

# 2015 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030003

參展科別 化學

作品名稱 以螢光探針作為過氧化氫與漂白水之微量檢測

得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 陳祖望、陳建添

作者姓名 楊欣琳

關鍵字 螢光檢測、過氧化氫、漂白水

## 作者簡介



小時候的我，是老師眼中的麻煩學生，總是喜歡抓著發現的奇怪現象到處發問，因為對這個世界充滿好奇，觀察探究身旁的一草一木，是我日常生活中不可缺少的樂趣。

也由於這份勇於嘗試的熱情，從小我就不怕離家求學，高中來到臺北就讀北一女中數理資優班，是我人生一大轉捩點，不但在這進步的大城市裡拓展視野，更在其中成長許多；更重要的事，它開啟了我走向科學研究的大門，雖然學校課業壓力纏繞於心，我仍利用課餘及假日的時間往清大實驗室跑去，在那裡享受自己的一片天。

這次有機會參加國際科展，真的非常高興、也非常感恩，若沒有人從旁支持和指導，也不會有今日的我。希望能在這次科展及交流中學到很多，並更加精進自己的能力，並期待能擴展人生新視野。

## 摘 要

本研究以順式二苯乙烯螺旋芬雙極型衍生物 (STIF) 為模板與帶有推電子基團的雙芳香胺及硼酯合成出本計畫所用螢光檢測劑。檢測劑與過氧化氫和漂白水發生氧化反應，利用螢光光譜儀可測量反應前後產生的藍位移大小。為提高檢測劑的偵測能力，嘗試替換雙芳香胺結構中的推電子基，並比較不同推電子基檢測劑反應變化的差異，以期能發展出更簡便的過氧化氫和漂白水的檢測方法。由於食品、用品加工常用到過氧化氫和漂白水，處理不當所導致的殘留以致慢性中毒的事件屢見不鮮，根據我國法律規定<sup>1</sup>，可用於製程但**最終產品（食品）不得檢驗出任何劑量殘留**，故此檢測劑同時具備了實際用途。

## Abstract

This study aims to develop fluorescent probe kit to detect bleach or hydrogen peroxide in aqueous solution. The kit reagent is consisted of spirally configured cis-stilbene/fluorene (STIF) hybrids as bipolar templates which bear electron donating diaryl amines at C3 position by performing Buchwald-Hartwig cross coupling reaction, followed by attaching a boronate at C7 position by Miyaura borylation with Bis(pinacolato)diboron. The kit will be subjected to oxidation reactions with bleach or hydrogen peroxide. The blue shift in the measured spectra of fluorescent emissions can be detected by emission spectroscopy. We further replaced the electron donating group of the appendage in the kit with other groups to establish the most effective detection group. Owing to the frequent uses of bleach or hydrogen peroxide during food processing, even trace residue could result in chronic intoxicification. According to the food processing law in Taiwan<sup>1</sup>, bleach or hydrogen peroxide can be used in the food processing but no residue is allowed in the final products. Therefore, the kit we introduced has potential wide applications.

## 壹、 前言

### 一、 研究動機

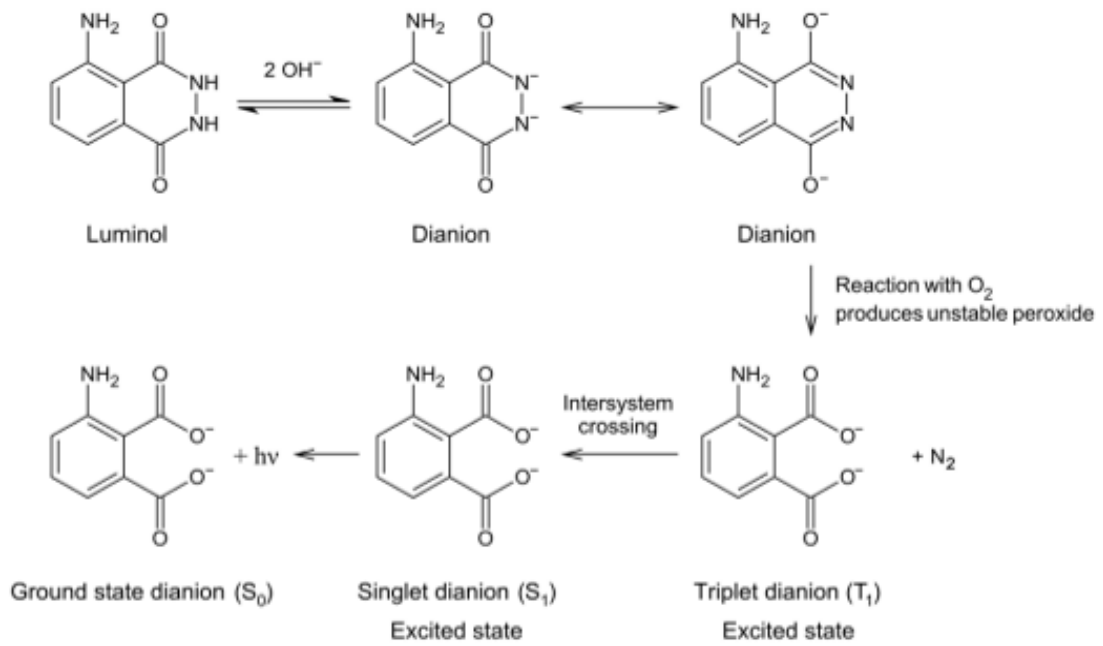
近半年來，食品安全的風暴可說是一波未平一波又起，黑心商人所引發的問題層出不窮；在食品加工的過程中，很多廠商會使用過氧化氫或漂白水來殺菌、改善賣相，國內曾驗出過氧化氫或漂白水殘留之食品有魚肉煉製品（如魚丸、魚板、魚捲及魷魚絲等）、麵製品（烏龍麵、油麵及米苔目等）、豆類製品（干絲、豆干及麵腸等）、蛤蜊、蜆、魚刺及鹽水雞等，許多人們常吃的食物通通上榜，實在令人感到憂心。不僅如此，人們經常使用的免洗餐具，製作過程在殺菌漂白的處理中都會使用過氧化氫、漂白水，一旦有殘留，長久使用下來，對人體造成的傷害不堪設想。食品安全問題使得人心惶惶，若能夠找到一種方法，可以快速、簡便的檢測餐具或食品中是否有過氧化氫或漂白水的殘留，對民眾來說，生活定是多一層保障。

### 二、 研究目的

- (1) 合成出能快速、簡便檢測過氧化氫與漂白水之檢測劑。
- (2) 在檢測劑結構中加入推電子甲氧基，以期增加檢測劑與過氧化氫與漂白水反應的藍位移。
- (3) 分析不同檢測劑偵測過氧化氫與漂白水之能力。

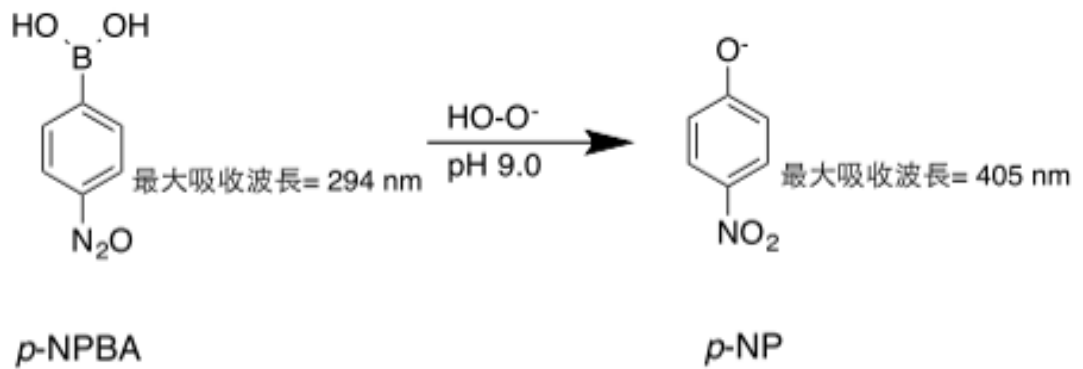
## 貳、 現行檢測原理探討

- 一、 衛福部食管署公告過氧化氫檢驗方法<sup>2</sup>：此方法用於食品中過氧化氫的檢測，需配置多種不同成分及濃度的溶液，當一般檢體接觸到 5% 硫酸鈦水溶液時呈黃色且接觸到硫酸鈇水溶液（稱取五氧化二鈇 0.1 g，加稀硫酸溶液 100 ml）呈淡黃至紅褐色時，代表檢體中有殘留過氧化氫。因為要同時用到多種藥品且步驟就為複雜。
  
