AuNPs 即產生聚集、變色的現象，如圖十二。



圖十二、Cys-AuNPs 加入不同濃度鋁離子的顏色變化、聚集情形。

II. UV-Vis 吸收光譜：

測量在不同鋁離子濃度下($0 \mu\text{M} \sim 50 \mu\text{M}$)，Cys-AuNPs 在波長為 720 nm 以及 530 nm 時消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖，如圖十三。



圖十三、鋁離子濃度對 Cys-AuNPs 消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖

(2). 討論：

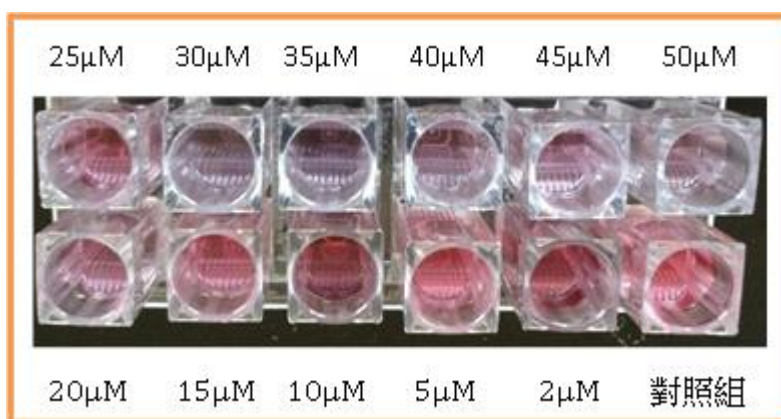
由圖十三的關係圖中，可以發現當鋁離子的濃度為 $5\ \mu\text{M}$ 時，消光係數比值 ($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$) 突然上升，代表 Cys-AuNPs 有明顯的聚集現象發生，由此可知鋁離子的偵測極限約為 $5\ \mu\text{M}$ 。

3. 鐵離子(Fe^{3+})

(1). 實驗結果：

I. 外觀：

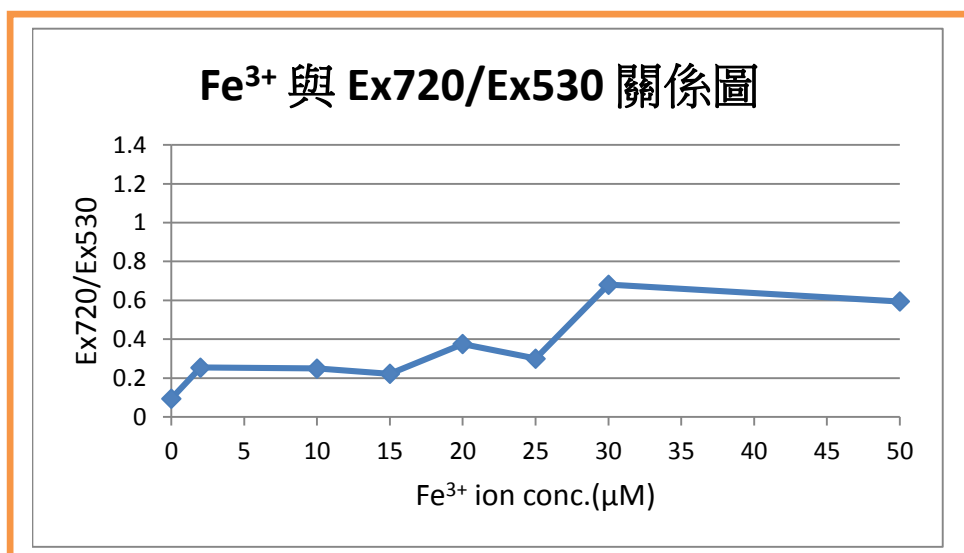
由實驗結果可發現當 Fe^{3+} 濃度大於 $30\ \mu\text{M}$ 時，Cys-AuNPs 即產生聚集、變色的現象，如圖十四。



圖十四、Cys-AuNPs 加入不同濃度鐵離子的顏色變化、聚集情形。

II. UV-Vis 吸收光譜：

測量在不同鐵離子濃度下($0\ \mu\text{M}\sim 50\ \mu\text{M}$)，Cys-AuNPs 波長為 $720\ \text{nm}$ 以及 $530\ \text{nm}$ 時消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖，如圖十五。



圖十五、鐵離子濃度對 Cys-AuNPs 消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖

(2). 討論：

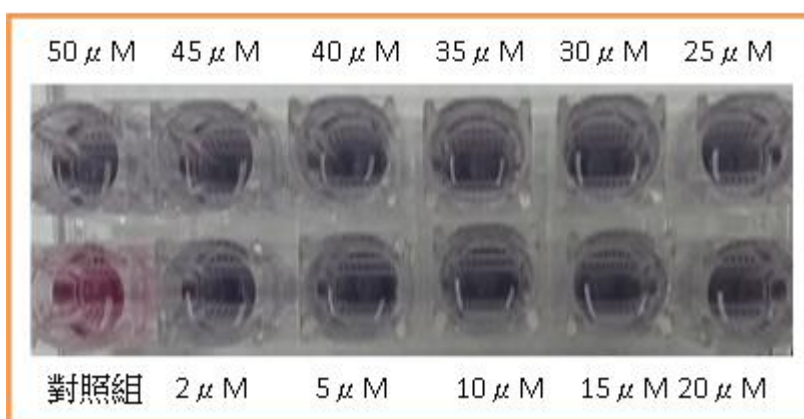
由圖十五的關係圖中，可以發現當鐵離子的濃度為 $30 \mu\text{M}$ 時，消光係數比值 ($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$) 突然上升，代表 Cys-AuNPs 有明顯的聚集現象發生，由此可知鐵離子的偵測極限約為 $30 \mu\text{M}$ 。

4. 鉻離子(Cr^{3+})

