

2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030009

參展科別 化學

作品名稱 利用硫醇分子合成之金銅奈米團簇偵測過
氧化氫及葡萄糖

得獎獎項 大會獎：三等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 張煥宗、吳淑芳

作者姓名 呂承樺、李承妍

關鍵字 金銅奈米團簇、過氧化氫、葡萄糖

作者簡介



大家好，我們是就讀於北一女中高二數理資優班的學生，呂承樺和李承妍，由於對實驗及化學有強烈企圖心，我們一同選擇了化學專研。很開心能幸運地到大學的實驗室學習許多平常不太能接觸到的知識，使用以往所沒見過的精密儀器。從懵懂無知到能圓滿完成一次科展，對我們來說，這是一次珍貴的學習機會和體驗。儘管在研究的路途中，遭遇大大小小的困難與挫折，還好我們一路互相扶持，一起成長，對彼此付出全然的信任，因此能突破種種瓶頸，對於所知所學樂在其中，並且對我們的成果抱持更多的熱忱及展望。真的十分感謝教授、老師、各位學長姐及同學們的協助與鼓勵，這次科展不僅對我們的作品有更進一步的認識，也在科學的領域中得到豐厚的收穫，滿載而歸。

摘要

本研究的方向是利用聚苯乙烯磺酸鈣(PSS)、硫醇小分子(PA)、銅離子(Cu^{2+})和金離子(Au^{3+})於最佳比例下合成的穩定金銅奈米團簇，分析此穩定、具有響應性之金銅奈米團簇並探討此系統用於過氧化氫以及葡萄糖偵測的效果，確認最佳合成比例(也就是改變 PA、 Cu^{2+} 、 Au^{3+} 的比例)、分析特性(螢光強度、奈米團簇大小、團簇溶液分散性、有無加入 PSS 之影響)後，探討偵測待分析物的效果。以葡萄糖為例，加入葡萄糖氧化酶後，製造出葡萄糖酸及過氧化氫，就能藉由過氧化氫改變團簇表面特性，使螢光強度減弱來進行間接偵測葡萄糖濃度。最後藉由此金銅奈米團簇做為偵測試劑於真實樣品中進行過氧化氫與葡萄糖之偵測並探討其效果。

Abstract

This study is to use PSS-PA-Au/Cu NCs composed in optimal proportion, analyze this novel nanocluster which its fluorescence response towards hydrogen peroxide, and then discuss the effect of determination of hydrogen peroxide and glucose. Not only confirm the optimal proportion(that is, change the ligand to metal ratio of synthesis nanocluster by D-Penicillamine, gold ion and copper ion.) but also analyze its characteristic (fluorescence, the size of nanocluster/nanocluster aggregates and the dispersity of PA-Cu NC aggregates with/without assistance of polymer (Polystyrene sulfonate (PSS))) at a certain concentration. We apply this novel nanocluster to indirect detect glucose, and discuss the effect of determination of analytes. The complete strategy is that glucose oxidase can catalyze glucose and then create gluconic acid and hydrogen peroxide. Therefore, we can make the fluorescence quenching through change the characteristic of cluster, and indirectly know the consistency of glucose. Finally, detection of hydrogen peroxide and glucose in real samples and analyze its effect through this Au/Cu NCs as detection agent.

壹、前言

一、研究動機

無論是在化學反應中、生理環境下、環境中或是在食品中，都可以見到過氧化氫的存在。過氧化氫不但具有細胞毒性，更常用來當作氧化壓力的指標。在體內的酵素催化反應中，有不少反應的副產物即為過氧化氫，例如葡萄糖、黃嘌呤及單胺分別經過葡萄糖氧化酶、黃嘌呤氧化酶和單胺氧化酶的作用都會產生過氧化氫，因此這些酵素基質的濃度(如葡萄糖的濃度)可以藉由偵測過氧化氫的濃度而測得。因此準確偵測葡萄糖濃度對於將血糖濃度作為指標的糖尿病而言將是一個重大的幫助。雖然目前偵測過氧化氫這方面已經發展出許多方法，但是通常過程繁瑣、耗時且容易受基質干擾，量測需要較昂貴的試劑。而奈米材料具有不同於塊材的物理性質與化學性質，因此在不同領域皆受到重視，因此我們選擇使用相對較便宜的銅離子和比例較低的金離子來合成具有氧化還原活性的奈米團簇，以期許可以開發出一個能直接應用在生物樣品上，並提供相當高的靈敏度、選擇性好、方便操作、穩定性高且較便宜的偵測方法，是一個值得去研究的方向。

二、研究目的及研究問題

- (一) 探討不同合成條件下之金銅奈米團簇的化學性質、物理性質之差異性。
- (二) 探討不同條件下合成之金銅奈米團簇的氧化還原活性差異。
- (三) 探討最佳化比例合成之金銅奈米團簇的過氧化氫與葡萄糖的偵測效果。

