中華民國第 57 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高級中等學校組　化學科

第三名

050212

「碳」幽索隱——研究碳量子點的性質與細菌偵測

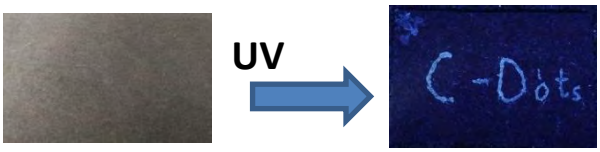
學校名稱：國立花蓮女子高級中學

作者：	指導老師：
高二 何倚帆 高二 黃怡君 高二 劉家余	陳玉時

關鍵詞：碳量子點、細菌偵測、量子產率

摘要

本研究以簡易微波法，開發出製備碳量子點並用於檢測細菌的新方法。將檸檬酸等含碳物微波製成碳量子點，加入精胺酸、甘露糖、高分子 PEI 等藥品微波，進行碳量子點的修飾，也以乾燒、兩步驟等方式製造碳量子點，並以螢光光譜儀等儀器測量其螢光強度與計算量子產率。利用碳量子點與細菌結合後離心可沉澱的特性，觀察沉澱物受 UV 照射後是否發螢光，來判定兩者是否結合，並測量其螢光強度，達到偵測與定量細菌的目的。由實驗得知，乾燒的碳量子點量子產率較水溶液微波高。檸檬酸銨加甘露糖之量子點可成功與大腸桿菌結合，但不與金黃色葡萄球菌結合。高分子 PEI 修飾的碳量子點與上述兩種細菌都能結合，最低可偵測 1／250 mg（0.25 mL）的細菌。



壹、　研究動機

在高二上學期，老師在教〈化學與化工〉單元裡，我們接觸到奈米科技，並分享了一則新聞——〈運用量子點奈米粒子殺死「超級細菌」〉[1] 中得知：隨著各種「超級細菌」變異過於快速，使傳統藥物無法有效對抗。對此，研究人員發現利用特製的量子點可以對抗具有抗藥性的大腸桿菌、金黃色葡萄球菌等細菌。

基於對量子點的好奇，我們上網查詢了許多資料 [2] 後，瞭解碳量子點是一種尺寸在 10 奈米以下的零維奈米材料，在光線照射下，本身會發出螢光，具有無毒、良好水溶性、成本低、對環境危害小等優點，於是我們選擇碳量子點進行了相關的研究與探討。我們嘗試利用檸檬酸等含碳物製造碳量子點，希望用碳量子點來偵測細菌，應用在醫療診斷上，提供另一種偵測細菌的方法。

貳、　研究目的

一、 利用微波爐製造碳量子點
二、 了解自製碳量子點的量子產率
三、 了解不同製造變因對自製碳量子點性質的影響
四、 利用自製碳量子點偵測細菌

參、 文獻探討

一、 碳量子點基本認識

(一) 製造碳量子點(CDs)方法[2~6]

1. 化學消融法

通過強氧化性的酸對碳源進行氧化處理製備 CDs。所得產物的粒徑不夠均一，分離步驟較為繁瑣。

2. 電化學法

利用碳源作為工作電極製備，但原材料的前期處理工作繁瑣耗時，後期純化所需透析等步驟耗時較長。

3. 激光燒蝕法

通過激光束對碳靶進行照射消蝕，將碳奈米顆粒從碳靶上剝落下來，從而獲得 CDs。主要缺點是所用儀器昂貴、合成過程複雜、產率低以及雜質多。

4. 微波法

將有機化合物以微波方式合成碳量子點。所得產物粒徑分佈可能不均勻，需進一步分離。

5. 水熱法

前驅體在一定的條件下，直接通過水熱反應製備 CDs 的方法。

為使製造碳量子點更為簡易，我們選擇微波法製作碳量子點。

(二) 在特定波長照射下，本身會吸光／放光[7~8]。故我們以 UV 照射樣品，以樣品是否發出螢光，來判斷是否產生碳量子點。

(三) 量子點尺寸大小會影響吸收／放光波長

根據文獻資料[7]，當材料縮小至一定大小以後(10 nm 以內就很明顯)，其電子能量不再連續，電子能量呈能階分佈，造成物化或光學特性的改變，這種現象稱為量子侷限效應。因為量子侷限效應，所以量子點隨著尺寸大小的遞減，能隙變寬，其光譜線的位置會往較高能方向移，亦即其光吸收往短波範圍移動。

(四) 自我吸收現象[8]

碳量子點在濃度高時，量子點發出的螢光會被周圍的量子點吸收，使得被吸收的螢光無法被偵測器測到，造成螢光減弱，此是自我吸收現象。而根據文獻[8]，碳量子點的 UV 吸光值在 0.05 以下時，可將自我吸收現象忽略。因此我們在低濃度下測量其螢光強度與計算量子產率，來瞭解碳量子點的發光效率。

(五) 量子點的應用[2]

碳量子點具有優異的生物特性如低毒性、良好的生物相容性等，這些性質使它們具有應用於生物成像、生物細胞標記等方面的潛力。而我們想要利用自製碳量子點來偵測細菌。

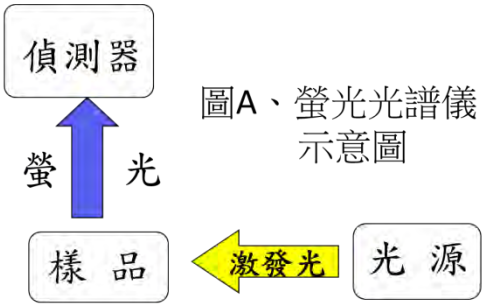
二、 螢光原理及儀器原理

(一) 螢光原理[10]

螢光（fluorescence）是一種因吸光導致的放光現象。當物質經特定波長（如紫外光）的入射光照射，吸收光能後進入激發態，並且立即以放光形式釋放能量（通常波長比入射光的波長長，如可見光）；而且一旦停止入射光，發光現象也隨之消失。具有這種性質的放射光即稱之為螢光，螢光持續發光時間通常短於 10^{-8} 秒。

(二) 螢光光譜儀原理（圖 A）

以一特定波長激發光（360 nm）照射樣品，使其發螢光，在90度的地方設置偵測器，偵測螢光，避免偵測到激發光，影響結果。



圖A、螢光光譜儀示意圖

三、 大腸桿菌與金黃色葡萄球菌的基本認識

(一) 大腸桿菌[11~12]

1. 性質

大腸桿菌屬於原核生物，細胞壁由肽聚醣組成，只含有核醣體簡單的細胞器，沒有細胞核。大腸桿菌是人和動物腸道中最著名的一種細菌，主要寄生於大腸內，多數情況下無害。

大腸桿菌線毛上的 FimH 蛋白對甘露糖具專一性結合[6、13~16]，因此，我們製造含甘露糖的碳量子點，期望可用來檢測大腸桿菌。另外，由於細菌普遍帶負電[17]，因此我們想開發帶正電之碳量子點，做為檢測細菌的新方法。

2. 危害性

人體與大腸桿菌的關係：在不致病的情況下（正常狀況下），可認為是互利共生；但是有些特定的菌株則會致病。

3. 應用

水源是否被糞便污染的標誌，其測量標準爲大腸菌群指數。

(二) 金黃色葡萄球菌[18~19]

1. 性質

屬革蘭氏陽性的球菌，兼性厭氧，對熱、乾燥有抵抗力，乾燥環境裡可存活數月。在顯微鏡下排列成葡萄串狀，無芽孢、鞭毛，大多數無莢膜。

2. 危害性

在碳水化合物以及蛋白質食品上生長時，容易產生腸毒素，會對人體造成傷害，腸毒素對熱穩定，煮沸 30 分鐘仍不被破壞，須持續 2 小時才會被破壞，對腸道內酵素也有抵抗力。

四、 細菌檢測方法[20~21]

(一) 酵素呈色及螢光反應檢測法：

大腸桿菌上的兩種特定酵素可分別水解 2 種色原，其中一個會呈黃色，另一個在波長 365nm 之紫外光照射之下會產生螢光。此檢測方法需在 35±1℃，培養 18 至 22 小時，將結果與標準圖表對照。

(二) 多管發酵法：

革蘭氏染色陰性、不產生內孢子之好氧或兼性厭氧桿菌，在 35±1℃、48±3 小時能發酵乳糖產生氣體。

(三) 凝固酶試驗：

將樣品用無菌稀釋液稀釋後塗抹於培養皿上，在 35℃培養 24 ± 2 小時，用凝固酶試驗。

(四) 傳統生化檢測方法：

將樣品用無菌稀釋液稀釋後塗抹於培養皿上，在 35 ± 1℃培養 48 ± 3 小時後計算菌落。並在培養液裡培養放大後，利用各種染色、生化方法分辨。

我們將以碳量子點檢測大腸桿菌，希望可以縮短作用時間，提供一項新的檢測大腸桿菌的方法。

五、 量子產率

(一) 由於高濃度碳量子點自我吸收螢光的現象，加上不易計算自製樣品所含碳量子點濃度，所以不能僅以樣品所發出的螢光強度來表示量子點的放光效率，故計算量子產率示之。

(二) 量子產率的計算公式（假設兩種溶液折射率相當[22]）：

$$\frac{\text{樣品螢光強度積分面積}}{\text{樣品吸光值*}} : \frac{\text{樣品量子產率}}{\text{樣品折射率}}$$

$$= \frac{\text{標準品螢光強度積分面積}}{\text{標準品吸光值}} : \frac{\text{標準品量子產率}}{\text{標準品折射率}}$$

故

$$\text{樣品量子產率} = \frac{\dfrac{\text{樣品螢光強度積分面積}}{\text{樣品吸光值}}}{\dfrac{\text{標準品螢光強度積分面積}}{\text{標準品吸光值}}} \times (\text{已知})\text{標準品量子產率} \times \frac{\text{樣品折射率}}{\text{標準品折射率}}$$

*樣品必須不受自我吸收現象干擾，故稀釋到 UV 吸光值約小於 0.05，且大於 0.01 後測螢光積分面積[9]。

(三) 本研究所使用的標準品(硫酸奎寧 quinine sulfate)其數值如下:

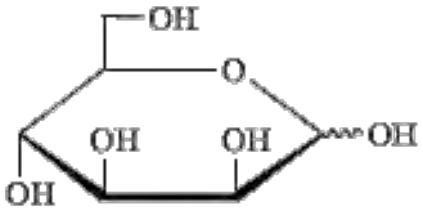
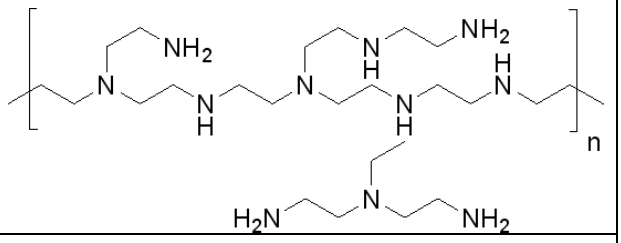
螢光強度積分面積／吸光值	量子產率
235788.9	54%

所以本研究量子產率公式如下:

$$\text{樣品之量子產率}=\frac{\dfrac{\text{樣品螢光強度積分面積}}{\text{樣品吸光值}}}{235788.9}\times 54\%$$

肆、 研究設備及器材

一、 實驗試劑

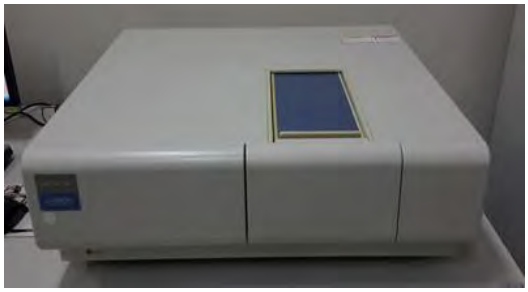
檸檬酸 Citric Acid (J.T.Baker) 以下簡稱 CA	檸檬酸銨 Ammonium citrate,98% (Aldrich) 以下簡稱 AC
檸檬酸(含一個結晶水) Citric Acid (FERAK) 以下簡稱 CA	精胺酸 Arginine (Sigma) 以下簡稱 Arg
甘露糖 D-(+)-Mannose (Sigma) 以下簡稱 D 	聚乙烯亞胺 (MW: 600) Polyethylenimine ethylenediamine branched (ALDRICH) ,H （$NHCH_2CH_2$） $_n$ NH_2 以下簡稱(高分子)PEI 
*大腸桿菌 *Escherichia coli* 2.092×10^9 CFU／mg 以下簡稱 *E. coli*	*金黃色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 以下簡稱 SA
氫氧化鈉 Sodium hydroxide (UniRegion)	

*本研究所使用的是以高溫殺菌後的細菌。

二、 實驗器材和設備

<table>
<tr><td>微量分注器</td><td>離心機 (Hettich)</td><td>磁石攪拌器</td><td>紫外光燈 (360nm)</td></tr>
<tr><td>試管振盪器</td><td>家用微波爐 (聲寶)、(LG)</td><td colspan="2">透析膜，截留(cutoff)分子量 1000</td></tr>
<tr><td colspan="2">聚焦型微波爐 (CEM)
光纖溫度計 (Opsens)

</td><td colspan="2">石英瓶 (Lightpath Optical Company Ltd)

</td></tr>
<tr><td colspan="2">紫外可見光光譜儀 (HITACHI)
  </td><td colspan="2">螢光光譜儀（JASCO）

</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">傅里葉轉換紅外光譜儀
Fourier-transform Infrared spectrometer
(Perkin Elmer Spectrum One)</td><td colspan="2">電位分析儀（Malvern Zetasizer Nano ZS）</td></tr>
<tr><td colspan="2">高速離心機 (MPW)</td></tr>
</table>

伍、 研究過程或方法

一、 製作碳量子點

(一) 家用微波爐

1. 取 1 g 檸檬酸加水 10 mL，置入微波爐中，以強火微波 13 min。
2. 取出冷卻後，加水 3 mL，以磁石攪拌 5 min 後，加水定量至 5 mL 即可。

(二) 聚焦型微波爐(如圖 C)

1. 一步驟水溶液微波：
   (1)取 0.1 g 檸檬酸(或檸檬酸銨)加不同添加物，加水 1 mL 配成溶液。
   (2)取出 0.5 mL 置入微波爐，以 150℃定溫微波數分鐘(1～90 min 不等) 。
   (3)取出冷卻後，加水 0.3 mL，以磁石攪拌 5 min。
   (4)若有加入甘露糖，則以 7500 xg 離心 10 min，取出上清液。
2. 兩步驟水溶液微波：
   (1)取 0.1 g 檸檬酸(或檸檬酸銨) 加水 1 mL 配成溶液，微波 1～5 min 不等。
   (2)取出冷卻後，加入甘露糖，加水 0.5 mL，再次以 150℃定溫微波 10 s～5 min。
   (3)取出冷卻後，*加水 0.3 mL，以磁石攪拌 5 min 即可。
   (4)以 7500 xg 離心 10 min，取出上清液。
   *微波 10 s 後溶液未燒乾，所以不加水直接攪拌。
3. 蘋果汁(含甘露糖)：
   (1)將 96 g 蘋果加水 150 mL，打成蘋果汁並過濾。
   (2)取 0.5 mL 蘋果汁置入微波爐，以 150℃定溫微波 5～10 min 不等。
   (3)取出冷卻後，加 3 mL 水，以磁石攪拌 5 min。
4. 高分子 PEI(如圖 B)：
   (一步驟水溶液微波)
   (1)取 0.4 g 檸檬酸和 0.251~6.57 g 高分子 PEI，加水 0.5 mL，加熱攪拌(Heat2／stir9) 2 min，使 PEI 與檸檬酸均勻混和。
   (2)以 140℃微波 15 min。
   (3)取出冷卻後加水 2 mL，以磁石攪拌 5 min。