(1). 實驗結果：

I. 外觀：

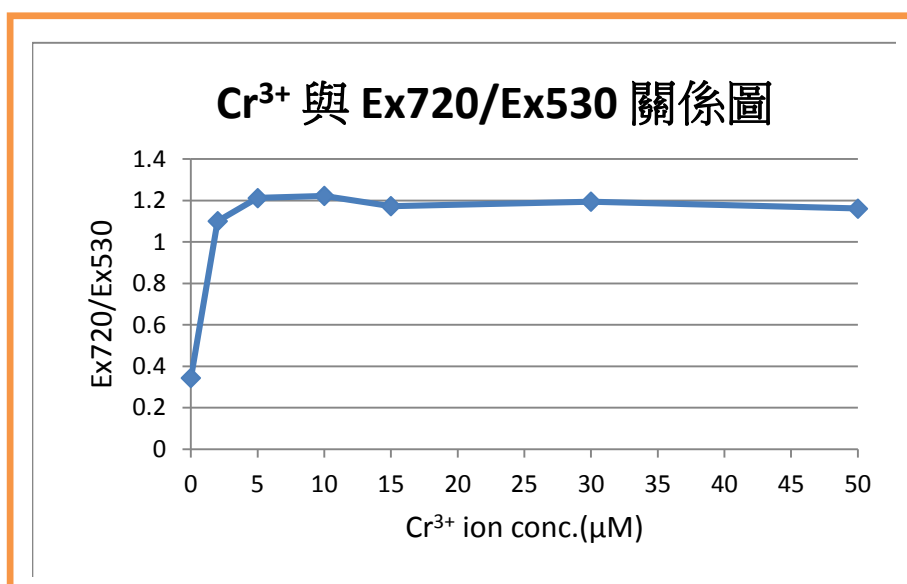
由實驗結果可發現當 Cr^{3+} 濃度大於 $2 \mu\text{M}$ 時，Cys-AuNPs 即產生聚集、變色的現象，如圖十六。



圖十六、Cys-AuNPs 加入不同濃度鉻離子的顏色變化、聚集情形。

II. UV-Vis 吸收光譜：

測量在不同鉻離子濃度下 ($0 \mu\text{M} \sim 50 \mu\text{M}$)，Cys-AuNPs 波長為 720 nm 以及 530 nm 時消光係數比值 ($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$) 的關係圖，如圖十七。



圖十七、鉻離子濃度對 Cys-AuNPs 消光係數比值 ($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$) 的關係圖

(2). 討論：

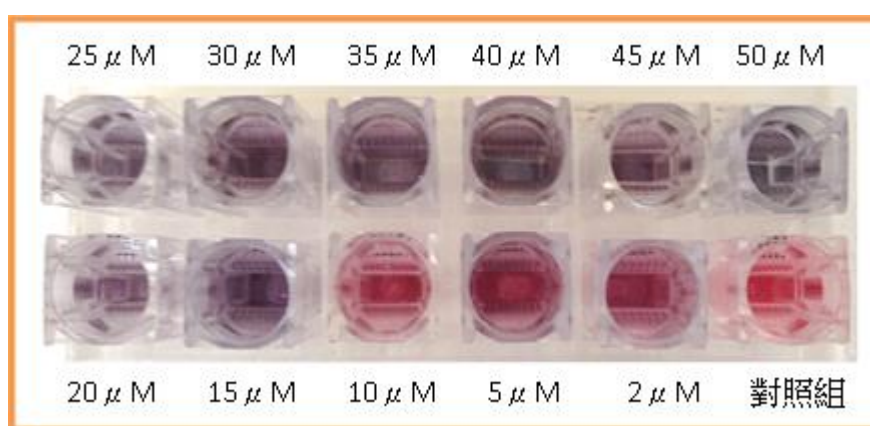
由圖十七的關係圖中，可以發現當鉻離子的濃度為 2 μM 時，消光係數比值 ($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$) 突然上升，代表 Cys-AuNPs 有明顯的聚集現象發生，由此可知鉻離子的偵測極限約為 2 μM 。

5. 鉛離子(Pb^{2+})

(1). 實驗結果：

I. 外觀：

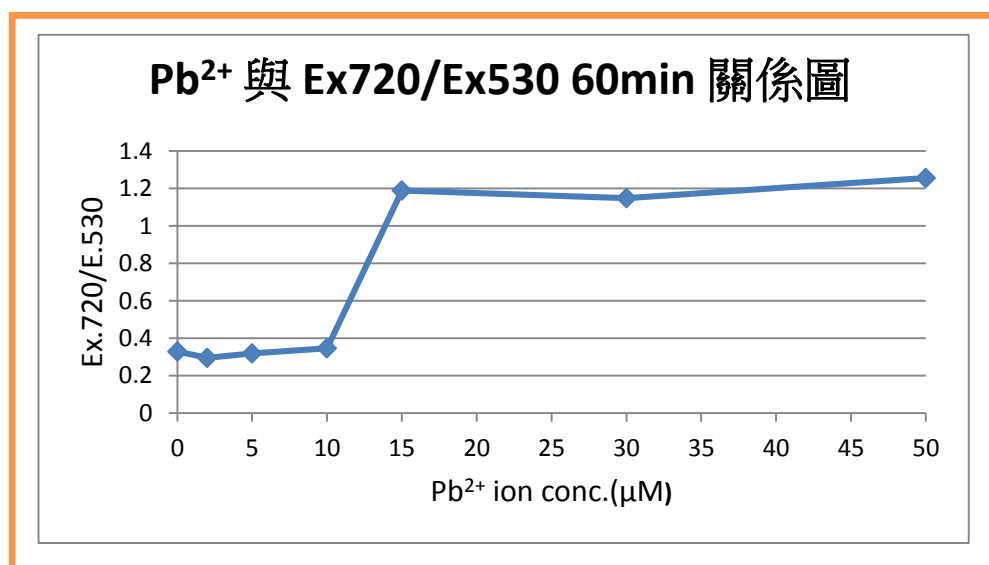
由實驗結果可發現當 Pb^{2+} 濃度大於 15 μM 時，Cys-AuNPs 即產生聚集、變色的現象，如圖十八。



