

# 第二十一屆旺宏科學獎

## 成果報告書

參賽編號：SA21-397

作品名稱：魯米諾與奈米金屬螢光增強

姓名：謝承磬

關鍵字：魯米諾、奈米金屬、螢光增強

## 摘要

本實驗探討 luminol(又稱魯米諾、發光胺)-  $\text{H}_2\text{O}_2$ -  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 化學冷光系統在不同氧化劑( $\text{H}_2\text{O}_2$ )濃度、催化劑( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )濃度、pH 值和溫度下，對 luminol 發光現象的影響，並加入奈米金屬(奈米銀、奈米銅、奈米氧化鐵)探討其在反應中扮演何種角色。我們以自製螢光偵測裝置蒐集光度數據，發現奈米金屬可作為此發光系統的增強劑而非催化劑，並進一步探討最佳濃度和溫度條件，同時討論奈米金屬增強發光的機制，包括氫氧自由基的產生以及奈米金屬螢光效應中的能量轉移效應，以數位分光光度計蒐集 luminol 的發射光譜數據後，得知奈米銀有最大的光譜重疊，因此其能量轉移效應較強，符合奈米銀展現最佳的發光增強效果。

## 壹、研究動機

在看 CSI 犯罪現場時，常看到刑事人員用一種特殊藥劑辨識現場中的血液痕跡，上網查資料後得知是 luminol 與血液反應後發光，但往往因 luminol 發光時間及發光強度不夠，需要大量噴灑 luminol 增強，我們想利用現有知識改進發光效益，而以往的作品多半改變多種催化劑來觀察 luminol 發光強度之變化，卻幾乎未跨足奈米領域，於是我們想探討奈米金屬在 luminol 發光系統中扮演的角色與影響。

## 貳、研究目的

- (一) 探討濃度因素(雙氧水和赤血鹽)對 luminol 發光現象的影響
- (二) 探討試劑體積因素對 luminol 發光現象的影響
- (三) 探討 pH 值因素對 luminol 發光現象的影響
- (四) 探討奈米金屬濃度對 luminol 發光現象的影響
- (五) 探討溫度因素對 luminol 發光現象的影響
- (六) 探討奈米金屬對 luminol 的發光增強機制

## 參、研究設備及器材

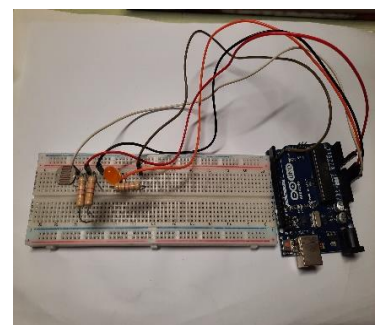
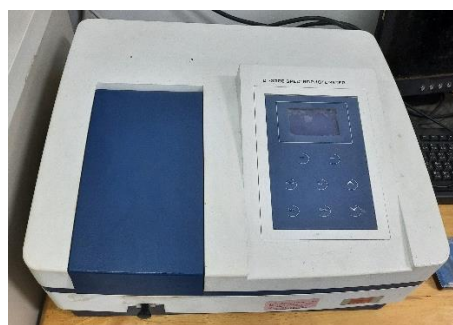
### 一、 器材

燒杯、容量瓶、分度吸量管、滴管、比色管、磁石加熱攪拌器、攪拌子、電子天平、刮勺、 樣品瓶、橡皮塞、自製暗箱、光敏電阻偵測裝置(2.3 歐姆)、恆溫水浴槽、照度計 (TES-1334N 數位式照度計)、筆電、酸鹼度計、分光光度計、鋁箔紙、數位分光光度計(Vernier SpectroVis Plus)