貳、 研究設備及器材

一、 研究設備

Hitachi(U-3310) spectrophotometer、Edinburgh(FS920) fluorimeter、

FLIM(Fluorescent Lifetime Imaging Microscopy)、H-7100 TEM (Hitachi,Tokyo,Japan)

二、 研究藥品

過氧化氫 H_2O_2 、四氯金酸 $HAuCl_4$ 、硝酸銅 $Cu(NO_3)_2$ 、二甲半胱氨酸溶液 D-

Penicillamine、聚苯乙烯磺酸鈣 polystyrene sulfonates (PSS)、聚丙烯酸 polyacrylic

acid (PAA)、聚甲基丙烯酸甲酯 polymethacrylic acid (PMA)、聚乙二醇 polyethylene

glycol (PEG)、聚乙烯亞胺 polyethylene imine (PEI)、丙三醇 glycerol、pH3 PB

buffer、pH4 acetate buffer、葡萄糖 glucose、葡萄糖氧化酶 glucose oxidase

參、 研究方法及過程

一、 實驗原理

於溶液中合成金銅奈米團簇，經過純化後得到具有氧化還原活性之奈米團簇，利用葡萄糖與葡萄糖氧化酶進行反應後產生之過氧化氫，在此過氧化氫會與奈米團簇行氧化還原反應進而促使改變奈米團簇表面特性，而使金銅奈米團簇螢光下降，可經由量測其螢光值大小來偵測過氧化氫之濃度進而間接量測葡萄糖濃度，更進一步利用以具有檢測葡萄糖的能力。

二、 實驗方法

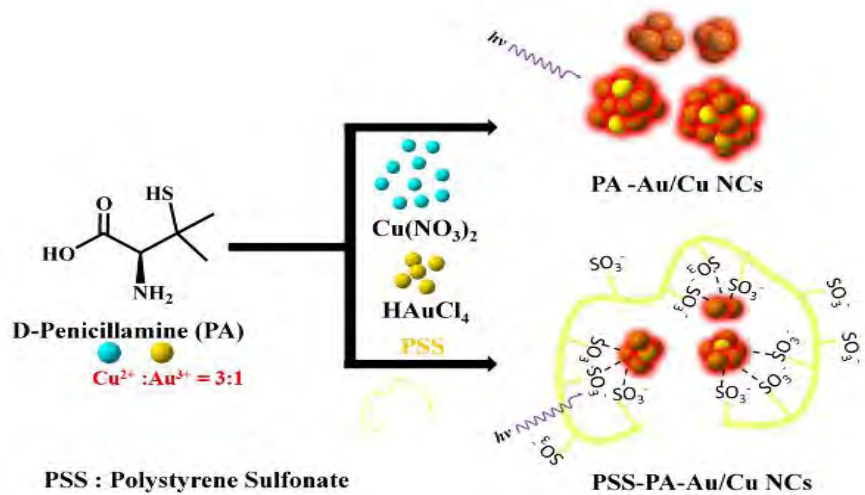
(一)、 金銅奈米團簇的合成及特性探討

1. 合成金銅奈米團簇[PA : Au³⁺ : Cu²⁺]=80 : 1 : 3(如圖一)

- (1) 配製 0.1 M 的硝酸銅、0.2 M 的四氯金酸以及 0.1 M 的二甲半胱氨酸溶液 (PA)。
- (2) 取 10 μ L 聚苯乙烯磺酸鈣(PSS)，加至 800 μ L 0.1 M 的二甲半胱氨酸溶液 (PA)及 155 μ L 的水中。
- (3) 加入 5 μ L 0.2 M 四氯金酸及 30 μ L 0.1 M 硝酸銅。
- (4) 劇烈攪拌約 5 秒後，將混合溶液避光反應兩個小時。
- (5) 將反應後的溶液以高速離心機離心 30 分鐘。

(6) 最後以微量吸量管吸取上清液，即可得金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)之溶液。

(7) 經由一系列濃縮，洗去未反應完之二甲半胱氨酸(PA)，即可得具有氧化還原活性之金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)。



圖一

合成 PSS-PA-Au/Cu NCs 之流程圖

2. 合成金銅奈米團簇[PA : Au³⁺ : Cu²⁺]比例探討

- (1) 配製 0.1 M 的硝酸銅、0.2 M 的四氯金酸以及 0.1 M 的二甲半胱氨酸溶液 (PA)。
- (2) 取 10 μ L 聚苯乙烯磺酸鈣(PSS)加入水中
- (3) 加入不同比例的 PA : Au³⁺ : Cu²⁺
- (4) 劇烈攪拌約 5 秒後，將混合溶液避光反應兩個小時。
- (5) 將反應後的溶液以高速離心機離心 30 分鐘。
- (6) 最後以微量吸量管吸取上清液，即可得不同合成比例金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)之溶液。