圖十八、Cys-AuNPs 加入不同濃度鉛離子的顏色變化、聚集情形。

II. UV-Vis 吸收光譜：

測量在不同鉛離子濃度下(0 μM ~50 μM)，Cys-AuNPs 波長為 720 nm 以及 530 nm 時消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖，如圖十九。



圖十九、鉛離子濃度對 Cys-AuNPs 消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖

(2). 討論：

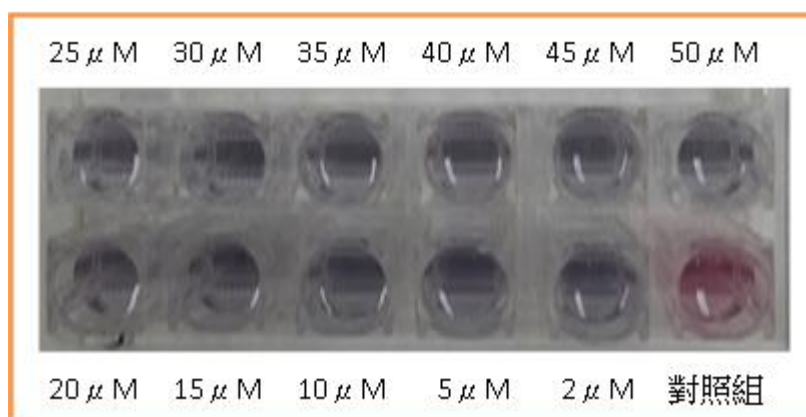
由圖十九的關係圖中，可以發現當鉛離子的濃度為 $15 \mu\text{M}$ 時，消光係數比值 ($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$) 突然上升，代表 Cys-AuNPs 有明顯的聚集現象發生，由此可知鉛離子的偵測極限約為 $15 \mu\text{M}$ 。

6. 汞離子(Hg^{2+})

(1). 實驗結果：

I. 外觀：

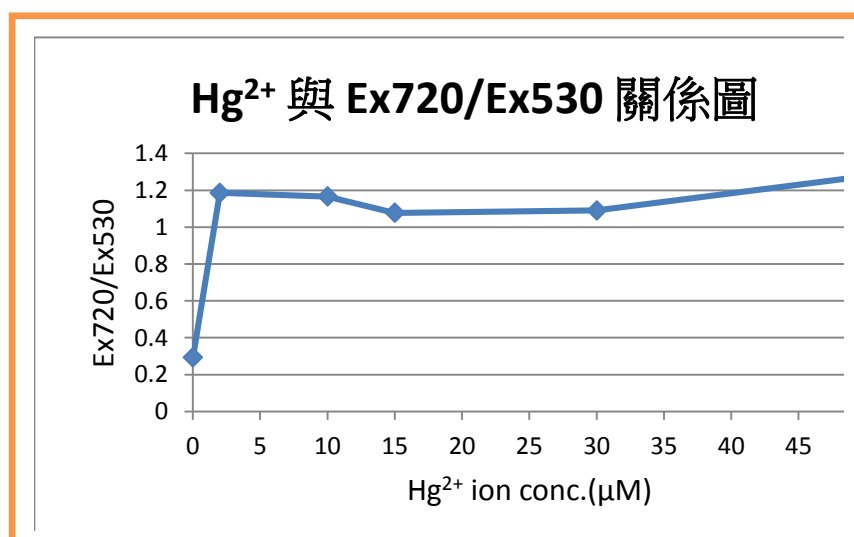
由實驗結果可發現當 Hg^{2+} 濃度大於 $2 \mu\text{M}$ 時，Cys-AuNPs 即產生聚集、變色的現象，如圖二十。



圖二十、Cys-AuNPs 加入不同濃度汞離子的顏色變化、聚集情形。

II. UV-Vis 吸收光譜：

測量在不同汞離子濃度下 ($0 \mu\text{M} \sim 50 \mu\text{M}$)，Cys-AuNPs 波長為 720 nm 以及 530 nm 時消光係數比值 ($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$) 的關係圖，如圖二十一。



圖二十一、汞離子濃度對 Cys-AuNPs 消光係數比值 ($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$) 的關係圖

(2). 討論：

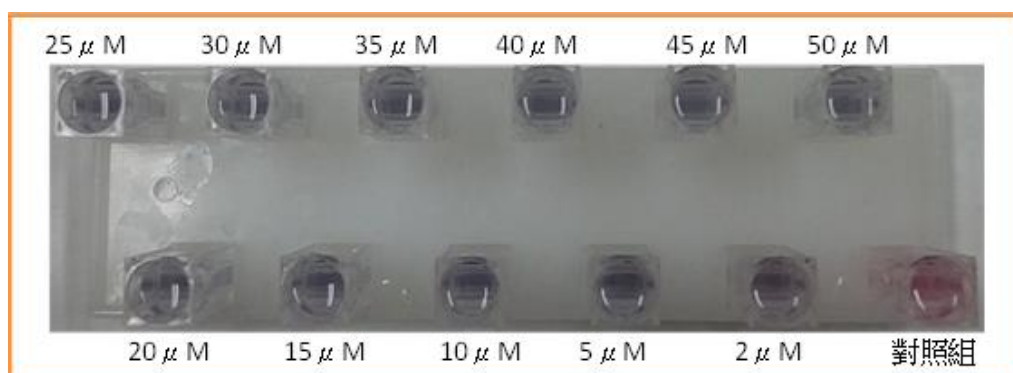
由圖二十一的關係圖中，可以發現當汞離子的濃度為 $2 \mu\text{M}$ 時，消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)突然上升，代表 Cys-AuNPs 有明顯的聚集現象發生，由此可知汞離子的偵測極限約為 $2 \mu\text{M}$ 。

7. 銅離子(Cu^{2+})