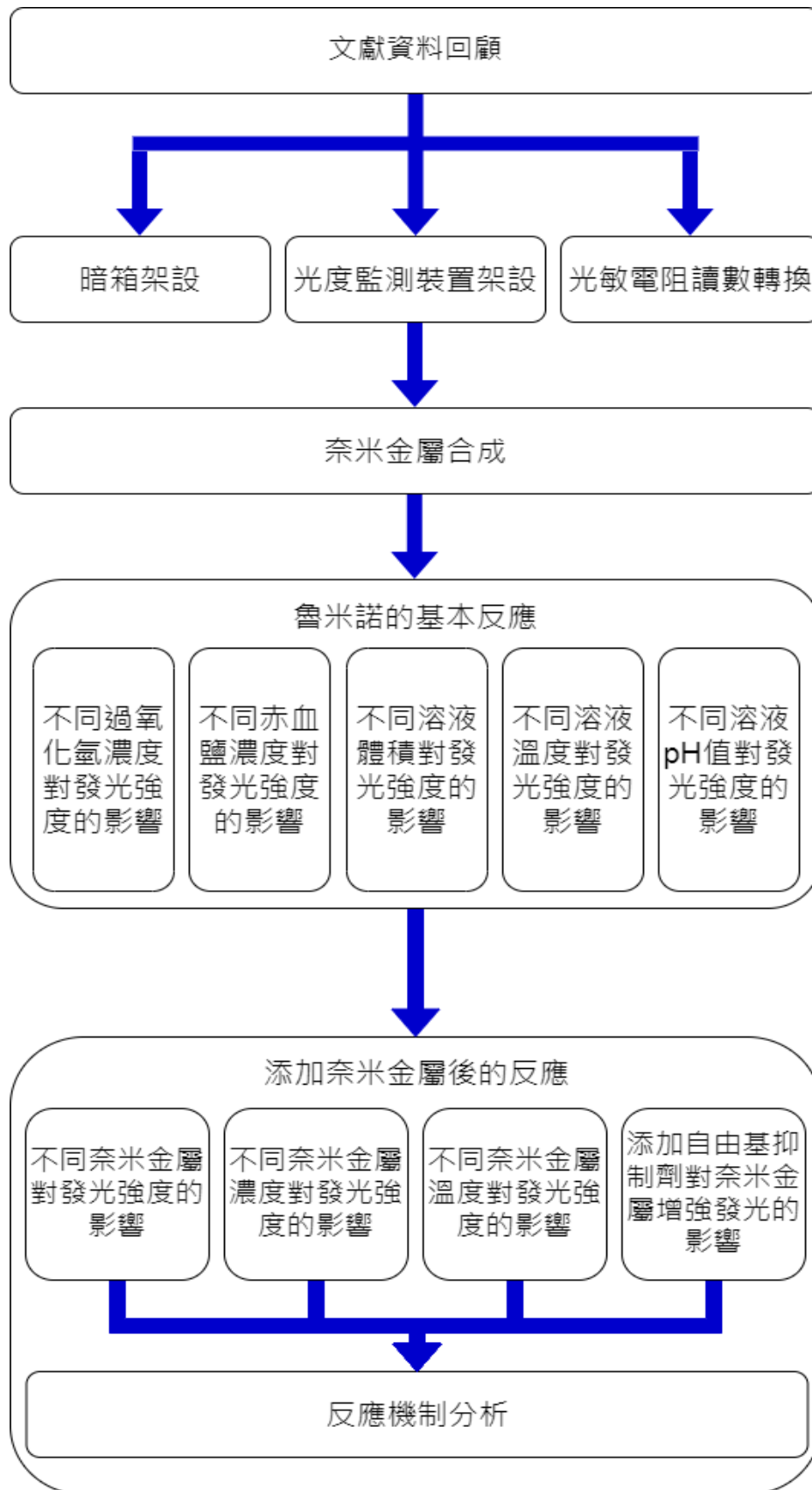
### 二、 藥品

發光胺 Luminol、赤血鹽  $K_3[Fe(CN)_6]$ 、氯化亞鐵  $FeCl_2$ 、氯化鐵  $FeCl_3$ 、氫氧化鈉  $NaOH$ 、鹽酸  $HCl$ 、雙氧水  $H_2O_2$ 、葡萄糖  $C_6H_{12}O_6$ 、D-甘露醇 D-mannitol、硝酸銀  $AgNO_3$ 、檸檬酸鈉  $Na_3C_6H_5O_7$ 、硼氫化鈉  $NaBH_4$ 、聚乙烯吡咯烷酮 PVP、醋酸銅  $Cu(CH_3COO)_2$ 、四級銨鹽、乙二胺四乙酸二鈉  $EDTA-2Na$ 、 溴化十六烷基三甲銨 CTAB