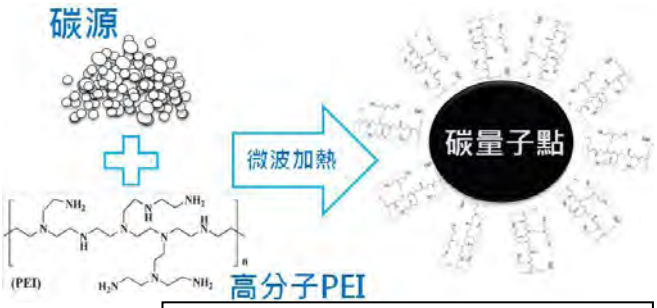


圖 B、高分子 PEI 修飾碳量子點

5. 一步驟乾燒：
   (1)取 50 mg 檸檬酸銨與 2.5 mg 甘露糖，以研缽研磨混合均勻後，在不同溫度 (100℃～180℃) 下以 100W 微波 10 min。
   (2)取出冷卻後加水 0.3 mL，以磁石攪拌 5 min。
   (3)將溶液以 7500 xg 離心 10 min，取出上清液。
6. 兩步驟乾燒：

(1)取 200 mg 檸檬酸銨，置入微波爐中，在 150℃下以 200W 微波 5 min。
(2)取出冷卻後，加入甘露糖 20 mg 或高分子 PEI 125.5 mg，以研缽研磨混合均勻後，再置入微波爐，以 150℃ 200W 微波 5 min。
(3)取出冷卻後，加水 1 mL，以磁石攪拌 5 min。
(4)取出 0.5 mL 溶液以 7500 xg 離心 10 min，取出上清液。

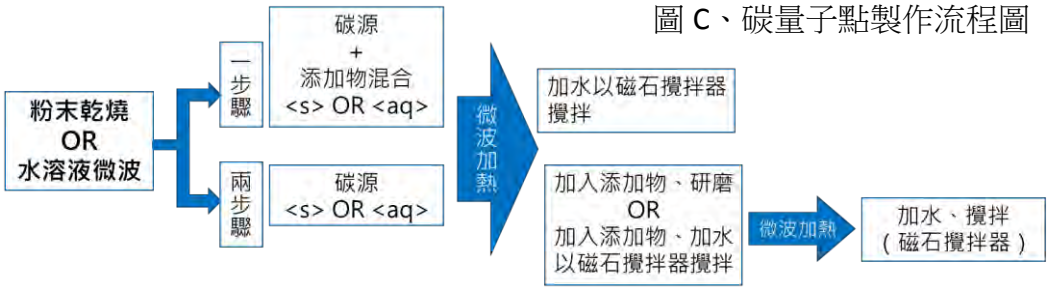


圖 C、碳量子點製作流程圖

二、 利用碳量子點偵測細菌

(一) 原理：

原本質量小且水溶性良好的碳量子點會溶於水溶液中，但在碳量子點與細菌結合後，細菌的重量會使結合的兩者在離心後沉澱，由沉澱物照紫外光是否發螢光，可判定量子點是否與細菌結合，進而達到偵測細菌的目的。

(二) 方法（如圖 D）：

1. 配製 1／250～1mg（0.25 mL）的 *E. coli* 水溶液，與等體積的碳量子點溶液混合。
2. 靜置、搖晃、間歇搖晃作用 1 小時～2 小時。
3. 離心後的沉澱物置於紫外燈光下照射，目測螢光。
4. 若有螢光，則除去上清液後加水再離心，重複兩次此清洗與離心的動作。
5. 重複兩次後，去除上清液加入 0.25 mL 的水，與沉澱物混和均勻，偵測螢光強度。

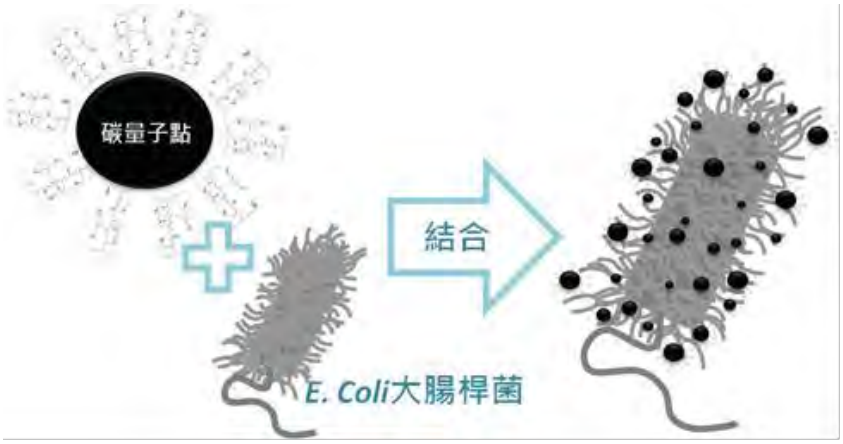


圖 D、高分子 PEI 修飾之碳量子點與大腸桿菌作用

陸、　研究結果與討論

一、 微波爐之穩定度測試

原本我們使用家用微波爐將檸檬酸溶液微波 10min 來製造碳量子點，發現有時觀察不到螢光反應，且以相同條件下製造出的量子點溶液，顏色不一定相同。為避免因微波爐背景溫度不同（隨著微波爐使用時間拉長，微波爐內部溫度有越來越高的趨勢），導致溶液顏色不同，我們將微波時間拉長為 13 分鐘，並等爐內溫度下降至 40℃左右，再進行下一次微波。雖已盡量使實驗條件相同，所得溶液以肉眼觀察仍可看出顏色上有明顯不同，如圖 1-1。

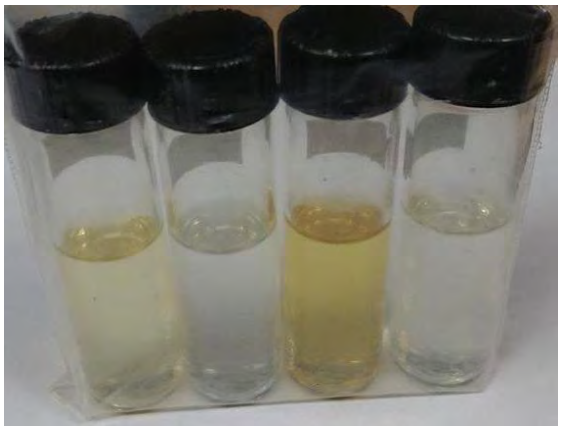


圖 1-1、家用微波爐製造的碳量子點溶液

因家用微波爐是不均勻地加熱整個爐內空間，而聚焦式微波爐是集中在一點上加熱，並偵測實際溫度來調節加熱與否，使溫度保持在一定範圍內。因此我們改以聚焦式微波爐製造碳量子點，進行螢光強度偵測並將兩種樣品進行比較，結果如表 1、圖 1-2。

表 1、家用微波爐與聚焦式微波爐的螢光強度

	聚焦式微波爐		家用微波爐	
數據	螢光強度	放射波長	螢光強度	放射波長
第一次	1.69237	423 nm	4.45274	468 nm
第二次	1.62763	425 nm	0.58934	410 nm
第三次	1.33865	426 nm	6.32552	473 nm
第四次	1.49569	425 nm	0.96858	411 nm
第五次	2.04647	425 nm	0.43000	410 nm
第六次	1.66263	425 nm	16.06230	488 nm
平均	1.64391	424.8 nm	4.87514	442.8 nm
標準差	0.23672	0.98	6.72021	38.80

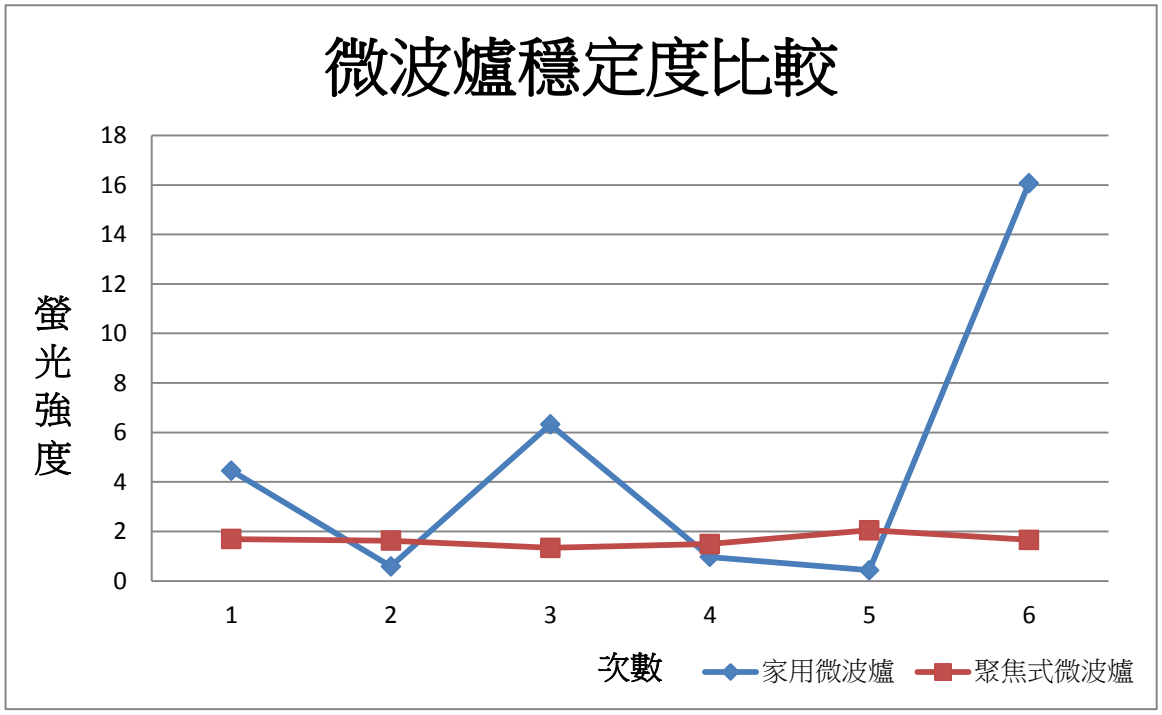


圖 1-2、家用微波爐與聚焦式微波爐穩定度比較

在相同條件下重複實驗，家用微波爐螢光強度／放光波長的標準差為 6.72021／38.80，聚焦式微波爐的標準差 0.23672／0.98。家用微波爐誤差較聚焦式微波爐大，所以後續實驗主要使用聚焦式微波爐。

二、 不同濃度的量子點對螢光的影響

在實驗的過程中，發現碳量子點濃度越高，螢光不一定越強。為了解原因，我們查詢相關資料[15]後發現：當發螢光的物質濃度高時，有明顯的自我吸收現象，導致螢光強度下降。

因此將檸檬酸銨加甘露糖溶液，於 150℃微波 5 分鐘所製的碳量子點(濃度 C_0)，稀釋成不同濃度，偵測其螢光強度，想了解碳量子點在高濃度時是否有自我吸收現象，如表 2、圖 2-1。

表 2、不同濃度量子點對螢光、放射波長的影響

稀釋濃度	平均螢光強度	平均放射波長(nm)
3.91×10^{-4} C_0＝1／2560 C_0	8.52467	426.7
7.81×10^{-4} C_0＝1／1280 C_0	17.24527	428.3
15.63×10^{-4} C_0＝1／640 C_0	33.09143	429.0
31.25×10^{-4} C_0＝1／320 C_0	54.79467	437.0
125.00×10^{-4} C_0＝1／80 C_0	65.28235	448.5
250.00×10^{-4} C_0＝1／40 C_0	70.99090	459.0
500.00×10^{-4} C_0＝1／20 C_0	46.41620	482.0

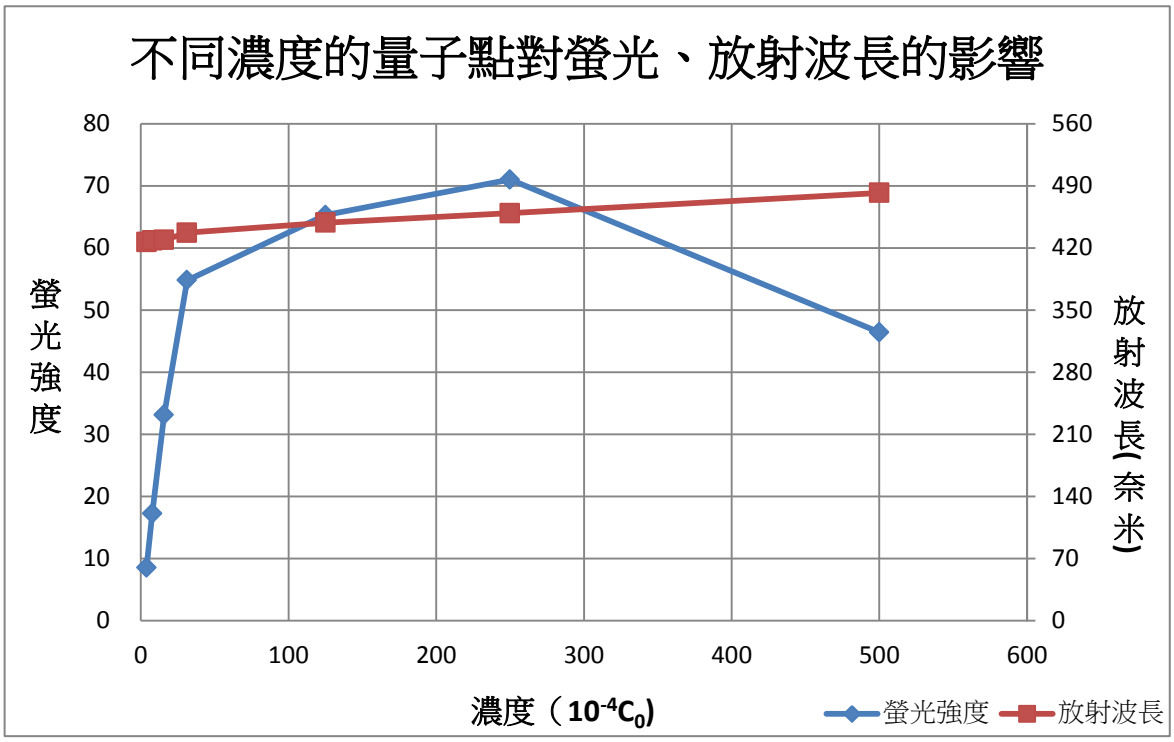


圖 2-1、不同濃度量子點對螢光、放射波長的影響

1. 配製一系列不同濃度的量子點，測量螢光強度，發現濃度＞250×10^{-4} C_0 之後螢光強度減弱，顯示量子點濃度愈高螢光不一定較強。驗證了自我吸收現象。
2. 我們亦發現隨著濃度增加，螢光波長有紅位移的現象(如圖 2-1)，推測是因為短波長的螢光在較高濃度時被碳量子點自我吸收所造成。
3. 將圖 2-1 中，稀釋至濃度＜31.25×10^{-4} C_0 的數據另做成圖 2-2，發現量子點濃度與螢光強度呈線性關係，顯示此時自我吸收現象的干擾可以忽略。