(1). 實驗結果：

I. 外觀：

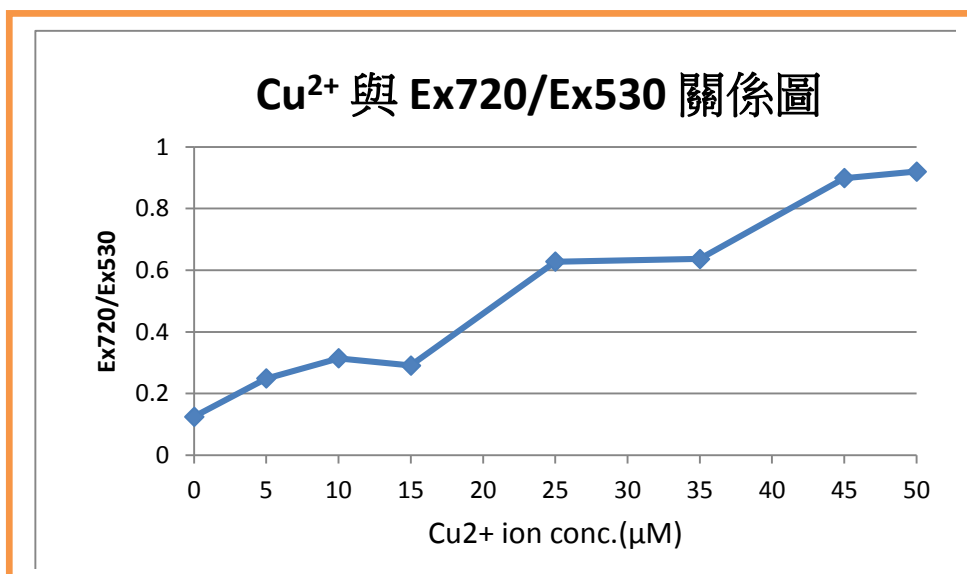
由實驗結果可發現當 Cu^{2+} 濃度大於 $2 \mu\text{M}$ 時，Cys-AuNPs 即產生聚集、變色的現象，如圖二十二。



圖二十二、Cys-AuNPs 加入不同濃度銅離子的顏色變化、聚集情形。

II. UV-Vis 吸收光譜：

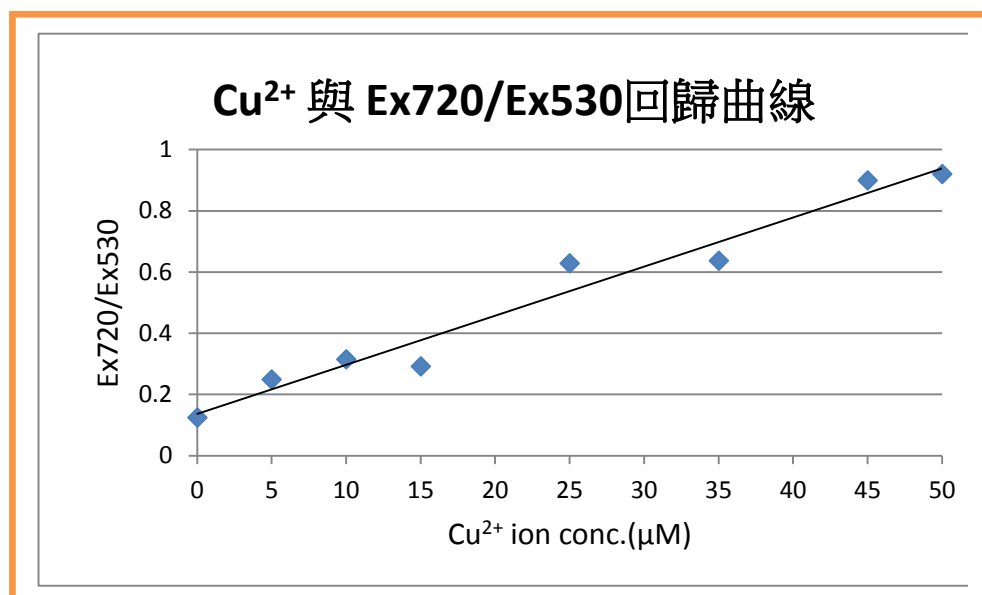
測量在不同銅離子濃度下($0 \mu\text{M} \sim 50 \mu\text{M}$)，Cys-AuNPs 波長為 720 nm 以及 530 nm 時消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖，如圖二十三。



圖二十三、銅離子濃度對 Cys-AuNPs 消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖

(2). 討論：

從此實驗數據中發現，Cys-AuNPs 對於銅離子可偵測的濃度範圍很廣，並沒有明顯的偵測極限。由銅離子濃度與 Ex720/Ex530 的回歸曲線，可看出其線性關係良好，如圖二十四，故可藉由測 Ex720/Ex530 值，推算銅離子的濃度，進行銅離子的定量實驗。



圖二十四、銅離子濃度對 Cys-AuNPs 消光係數比值(Ex720/Ex530)的回歸曲線。

Cys-AuNPs 對各種不同金屬離子都有不錯的偵測極限，其中銅離子、鉻離子、汞離子，可在濃度為 2 μM 時即偵測出來，如表二。

表二、Cys-AuNPs 對銅、銀、鋁、鐵、鉻、鉛、汞等金屬離子的偵測極限

金屬離子	最小限度
Cu ²⁺	2 μM
Cr ³⁺	2 μM
Hg ²⁺	2 μM
Ag ⁺	5 μM
Al ³⁺	5 μM
Pb ²⁺	15 μM
Fe ³⁺	30 μM