3. 合成時之聚苯乙烯磺酸鈣 PSS 比例探討

- (1) 配製 0.1 M 的硝酸銅、0.2 M 的四氯金酸以及 0.1 M 的二甲半胱氨酸溶液 (PA)。
- (2) 加入不同濃度的聚苯乙烯磺酸鈣(PSS)。
- (3) 加入 5 μL 0.2 M 四氯金酸及 30 μL 0.1 M 硝酸銅。
- (4) 劇烈攪拌約 5 秒後，將混合溶液避光反應兩個小時。
- (5) 將反應後的溶液以高速離心機離心 30 分鐘。
- (6) 最後以微量吸量管吸取上清液，即可得不同 PSS 濃度的金銅奈米團簇 (PSS-PA-Au/Cu NCs) 之溶液。
- (7) 觀察溶液分散性及 UV 燈下螢光強度。

(二)、 探討加入不同聚合物對材料分散性影響

- (1) 配製 0.1 M 的硝酸銅、0.2 M 的四氯金酸以及 0.1 M 的二甲半胱氨酸溶液 (PA)。
- (2) 分別取出 10% 的聚苯乙烯磺酸(PSS)、聚丙烯酸(PAA)、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMA)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯亞胺(PEI) 10 μL ，加至 800 μL 0.1 M 的二甲半胱氨酸溶液(PA)及 155 μL 的水中。
- (3) 加入 5 μL 0.2 M 四氯金酸及 30 μL 0.1 M 硝酸銅。
- (4) 劇烈攪拌約 5 秒後，將混合溶液避光反應兩個小時。

(三)、 探討不同環境對金銅奈米團簇的影響

1. 不同酸鹼環境對金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)的螢光影響

- (1) 將配製完成的金銅奈米團簇溶液，經由透析薄膜，分別洗去未反應完之二甲半胱氨酸(PA)零次、一次、三次。
- (2) 將洗去多餘 PA 的團簇溶液配製於 pH 3、pH 4、pH 5、pH 7、pH 9 的 buffer 內。
- (3) 分別量測螢光值，共計 15 管。

2. 金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)的耐鹽性探討

- (1) 將配製完成的金銅奈米團簇溶液，經由透析薄膜，分別洗去未反應完之二甲半胱氨酸(PA)零次、一次、三次。
- (2) 將洗去多餘 PA 的團簇溶液配製於 0 mM、0.05 mM、0.1 mM、0.5mM、1mM、5 mM、10 mM 的 NaCl 溶液中。
- (3) 分別量測螢光值，共計 21 管。

(四)、偵測過氧化氫

1. 偵測不同濃度過氧化氫

- (1) 配製不同濃度之過氧化氫溶液
- (2) 利用透析薄膜洗去金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)溶液中多餘的二甲半胱氨酸溶液(PA)，再回溶成原體積。
- (3) 加入不同濃度過氧化氫及水，再將此反應溶液加入我們事先清洗完畢之金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)水溶液。
- (4) 避光反應一個小時後，量測螢光值。

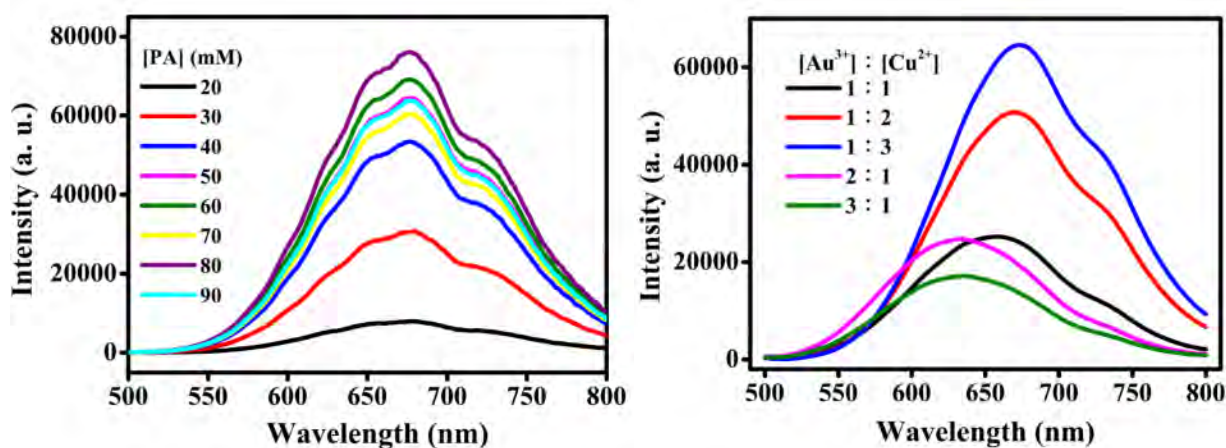
2. 偵測不同濃度葡萄糖經氧化酶反應後之過氧化氫濃度

- (1) 配製葡萄糖溶液及葡萄糖氧化酶溶液。
- (2) 利用透析薄膜洗去金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)溶液中多餘的二甲半胱氨酸溶液(PA)，再回溶成原體積。
- (3) 先於另一小試管中加入水及葡萄糖，接著再加入葡萄糖氧化酶反應 5 分鐘，最後再將此反應溶液加入我們事先清洗完畢之金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)水溶液。
- (4) 避光反應一個小時後，量測螢光值。