- 二、 Luminol 檢測法<sup>3</sup>：過氧化氫在鐵或光的催化下會裂解成氧氣和水，氧氣會把 Luminol 氧化成有機過氧化物，因為很不穩定所以會裂解出氮氣，並生成激發態的 3-氨基鄰苯二甲酸，再回到基態時會放出藍光，維持時間少於 30 sec。因為發光較弱，當過氧化氫在微量的情況下，便無法用肉眼直接觀察，必須用相機進行長時間曝光後才可以知道結果，不甚方便。（如圖一 所示）



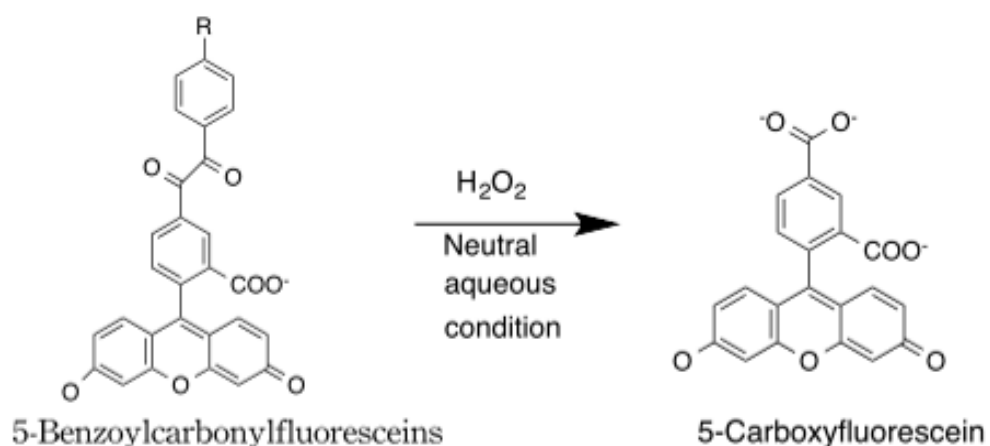
圖一、Luminol 的發光過程<sup>3</sup>

三、在中研院發表的一篇論文中<sup>4</sup>，他們用 Nitrophenylboronic acid (NPBA) 在鹼性環境與過氧化氫發生氧化反應，反應後生成黃色的 Nitrophenolate (NP)。在反應前後，其吸收波長從原本的 298 nm 變成 405 nm，吸收的波長有顯著的差異，且隨著過氧化氫的濃度增加在波長為 405 nm 時的吸收度的變化也呈現高度線性關係（回歸係數為0.9998）。對比我們的漂白水過氧化氫檢測劑，論文中的檢測劑合成起來較為容易且便宜，但吸收度無法用肉眼直接判斷，必須有可見光-紫外光光譜儀進行量測，才能進一步得到過氧化氫的含量，因此若想廣泛使用此檢測劑，因為對器材的需求較高，一般民眾可能無法即時的便利使用。因此相對而言，這種方法較適合用於檢驗機構。(如圖二 所示)



圖二、 *p*-NPBA 與過氧化氫生成 *p*-NP

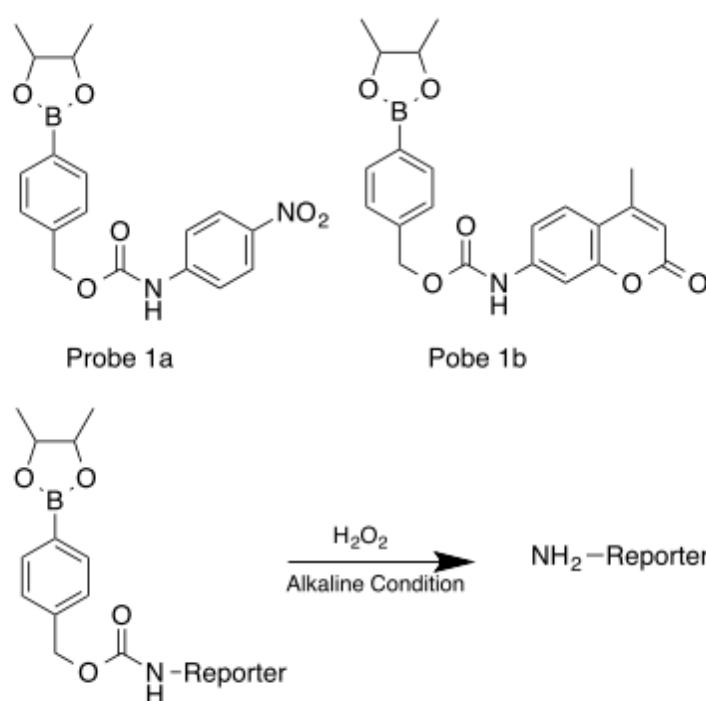
四、在 Tetsuo Nagano 教授所指導的一篇論文中<sup>5</sup>，他們是選用 5-Benzoylcarbonylfluoresceins 分子，因為分子內的 d-PeT (donor-excited photoinduced electron transfer process)，所以螢光量子產率相當低。但當此分子與過氧化氫在中性水溶液的情況下反應後，其螢光量子產率會大幅度上昇，從原先的 0.004 到後來的 0.8，使的螢光強度增加，此外其螢光強度變化與過氧化氫濃度變化亦呈正比關係。(如圖三 所示)



圖三、 Design of Fluorescence Probes for Hydrogen Peroxide<sup>5</sup>



五、在羅禮強教授的論文中<sup>6</sup>，經過特殊設計過的分子，在與過氧化氫反應後會釋出 reporter group，可以根據不同的需求對 reporter group 進行設計且不影響原本與過氧化氫的反應途徑為一大特點。以其中的 probe 1a 為例，與過氧化氫反應後會生成 p-Nitroaniline，其吸收波長相較於反應前會增加約莫 100 nm，而且 p-Nitroaniline 吸收度的變化跟過氧化氫的濃度的變化呈高度線性相關。另外，針對 probe 1b 的部分，在與過氧化氫反應後會生成 7-Amino-4-methylcoumarin，在 355 nm 激發光下，其放射光波長在 460 nm 的強度與過氧化氫的濃度也呈高度線性相關。(如圖四 所示)



圖四、Probe 1a 與 Probe 1b 的結構與其跟過氧化氫的反應方程式<sup>6</sup>

## 參、 研究方法

### ◎ 研究過程及試驗步驟規劃如下：

- (1) 初步先測試「初配檢測劑」對過氧化氫和漂白稅反應後的螢光效果。
- (2) 設計不同檢測劑進行合成。
- (3) 就不同檢測劑對不同濃度之漂白水 and 雙氧水進行檢測，觀察記錄反應速率及效果。
- (4) 以TLC (Thin layer chromatography)片(薄層色層分析法)及螢光光譜儀追蹤反應進行。
- (5) 以肉眼觀察可見光及 UV 燈下螢光變化。
- (6) 以光譜分析分析藍位移。