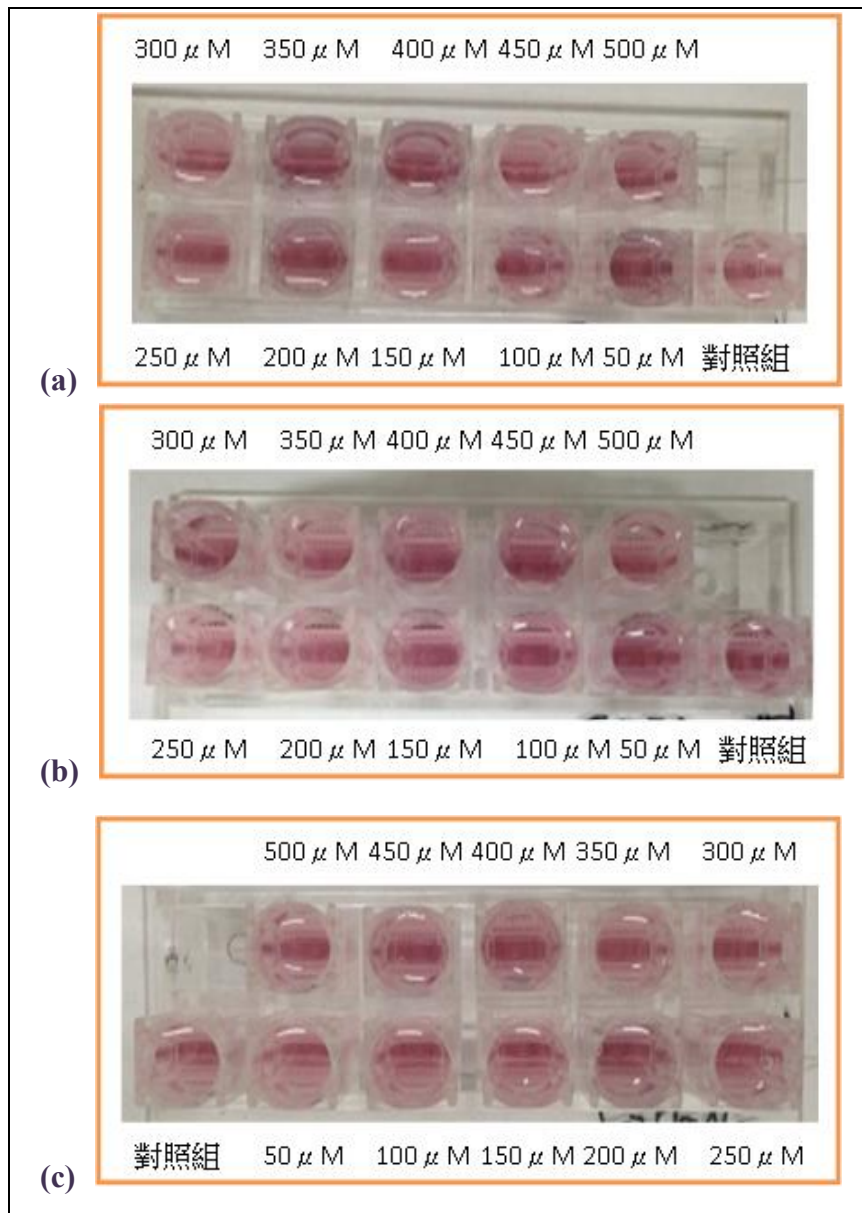
三、Cys-AuNPs 加入不同種的添加劑對金屬離子的辨識效果

(一)、 Cys-AuNPs 在不同濃度乙二胺四乙酸四鈉(EDTA-4Na)、草酸鉀($K_2C_2O_4$)、乙二胺($C_2H_8N_2$)的穩定性

(1). 實驗結果：

I. 外觀：

由實驗結果可發現當添加劑的濃度介於 0 μM ~500 μM 時，Cys-AuNPs 並沒有產生聚集、變色的現象，如圖二十五。

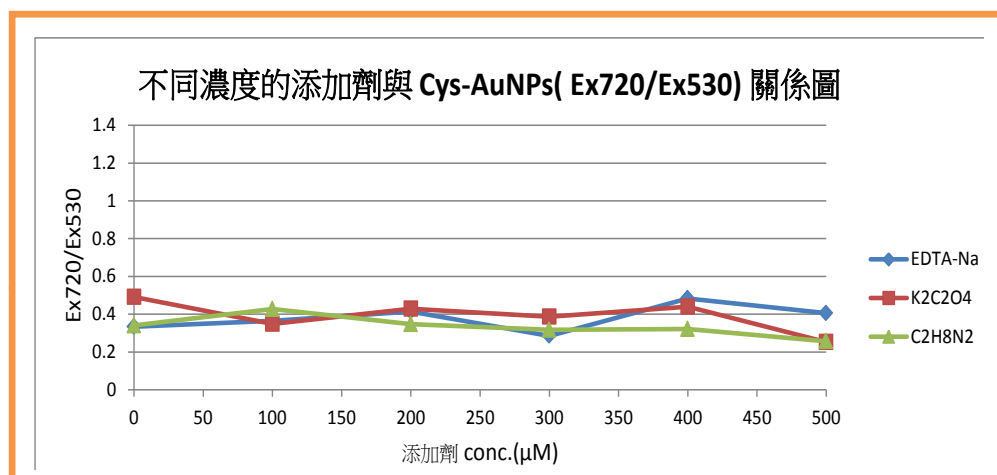


圖二十五、Cys-AuNPs 加入不同濃度、添加劑的顏色變化

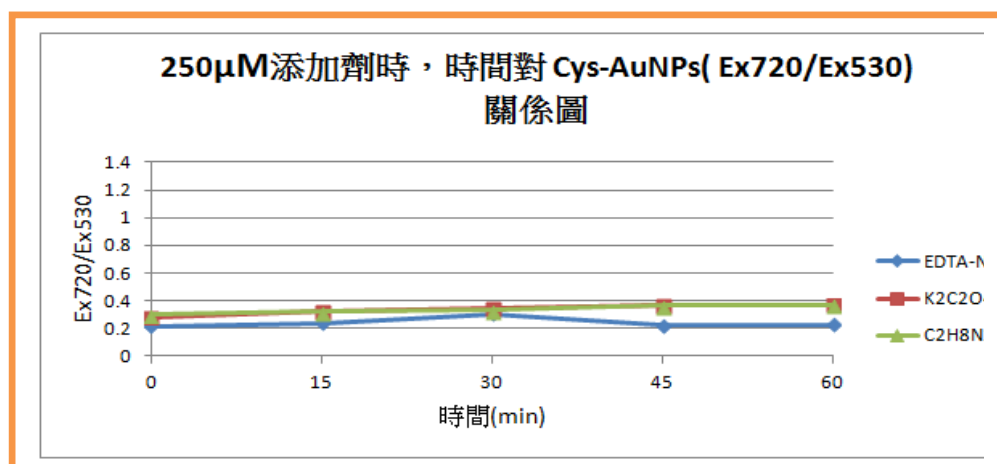
(a)加入 EDTA-4Na (b)加入 $K_2C_2O_4$ (c)加入 $C_2H_8N_2$ 。