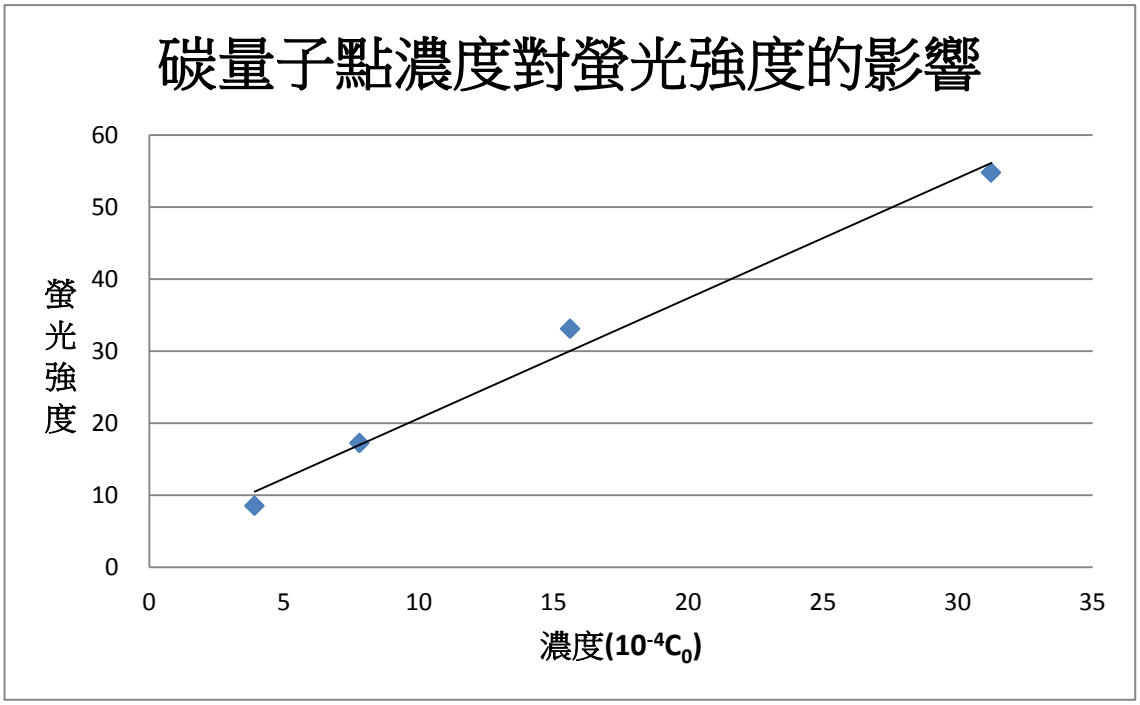


圖 2-2、碳量子點濃度（小於 1／320 C_0）對螢光強度的影響

三、 不同材料和方法製造碳量子點

(一) 不同材料製造碳量子點

一開始我們使用檸檬酸做碳源製造量子點，但是螢光強度不高。為製作螢光較強的碳量子點，我們查詢文獻[23]，得知氮原子可使量子點表面產生缺陷，提升碳量子點之螢光強度。因此我們選擇含氮物質作為碳源(如檸檬酸銨)或添加物(如高分子 PEI、精胺酸)，並想藉此製造出表面帶正電的量子點，希望可以和帶負電的細菌有不錯的結合，並製造出螢光更強的量子點。

文獻[6、13~16]中提到甘露糖與大腸桿菌的線毛（pili）的 FimH 蛋白有特殊的親和力，所以我們選擇含有甘露糖之水果汁作為碳源，也嘗試在藥品中添加甘露糖，期望能檢測到大腸桿菌。

1. 蘋果汁製造碳量子點：

我們選用含有甘露糖之蘋果汁[24]作為碳源製造碳量子點（如圖 3-1）。並且，為防止雜質及未與量子點結合的甘露糖影響偵測細菌，我們亦嘗試使用萃取的方法，期望使碳量子點顏色變淺：

以正己烷為萃取液，利用正己烷與水不互溶、但與有機物可溶特性，想將色素(可能是有機物)萃取出來，結果發現量子點溶液顏色幾乎沒有變淡。

圖 3-1、蘋果汁製造碳量子點

2. 以甘露糖修飾碳量子點

有添加甘露糖的樣品(CA+D 與 AC+D)，在微波之後有明顯的沉澱物出現，且溶液的顏色深，與細菌作用後會使細菌顏色變深。可能會影響細菌與量子點作用，或使後續的螢光觀察產生困難。

為此我們利用透析做後續處理，利用截留(cutoff)分子量 1000 的透析膜，透析碳量子點(如圖 3-2)，並將溶液離心，取出上清液，發現顏色雖有些微變淡，但仍無法與細菌結合，且螢光變淡。

圖 3-2、透析

由於甘露糖含碳，我們想知道甘露糖本身在加熱後會不會形成碳量子點，故將純甘露糖微波加熱 10 s～30 min，發現在 10 min 時甘露糖熔化呈現透明稠狀(如圖 3-3)，於 20 min 呈現淡黃色，於 30 min 時呈現微焦的黃色，並沒有焦黑現象，以 UV 照射會發出綠色螢光。

在後面實驗中，用來與細菌作用的甘露糖修飾之碳量子點，所微波時間都不超過 10 min，故可推測未與細菌成功結合的樣品，並非因為甘露糖碳化成碳量子點所造成。

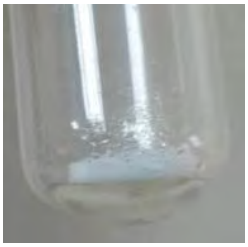


圖 3-3、純甘露糖

3. 以 PEI 修飾的碳量子點

從 CA 量子點和 CA+PEI 量子點的紅外光譜圖中，可以看出 CA+PEI 量子點的表面多了醯胺 N-H 鍵結(1578.5)，此鍵結非 CA

及 PEI 本身結構所有，推測是兩者微波後產生的新鍵結。（如圖 3-4、圖 3-5）

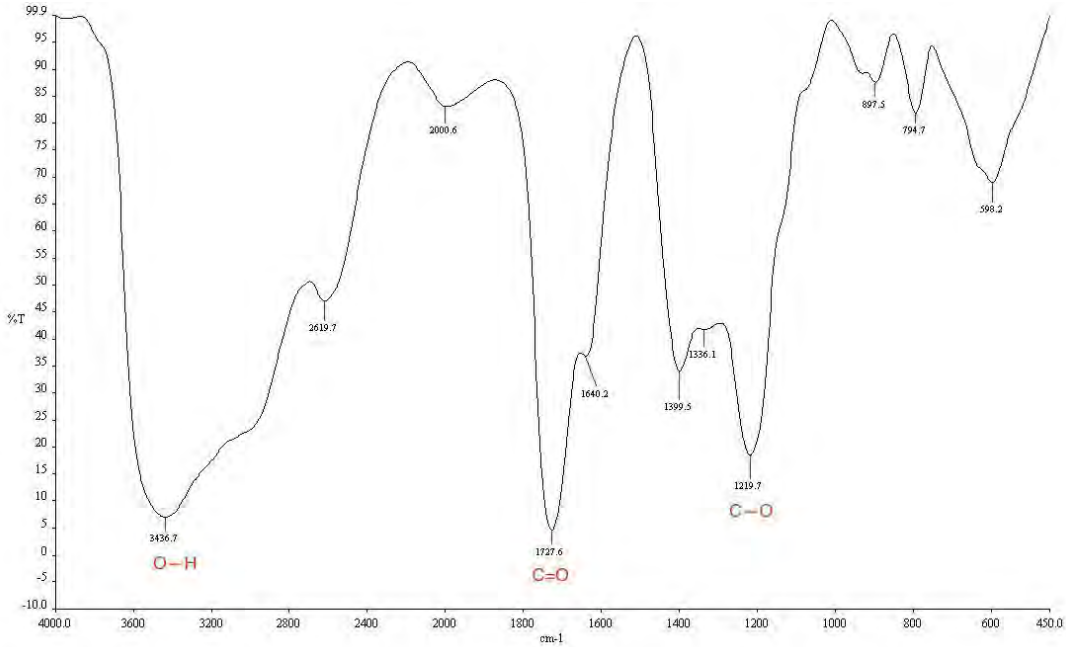


圖 3-4、CA 量子點

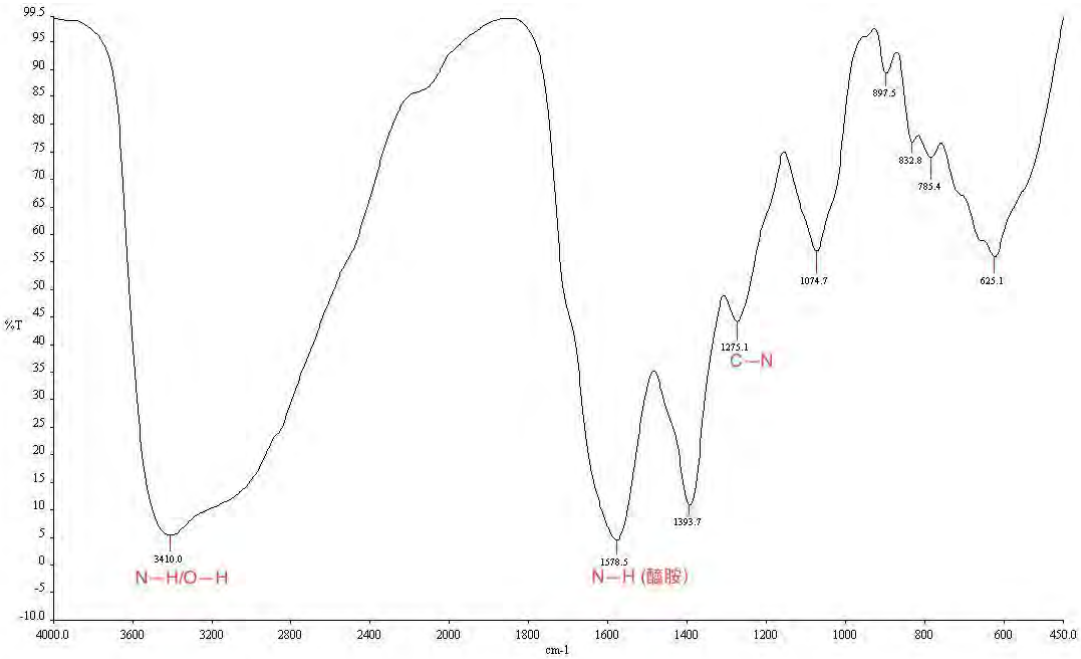


圖 3-5、CA+PEI 量子點

(二) 不同方法製造碳量子點

相較於其他製造碳量子點耗時且步驟複雜的方法，本實驗使用快速、簡單的微波法製造碳量子點。

1. 一步驟水溶液加熱／乾燒：

將藥品混和後，在水溶液／粉末的狀態下加熱製造碳量子點，由圖 3-6 可看出，以乾燒方式製得的碳量子點，目測螢光較強，推測是因為在無水的狀況下濃度較高所致。

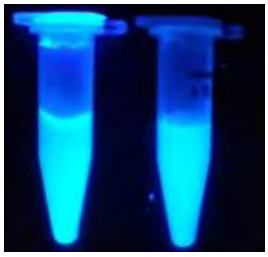


圖 3-6、乾燒(左)、水溶液微波(右)

2. 兩步驟水溶液加熱／乾燒（分段微波）：

先製造出碳量子點，再添加甘露糖／PEI 修飾，期望修飾物可以和量子點連結的更好。

(1)兩步驟水溶液加熱：

為使含甘露糖的碳量子點顏色變淺，我們嘗試先加熱檸檬酸銨，再加入甘露糖微波。結果發現若甘露糖微波時間為 10s，溶液顏色明顯變淡(如圖 3-7)。

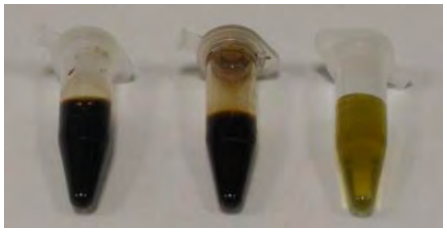


圖 3-7、
一步驟 2min(左)、
兩步驟 2min/2min(中)、
兩步驟 2min/10s(右)

(2)兩步驟乾燒加熱：

因為一步驟乾燒的量子產率高，所以我們進一步嘗試兩步驟乾燒，想了解這個新方法效果如何。

在乾燒兩步驟的實驗中，我們先將檸檬酸銨粉末以家用微波爐 500W 微波 5min 後，得到類似木炭的產物，但微波途中易起火燃燒，因此嘗試使用聚焦式微波爐，並降低瓦數。

由於 100W 微波 5min 後產物無變化，故改為 200W 微波 5min 得到熔化的稠狀檸檬酸銨（如圖 3-8），並以此相同條件再加入添加物後進行二次微波。

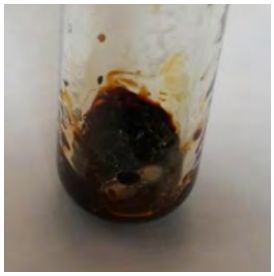


圖 3-8、檸檬酸銨

(三)不同材料和方法製造碳量子點的性質比較

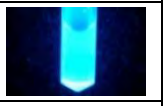
不同藥品於 150℃下微波製成碳量子點的比較，如表 3-1、表 3-2 和圖 3-9。

表 3-1、螢光強度較弱（目測沒有明顯螢光）之碳量子點

編號	藥品
CA	檸檬酸 50mg／水 0.5mL
CA+D	檸檬酸 50mg+甘露糖 50mg／水 0.5mL
蘋果汁	蘋果汁 0.5mL

對於濃度不同的碳量子點，若欲稀釋至可忽略自我吸收現象的濃度，其濃度不同，無法直接比較螢光，因此以量子產率來進行比較。

表 3-2、螢光強度較強之碳量子點量子產率比較

編號	藥品	UV 吸光值(稀釋後)	螢光強度積分面積	量子產率(%)	照片
CA+PEI	檸檬酸+PEI 40mg+11.36mg／水 0.6mL	-	-	29.98	
AC	檸檬酸銨 50mg／水 0.5mL	0.02012	795.007	9.05	
AC+Arg	檸檬酸銨+精胺酸 50mg+50mg／水 0.5mL	0.04991	953.995	4.38	

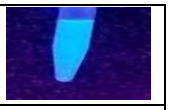
AC+D 10:1	檸檬酸銨+甘露糖 50mg+5mg／水 0.5mL	0.02816	818.452	6.66	
AC+D 10:1 乾燒	檸檬酸銨+甘露糖 50mg+5mg／無水	0.02650	3130.270	27.05	
AC+D 20:1 乾燒	檸檬酸銨+甘露糖 50mg+2.5mg／無水	0.03120	1019.520	7.48	
AC+D 兩步驟	檸檬酸銨+甘露糖 50mg+2.5mg／水 0.5mL	0.03539	667.451	4.32	
AC+D10：1 兩步驟 乾燒	檸檬酸銨+甘露糖 200mg+20mg／無水	0.04121	2220.820	12.34	
AC+PEI 兩步驟 乾燒	檸檬酸銨+PEI 200mg+125.5mg／無水	0.01355	738.564	12.48	

圖 3-9、不同材料和方法製量子點的量子產率 （由上到下，量子產率由小到大）

1. 由表 3-2、圖 3-9 得知，量子產率最高的是 CA+PEI 11：1（29.98%），最低是檸檬酸銨加甘露糖兩步驟（4.32%）。
2. 乾燒 AC+D10:1（27.05%）的量子產率比 20:1（7.48%）高，說明修飾劑的比例是一個重要的因素，未來將進一步探討比例對量子產率的影響。
3. 比較不同方法製造 AC+D10：1 碳量子點之量子產率，發現一步驟乾燒方式優於兩步驟乾燒方式。
4. 比較不同方法製造 AC+D 量子點之量子產率，發現乾燒方式優於水溶液微波方式。
5. 因為氮可以使量子點表面產生缺陷[23]使量子點螢光增強，另有文獻[4、22]顯示含氮的碳量子點量子產率較高，但是檸檬酸銨加精胺酸量子產率（4.38%）明顯小於檸檬酸銨（9.05%），推測加了精胺酸的碳量子點，改變了吸光與放光的特性，造成量子產率下降。
6. 檸檬酸量子點的螢光強度（目測沒有明顯螢光）明顯較檸檬酸銨量子點低，應該是因為檸檬酸製成的碳量子點在 360nmUV 吸光值明顯較檸檬酸銨的量子點低（如圖 3-10、圖 3-11），以致其可以放出的螢光較弱。