肆、 研究結果與討論

一、 金銅奈米團簇的合成

本研究將以氧化硫醇小分子合成金銅奈米團簇，此奈米團簇具有特定的光學與化學性質，尤其具有一定的氧化還原活性。有鑑於此，本研究將拿此材料來做氧化還原反應，其中利用螢光值的下降來判定過氧化氫之濃度。更希望能夠製備出具良好再現性及準確度、穩定性佳之高靈敏度的葡萄糖感測器。

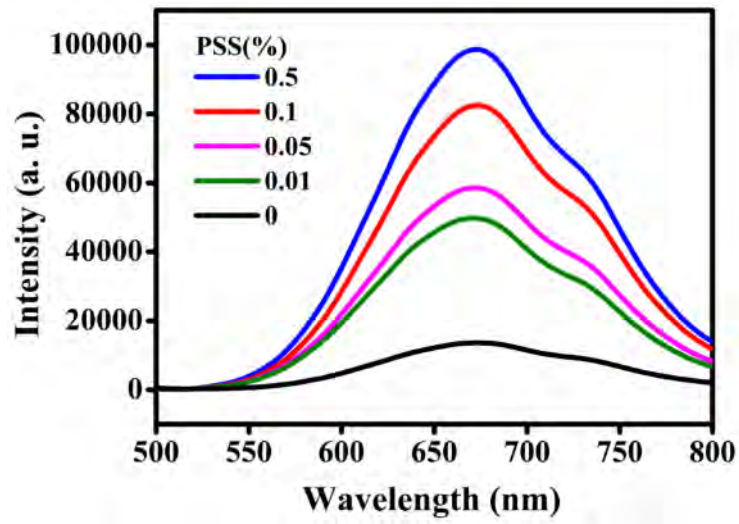


圖二

合成之 PSS-PA-Au/Cu NCs 最佳化比例螢光圖
(左圖改變 PA 濃度，右圖改變金離子和銅離子濃度)

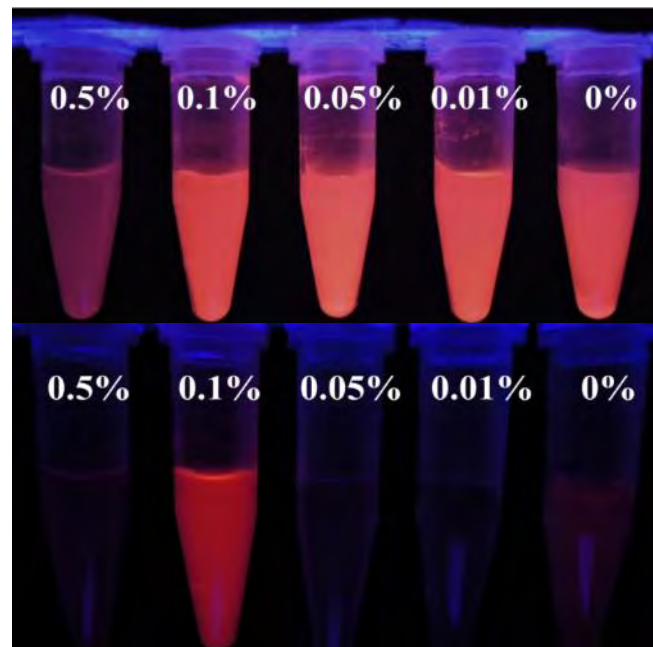
由圖二左圖可知，固定金離子比銅離子 1:3 的比例，去探討硫醇分子的最佳比例，當硫醇分子(PA)的濃度為 80 mM 時，螢光強度最強。