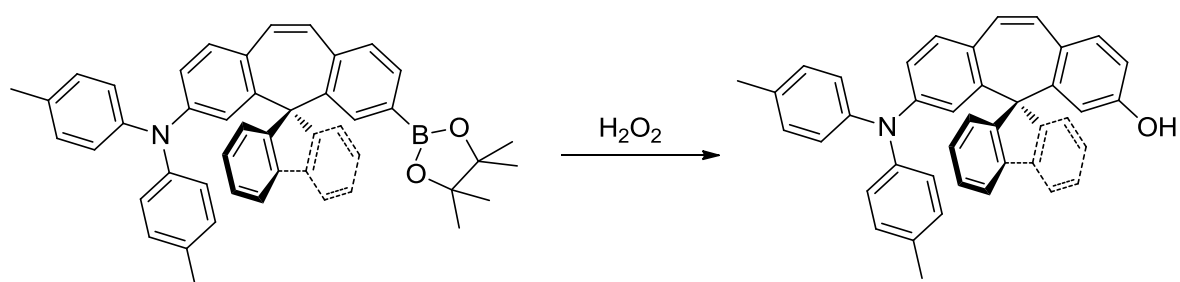
## 一、 基本原理說明

指導教授實驗室的專長為 OLED 相關材料分子的研究，以 STIF 為基礎接上雙芳香胺後的材料會有很高的螢光量子產率，換句話說，這種分子的顏色變化比較容易被辨識，對於較不敏銳的感測器（如肉眼）將更容易進行偵測。當中在以 STIF 為模板進行合成一系列材料的步驟中，會有一中間化合物（即文中的過氧化氫和漂白水的螢光檢測劑）具有綠色螢光的性質。

因為硼酯為拉電子基，會使得檢測劑的 LUMO 能階降低，且共軛性較佳，在檢測劑與過氧化氫或漂白水發生氧化反應後，硼酯會被氫

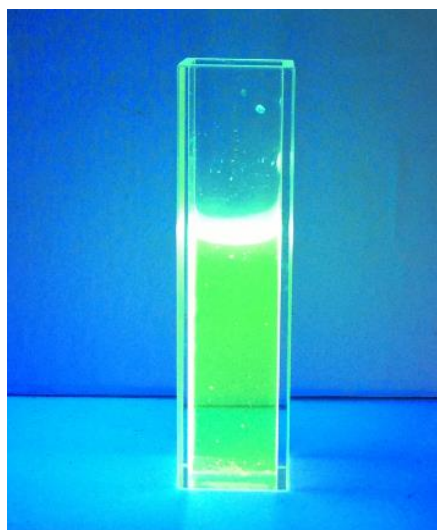
氧基替換掉，造成其 HOMO 會上升，且共軛性降低，故檢測劑的螢光波長會有顯著的藍位移現象發生。

本研究中之檢測劑反應機置如下列圖五所示，初步之螢光反應結果如圖六。

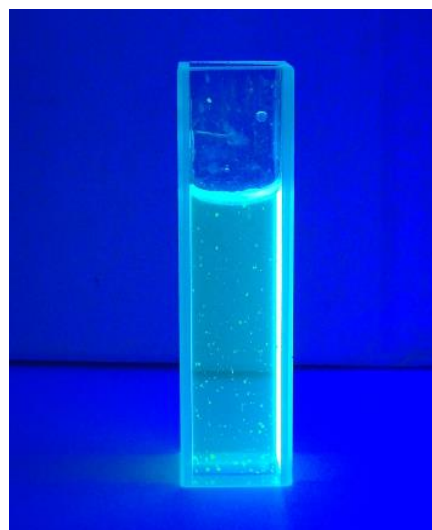


圖五、檢測劑反應機置

綠色螢光照片



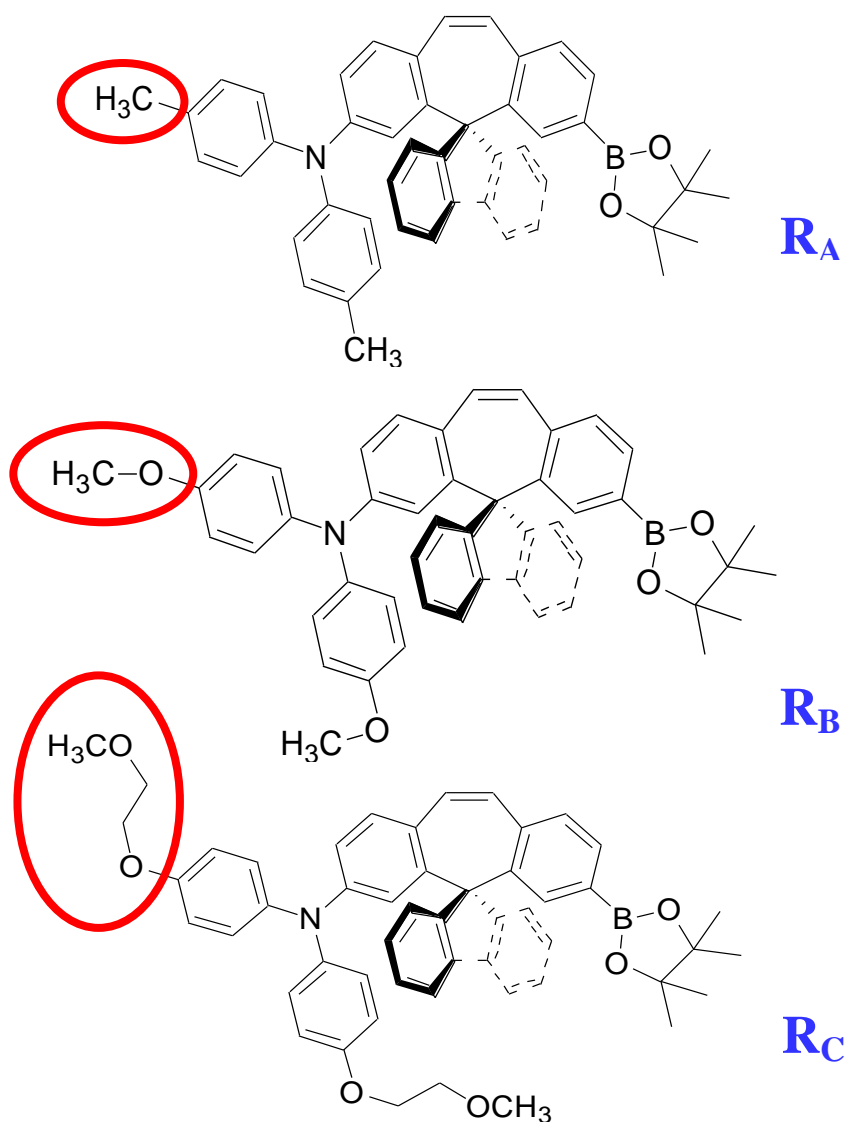
藍色螢光照片



圖六、初配檢測劑反應前後螢光照片

◎ 共設計三種螢光檢測劑：替換檢測劑結構中的推電子基

設定三種檢測劑如下圖所示， $R_A$ :  $CH_3$  (甲基)、 $R_B$ :  $O-CH_3$  (甲氧基)、 $R_C$ :  $O-CH_2CH_2-O-CH_3$  (含氧碳鏈)，其中  $R_A$   $CH_3$  (甲基) 為初步測試之檢測劑； $R_B$ :  $O-CH_3$  (甲氧基) 為設計使推電子性增高，目的是想加大藍位移； $R_C$ :  $O-CH_2CH_2-O-CH_3$  (含氧碳鏈) 為設計增加檢測劑親水性，期望可以使親油性的檢測劑和親水的過氧化氫反應時，不需要使用二甲基亞砜 (DMSO) 作為中間溶劑。