### 三、 實驗裝置



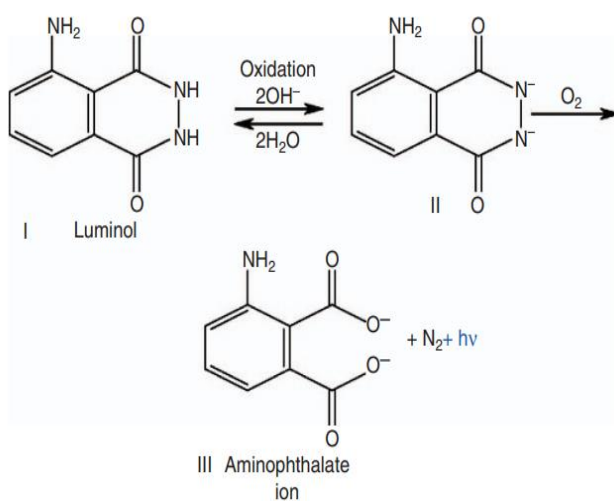
## 肆、研究過程或方法



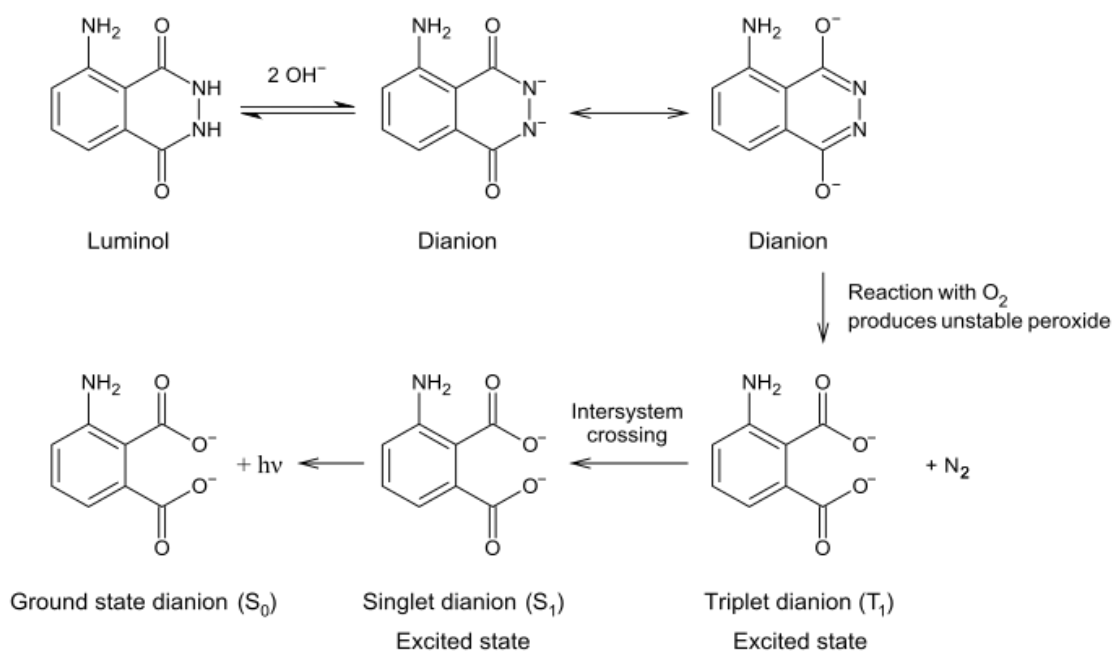
一、 文獻回顧

(一) 化學冷光與 luminol 發光機制(參考資料一、二)