由圖二右圖可知，固定硫醇分子的濃度，也就是 80 mM 進行比較，明顯看出金離子比銅離子為 1:3 時，螢光強度最強。



圖三

不同濃度 PSS(%)對 PSS-PA-Au/Cu NCs 螢光影響

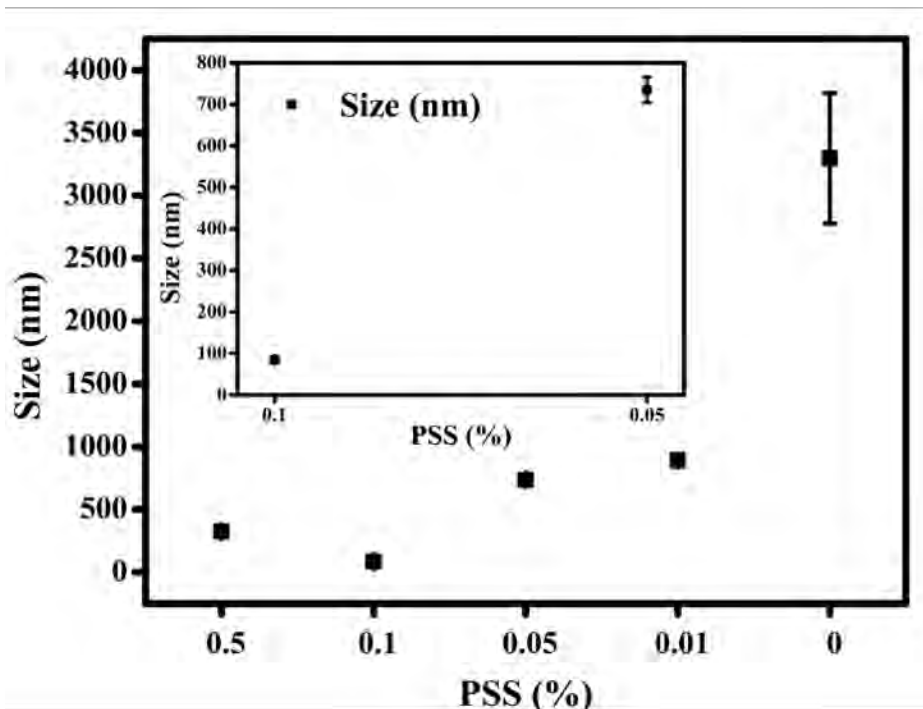


圖四

不同濃度 PSS 對 PSS-PA-Au/Cu NCs 螢光影響(UV 燈)
(上圖為離心前，下圖為離心後)

由於在發展奈米材料中最大的困難即是分散性不均勻的問題，於是我們嘗試利用不同的聚合物試圖改善奈米團簇的分散性，其中，我們發現常見的聚合物 PSS 具有有效改善奈米材料分散性的性質，便決定探討 PSS 的最佳化比例。

由圖三可以看出在不同 PSS 濃度合成下之金銅奈米團簇螢光數值，0.05% 的 PSS 螢光強度最強，但由於沉澱物會干擾團簇反應，故離心後吸取上清液，在 UV 燈下螢光如圖四，可見只有 0.1% 有明顯螢光，故之後合成金銅奈米團簇皆採用 0.1% PSS 的比例。

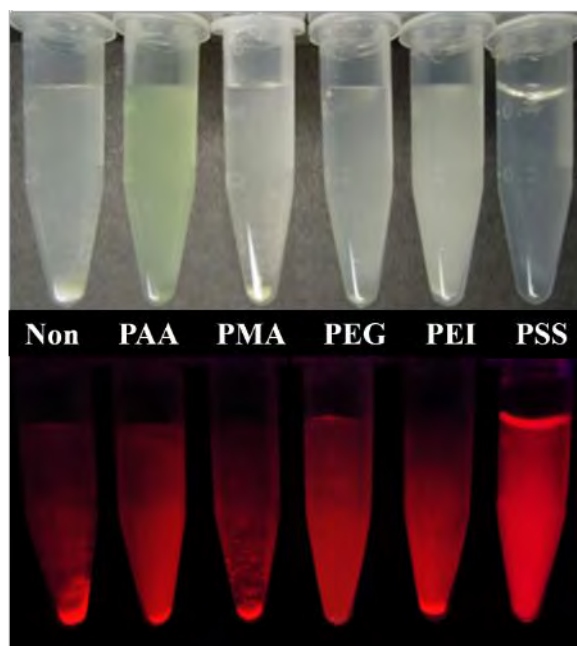


圖五

不同濃度 PSS 對 PSS-PA-Au/Cu NCs 聚集大小比例

由圖五可再次證明 0.1% 為最佳化合成比例，因其聚集大小比例最為均勻，在一定範圍內，對於偵測有較良好效果，故之後合成金銅奈米團簇皆採用 0.1% PSS 的比例。

二、不同聚合物對 PSS-PA-Au/Cu NCs 的影響

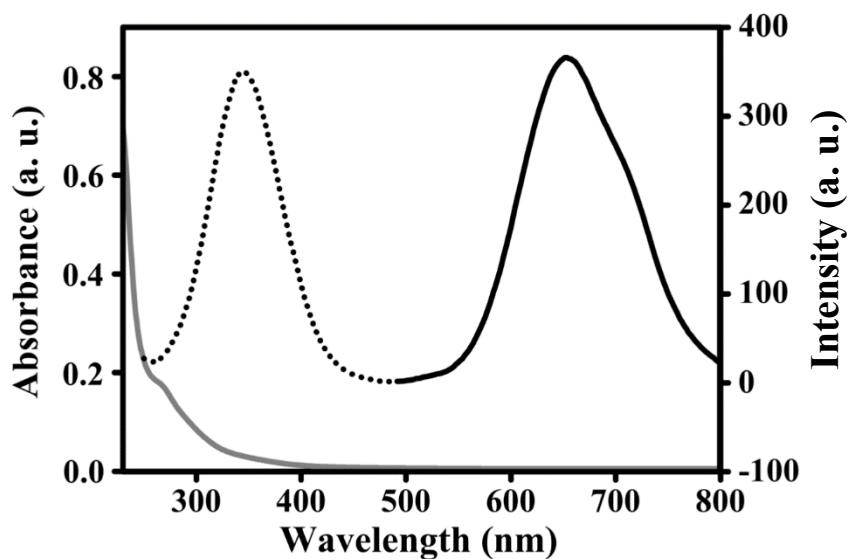


圖六

不同聚合物對 PSS-PA-Au/Cu NCs 的影響
(上圖為日光燈下，下圖為 UV 燈下)