II. UV-Vis 吸收光譜：

測量在不同添加劑濃度下(0 μM ~500 μM)，Cys-AuNPs 波長為 720 nm 以及 530 nm 時消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖，如圖二十六。



圖二十六、添加劑濃度與 Cys-AuNPs 消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖



圖二十七、加入 25 mM 添加劑(最終濃度為 250 μM)後，時間與 Cys-AuNPs 消光係數比值($\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$)的關係圖

(2). 討論：

- I. 在進行比色法的實驗之前，我們必須先決定合適的添加劑濃度，確保在還沒加入金屬離子只有添加劑時，並不造成 Cys-AuNPs 的聚集。因此我們探討當加入不同濃度添加劑時，是否會對 Cys-AuNPs 的聚集造成影響。
- II. Cys-AuNPs 溶液中，若沒有金屬離子，只加入不同濃度的添加劑(最終濃度 0~500 μM)時，由圖二十六可知，隨著添加劑濃度增加， $\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$ 幾乎沒有改變，因此在此濃度範圍下，並不造成 Cys-AuNPs 的聚集。

III. 當 Cys-AuNPs 溶液加入 25 mM 的添加劑(最終濃度為 250 μM)後，隨時間增加觀察 Cys-AuNPs 的穩定程度，由圖二十七可知，即使時間長達一個小時，添加劑亦不造成 Cys-AuNPs 的聚集。

IV. 最後，我們選用了 25 mM 的添加劑濃度，作為後續比色陣列的實驗條件。

(二)、 探討加入乙二胺四乙酸四鈉(EDTA-4Na)、草酸鉀($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$)、乙二胺($\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$)，對金屬離子辨識效果的影響

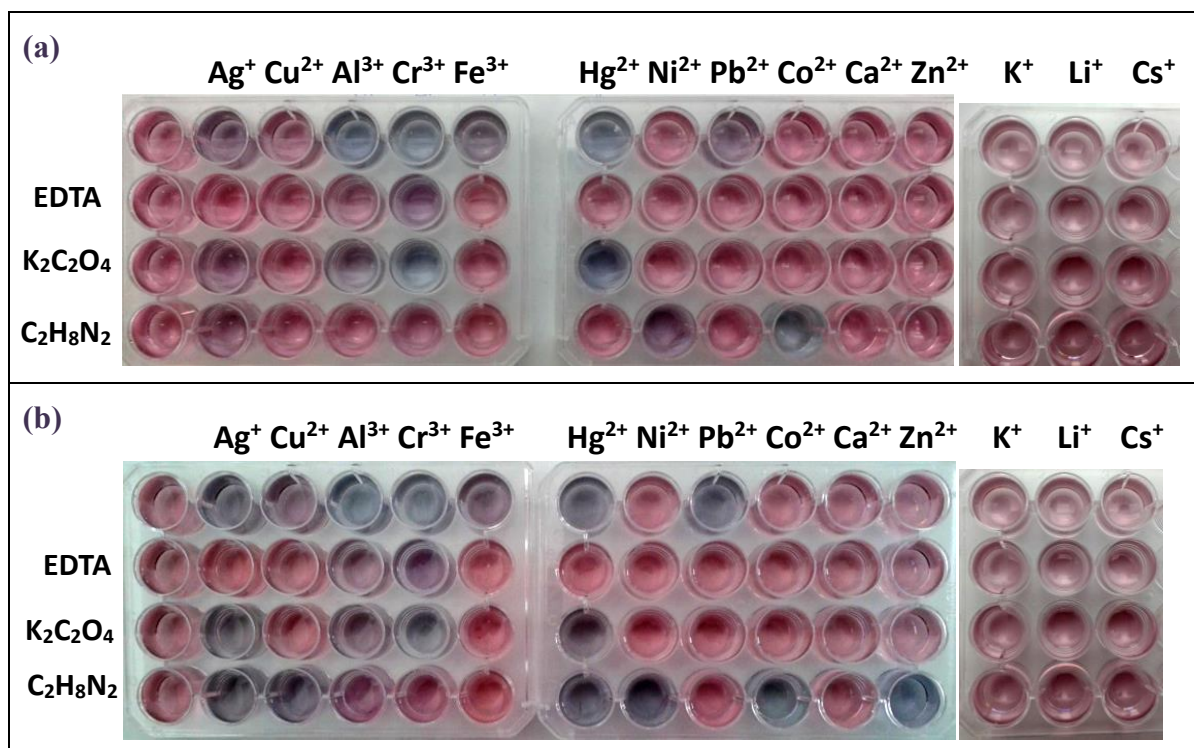
(1). 實驗結果：

I. 外觀：

當 Cys-AuNPs 溶液中，分別加入添加劑(乙二胺四乙酸鈉、草酸鉀、乙二胺)與不同種類的金屬離子後，透過比色陣列所呈現的顏色變化，即可看出當離子種類不同，其成色變化就不同，使我們能用肉眼區分十種金屬離子，如圖二十八。

第一天，能辨識出 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 等離子，其中因 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 離子顏色相近無法區別，如圖二十八(a)；第二天， Pb^{2+} 的顏色從紫色轉為藍色，即可區別出 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 離子，而 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 也有了明顯的顏色變化，如圖二十八(b)。因此能辨識出 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 等離子。

從第一天結果，我們觀察到某些離子在陣列中有比較多的顏色變化，例如 Ag^+ 、 Cr^{3+} 在四個實驗中有三個有變化，而 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Co^{2+} 等，四個實驗中只有一個變色。我們也試了其它離子如 Ca^{2+} 、 K^+ 、 Li^+ 和 Cs^+ ，但這些離子在比色陣列中，皆沒有明顯的顏色變化。