化學冷光定義為透過化學反應產生的能量，將發光分子的基態電子躍遷至激發態，而當激發態電子回到基態時會伴隨能量以光的形式釋出，此放射出的光即為化學冷光。luminol 是常見的化學冷光試劑之一，廣泛地應用於檢驗犯罪現場血跡之存在，其中以 luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-催化劑發光系統在鹼性水溶液中的應用最廣泛，luminol 的發光機制如下圖，透過催化劑分解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 產生 O<sub>2</sub>，其中催化劑可為酵素和金屬離子，接著 O<sub>2</sub> 氧化 luminol 的雙陰離子成激發態(圖一)(Karabchevsky et al., 2016)，隨後回到基態放出藍光(圖二) (參考資料一)。



圖(一) O<sub>2</sub> 氧化 luminol 的雙陰離子



圖(二) luminol 發光機制

## (二) 放光強度與反應速率(參考資料二)

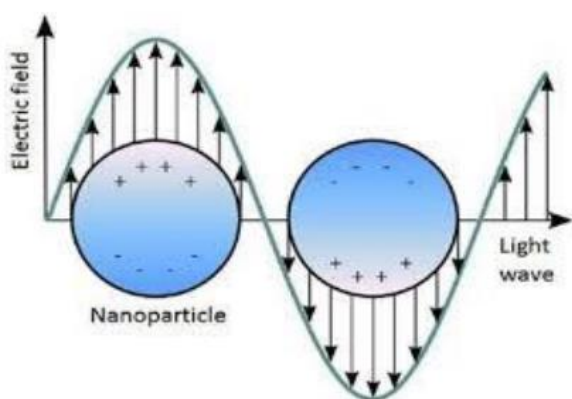
$$\text{放光強度計算公式： } I_{cl} = \phi_{cl} \times \frac{dC}{dt}$$

1.  $I_{cl}$ :放光強度(放射光子數/秒)
2.  $\phi_{cl}$ :量子產率(放射光子數/反應分子數)
3.  $dC/dt$ :化學反應速率(反應分子數/秒)

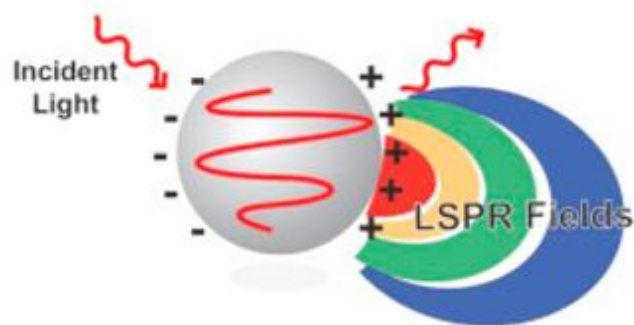
由上述公式可知放光強度正比於反應速率，因此可藉由偵測 luminol 放光強度的變化，定量地應用於分析物濃度的改變。

## (三) 奈米金屬螢光增強效應(參考資料三、四、五)

當金屬進到奈米尺度會有許多特性的改變，諸如表面效應使表面原子擁有高活性，而奈米金屬螢光增強效應可從局部場增強效應、能量轉移效應和輻射速率增減看起，局部表面電漿共振是奈米金屬的非定域電子瞬間極化產生不均勻的電子雲密度(圖三)(黃珮瑜，2020)，在庫倫力作用下電子雲集體震盪使電場局部性增強，此種共振模式如同駐波形式可儲存能量。當入射光頻率和奈米金屬表面自由電子頻率相近，螢光分子會在奈米金屬表面附近受到電場的耦合作用增加其發光強度，此即局部場增強效應(圖四)(黃珮瑜，2020)。