圖六為聚合物對金銅奈米團簇的分散性探討。上圖是在一般室光下拍攝，左邊五管皆呈現混濁，唯有最右管加入 PSS 的較為澄清。下圖為 UV 燈下拍攝螢光。

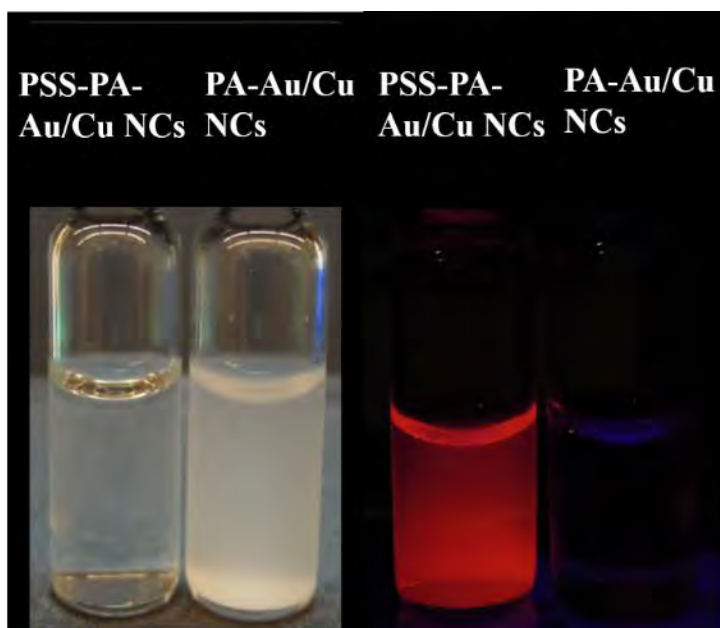
三、 PSS-PA-Au/Cu NCs 的各種特性



圖七

金銅奈米團簇螢光激發及放光波長位置
(虛線為激發波長，實線為放光波長)

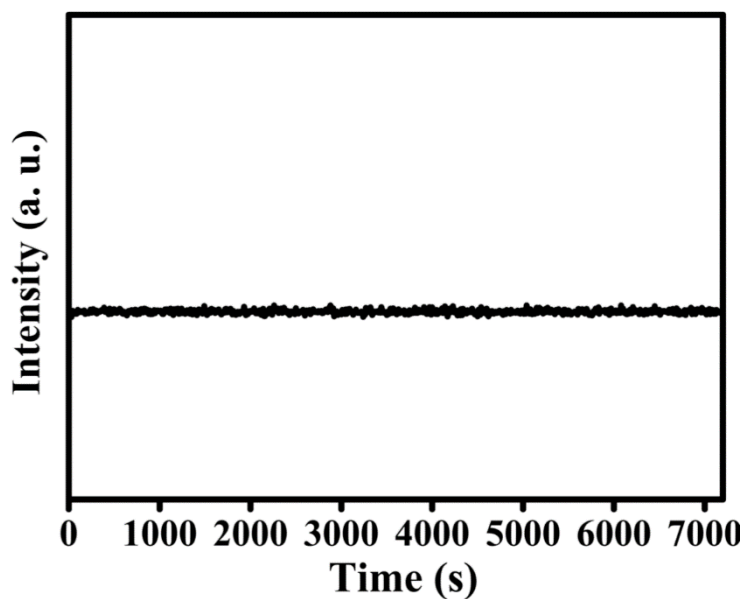
由圖七能得知金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)的激發波長為 335 nm；
放光波長為 670nm。吸收曲線也可看到在 335 nm 的地方，有一吸收峰。