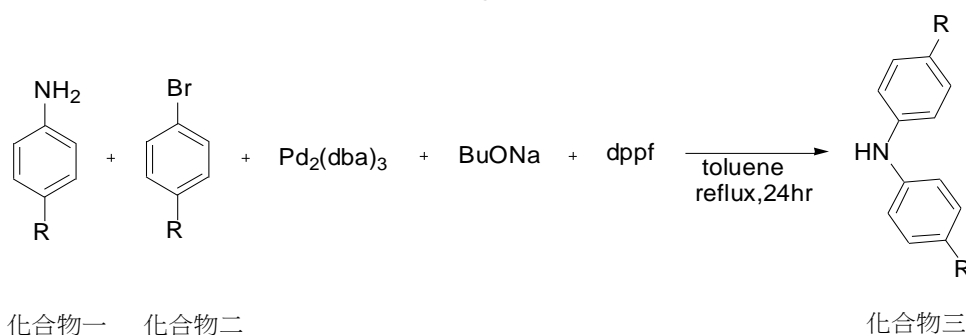


圖七、不同親水基檢測劑結構圖

## 二、 螢光檢測劑的合成

合成的過程共有三步。第一步，先將化合物一與化合物二進行 Buchwald-Hartwig 偶合反應得到具有推電子基團的產物（化合物三）。接著 STIF 與化合物三進行 Buchwald-Hartwig 偶合反應取得單邊產物（化合物四），再與 Bis(pinacolato)diboron 進行 Miyaura Borylation 硼酯偶合得到檢測劑（化合物五）。

（一）合成第一步：Buchwald-Hartwig 偶合反應，使雙芳香胺接上推電子基團。



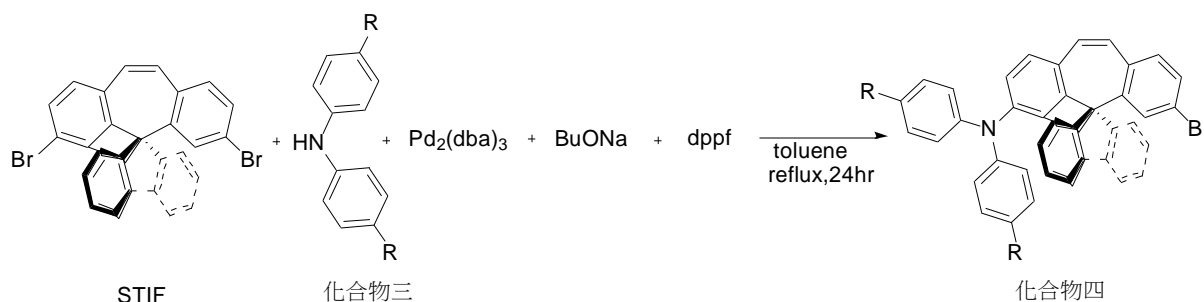
化合物一 化合物二

化合物三

其中： $R_A$ : $\text{CH}_3$ (甲基)  $R_B$ : $\text{O}-\text{CH}_3$ (甲氧基)  $R_C$ : $\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ (含氧碳鏈)

圖八、檢測劑合成示意圖-1

（二）合成第二步：Buchwald-Hartwig 偶合反應，取單邊產物。



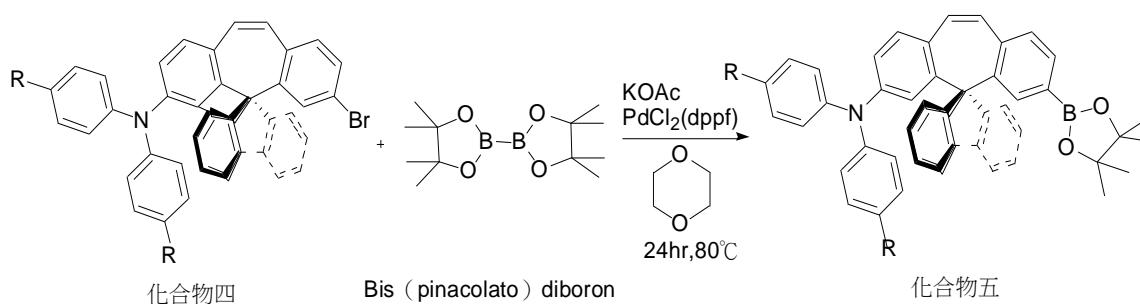
STIF

化合物三

化合物四

圖九、檢測劑合成示意圖-2

(三) 合成第三步：Miyaura Borylation 硼酯偶合 後，得到最終檢測劑。



圖十、檢測劑合成示意圖-3

### 三、不同檢測劑檢測能力的分析比較

#### (一) 不同檢測劑藍位移大小測定

利用螢光光譜儀及光激螢光光譜儀測定不同檢測劑反應前、後的雜收集放射光譜，疊圖並進行比較。

#### (二) 不同檢測劑反應時間測定

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 測試時，配置以5 mg檢測劑 (R<sub>A</sub>、R<sub>B</sub>) 溶於10 ml 的 DMSO 的溶劑的檢測劑試劑及不同濃度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 試劑，每次取定量1 ml為檢測劑試劑，與1 ml不同濃度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 試劑反應。漂白水的測試方法和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 相同。

合成出含有不同推電子基的檢測劑，將檢測劑和不同濃度的過氧化氫反應，每十分鐘以 TLC片追蹤反應，並利用螢光光譜儀和光激螢光光譜儀測得檢測劑與過氧化氫反應的光譜變化，最後將數據進行比較。

#### 四、 使用設備

本研究計畫需使用：螢光光譜儀和光激螢光光譜儀、迴旋濃縮儀等儀器；如下列圖十一~十四所示。



圖十一、試驗機臺



圖十二、迴旋濃縮儀



圖十三、可見光光譜儀



圖十四、光激螢光光譜儀

## 肆、研究結果與討論

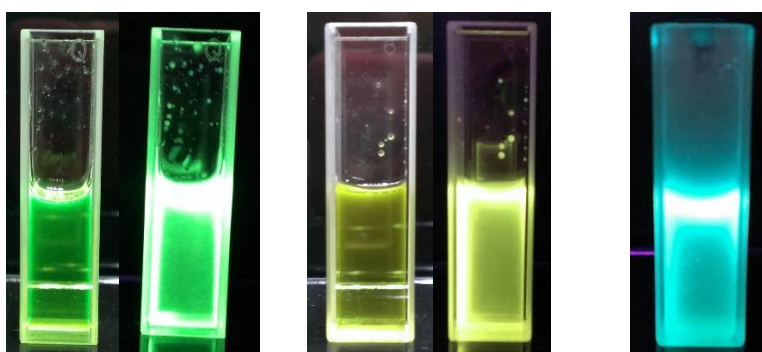
### 一、研究結果

(一) 不同檢測劑的合成：

**$R_A$ 、 $R_B$  順利合成， $R_C$  合成面臨困難。**

(由於含氧碳鍊極親水，在合成第一步遇到產物純化上的困難)

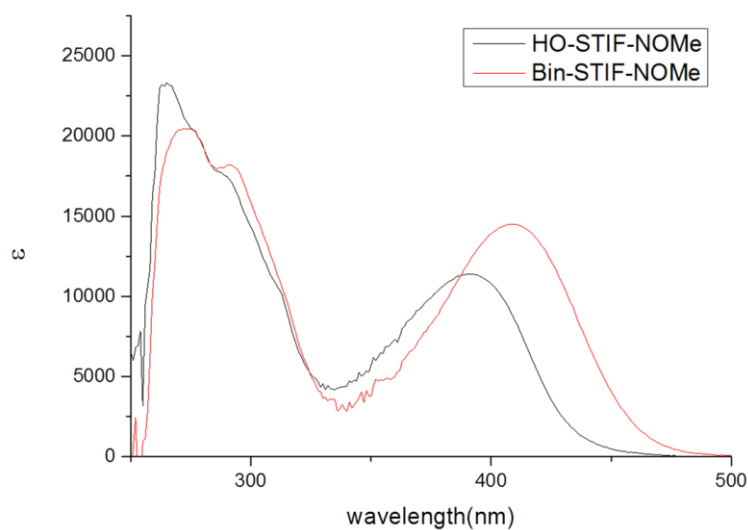
(二)  $R_A$ 、 $R_B$  未反應前之可見光、螢光顏色反應如下：



(對  $H_2O_2$  及漂白水 反應後之螢光顏色如右)