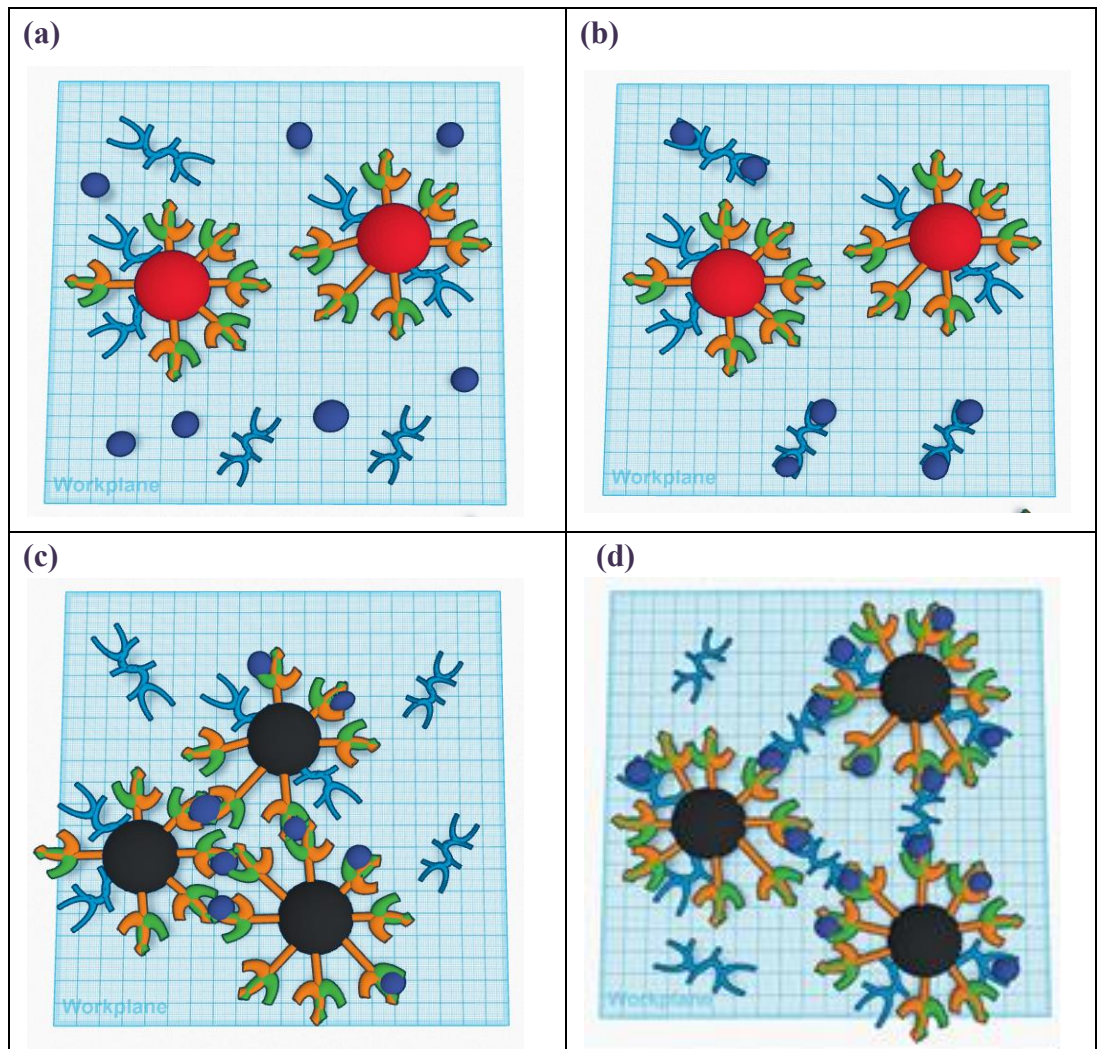
圖二十八、Cys-AuNPs 加入不同金屬離子和添加劑的比色陣列 (a) Day1 可辨識出 Ag⁺、Al³⁺、Cr³⁺、Hg²⁺、Ni²⁺、Co²⁺離子 (b) Day2 比色陣列可辨識出 Cu²⁺、Fe³⁺、Pb²⁺、Zn²⁺離子。

(2). 討論：

- I. 我們添加乙二胺四乙酸鈉、草酸鉀、乙二胺作為添加劑，是因添加劑上的胺基或羧酸基能與 Cys-AuNPs 鍵結，亦可與金屬離子形成錯合物，因為有許多不同的結合方式，所以會對 Cys-AuNPs 以及金屬離子間的鍵結產生選擇性。於是在比色陣列(colorimetric array)中，每種添加劑與 Cys-AuNPs 形成不同的感測器。
- II. 我們觀察到添加劑能夠增強或削弱金屬離子誘發的聚集現象，當 Cys-AuNPs 聚集時，溶液的顏色會從紅色→紅紫色→藍紫色→藍色。因此透過組合型的比色陣列，我們能夠透過肉眼區別十種不同的金屬離子。
- III. 在這個比色陣列中，因 Cys-AuNPs、添加劑、金屬離子間有許多可能的鍵結方式。我們參考 Sener^[1]並提出一些可能的機構，如圖二十九。第一種情況，金屬離子與添加劑完全都不跟 Cys-AuNPs 作用，使奈米金之間沒有聚集現象，如圖二十九(a)；第二種情形，添加劑與金屬離子間作用，使金屬離子不與 Cys-AuNPs 作用產生聚集現象，如圖二十九(b)；第三種情形為金屬離子誘發奈米金的聚集並導致顏色改變，添加劑的存在並不導致奈米

金的聚集，如圖二十九(c)；第四種情況，金屬離子和添加劑都能夠造成 Cys-AuNPs 的聚集，如圖二十九(d)。在我們的實驗中，若沒有金屬離子，單純添加劑的存在並不造成 Cys-AuNPs 的聚集。因此，添加劑誘發 Cys-AuNPs 聚集的情況，不在我們實驗的討論範圍。