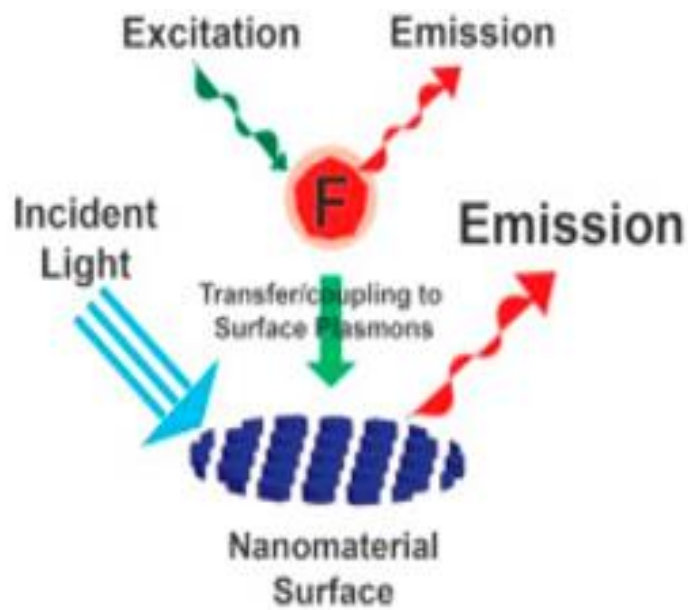


圖(三) 局部表面電漿共振

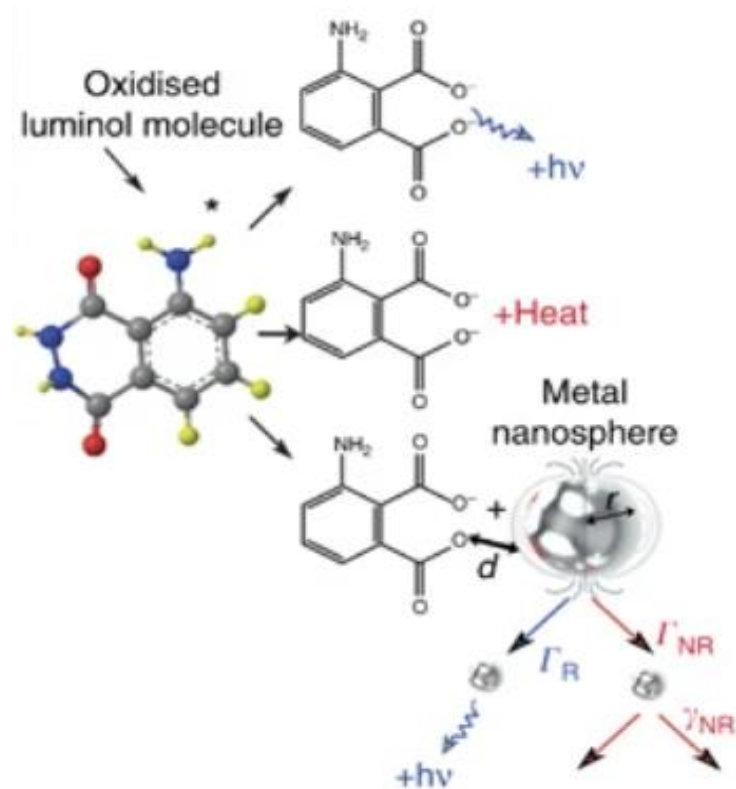


圖(四) 局部場增強效應

而能量轉移效應(圖五)( YoonJeong et al., 2018)受電場強度和光譜重疊程度影響，當重疊程度越大對螢光有愈顯著的增強，另外奈米金屬也會使螢光分子輻射速率和量子產率增加(圖六)(Karabchevsky et al., 2016)，其中距離為奈米金屬螢光增強效應最重要的變因，距離過近會產生螢光猝滅，距離過遠則會使增強效應不顯著，因此將透過實驗找出最佳濃度，等效於螢光分子與奈米金屬在溶液中的最佳距離。



圖(五) 能量轉移效應



圖(六) 螢光分子輻射速率和量子產率增加

## 二、 自製發光強度偵測裝置

### (一) 暗箱製作

1. 選取適當紙箱，並將接口處以膠帶黏接，避免外界光源影響實驗結果(圖七)
2. 內箱:43.3cm×31.3cm×23.0cm，外箱:52.9cm×49.3cm×55.8cm