(三) 不同檢測劑對  $H_2O_2$  反應藍位移變化：

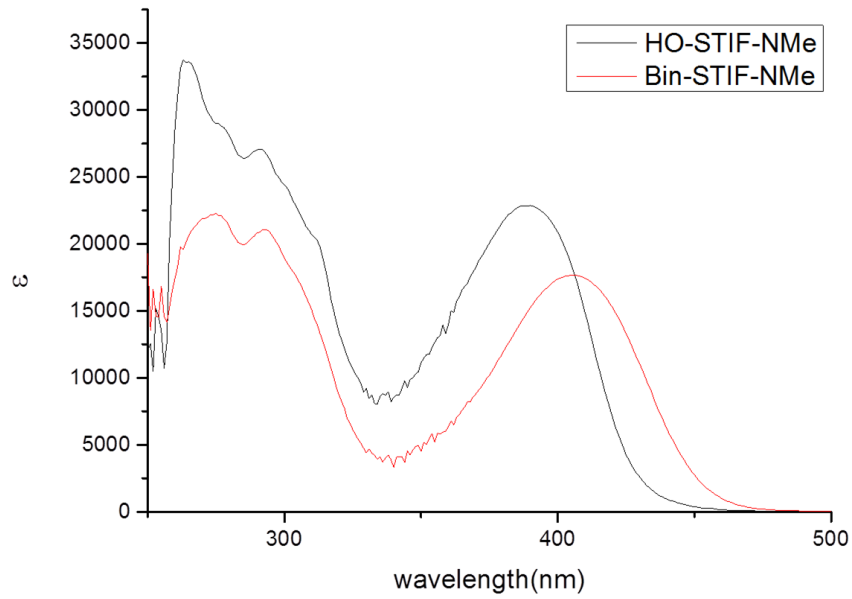
1.  $R_A$  檢測劑 反應前、後的吸收光譜變化如下：



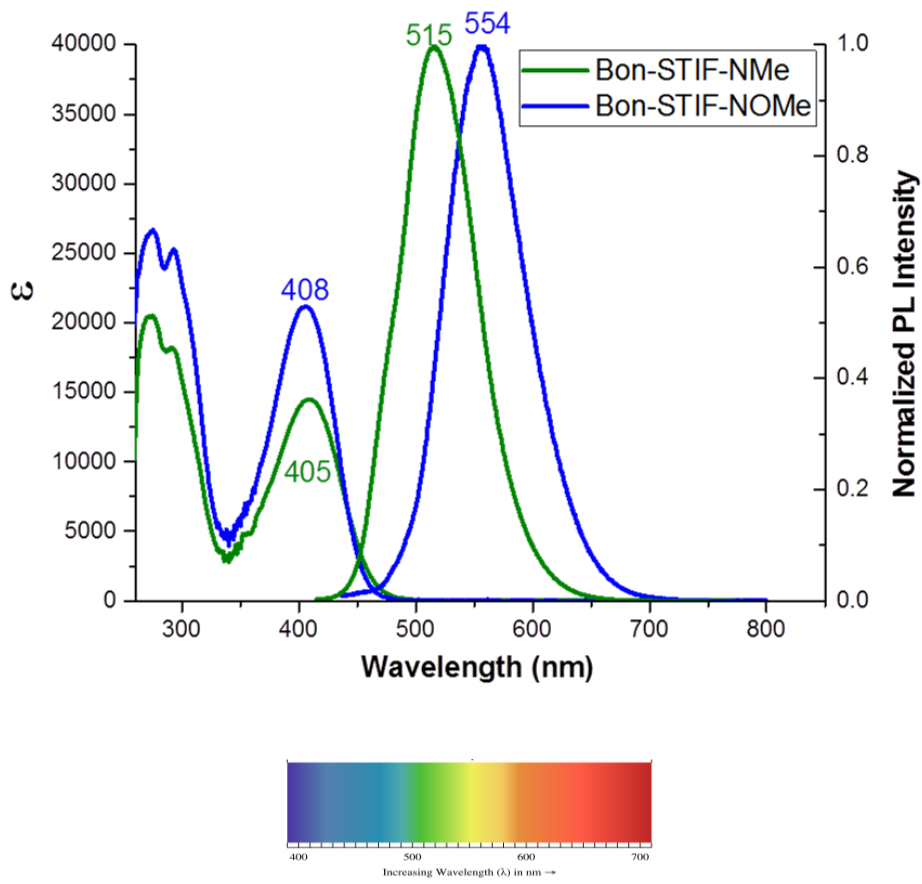
圖十五、 $R_A$  檢測劑 反應前、後的吸收光譜



2.  $R_B$  檢測劑 反應前、後的吸收光譜變化如下：



圖十六、 $R_B$  檢測劑 反應前、後的吸收光譜



圖十七、 $R_A$ 、 $R_B$  吸收、放射光譜比較

(四) 檢測濃度→最低可檢測濃度：0.58 mM

◎ 換算 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 試劑含量的莫耳數及重量如下表所示

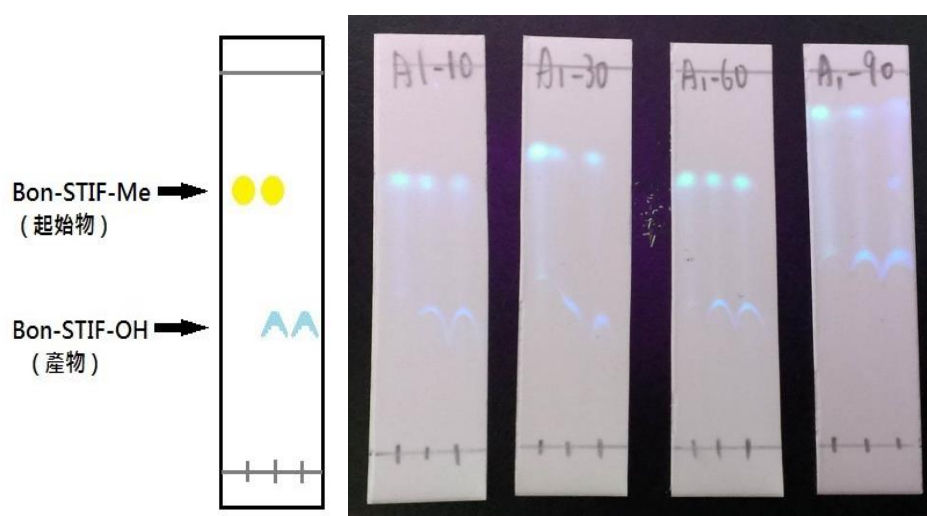
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 試劑		DMSO		檢測劑試劑		
濃度	35 wt %	密度	1.104 g/cm <sup>3</sup>	檢測劑		5 mg
密度	1.135 g/cm <sup>3</sup>			溶劑 (DMSO)		10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 溶液 稀釋倍數	含H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 重量(mg)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 溶液(g)	檢測劑試劑(g)	總重(g)	ppm	莫耳濃度(M)
1	397.2500	1.1350	1.104	2.2390	177422.957	5.84191
1/10	39.7250	1.0135	1.104	2.1175	18760.331	0.58419
1/30	13.2417	1.0045	1.104	2.1085	6280.136	0.19473
1/50	7.9450	1.0027	1.104	2.1067	3771.301	0.11684
.....			.....			
1/10000	0.0040	1.0000	1.104	2.1040	1.888	0.00058