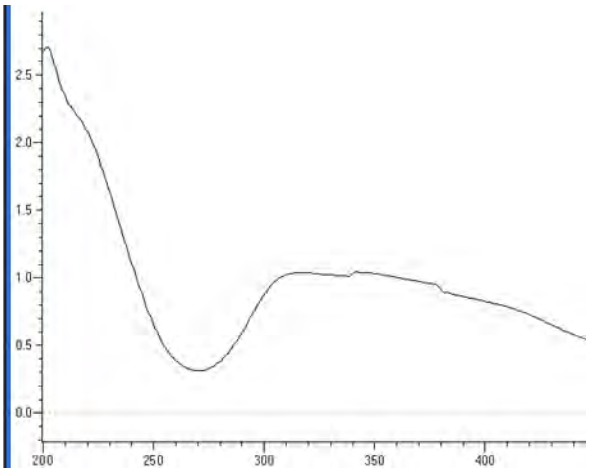


圖 3-10 檸檬酸銨量子點吸收光譜

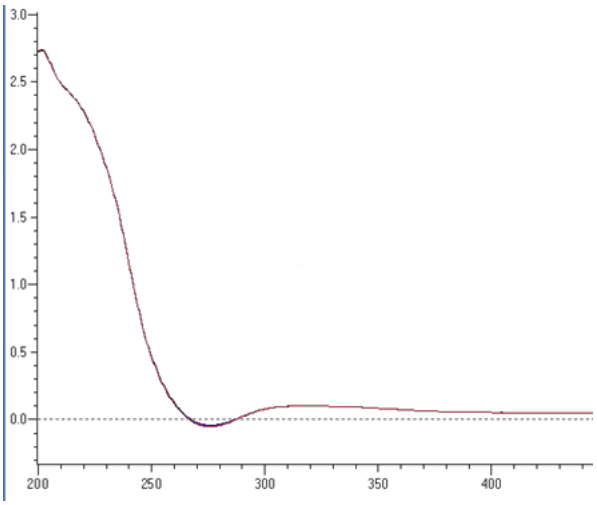


圖 3-11 檸檬酸量子點吸收光譜

四、 微波時間對碳量子點性質的影響

為了瞭解不同微波時間對碳量子點濃度、量子產率的影響，我們將檸檬酸銨加甘露糖（10：1）水溶液，於 150℃下微波不同時間（1～90 min），測量螢光強度積分面積、360 nm UV 吸光值，來計算樣品的量子產率，為避免碳量子點自我吸收現象，我們將微波後的溶液，稀釋後再進行偵測，結果如表 4-1、圖 4-1、圖 4-2。

表 4-1、不同微波時間對量子點（檸檬酸銨+甘露糖）性質的影響

微波時間	螢光強度 積分面積	UV 吸光值 (稀釋後)	量子產率
1 min	102.513	0.02090	1.12 %
2 min	515.379	0.03358	3.53 %
5 min	1322.020	0.03796	7.98 %
10 min	818.452	0.02816	6.66 %
15 min	1447.090	0.03911	8.47 %
30 min	1739.570	0.03742	10.65 %
45 min	1240.680	0.02711	10.48 %
60 min	514.276	0.04961	2.37 %
75min	819.364	0.04542	4.13 %
90min	779.126	0.03641	4.90 %

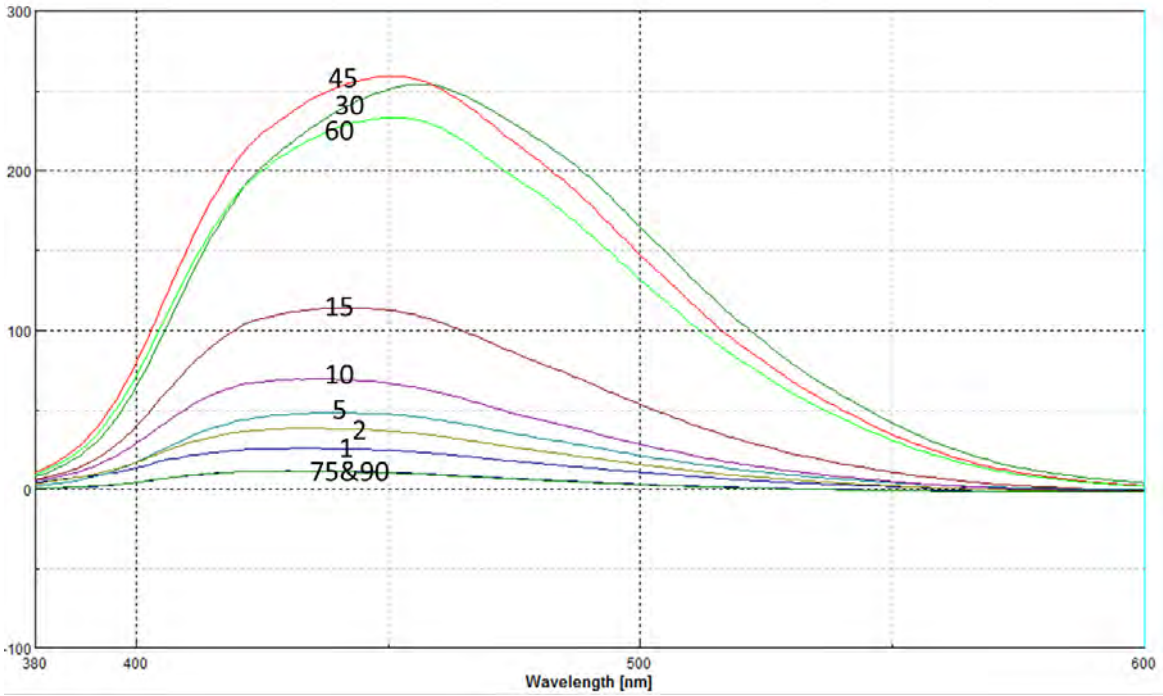


圖 4-1、不同微波時間之碳量子點（檸檬酸銨+甘露糖）的螢光光譜圖
(由下到上分別為：75&90min、1min、2min、5min、10min、15min、60min、30min、45min)

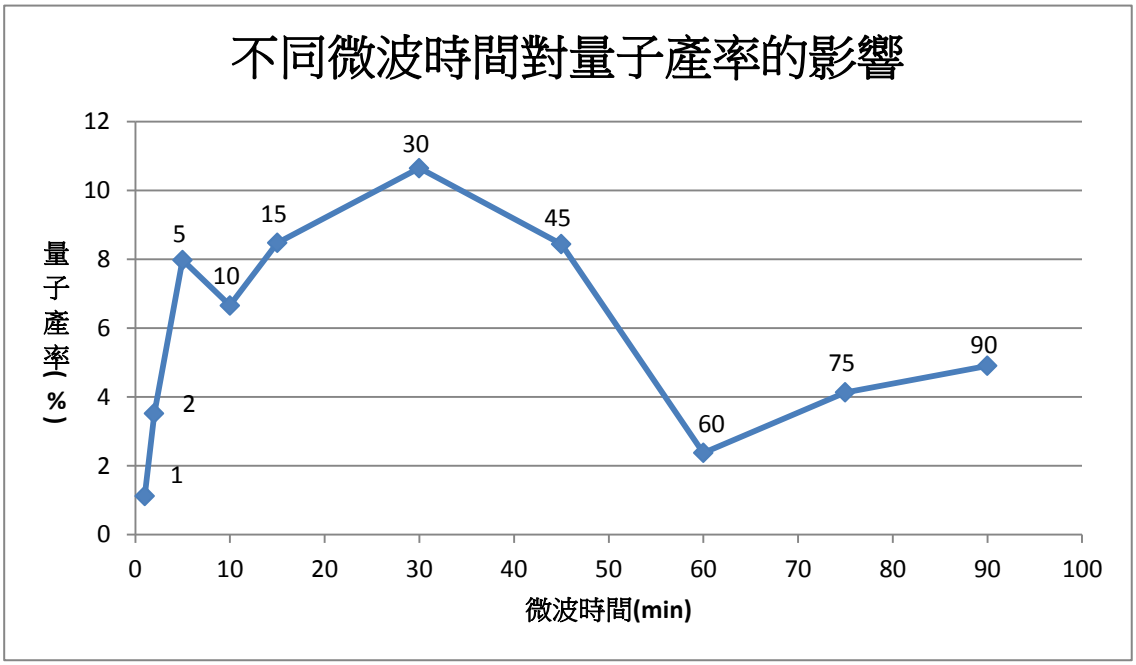


圖 4-2、不同微波時間對量子點（檸檬酸銨+甘露糖）量子產率的影響

1. 由圖 4-1 發現，微波時間在 30 min 以內時，檸檬酸銨+甘露糖量子點的最大放射波長有隨微波時間增加而產生紅位移的趨勢。可能是微波時間變長使得碳點尺寸變大，亦可能是碳點濃度提高，短波長螢光被自我吸收所導致。
2. 由圖 4-2 發現，在 30 min 內，微波時間越長，其量子產率有越高的趨勢；30 min 後，隨時間增加，量子產率下降。推測在 30 min 時，形成最完整的碳量子點，之後量子點表面修飾官能基可能隨時間遭到破壞。

五、 以不同溫度製造碳量子點對量子產率的探討

在不同材料和方法製造碳量子點實驗得知乾燒的量子產率明顯高於其他，於是我們將檸檬酸銨粉末與甘露糖粉末（20：1）混合後，以不同溫度微波 10 分鐘，製造一步驟乾燒的碳量子點，計算量子產率進行探討，如表 5、圖 5-1。另外，為了解不同時間一步驟乾燒製得碳量子點的螢光強度與波長關係，製作了圖 5-2。

表 5、不同溫度乾燒對量子點的量子產率之影響

微波溫度	UV 吸光值 (稀釋後)	螢光強度積分面積	量子產率	平均放射波長 (nm)
100℃	0.03245	129.337	0.91%	427
120℃	0.00712	214.329	6.89%	428
140℃	0.01954	886.199	10.39%	429
150℃	0.03120	1019.520	7.48%	430
180℃	0.03396	990.600	6.68%	431

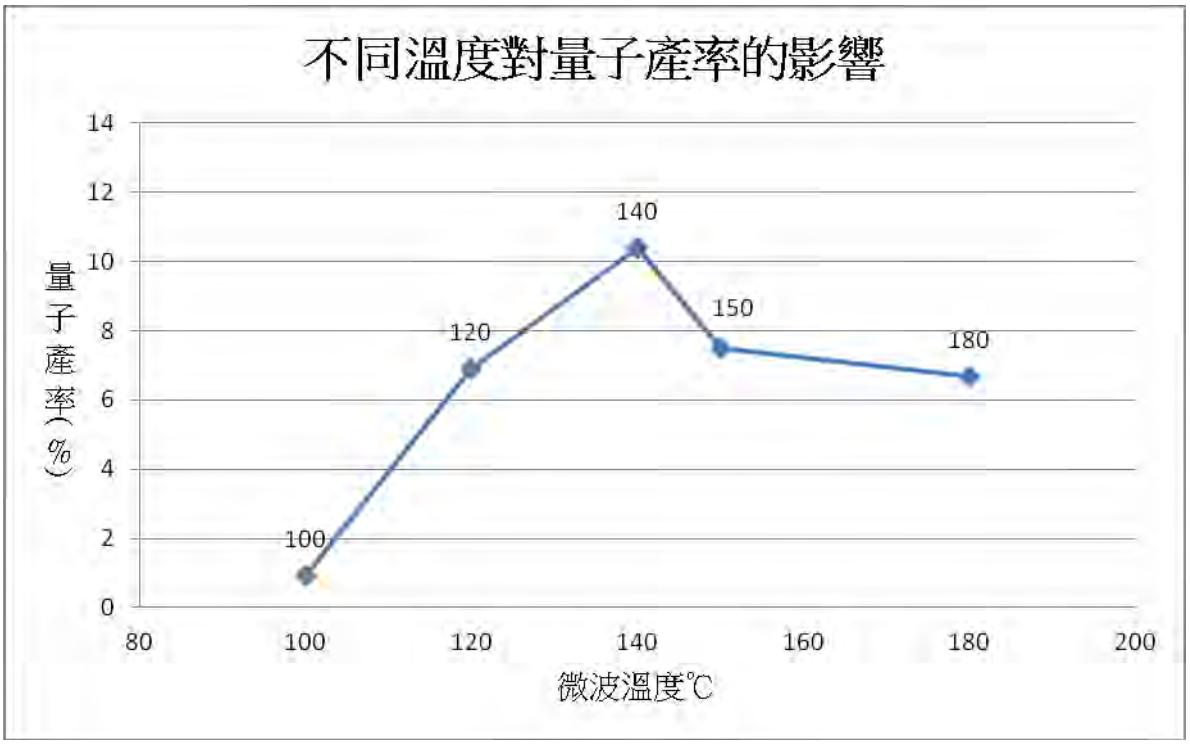


圖 5-1、不同溫度一步驟乾燒對量子點的量子產率之影響

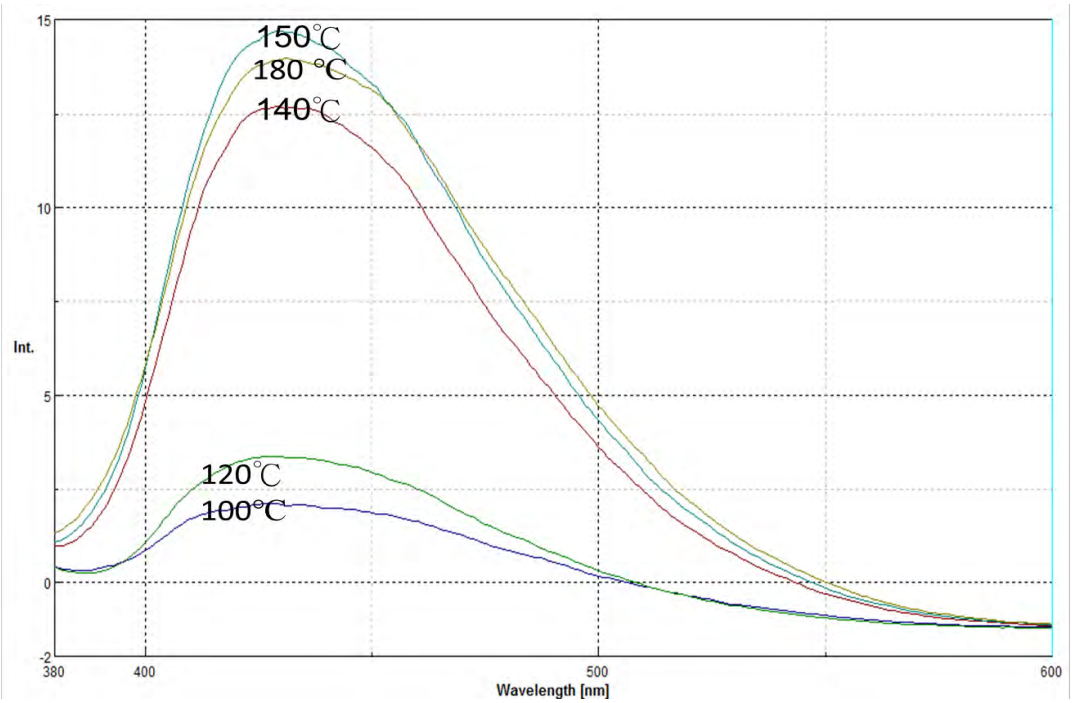


圖 5-2、不同溫度一步驟乾燒之碳量子點螢光光譜圖
(由下到上分別為 100℃、120℃、140℃、180℃、150℃)

1. 結果發現在 140℃時量子產率最好，在溫度升高時，量子產率有些微下降，推測溫度過高會破壞量子點表面之官能基。100℃時量子產率明顯低於其他溫度，推測可能是因 100℃溫度太低量子點還在形成階段。
2. 由表 5、圖 5-2 的結果，溫度越高，放射波長有增加的趨勢，但最大值與最小值只差 4 nm，因此在 100℃～180℃間溫度對一步驟乾燒檸檬酸銨加甘露糖製成量子點的放射波長影響不大。

六、 利用碳量子點偵測大腸桿菌(*E. coli*)

(一) 利用含氮、含甘露糖的量子點偵測 *E. coli*

我們推測以氮修飾的碳量子點帶有正電，能與帶負電的 *E. coli* 結合[17]，且文獻[6、13~16]提到甘露糖具有能和大腸桿菌結合的構造。於是我們藉由加入精胺酸、甘露糖來製造碳量子點，使碳量子點與 *E. coli* 溶液混合作用到至少 2 hr，結果如表 6-1、圖 6-1。