圖(七)

3. 吸光塗料:將市面上吸光塗料均勻塗於內箱上，經實測獲得良好效果(以手機為光源，並以市售光度計測量亮度，結果如下表)

	無吸光塗料	有吸光塗料
測量亮度(勒克斯 Lux)	90.1	10.3

(二) 光度計、光敏電阻讀數與 Lux 轉換

原本以市售光度計測量 luminol 發光亮度，但因光度計精度不足，改以光敏電阻(搭配 Arduino) ，而輸出數值並非公制單位，故設計光敏電阻讀數與 Lux 轉換:

1. 取內壁塗上吸光塗料的暗箱，在兩對面對應位置各鑽一洞，並確認兩洞在同一直線上，且平行暗箱的一邊。關閉環境光源進行實驗。
2. 在其中一個洞以光源(在此選用手機照明和手電筒)貼在洞口向暗箱內發光，另一洞口以光敏電阻原件感光，並將測得的數值換入電腦記錄。
3. 以同一光源照射，但將另一洞口改用照度計測量，並記錄測得的實際照度(單位：Lux)
4. 更換其他光源，重複進行步驟 2~3。
5. 將測得單種光源的兩種測量數據繪製於圖(十)上

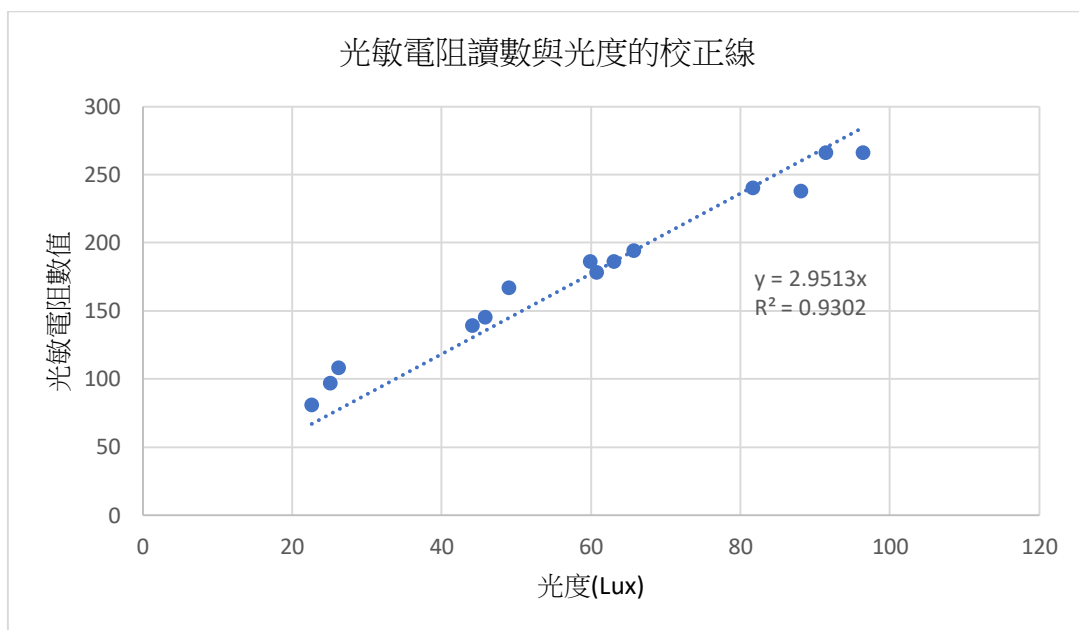




圖(八) 市售光度計



圖(九)光度數值轉換實驗



圖(十) 光敏電阻讀數與光度 Lux 的轉換公式

由圖(十)可知，光敏電阻可將 Lux 數值放大 2.951 倍，故後續實驗數據能採用此轉換公式得出光度數值。

### 三、以化學還原法合成奈米金屬

#### (一) 合成奈米銀(參考資料六)

**藥品:** 硝酸銀、檸檬酸鈉、硼氫化鈉、聚乙烯吡咯烷酮

1. 配製硝酸銀溶液  $10^{-3}M$ 、檸檬酸鈉溶液  $2 \times 10^{-3}M$ 、硼氫化鈉溶液  $2 \times 10^{-3}M$ 。
2. 以分度吸量管吸取硝酸銀溶液 5ml 至包裹鋁箔紙的容量瓶中。