表一、反應比例換算表

◎ 對漂白水部份 (成份標示為 5~6% )因以市售之樣品進行測試，無法知道準確之濃度，故不換算漂白水試劑含量的莫耳數及重量，但可以確定檢測劑會與漂白水發生反應。

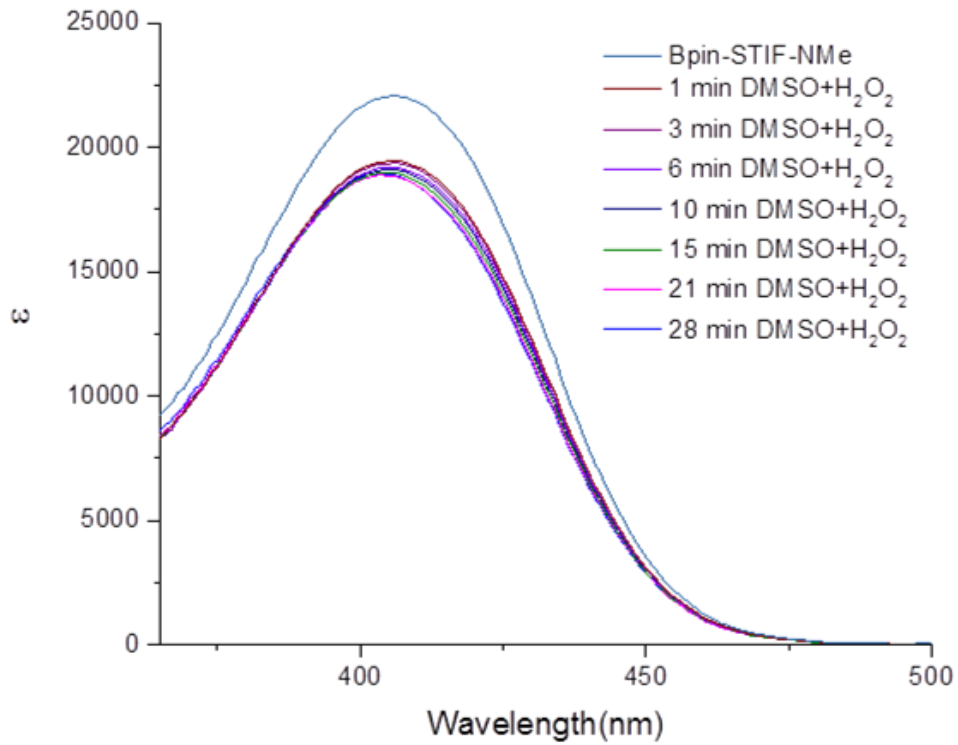
(五) 反應時間測定

◎ 每十分鐘以 TLC 片做簡單反應追蹤：

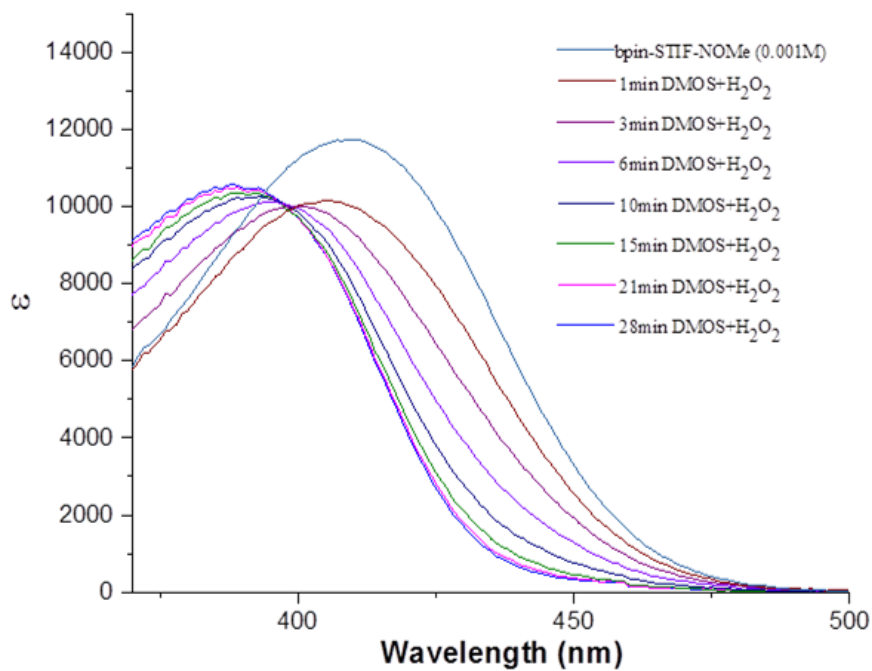


圖十八、不同反應時間的 TLC 片 照片

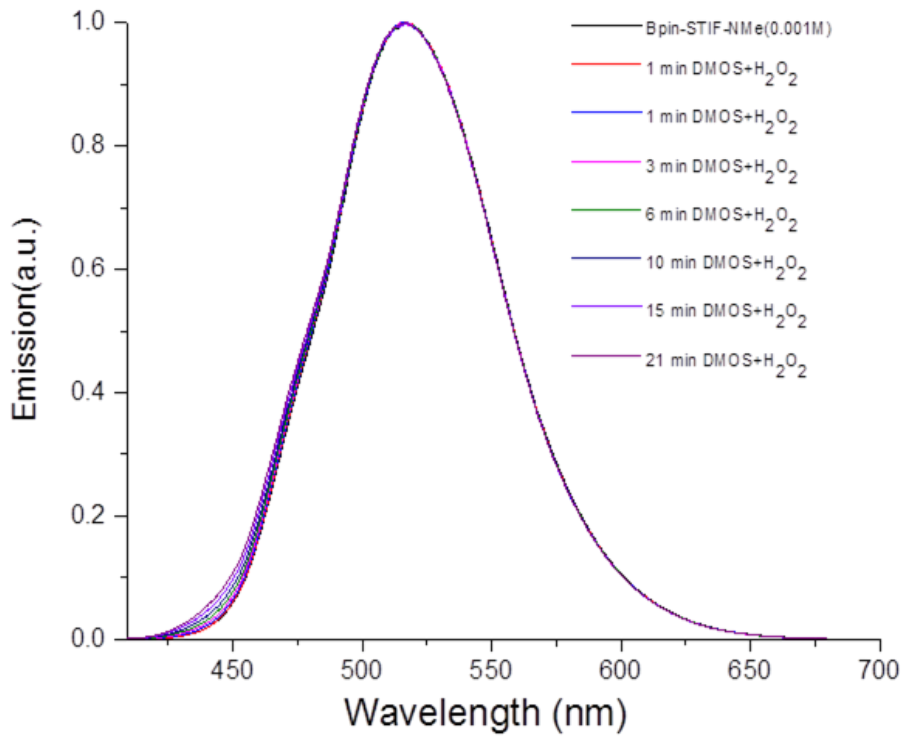
◎  $\text{H}_2\text{O}_2$  低濃度 (0.001M),  $R_A$ 、 $R_B$  反應時間