圖八

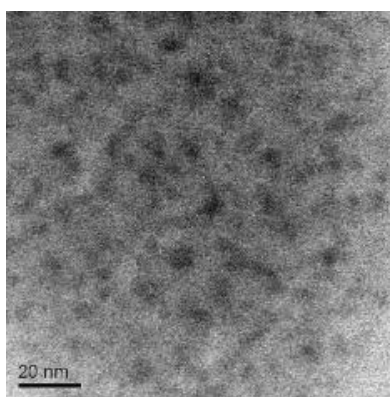
左圖為室光照射原貌，右圖為 UV 燈照射原貌

由圖八左圖可知，加入 Polystyrene sulfonates(PSS)之金銅奈米團簇溶液，讓整體水溶液分散性變好，避免濃稠導致反應不均勻。



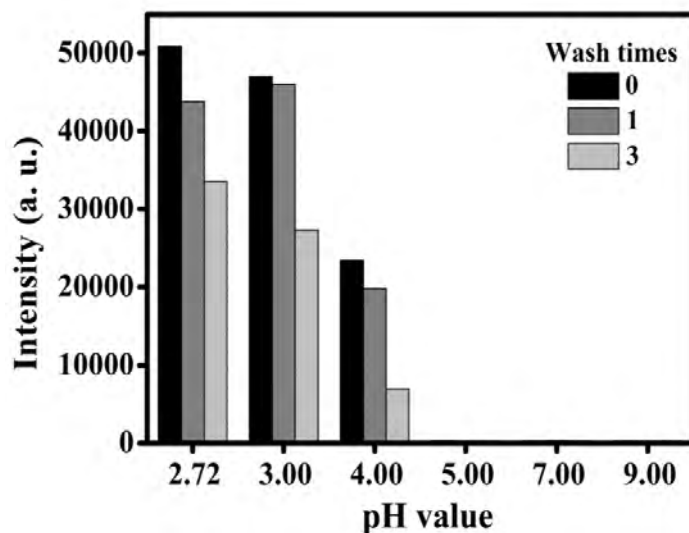
圖九
金銅奈米團簇之光穩定性圖

圖九為測量金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)的光穩定性結果。可明顯看出 2 小時內，每 20 秒打一次光，反射光強度近乎呈現一直線，可見它有足夠光穩定性，不會因長時間打光改變團簇特性。



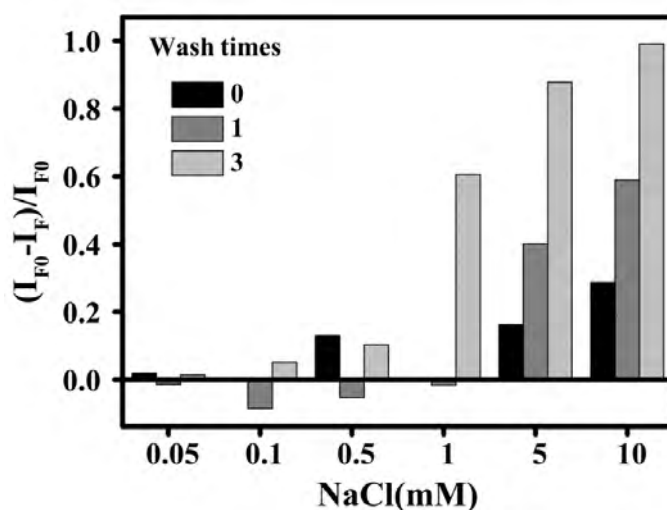
圖十
PSS-PA-Au/Cu NCs 之 TEM 圖

四、PSS-PA-Au/Cu NCs 的各種特性



圖十一

不同 pH 值對 PSS-PA-Au/Cu NCs 的影響



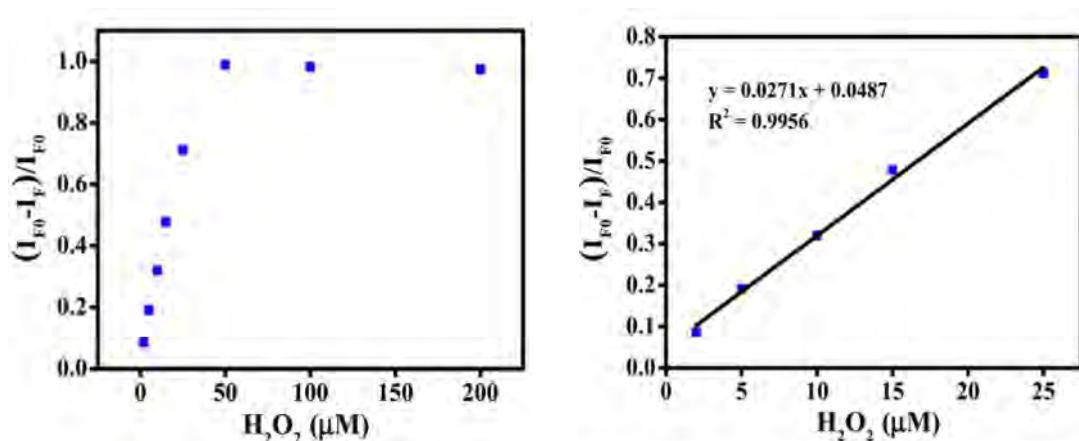
圖十二

PSS-PA-Au/Cu NCs 耐鹽性探討

由於實驗結果的數據變異性偏高，於是我們開始懷疑是否是因為系統中之未反應之 PA 而導致干擾，因此作了有關清洗次數及配製環境 pH 值之探討，結果如圖十一。另外為確認使用之 PB buffer(含 Na 離子)所含鹽類及材料純化程度是否影響螢光強度，故做了耐鹽性探討。由圖十二可知水洗三次材料或 NaCl 濃度過高，皆易使螢光減弱。