IV. 我們也歸納出 Cys-AuNPs 大多只能辨識重金屬離子，對於 IA 族、IIA 族的離子都不會造成 Cys-AuNPs 產生聚集。



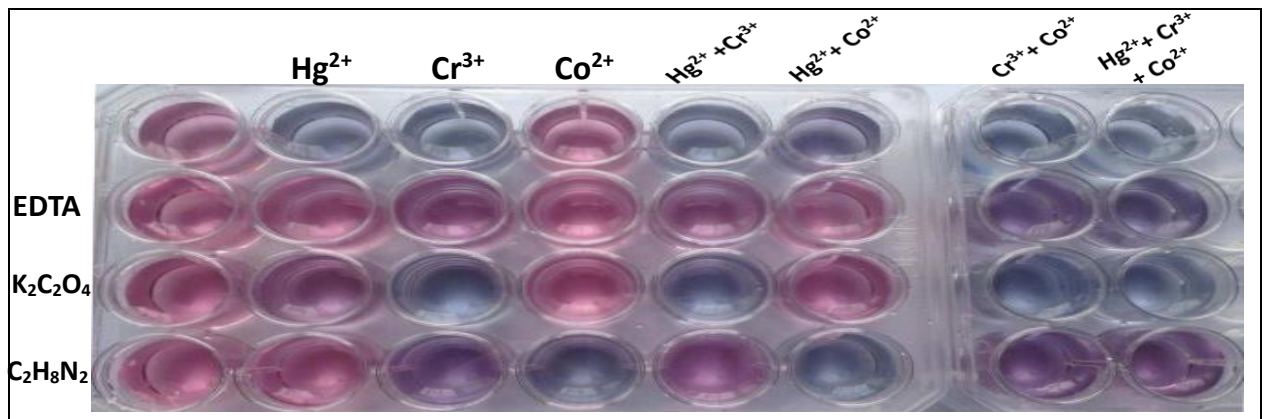
圖二十九、Cys-AuNPs 與添加劑和金屬離子間可能的鍵結情況。

(三)、 探討加入乙二胺四乙酸四鈉(EDTA-4Na)、草酸鉀($K_2C_2O_4$)、乙二胺($C_2H_8N_2$)，對二或三種金屬離子(Hg^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{2+})混合後辨識效果的影响

(1). 實驗結果：

I. 外觀：

當 Cys-AuNPs 溶液中，分別加入添加劑(乙二胺四乙酸鈉、草酸鉀、乙二胺)與二或三種的混合金屬離子後，透過比色陣列所呈現的顏色變化，能夠辨識出不同離子的組合。如圖三十。



圖三十、Cys-AuNPs 加入 Hg^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{2+} 離子，和他們二或三種的混合金屬離子和添加劑的比色陣列

(2). 討論：

可以預期當二種或三種離子同時加入比色槽中，所顯現的顏色為各別離子在比色陣列中顏色的總合，這與我們所做的實驗結果相符合。由此結果可知， Hg^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{2+} 這三種離子，並不會因同時存在而互相干擾，影響奈米金粒子的聚集。

陸、 結論與未來展望

我們成功將半胱胺酸修飾於奈米金上，並藉由(L-cystein)的兩個螯合點胺基及羧基來進行對金屬離子配位，並搭配乙二胺四乙酸四鈉、草酸鉀、乙二胺，透過比色陣列可同時偵測 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} ，大大提高對各種金屬離子之辨識性，係為極佳的離子辨識系統。我們合成出的修飾半胱胺酸奈米金對各種不同金屬離子亦有很低的偵測極限，其中銅離子、鉻離子及汞離子於濃度為 $2 \mu\text{M}$ 即可被偵測，另半胱胺酸奈米金亦可藉由具線性關係的銅離子濃度與 $\text{Ex}_{720}/\text{Ex}_{530}$ 值，來對未知濃度的銅離子進行定量。此外，半胱胺酸修飾金奈米亦可對 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 及 Hg^{2+} 的離子混合液具有辨識力，惟應用於更多種類離子混合液偵測時，半胱胺酸奈米金即無法有效辨識，但如能將離子混合液先進行層析分離，再搭配本研究發展出之極佳離子辨識系統，即係一套簡易又經濟的離子檢測裝置，這將是未來我們研究的延伸及重點。

柒、 參考文獻

- 一、Gulsu Sener ; Lokman Uzun ; Adil Denizli, Colorimetric Sensor Array Based on Gold Nanoparticles and Amino Acids for Identification of Toxic Metal Ions in Water. *Appl. Mater. Interfaces*. **2014**, 6, 18395–18400
- 二、Enüstün, B. V.; Turkevich, J. Coagulation of Colloidal Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3317.
- 三、Hung, Y. L.; Hsiung, T. M.; Chen, Y.Y.; Huang, Y.F.; Huang C.C., *J. Phys. Chem. C*. **2010**, 114, 16329-16224
- 四、中華民國第51屆高中化學組科展作品：國立臺中女子高級中學。胺能辨魚新鮮否？—金奈米 之胺類分子檢測研究。
- 五、中華民國第52屆高中化學組科展作品：國立嘉義高級中學。金黃奈米銀性質探討及在纖維製作的應用。
- 六、中華民國第54屆國中化學組科展作品：彰化縣立陽明國民中學。鉛金一髮～利用自製的光度計與奈米金檢測溶液中鉛離子的濃度。
- 七、聯合新聞網
<http://udn.com/news/story/7314/1445418-%E9%87%8D%E9%87%91%E5%B1%AC%E6%B1%99%E6%9F%93%E8%BE%B2%E5%9C%B0-%E6%A1%83%E5%B8%82%E3%80%81%E5%BD%B0%E7%B8%A3%E6%9C%80%E5%9A%B4%E9%87%8D>
- 八、廖芳陞:與水污染相關的疾病。《科學發展》月刊，2009年6月，第438期。
http://ejournal.stpi.narl.org.tw/NSC_INDEX/Journal/EJ0001/9806/9806-04.pdf
- 九、行政院環境保護署---全國環境水質監測資訊網 <http://wq.epa.gov.tw/Code/?Languages=tw>

【評語】 052401

本研究針對金屬離子的偵測及辨識，期望提供快篩方法。主題兼具實用價值與學術性；問題解決採用目前學術界發展中的主流實驗方法。表達清楚生動。