我們嘗試加入 0.1 M 氫氧化鈉 (增加碳量子點的溶解度) 後離心，並比較透析與否對結果的影響，結果如表 6-2。

表 6-1、利用含氮、含甘露糖的量子點偵測 *E. coli*

樣品	螢光 有（✓）無（－）
CA+Arg 檸檬酸+精胺酸	－
蘋果汁	－
AC+D 檸檬酸銨+甘露糖	－

AC+D 兩步驟	—
AC+D 兩步驟透析	—
AC+Arg 檸檬酸銨+精胺酸	—
AC+D10：1 乾燒　(溶於水)	✓
AC+D10：1 乾燒　(溶於 NaOH)	✓

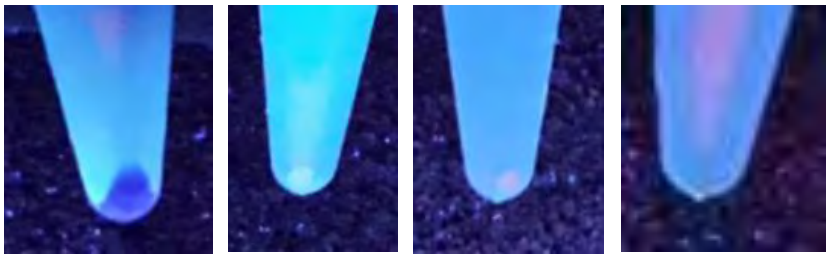


圖 6-1、（左到右）AC+D(檸檬酸銨+甘露糖)、AC+D 兩步驟、AC+D 兩步驟透析、AC+Arg(檸檬酸銨+精胺酸)。E. coli 皆為 0.5 mg （0.25 mL）。

表 6-2、利用溶於氫氧化鈉的 AC+D10：1 乾燒量子點偵測大腸桿菌(作用 2 hr)

是否透析	稀釋濃度	大腸桿菌含量	螢光強度	備註
否	1／10 C_0	1／4 mg（0.25 mL）	2.14257	圖 6-3 左
否	1／50 C_0	1／4 mg（0.25 mL）	2.17729	圖 6-3 右
是	1／10 C_0	1／4 mg（0.25 mL）	1.67895	圖 6-2 左
是	1／50 C_0	1／4 mg（0.25 mL）	1.54961	圖 6-2 右

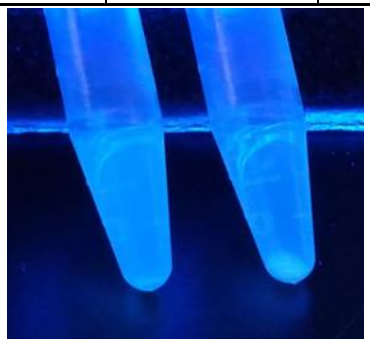


圖 6-2、0.25 mg（0.25 mL）*E. coli* + AC+D10：1 乾燒（溶於 NaOH）（有透析）

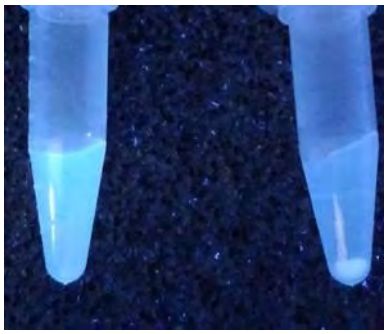


圖 6-3、0.25mg（0.25 mL）E. coli + AC+D10：1 乾燒（溶於 NaOH）（未透析）

1. 本以為含甘露糖的蘋果汁量子點應該較易與細菌結合，作用後發現沉澱物顏色太深且觀察不到螢光，推測可能有雜質影響檢測細菌的結果。因此另外嘗試將經過透析的量子點（顏色稍微變淺）與細菌作用，但作用後在細菌處仍觀察不到螢光。
2. 檸檬酸加甘露糖的碳量子點與蘋果汁製作的量子點很相似，均是溶液顏色極深，且螢光強度弱，因此不再進行 *E. coli* 測試。
3. 結果發現不論是否溶於氫氧化鈉，AC+D10：1 乾燒的碳量子點，皆成功與大腸桿菌結合，其中溶於氫氧化鈉的量子點無論有無透析，皆成功與大腸桿菌結合。
4. 利用透析過的碳量子點偵測大腸桿菌，結果螢光強度變低，推測是透析時一些碳量子點流失，導致螢光強度降低。

(二) 利用高分子 PEI 量子點偵測細菌

因為生物老師說過 PEI 可作為 DNA 載體，主要是利用帶負電的 DNA 與帶正電的 PEI 結合。為了解帶正電的 PEI 是否使碳量子點帶正電，我們利用動態雷射散射尺寸與電位分析儀測其表面電位，結果如圖 6-4、圖 6-5。

由於目前未查到以 PEI 製成的量子點來偵測細菌的文獻，因此我們嘗試利用檸檬酸和高分子 PEI 製成的量子點與細菌作用，希望帶正電的 PEI 使碳量子點帶正電(圖 6-4)，與帶負電的細菌結合，來「捕捉」細菌，結果如表 6-3、圖 6-6。

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	5.59	Peak 1:	5.59	100.0	4.63
Zeta Deviation (mV):	4.63	Peak 2:	0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm):	0.354	Peak 3:	0.00	0.0	0.00
Result quality :	Good				

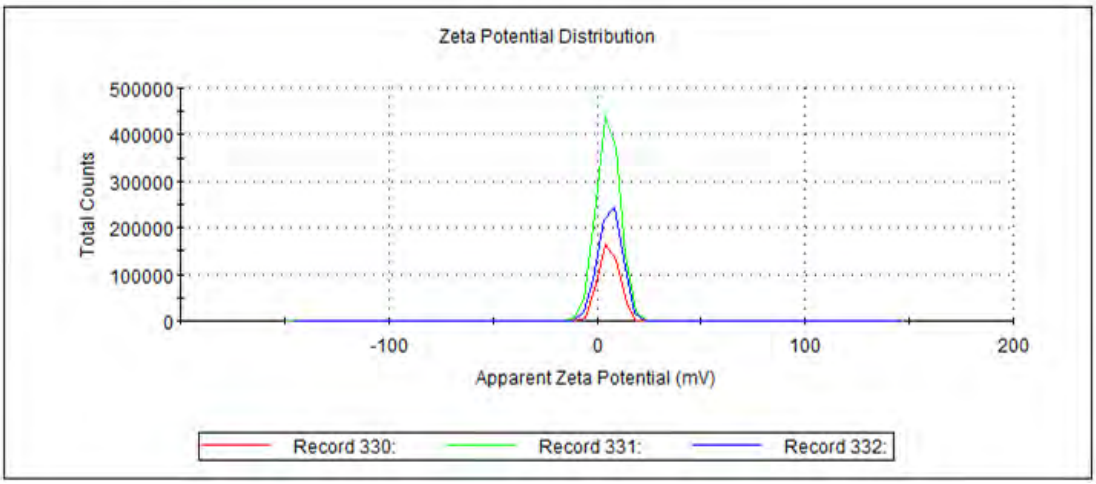


圖 6-4、CA+PEI 量子點電位

			Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm):	4.299	Peak 1:	2.472	86.9	0.8653
PdI:	0.148	Peak 2:	1662	13.1	1147
Intercept:	0.318	Peak 3:	0.000	0.0	0.000
Result quality :	Refer to quality report				

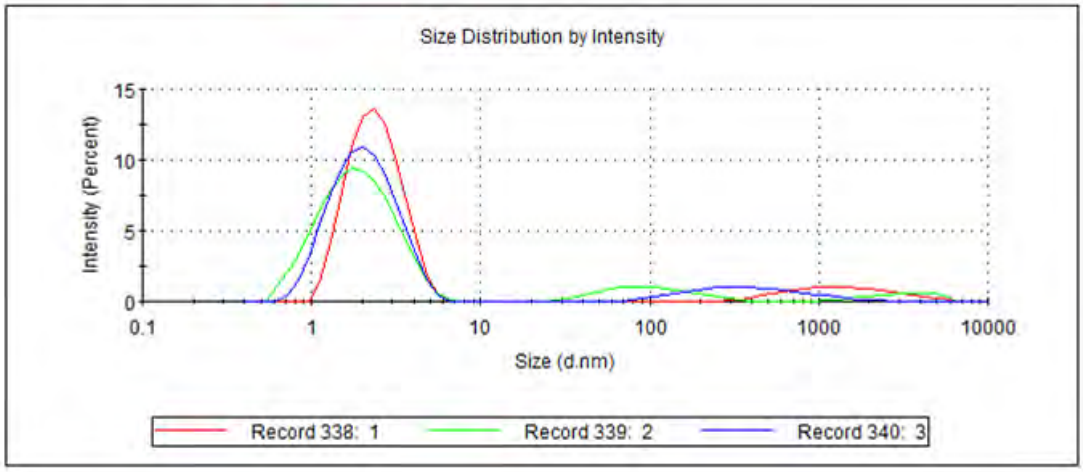


圖 6-5、CA+PEI 量子點尺寸

另外偵測了大腸桿菌以及與大腸桿菌結合之量子點的電位，如圖 6-6、圖 6-7。

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-29.9	Peak 1:	-29.9	100.0	7.89
Zeta Deviation (mV):	7.89	Peak 2:	0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm):	0.00550	Peak 3:	0.00	0.0	0.00

Result quality : Good

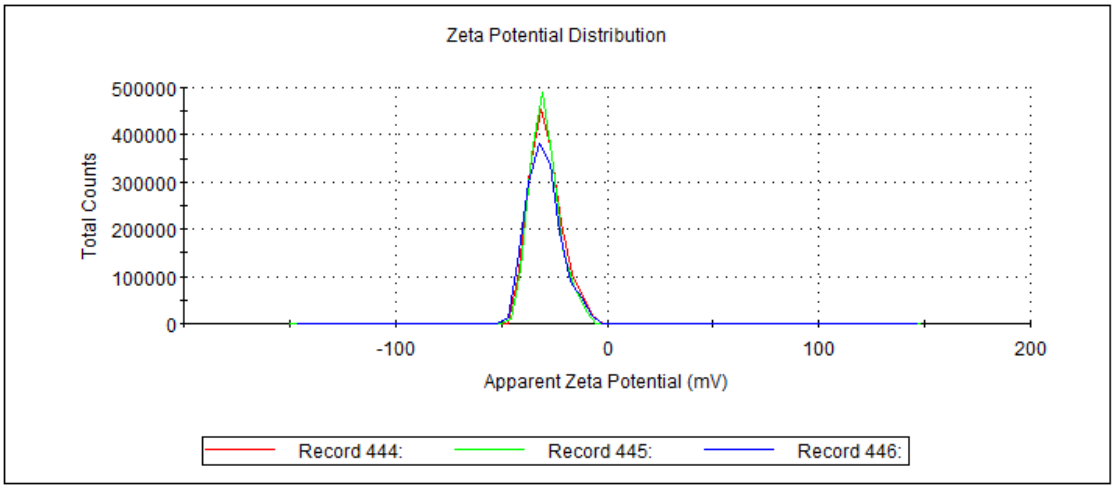


圖 6-6、*E. coli* 的電位

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-11.3	Peak 1:	-11.3	100.0	4.42
Zeta Deviation (mV):	4.42	Peak 2:	0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm):	0.0128	Peak 3:	0.00	0.0	0.00

Result quality : Good

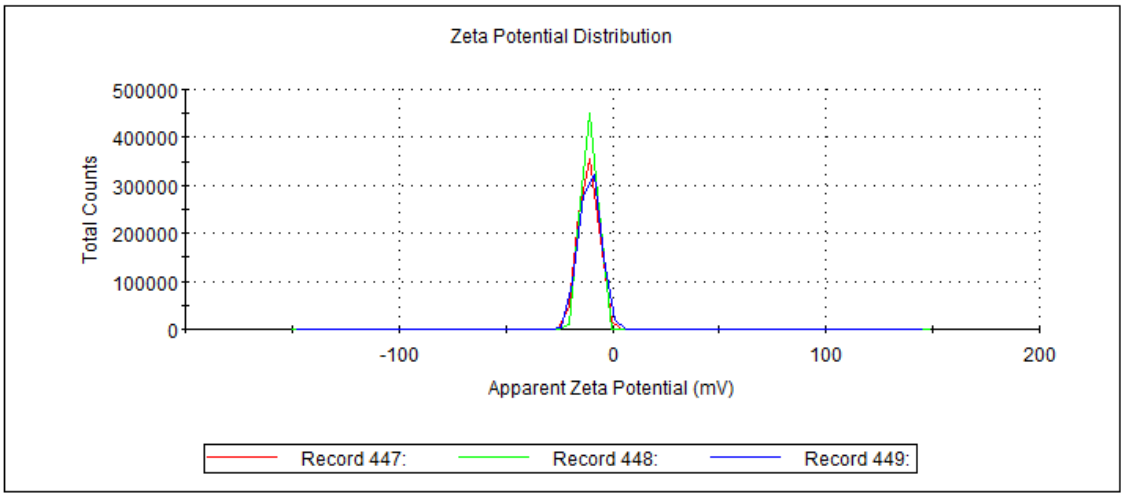


圖 6-7、*E. coli* + PEI 修飾之量子點作用後沈澱物的電位

表 6-3、利用高分子 PEI 量子點偵測細菌

藥品	螢光 有（✓）無（－）
檸檬酸+PEI	✓
檸檬酸銨+ PEI	✓
檸檬酸銨+甘露糖+PEI	✓
檸檬酸銨+ PEI(乾燒)	✓

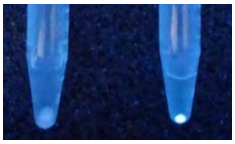


圖 6-8、
右: 檸檬酸+PEI 量子點 + *E. coli* 1／4 mg（0.25 mL）、
左: *E. coli* 1／4 mg（0.25 mL）

1. 由圖 6-4 的結果顯示，CA+PEI 製成的量子點表面電位平均為 5.59 mV，表面電位為正值，表示以 PEI 修飾的碳量子點確實帶正電。
2. 由圖 6-5 的結果顯示，CA+PEI 製成的碳量子點，經 30000 xg 離心 1 hr，約有 86.9% 的碳量子點平均粒徑為 2.472 nm。若碳原子粒徑以 0.1 nm 計算，當作正方體，則此種碳量子點約含 15000 個碳原子（$24.72^3 \fallingdotseq 15105$）。
3. 由圖 6-6、圖 6-7，*E. coli* 的電位為-29.9 mV，與量子點結合後為-11.3 mV，電位明顯增加，由此可推測適量 PEI 修飾的量子點帶正電，能與帶負電的 *E. coli* 結合。
4. 根據結果顯示，目前嘗試的方法中，只要含有 PEI 所製得的碳量子點與 *E. coli* 均有不錯的結合，可用此方法初步檢測 *E. coli*。

七、 不同 PEI 比例碳量子點之性質的探討

(一) 不同 PEI 比例碳量子點對量子產率的影響

在利用碳量子點偵測大腸桿菌(*E. coli*)實驗後，為了解不同比例的檸檬酸與高分子 PEI 對碳量子點量子產率的影響，我們將檸檬酸與高分子 PEI 以 1：1、3：1、5：1、7：1、9：1、11：1、13：1、19：1 的比例混和配製水溶液，製作碳量子點，計算量子產率進行探討，如表 7-1、圖 7-1。

表 7-1、不同比例 CA+PEI 碳量子點對量子產率的影響

比例 （CA：PEI）	UV 吸光值 （稀釋後）	螢光強度積分面積	量子產率 （%）
1：1	0.01151	258.360	5.14
3：1	0.01778	434.519	5.60
5：1	0.03477	2010.470	13.24
7：1	0.04893	3129.710	14.65
9：1	0.01756	1499.080	19.55
11：1	-	-	29.98*
13：1	0.03880	1518.060	8.96
19：1	0.02171	813.3650	8.58