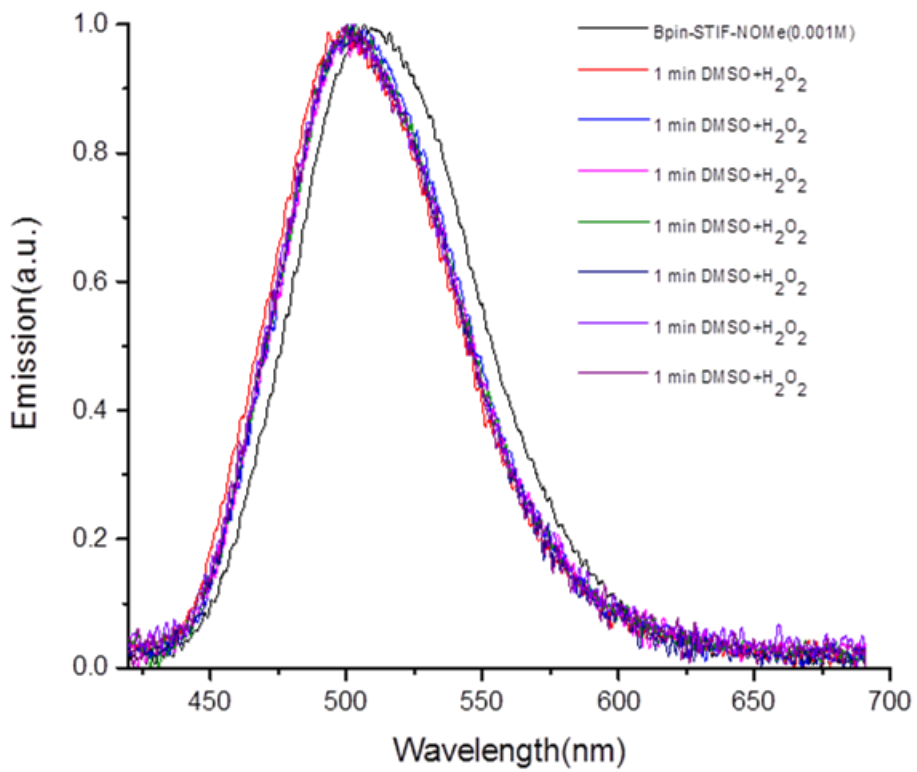
圖十九、 $R_A$  和低濃度  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1mM) 反應吸收光譜



圖二十、 $R_B$  和低濃度  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1mM) 反應吸收光譜



圖二十一、 $R_A$  和低濃度  $H_2O_2(1mM)$  反應放射光譜



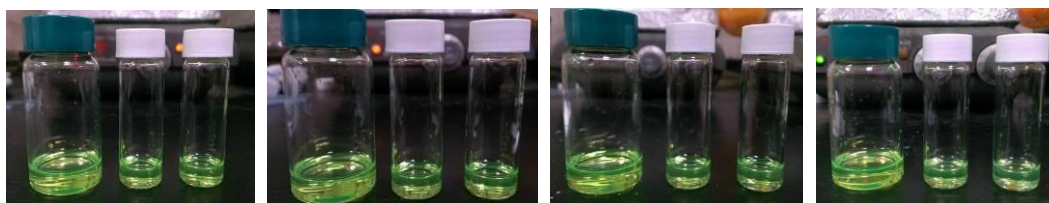
圖二十二、 $R_B$  和低濃度  $H_2O_2(1mM)$  反應放射光譜

(六) 確認反應完畢，記錄檢測劑可見光及螢光變化

1.  $R_A : CH_3$  for  $H_2O_2$

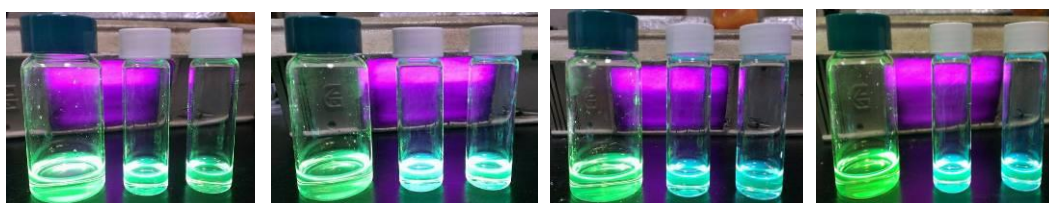
可見光變化

反應 10 min                      30min                      60min                      90min



螢光變化

反應 10 min                      30min                      60min                      90min

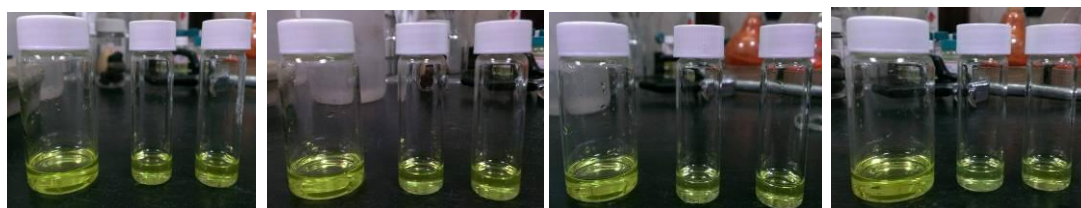


圖二十三、 $R_A$  檢測劑 反應前後的可見光及螢光變化 ( $H_2O_2$ )

2.  $R_B : O-CH_3$  for  $H_2O_2$

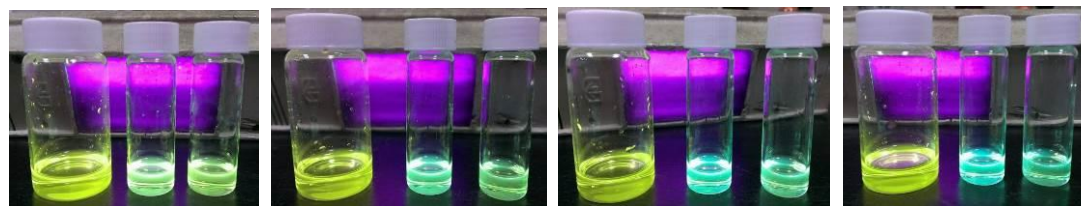
可見光變化

反應 10 min                      30min                      60min                      90min



螢光變化

反應 10 min                      30min                      60min                      90min



圖二十四、 $R_B$  檢測劑反應前後的可見光及螢光變化 ( $H_2O_2$ )

3.  $R_A : CH_3$  for 漂白水

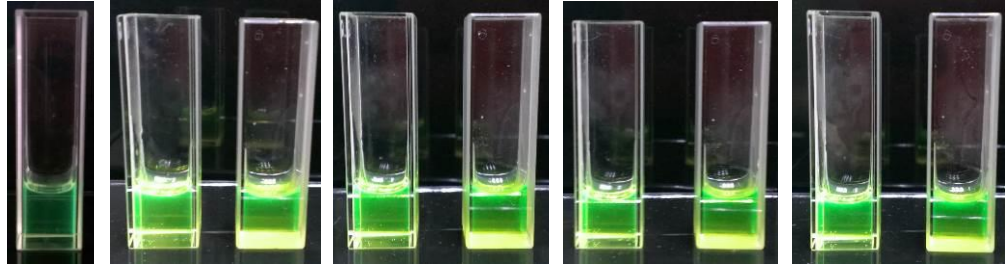
可見光變化 0.19M vs 0.11M

反應 10 min

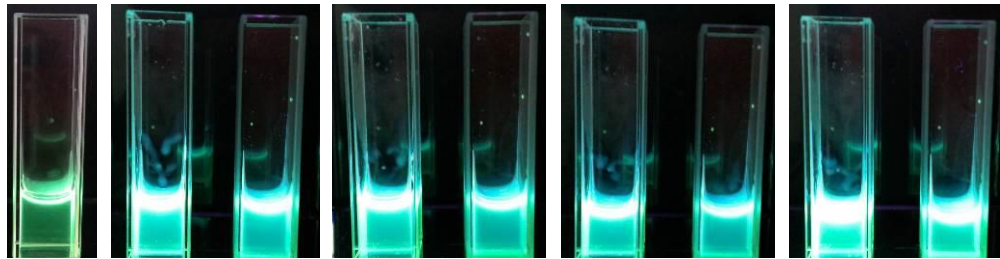
30min

60min

90min



螢光變化



圖二十五、 $R_A$  檢測劑 反應前後的可見光及螢光變化(漂白水)