結果顯示奈米團簇使用透析薄膜水洗三次，或 NaCl 濃度過高，皆易使螢光減弱。為了兼顧穩定性，決定採用透析薄膜水洗一次之金銅奈米團簇，濃度 10 mM，pH3 之 PB buffer，並藉由加入 glycerol，降低鹽類對於螢光抑制的速度，進而改善結果。

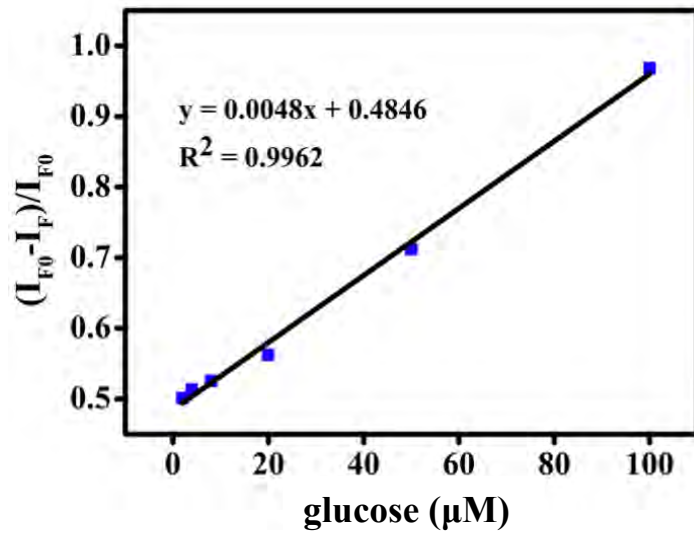
五、偵測過氧化氫及葡萄糖



圖十三

利用金銅奈米團簇偵測 H_2O_2 之線性圖，及其偵測系統之反應條件。

由圖十三可知，隨著過氧化氫濃度增加，螢光強度跟著被抑制，故此材料 (PSS-PA-Au/Cu NCs) 對偵測過氧化氫濃度具良好效用。



圖十四

利用金銅奈米團簇偵測葡萄糖之線性圖，及其偵測系統之反應條件。

由圖十四可知，葡萄糖濃度越高，產生越高濃度過氧化氫，螢光強度跟著被抑制，故具偵測效果。目前已可偵測過氧化氫的最低濃度為 $0.5 \mu\text{M}$ ，可知金銅奈米團簇(PSS-PA-Au/Cu NCs)以具有偵測低濃度葡萄糖的能力，而人體內的血糖濃度約為 $4\sim 6 \mu\text{M}$ ，因此未來有做為血糖偵測計的潛力。

伍、 本計畫之創見性及其未來應用

以相對較便宜的銅離子和比例較低的金離子合成金銅奈米團簇來偵測過氧化氫，不僅成本上比實驗室之前合成出的發光金奈米點螢光感測器來偵測過氧化氫來得更低外，包括在金屬離子的使用上將金離子換成較大比例的銅離子；除此之外在巨觀上的金屬特性上銅比金有更高的化學活性，於微觀中的奈米團簇也同樣有此性質。因此推知此金銅奈米團簇應具有較高的氧化還原能力，所以本研究將以此材料作為具有選擇性之偵測試劑，如此一來也能減少貴金屬的使用量，使成本比以生物酵素或市面上通售之機器之偵測方式更加低廉。若成功合成具有高靈敏度、高專一性具有催化活性之金銅奈米團簇，並運用於偵測過氧化氫或葡萄糖感測器上，在經濟效益方面，因其成本低廉、穩定性高，量產的可能性必能增加；在醫療科技，傳統繁雜的檢測血糖步驟且昂貴許多，將得到更簡化且精確的方法；對於糖尿病患者及其他社會大眾而言，就能便利且精準的調控自身每日的血糖狀況。

陸、 結論

實驗室目前已合成出具有偵測過氧化氫之發光金奈米點，但由於成本較高且需要專業的螢光儀作為量測螢光強度的工具，所以難以有效的使用。藉由此研究希望能使用此新合成方式合成的金銅奈米團簇來提高對於偵測過氧化氫的靈敏度，且更進一步做出具有選擇性的應用於偵測葡萄糖濃度的簡單、便宜葡萄糖檢測方式。

柒、 參考資料(文獻)及其他

- 一、項燕君，發光金奈米點之生物應用，碩士論文，2009 年
- 二、葉庭吟，螢光碳奈米複合材料之生物應用，碩士論文，2013 年
- 三、Z Yang; C-K Chiang; H-T Chang, Synthesis of fluorescent and photovoltaic Cu₂O nanocubes, 2008.
- 四、Prathik Roy; Zong-Hong Lin; Chi-Te Liang; Huan-Tsung Chang, Synthesis of enzyme mimics of iron telluride nanorods for the detection of glucose, 2012.

【評語】 030009

作者合成金銅奈米團簇，另加入聚苯乙烯硫酸鈣(pss)，對於團簇的分散性具有一定的效果，以此團簇後測 H_2O_2 ，反推葡萄糖的含量。作品具有創意，作者可在應用性方面多一些實驗，則作品會更佳。