*11：1 數據為三組平均

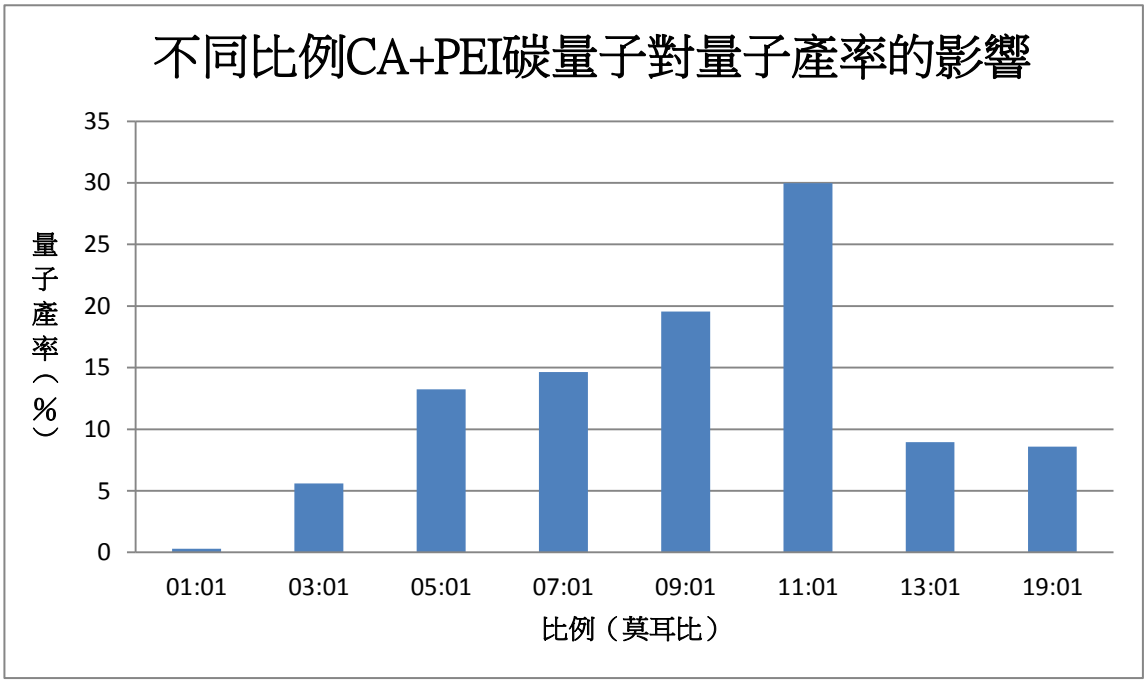


圖 7-1、不同比例 CA+PEI 碳量子點對量子產率的影響

由表 7-1、圖 7-1 得知，隨著高分子 PEI 比例減少，製成的量子點量子產率越高，在 11：1 時有最佳量子產率為 29.98337，之後高分子 PEI 比例越少，量子產率越低。

(二) 不同 PEI 比例碳量子點對電位的影響

將量子產率最高的 11：1 之 CA+PEI 量子點與細菌作用後發現偵測極限遠高於 5：1，推測是量子點與大腸桿菌(*E. coli*)未成功結合，為了解原因，我們偵測其表面電位，結果如圖 7-2。

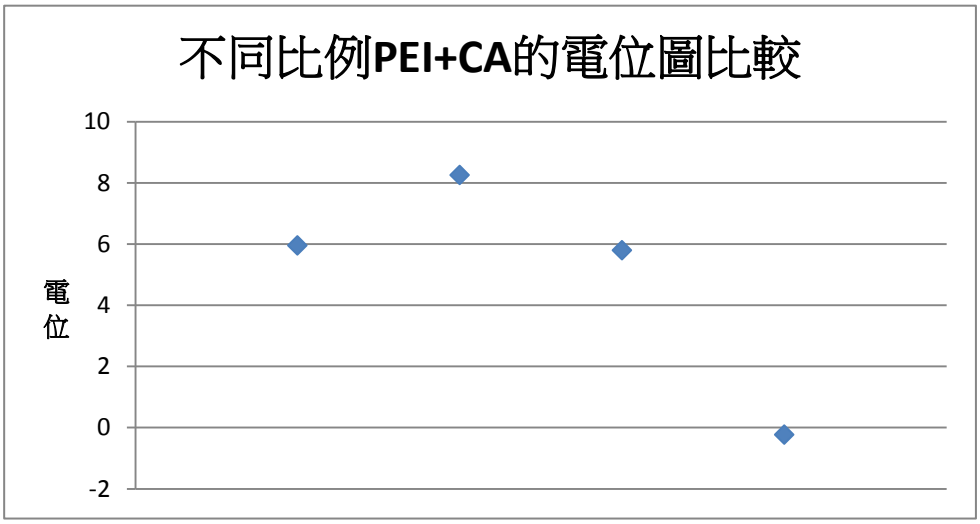


圖 7-2、不同比例 CA+PEI 碳量子點對表面電位的影響

(由左到右分別是 5：1、7：1、9：1、11：1)

由圖 7-2 得知，11:1 量子點之量子產率雖然最高，但因表面不帶正電(-0.228 mV)，導致它無法和帶負電的大腸桿菌結合，我們推測是因為 11:1 量子點中 PEI 含量不足，導致表面不帶正電。

八、 不同方法與時間對偵測大腸桿菌（*E. coli*）的影響

為縮短碳量子點與大腸桿菌的作用時間，我們將檸檬酸加高分子 PEI（5:1）製成的碳量子點，與 1／8 mg（0.25 mL）的 *E. coli* 混合，分別作用 2 hr 和 1 hr，想了解量子點與大腸桿菌需要作用多長的時間，並在作用 1hr 的實驗中以靜置、連續晃動和每 15 min 晃動 15 min 間斷等三種方式進行作用，如圖 8。

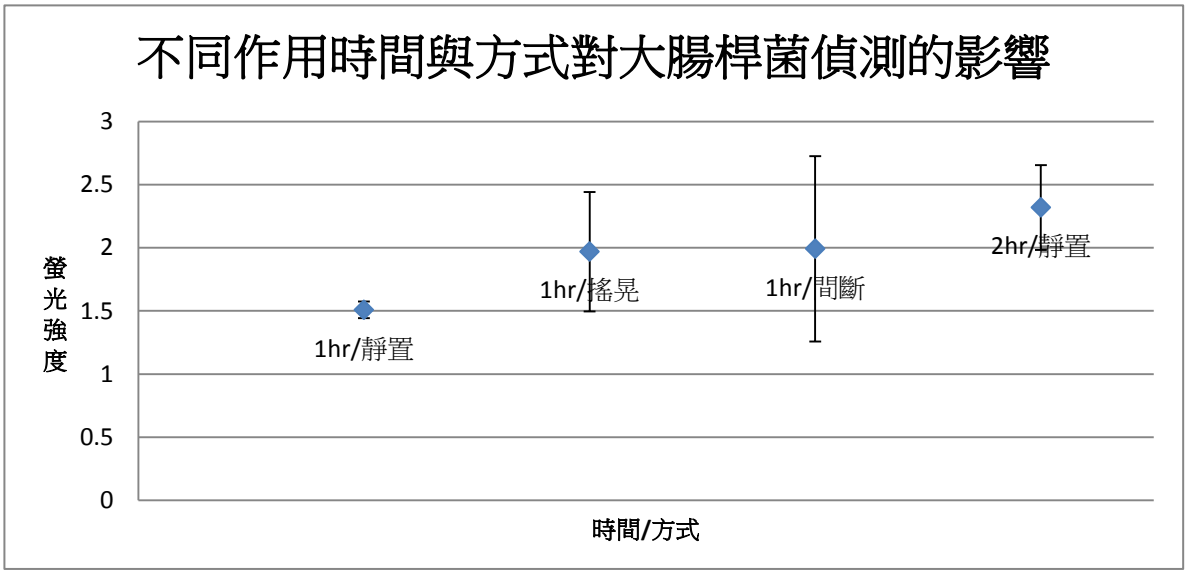


圖 8、不同作用時間與方式對大腸桿菌偵測的影響

1. 結果顯示，靜置 1hr 沉澱物的螢光強度(1.50846)，雖比靜置 2hr 的螢光強度(2.31811)低，但仍可以檢測大腸桿菌。
2. 在不同反應方式的實驗中，搖晃使螢光強度略微上升，推測搖晃會增加碳量子點與細菌接觸的機會，且持續搖晃與間斷搖晃的差異不大。

九、 大腸桿菌的定量

為了解自製的碳量子點能與多少的 *E. coli* 作用，我們將檸檬酸加高分子 PEI（5:1）製成的碳量子點，與不同濃度的細菌混合作用，得到細菌沉澱的螢光強度和細菌濃度關係如下表 9、圖 9-1、圖 9-2。

表 9、PEI 修飾之量子點與不同濃度之 *E. coli* 作用

大腸桿菌 *E. coli* mg（0.25 mL）	平均螢光強度
1	7.93950
3／4	7.35220
1／2	6.02220
1／4	4.35280
1／8	2.31810

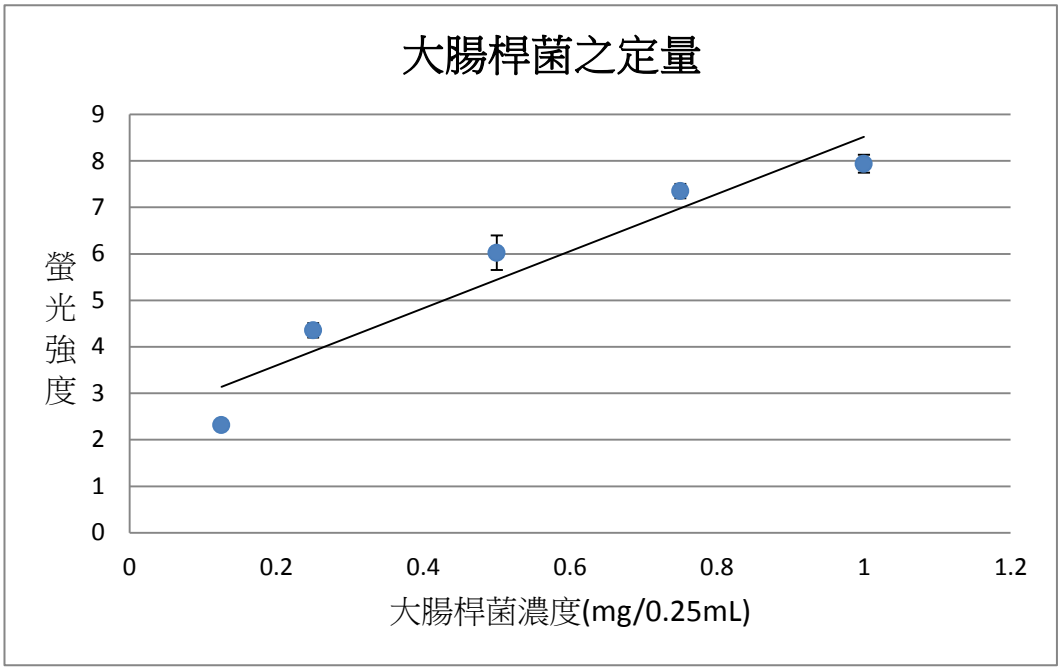


圖 9-1、PEI 修飾之量子點與不同濃度之 *E. coli* 作用

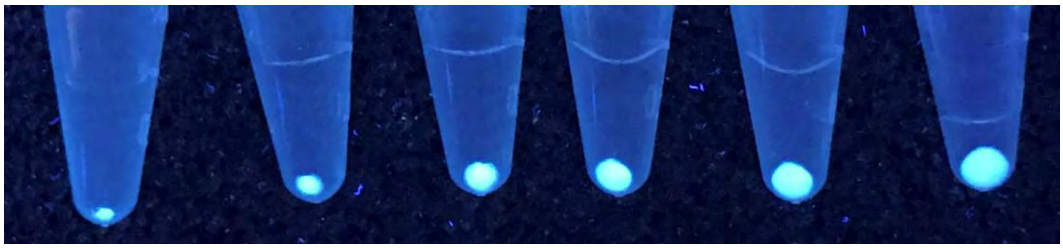


圖 9-2、PEI 修飾之量子點與不同濃度之 *E. coli* 作用
(由左到右) 1／16、1／8、1／4、1／2、3／4、1（mg ／0.25 mL）

1. 圖 9 中，在 *E. coli* 濃度為 1／8～1 mg（0.25 mL）時，濃度與螢光強度呈不錯的線性關係（Rsquare = 0.9203），證明本方法在 *E. coli* 濃度為 1／8～1 mg（0.25 mL）時可以作為 *E. coli* 的定量。
2. 我們嘗試將 *E. coli* 濃度降更低，即使是 1／250 mg（0.25 mL）的 *E. coli*，也可以偵測到螢光。若直接將含 1／250 mg 的細菌水溶液離心，因細菌量很少，不容易看見。細菌與量子點結合後，因為量子點在紫外光下會發螢光，可以清楚的看見細菌的存在。但螢光強度較低，不在線性範圍內(如圖 9-3)。由於所使用的螢光儀樣品槽較大，未來若能使用靈敏度較高的螢光儀，期望將定量極限與偵測極限大幅降低。

圖 9-3、
檸檬酸+PEI 量子點
+1/250mg（0.25 mL）*E. coli*

3. 為了解本方法檢測實際樣品大腸桿菌的可行性，我們模擬實際環境，在柳橙汁中添加大腸桿菌，使其濃度為 1／4 mg（0.25 mL），和碳量子點進行作用（圖 9-4），測得平均螢光強度為 4.72520。柳橙汁測得的螢光強度與上述定量線大致符合，表示本方法確實可以檢測未知濃度的大腸桿菌。

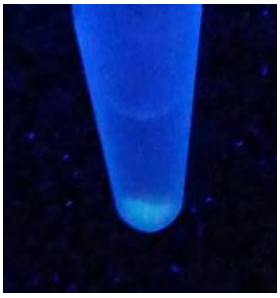


圖 9-4、柳橙汁之大腸桿菌檢測

十、 利用碳量子點偵測金黃色葡萄球菌

1. 將高分子 PEI 修飾的碳量子點（5:1），和不同濃度之金黃色葡萄球菌作用。顯示高分子 PEI 修飾之碳量子點也可以和金黃色葡萄球菌作用，且目前最低可偵測到 1／250 mg (0.25 mL)。（如圖 10-1）
2. PEI 修飾過的碳量子點能與大腸桿菌與金黃色葡萄球菌結合，或許可以用其偵測其他含有不同細菌樣品的總菌量。
3. 將與大腸桿菌成功結合的甘露糖修飾之檸檬酸銨(AC+D10：1 乾燒溶於氫氧化鈉)碳量子點與金黃色葡萄球菌作用，發現其沉澱物水溶液偵測不到螢光，表示甘露糖修飾之碳量子點偵測細菌具有選擇性，未來將進一步探討。（如圖 10-2）

圖 10-1、
PEI 量子點+1/250 mg(0.25 mL) SA

圖 10-2、
甘露糖修飾之量子點
+1/4 mg (0.25 mL) SA
無螢光
（量子點： AC+D10：1 乾燒，溶於氫氧化鈉）

柒、 結論

一、 聚焦式微波爐較家用微波爐穩定，但目前文獻多用家用微波爐，必須注意產物成分的穩定性。

二、 不同材料與方法製造碳量子點中，量子產率最高的是檸檬酸加高分子 PEI 11：1；最低的是檸檬酸銨加甘露糖兩步驟水溶液。

三、 同材料下，乾燒製成的碳量子點量子產率明顯比水溶液製成的量子點大。

四、 以檸檬酸銨加甘露糖製成的碳量子點，量子產率隨著微波時間增加先上升再下降，以 30 min 的量子產率最高。

五、 不同溫度的一步驟乾燒中，量子產率 140℃時最高；100℃時最低。

六、 以檸檬酸銨為碳源或以精胺酸修飾的碳量子點，雖螢光強度較強，但與細菌結合狀況不佳。

七、 以甘露糖修飾之碳量子點 AC+D 10：1 乾燒，可成功偵測大腸桿菌。

八、 以高分子 PEI 修飾的碳量子點，與大腸桿菌作用，最低可以偵測到 1／250mg (0.25 mL) 的大腸桿菌。

九、 成功定量實際樣品柳橙汁中所添加之大腸桿菌含量。

十、 以高分子 PEI 修飾的碳量子點溶液亦能偵測金黃色葡萄球菌，最低可以偵測到 1／250 mg (0.25 mL)。

捌、　未來展望

一、 希望未來使用靈敏度較高的螢光儀，降低定量極限與偵測極限。
二、 探討甘露糖修飾之碳量子點對大腸桿菌的選擇性。
三、 預計利用不同的添加物對碳量子點進行修飾，期望提升量子產率，並降低細菌偵測極限。