4.  $R_B : O-CH_3$  for 漂白水

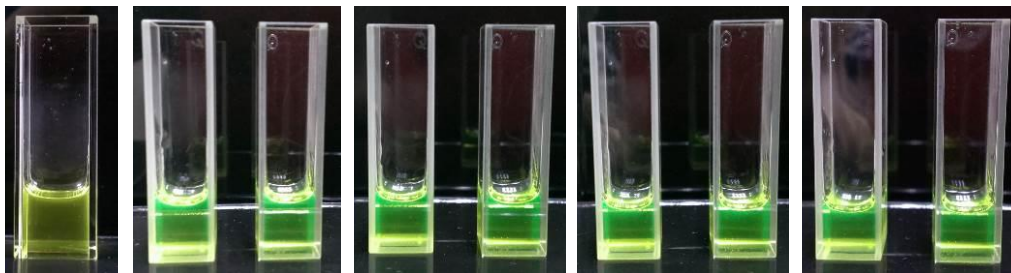
可見光變化 0.19M vs 0.11M

反應 10 min

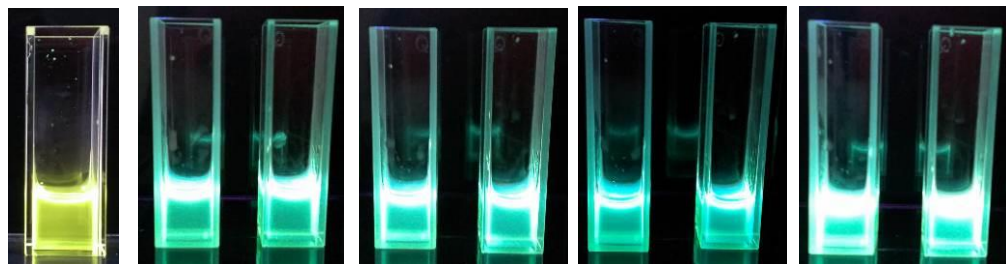
30min

60min

90min



螢光變化



圖二十六、 $R_B$  檢測劑反應前後的可見光及螢光變化(漂白水)

## 二、 討論

(一) 不同檢測劑對  $\text{H}_2\text{O}_2$  反應藍位移變化：

1.  $\text{R}_A(\text{CH}_3)$  吸收光譜約有 15 nm 藍位移，如圖十五。
2.  $\text{R}_B(\text{O}-\text{CH}_3)$  吸收光譜約有 20 nm 藍位移，如圖十六。
3. 將 $\text{R}_A$ 、 $\text{R}_B$  反應前的吸收及放射光譜進行疊圖，如圖十七，

可以發現在檢測劑結構中加入較強推電子基，確實使得檢測劑的放射波長變大( $\text{R}_A$ ：515 nm  $\rightarrow$ 綠色、 $\text{R}_B$ ：554 nm  $\rightarrow$ 黃色)。

(二) 不同檢測劑對  $\text{H}_2\text{O}_2$  可見光及螢光變化：如圖二十三、二十四

不同檢測劑對漂白水可見光及螢光變化：如圖二十五、二十六  
反應後溶液顏色變淺，但不易辨識。

(三) 比較  $\text{R}_A$ 、 $\text{R}_B$  試劑反應時間

1. 以 TLC 做初步反應追蹤：如圖十八，TLC 片上的黃色亮點為反應前的檢測劑，藍色亮點為反應後的檢測劑，由圖中可以看出，檢測劑加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  十分鐘內已經開始反應，九十分鐘時接近反應完畢。
2. 不同檢測劑對  $\text{H}_2\text{O}_2$  可見光及螢光變化：如圖二十三、二十四

$\text{R}_A$  試劑( $\text{CH}_3$ )：在三十分鐘以後開始有顏色變化。

不同反應比例顏色變化無明顯差異。

$\text{R}_B$  試劑( $\text{O}-\text{CH}_3$ )：在十分鐘以後開始有顏色變化。

不同反應比例顏色變化有明顯差異。

3. 由  $R_A$ 、 $R_B$  的吸收光譜 (圖十九、二十) 可以發現, 不同檢測劑和低濃度  $H_2O_2$  (1 mM) 反應 30 分鐘後,  $R_A$  的最大吸收波有減弱的現象, 但是尚未發生藍位移, 而  $R_B$  約在六分鐘時開始發生藍位移; 對照  $R_A$ 、 $R_B$  的放射光譜 (圖二十一、二十二) 也可以看到, 不同檢測劑和低濃度  $H_2O_2$  (1 mM) 反應 30 分鐘後,  $R_A$  沒有發生藍位移, 而  $R_B$  有發生藍位移的現象。



## 伍、 結論與應用

- 一、 本研究已成功合成出兩種可以檢測微量過氧化氫與漂白水的螢光檢測劑， $R_A$  試劑( $CH_3$ ) 螢光顏色變化為：綠 $\rightarrow$ 藍， $R_B$  試劑( $O-CH_3$ ) 螢光顏色變化為：黃 $\rightarrow$ 藍，在甲基替換成甲氧基確實使得藍位移增加，即反應前後顏色變化更明顯。
- 二、 目前測試中最低檢測濃度約為 1 ppm，且在低濃度  $H_2O_2$  檢測時，可以發現  $R_B$  檢測劑對於  $H_2O_2$  的敏感度較高。
- 三、 檢測方法具有簡便的特性：將檢測劑粉末以一定比例和 DMSO 配置成檢測劑試劑，與待測物一同放入透明容器中反應，反應後以 UV 燈照射即可觀察檢測劑顏色變化，即可知樣品內是否含有檢測物。可找出用肉眼即可辨識的最低過氧化氫比例，用以直接判定過氧化氫在食物或免洗餐具中是否有殘留，將會比現行的檢測方法更為便利。
- 四、  $R_C$  試劑： $O-CH_2 CH_2-O-CH_3$  (含氧碳鏈) 若合成成功，在檢測劑與過氧化氫反應時，即不需要使用有機溶劑(DMSO)做中間溶劑，將會大大提升本研究檢測方法的方便性。

## 陸、 參考文獻及蒐尋網址

1. 過氧化氫 (Hydrogen peroxide) 。食衛部。網址：

<http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CC8QFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.fda.gov.tw%2FTFC%2Fincludes%2FGetFile.ashx%3FmID%3D133%26id%3D10865%26chk%3Dea511e76-b8f8-49c8-b679-5e58cc11c121&ei=WbL8UrvUHoPCkwXji4GYDA&usg=AFQjCNGKrNZEzfucfMoTNPfanbKTFKI0AA&sig2=yaK4VyR9hYVEocOt-ZW1QA>

2. 食品中過氧化氫之檢驗方法。食品衛生福利部。網址：

<http://www.fda.gov.tw/upload/133/Content/2013091016532032261.pdf>。

3. Luminol。Wikipedia。網址：<http://en.wikipedia.org/wiki/Luminol>。

4. C.-P. Lu, C.-T. Lin, C.-M.Chang, S.-H. Wuand, L.-C. Lo, *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59, 11403.

5. Abo, M.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Komatsu, T.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10629.

6. L.-C. Lo and C.-Y. Chu, *Chem. Commun.*, **2003**, 2728.

## 【評語】 030003

本研究是以螢光探針作為  $\text{H}_2\text{O}_2$  微量探測的研發具有環保概念，有以下加強點：

1. 檢測極限應該作系統的檢測。
2. 使用檢測顏色不夠問題須作改善。
3. 應該與該有檢測方法作比較。