玖、　參考資料

1. 運用量子點奈米粒子殺死「超級細菌」（2016.1）• 讚新聞 • 取自 http:／／hssszn.com／archives／8855
2. 吳騰飛、敖燕輝、王沛芳、王超(2016 年 7 月) • 碳量子點的合成和應用 • 材料導報 A：綜述篇 • (A)第 30 卷第 7 期
3. 周興平、鄭楠楠、畢森林(申請日期 2015 年 11 月 5 日發佈日期 2016 年 1 月 27 日) • 一種以檸檬酸-脲為原料的超高量子產率碳量子點的製備方法 • 專利
4. 唐志姣、李攻科、胡玉玲(2016.10) • 化學進展 • 氮摻雜碳點的製備及在定量分析中的應用
5. 劉越、李曉霜、李琰(申請日期 2015 年 4 月 9 日發佈日期 2015 年 7 月 22 日) • 一種聚乙烯亞胺功能化碳量子點的製備方法及其應用 • 專利
6. Cheng-I,Weng Huan-Tsung, Chang Chia-Hua, Lin Yu-Wei, Shen Binesh, Unnikrishnan, Yu-JiaLi,Chih-Ching Huang(2015). One-step synthesis of biofunctional carbon quantum dots for bacterial labeling. *Biosensors and Bioelectronics*(Pages 1 – 6).Volume 68, 15 June 2015.
7. 奈米結構材料之特殊現象（2014 年 4 月 17 日）• 取自 https:／／www.google.com.twurl?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiFltTwp4zTAhXKwLwKHYKsBToQFggfMAA&url=http%3A%2F%2Fwww2.cma.edu.tw%2Fu_edu%2Fdep_physics%2Fcourse%2Fnano_phys%2Fppt%2Fch2_nano-phenomenon.pptx&usg=AFQjCNFw1XK1rFFQl4l35HGA6QiWdHFuUQ
8. 徐晨皓、袁子鈞、劉佳霖、邱泰嘉、胡焯淳（2014.11）• 科學教育 • 利用植物廢棄物合成含奈米碳點的螢光物質
9. 林志城、梁哲豪、張永鍾、薛文發、施明智(2012) • 儀器分析(二版) (第五章、分子螢光分析之操作細節) • 台中市:華格那
10. 螢光 • 維基百科 • 取自：https:／／zh.wikipedia.org／wiki／%E8%8D%A7%E5%85%89
11. 大腸桿菌 (2013 年 07 月 14 日) • 台灣 word • 取自 http:／／www.twword.com／wiki／%E5%A4%A7%E8%85%B8%E6%A1%BF%E8%8F%8C#1
12. 大腸桿菌 • 維基百科 • 取自 https:／／zh.wikipedia.org／wiki／%E5%A4%A7%E8%85%B8%E6%A1%BF%E8%8F%8C

13.沈祐維(2015)・許邦弘・國立臺灣海洋大學・生命科學暨生物科技學系・利用功能性奈米粒子檢測環境與生物樣品中碘離子與大腸桿菌
14.Chun-Cheng Lin, Yi-Chun Yeh, Chan-Yi Yang, Chan-Long Chen, Gee-Fong Chen,Chia-Chun Chen,Yi-Chun Wu(March10,2002). Selective Binding of Mannose-Encapsulated Gold Nanoparticles to Type 1 Pili in Escherichia coli. *J. Am. Chem. Soc., 124 (14),*, 3508-3509.
15.Sudha Moorthy,1Julia Keklak,1 and Eric A. Klein1,2,(2016 Feb 18). Perspective: Adhesion Mediated Signal Transduction in Bacterial Pathogens. *PMC Pathogens. 2016 Mar; 5(1): 23.*
16.Irving Po-Jung Laia, Scott G. Harrounb, Shiow-Yi Chena, Binesh Unnikrishnan, Yu-Jia Li, Chih-Ching Huang(2 June 2016). Solid-state synthesis of self-functional carbon quantum dots for detection of bacteria and tumor cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*(Pages 465–470). Volume 228.
17.林展平、王勇勝、沈俊宏、洪肇嘉、謝祝欽、郭昭吟(102 年 10 月)・添加銅銀金屬沸石材料之除菌與物化特性研究・科技學刊(第 22 卷)(P.38)・科技類(第 1 期)
18.李以彬(2012 年 9 月 15 日)・大腸桿菌群檢測方法介紹及常見問題探討・環保署環境檢驗所
19. 金黃色葡萄球菌腸毒素介紹、危害因子、檢驗標準法規－台美檢驗(102 年 9 月 6 日)・取自：http:／／www.superlab.com.tw／index.php?a=pro_detail&id=617
20.殺不死的超級細菌－金黃色葡萄球菌作者：何其錩。國立台中一中 (2008 年 9 月 28 日)・取自：www.shs.edu.tw／works／essay／2008／09／2008092923154954.pdf
21. 金黃色葡萄球菌、水中腸球菌、沙門氏桿菌、大腸桿菌及李斯特菌之 ISO 檢驗方法介紹(98 年 12 月)・黃乃芸・標準檢驗局九十八年度輸歐盟漁產品，官方管制人員教育訓
22.Yi Zhang, Yaling Wang, Xiaoting Feng, Feng Zhang, Yongzhen Yang, Xuguang Liu. (30 November 2016)Effect of reaction temperature on structure and fluorescence properties of nitrogen-doped carbon dots. Applied Surface Science(Pages 1236–1246). Volume 387.
23.陳柏翔(2016 年 2 月 11 日)・表面缺陷及粒徑對碳點螢光特性之探討・摘要
24.楊陽(2014 年)・蘋果水溶性膳食纖維硫酸酯化改性的研究・《陝西科技大學》・摘要

【評語】050212

本研究以簡易微波法，製備碳量子點並用於檢測細菌。將含碳物微波製成碳量子點進行修飾，並以螢光儀器測量其量子產率。也利用碳量子點與細菌結合後離心可沉澱的特性，測量其螢光強度來判定兩者是否結合及細菌的數目。屬於有創意值得嘉許，但無法辨別何種細菌，因此對細菌檢測的專一性仍然值得更多的探討。

作品海報

摘要

本研究以簡易微波法，開發出製備碳量子點並用於檢測細菌的新方法。將檸檬酸等含碳物微波製成碳量子點，加入精胺酸、甘露糖、高分子 PEI 等藥品微波，進行碳量子點的修飾，也以乾燒、兩步驟等方式製造碳量子點，並以螢光光譜儀等儀器測量其螢光強度與計算量子產率。利用碳量子點與細菌結合後離心可沉澱的特性，觀察沉澱物受 UV 照射後是否發螢光，來判定兩者是否結合，並測量其螢光強度，達到偵測與定量細菌的目的。由實驗得知，乾燒的碳量子點量子產率較水溶液微波高。檸檬酸銨加甘露糖之量子點可成功與大腸桿菌結合，但不與金黃色葡萄球菌結合。高分子 PEI 修飾的碳量子點與上述兩種細菌都能結合，最低可偵測 1／250 mg（0.25 mL）的細菌。

壹、研究動機

在高二上學期，老師在教〈化學與化工〉單元裡，我們接觸到奈米科技，並分享了一則新聞——〈運用量子點奈米粒子殺死「超級細菌」〉[(1)] 中得知：隨著各種「超級細菌」變異過於快速，使傳統藥物無法有效對抗。對此，研究人員發現利用特製的量子點可以對抗具有抗藥性的大腸桿菌、金黃色葡萄球菌等細菌。

基於對量子點的好奇，我們上網查詢了許多資料[(2)]後，瞭解碳量子點是一種尺寸在 10 奈米以下的零維奈米材料，在光線照射下，本身會發出螢光，具有無毒、良好水溶性、成本低、對環境危害小等優點，於是我們選擇碳量子點進行了相關的研究與探討。我們嘗試利用檸檬酸等含碳物製造碳量子點，希望用碳量子點來偵測細菌，應用在醫療診斷上，提供另一種偵測細菌的方法。

貳、研究目的

一、 利用微波爐製造碳量子點

二、 了解自製碳量子點的量子產率

三、 了解不同製造變因對自製碳量子點性質的影響

四、 利用自製碳量子點偵測細菌

參、文獻探討

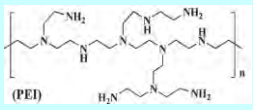
一、 量子產率

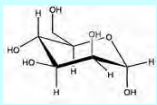
因高濃度碳量子點有自我吸收螢光的現象，且不易計算自製樣品所含碳量子點濃度，所以不能僅以樣品所發出的螢光強度來表示量子點的放光效率，故計算量子產率示之。本研究量子產率公式如右：

$$\text{樣品之量子產率}=\frac{\dfrac{\text{樣品螢光強度積分面積}}{\text{樣品吸光值}}}{235788.9}\times 54\%$$

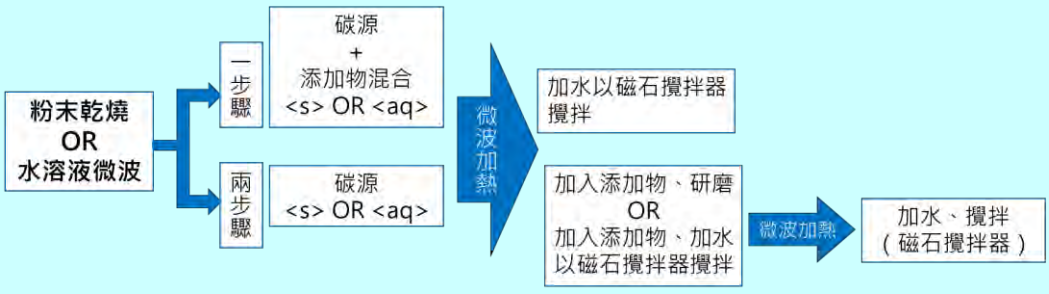
肆、研究設備及器材

檸檬酸、檸檬酸(含一個結晶水)、檸檬酸銨、精胺酸、甘露糖、聚乙烯亞胺(PEI)、大腸桿菌、金黃色葡萄球菌、氫氧化鈉、光纖溫度計、家用微波爐、聚焦型微波爐、透析模(截留分子量 1000)、電位分析儀、傅里葉轉換紅外光譜儀、紫外可見光光譜儀、螢光光譜儀。





伍、研究過程或方法



陸、研究結果與討論

一、 微波爐之穩定度測試

家用微波爐誤差較聚焦式微波爐大(圖 1-2)，所以後續實驗主要使用聚焦式微波爐。

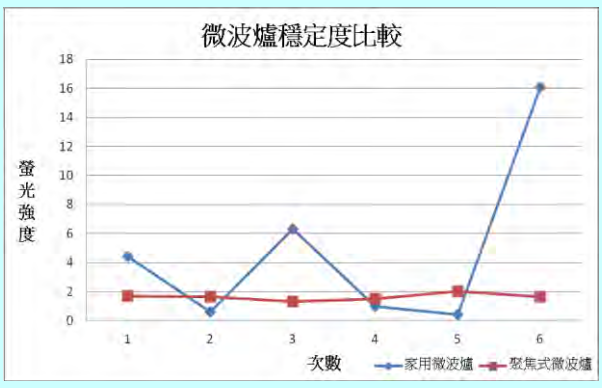


圖 1-2、家用微波爐與聚焦式微波爐穩定度比較

二、不同濃度的量子點對螢光的影響

將檸檬酸銨加甘露糖溶液以 150℃微波 5 min 之量子點(濃度 C_0)進行稀釋。測其螢光強度如圖 2-1，發現量子點濃度愈高螢光不一定較強，且隨濃度增加，螢光波長有紅位移現象。

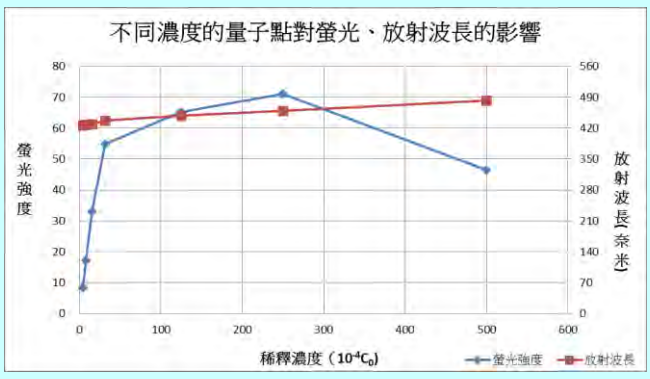


圖 2-1、不同濃度量子點對螢光、放射波長的影響

三、不同材料和方法製造碳量子點：

（一）不同材料製造碳量子點

1. 以甘露糖修飾：在微波之後有明顯的沉澱物出現，且顏色深。
2. 以 PEI 修飾：從圖 3-4，圖 3-5 中，看出 CA+PEI 量子點表面多了醯胺 N-H 鍵結，此鍵非 CA 及 PEI 本身結構所有，推測是微波後產生的新鍵結。

（二）不同方法製造碳量子點

1. 一步驟水溶液加熱／乾燒：以乾燒方式製得碳點目測螢光較強(圖 3-6)，推測是因在無水狀況下濃度較高所致。

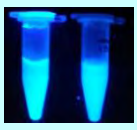


圖 3-6、乾燒(左)、水溶液微波(右)

2. 兩步驟水溶液加熱／乾燒（分段微波）：
   (1)兩步驟水溶液加熱：為使含甘露糖的碳量子點顏色變淺，我們先加熱檸檬酸銨，再加入甘露糖微波。發現後者微波 10s 時，顏色明顯變淡。
   (2)兩步驟乾燒加熱：因一步驟乾燒的量子產率高，所以我們進一步嘗試兩步驟乾燒。

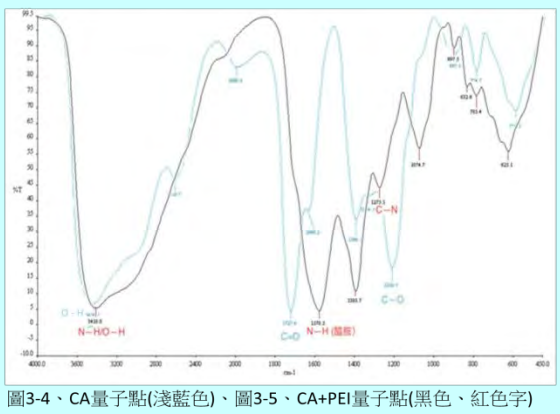


圖3-4、CA量子點(淺藍色)、圖3-5、CA+PEI量子點(黑色、紅色字)

（三）不同材料和方法製造碳量子點的性質比較

1. 由圖 3-9 得知，量子產率最高的是 CA+PEI 的 11:1（29.98%），最低是 AC+D 兩步驟（4.32%）。
2. 乾燒 AC+D10:1（27.05%）的量子產率比 20:1（7.48%）高，說明修飾劑的比例是一個重要的因素。
3. AC+D10：1 碳量子點之量子產率，一步驟乾燒優於兩步驟乾燒。
4. AC+D 量子點之量子產率，乾燒方式優於水溶液微波方式。
5. AC+Arg 量子產率(4.38%)明顯小於 AC(9.05%)，推測加了 Arg 的碳量子點，改變了吸光與放光的特性，造成量子產率下降。
6. CA 量子點的螢光強度(目測沒有明顯螢光)低於 AC，應是因為吸光值較低(如圖 3-10、圖 3-11)，以致放出的螢光較弱。

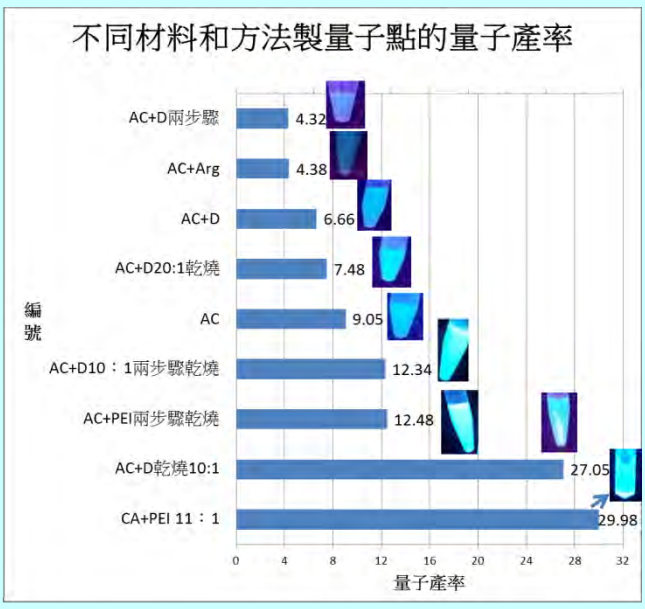


圖 3-9、不同材料和方法製量子點的量子產率（於 150℃下微波）

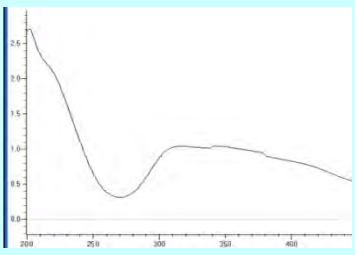


圖 3-10、檸檬酸銨量子點吸收光譜

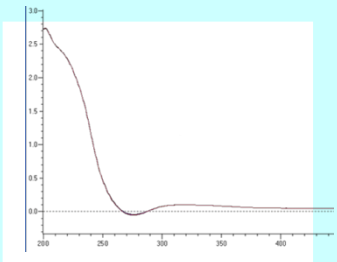


圖 3-11、檸檬酸量子點吸收光譜

四、 微波時間對碳量子點性質的影響

1. 由圖 4-1 發現，微波時間在 30 min 以內時，檸檬酸銨+甘露糖量子點的最大放射波長有隨微波時間增加而產生紅位移的趨勢。可能是微波時間變長使得碳點尺寸變大，亦可能是碳點濃度提高，短波長螢光被自我吸收所導致。
2. 由圖 4-2 發現，在 30 min 內，微波時間越長，其量子產率有越高的趨勢；30 min 後，隨時間增加，量子產率下降。推測在 30 min 時，形成最完整的碳量子點，之後量子點表面官能基可能隨時間遭到破壞。

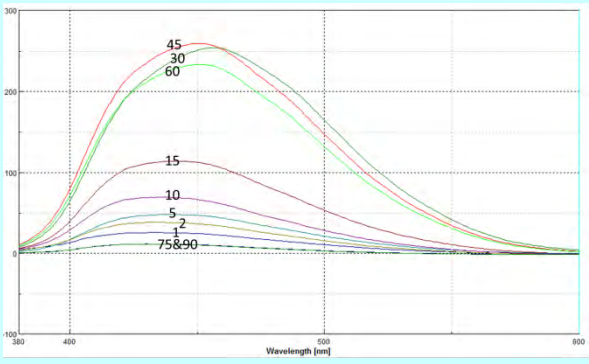


圖 4-1、不同微波時間之碳量子點的螢光光譜圖

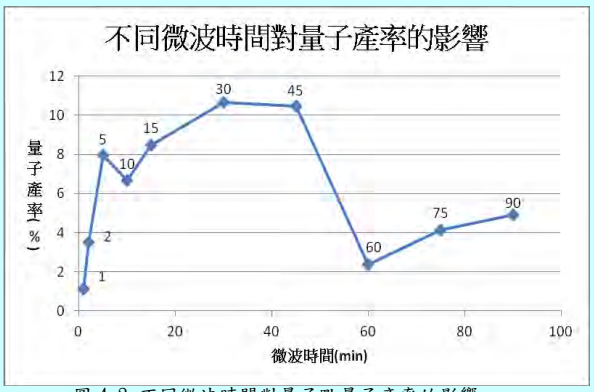


圖 4-2、不同微波時間對量子點量子產率的影響

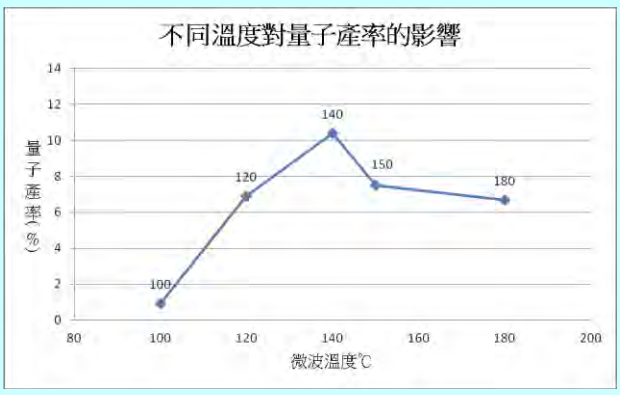


圖 5-1、不同溫度一步驟乾燒對量子點的量子產率之影響

五、 以不同溫度製造碳量子點對量子產率的探討

由圖 5-1 得知在 140℃時量子產率最好，在溫度升高時，量子產率有些微下降，推測溫度過高會破壞量子點表面之官能基。100℃時量子產率明顯低於其他溫度，推測可能是因 100℃溫度太低量子點還在形成階段。

六、 利用碳量子點偵測大腸桿菌(*E. coli*)

（一）利用含氮、含甘露糖的量子點偵測 *E. coli*

實驗結果(表 6-1)發現 AC+D 10：1 乾燒之碳量子點加水或加氫氧化鈉均成功與大腸桿菌結合(圖 6-1 為示意圖)。

表 6-1、利用含氮、含甘露糖的量子點偵測 *E. coli*

樣品	CA+Arg 檸檬酸+精胺酸	蘋果汁	AC+D 檸檬酸銨+甘露糖	AC+D 兩步驟	AC+D 兩步驟透析	AC+Arg 檸檬酸銨+精胺酸	AC+D 10：1 乾燒（溶於水）	AC+D 10：1 乾燒（溶於 NaOH）
螢光有(✓)無(－)	－	－	－	－	－	－	✓	✓

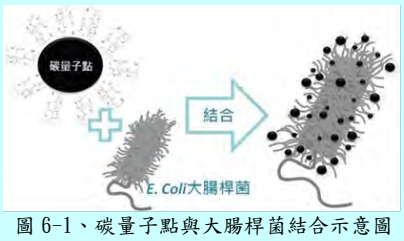


圖 6-1、碳量子點與大腸桿菌結合示意圖

（二）利用高分子 PEI 量子點偵測細菌

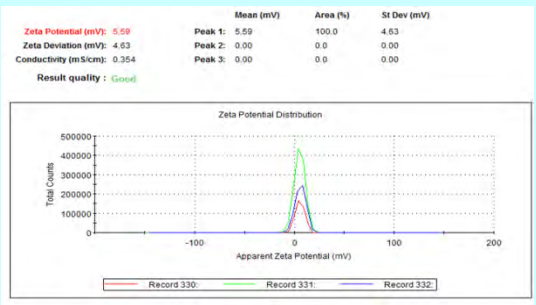


圖 6-4、CA+PEI 量子點表面電位

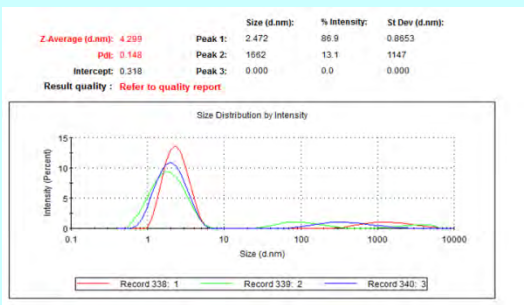


圖 6-5、CA+PEI 量子點尺寸

1. 由圖 6-4 的結果顯示，CA+PEI 製成的量子點表面電位平均為 5.59 mV，表面電位為正值，表示以 PEI 修飾的碳量子點確實帶正電。
2. 由圖 6-5 的結果顯示，CA+PEI 製成的碳量子點，經 30000 xg 離心 1 hr，約有 86.9%的碳量子點平均粒徑為 2.472 nm。若碳原子粒徑以 0.1 nm 計算，當作正方體，則此種碳量子點約含 15000 個碳原子（24.72^3=15105）。
3. 根據結果顯示(表 6-2)，目前嘗試的方法中，只要含有 PEI 所製得的碳量子點與 *E. coli* 均有不錯的結合，可用此方法初步檢測 *E. coli*。

表 6-2、利用高分子 PEI 量子點偵測細菌

藥品	螢光有(✓)無(－)
檸檬酸+PEI	✓
檸檬酸銨+PEI	✓
檸檬酸銨+甘露糖+PEI	✓
檸檬酸銨+PEI(乾燒)	✓

七、 不同 PEI 比例碳量子點之性質的探討

1. 隨著高分子 PEI 比例減少，量子點的量子產率越高，在 11：1(CA:PEI)時有最佳量子產率為 29.98337，之後高分子 PEI 比例越少，量子產率越低。(圖 7-1)

2. 11:1 量子點之量子產率雖然最高，但因表面不帶正電（-0.228 mV）(圖 7-2)，導致它無法和帶負電的大腸桿菌結合，我們推測是因為 11:1 量子點中 PEI 含量不足，導致表面不帶正電。

圖7-1、不同比例CA+PEI碳量子點對量子產率的影響

圖7-2、不同比例CA+PEI碳量子點對表面電位的影響

八、 不同方法與時間對偵測大腸桿菌（*E. coli*）的影響

1. 由圖 8 的結果得知，靜置 1hr 沉澱物的螢光強度(1.50846)，比靜置 2hr 的螢光強度(2.31811)低，但仍可用以檢測大腸桿菌。
2. 搖晃使螢光強度略微上升，推測搖晃會增加碳量子點與細菌接觸的機會，且持續搖晃與間斷搖晃的差異不大。

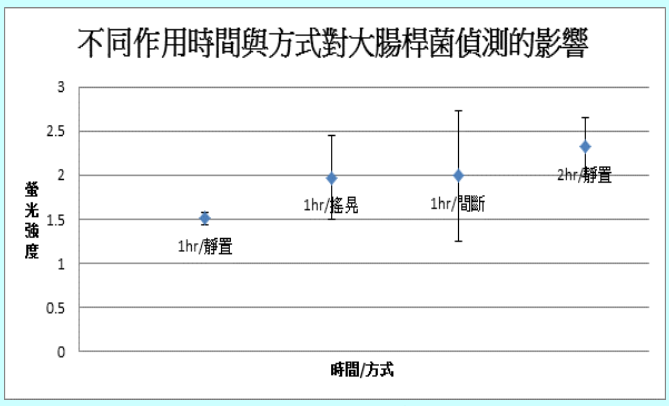


圖 8、不同作用時間與方法對大腸桿菌偵測的影響

九、 大腸桿菌的定量

1. 在 *E. coli* 濃度為 1/8～1 mg（0.25 mL）時，濃度與螢光強度呈現不錯的線性關係（R square = 0.9203），證明本方法在 *E. coli* 濃度為 1/8～1 mg（0.25 mL）時可以作為 *E. coli* 的定量。(如圖 9-1)
2. 我們嘗試將 *E. coli* 克數降更低，即使是 1/250 mg(0.25 mL)的 *E. coli*，也可以偵測到螢光(圖 9-2)，但螢光強度較低，不在線性範圍內。由於所使用的螢光儀樣品槽較大，未來若能使用靈敏度較高的螢光儀，定量極限與偵測極限應該可以大幅降低。
3. 為了解本方法檢測實際樣品大腸桿菌的準確度，我們在柳橙汁中添加大腸桿菌，使其濃度為 1/4 mg（0.25 mL），和碳量子點進行作用（圖 9-3），測得平均螢光強度為 4.72520。柳橙汁測得的螢光強度與上述定量線大致符合，表示本方法確實可以檢測未知濃度的大腸桿菌。

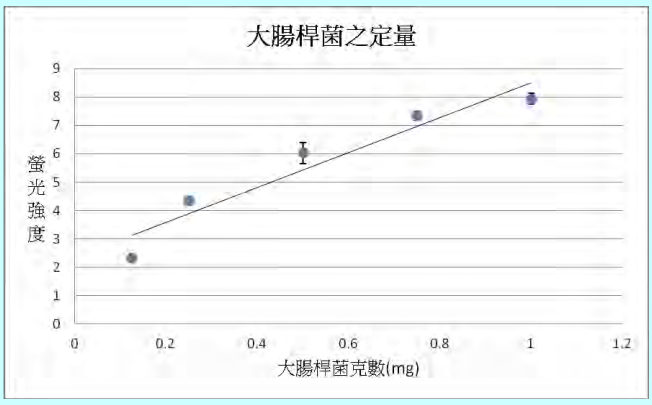


圖 9-1、大腸桿菌之定量

圖 9-2、
檸檬酸+PEI 量子點(1/50)
+1/250mg(0.25 mL)*E. coli*

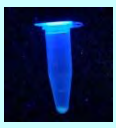


圖 9-3、柳橙汁之大腸桿菌檢測

十、 利用碳量子點偵測金黃色葡萄球菌

1. 高分子 PEI 修飾的碳量子點最低可偵測到 1/250 mg (0.25 mL)金黃色葡萄球菌(圖 10-1)。或許 PEI 量子點可以用其偵測其他含有不同細菌樣品的總菌量。
2. 將與大腸桿菌成功結合的甘露糖修飾之碳量子點與金黃色葡萄球菌作用，其沉澱物水溶液偵測不到螢光(圖 10-2)，表示甘露糖偵測細菌具有選擇性，未來將進一步探討。

圖 10-1、
PEI 量子點+1/250 mg(0.25 mL) SA

圖 10-2、
甘露糖量子點(1/50)+1/4 mg (0.25 mL) SA
無螢光 （量子點： AC+D10：1 乾燒，溶於氫氧化鈉）

柒、結論

一、 聚焦式微波爐較家用微波爐穩定，但目前文獻多用家用微波爐，必須注意產物成分的穩定性。
二、 不同材料與方法製造碳量子點中，量子產率最高的是 CA+PEI 11：1；最低的是檸檬酸銨加甘露糖兩步驟水溶液。
三、 同材料下，乾燒製成的碳量子點量子產率明顯比水溶液製成的量子點大。
四、 以檸檬酸銨加甘露糖製成的碳量子點，量子產率隨著微波時間增加先上升再下降，以 30 min 的量子產率最高。
五、 不同溫度的一步驟乾燒中，量子產率 140℃時最高；100℃時最低。
六、 以檸檬酸銨為碳源或以精胺酸修飾的碳量子點，雖螢光強度較強，但與細菌結合狀況不佳。
七、 以甘露糖修飾之碳量子點 AC+D10：1 乾燒 ，可成功偵測大腸桿菌。
八、 以高分子 PEI 修飾的碳量子點，與大腸桿菌作用，最低可以偵測到 1/250mg (0.25 mL)的大腸桿菌。
九、 本方法可成功檢測實際樣品柳橙汁中所添加之大腸桿菌。
十、 以高分子 PEI 修飾的碳量子點溶液亦能偵測金黃色葡萄球菌，最低可以偵測到 1/250 mg (0.25 mL)。

捌、未來展望

一、 希望未來能使用靈敏度較高的螢光儀，降低定量極限與偵測極限。
二、 進一步探討甘露糖偵測大腸桿菌選擇性。
三、 未來將進一步探討碳源跟添加物比例對量子產率的影響。
四、 預計利用不同的添加物對碳量子點進行修飾，期望提升量子產率，並降低細菌偵測極限。