3. 吸取檸檬酸鈉溶液 5ml 和硼氫化鈉溶液 5ml 至容量瓶中。
4. 將容量瓶中的溶液加水稀釋至 250ml。
5. 將容量瓶的溶液倒入燒杯中並放在磁石攪拌器上定速攪拌兩分鐘。
6. 加入聚乙烯吡咯烷酮 PVP 作為保護劑，放入樣品瓶保存。

## (二) 合成奈米銅(參考資料七)

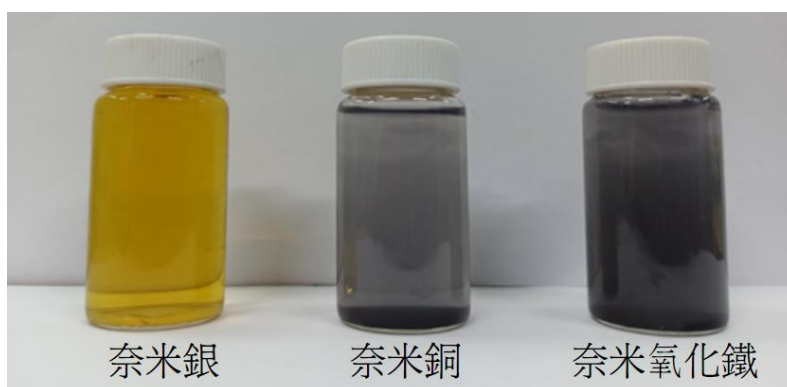
藥品: 醋酸銅、EDTA、硼氫化鈉、四級銨鹽

1. 配製醋酸銅溶液  $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、EDTA 溶液  $10^{-2} \text{M}$ 、硼氫化鈉溶液  $6 \times 10^{-2} \text{M}$ 。
2. 加入醋酸銅溶液 100ml、EDTA 溶液 50ml 和硼氫化鈉溶液 50ml 至燒杯中。
3. 燒杯置於冰浴( $5^\circ\text{C}$ )一小時。
4. 加入四級銨鹽作為保護劑，放入樣品瓶保存。

## (三) 合成奈米氧化鐵 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (參考資料八、九)

藥品: 氫氧化鈉、氯化鐵、氯化亞鐵、鹽酸、CTAB

1. 配置氫氧化鈉溶液 2M 和鹽酸溶液 2M
2. 取氯化鐵 3.30g 和氯化亞鐵 8.620g 加入燒杯中。
3. 於燒杯中加入鹽酸溶液 41.25ml
4. 將 240ml 氫氧化鈉溶液滴入溶液中並攪拌。
5. 放在磁石攪拌器上定速攪拌一小時。
6. 加入 CTAB 作為保護劑，放入樣品瓶保存。



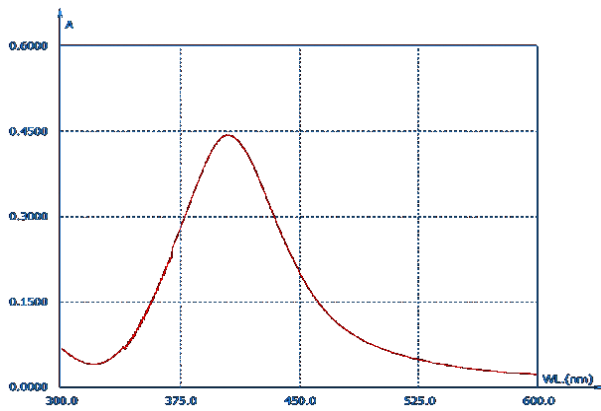
圖(十一)

## (四) 濃度計算

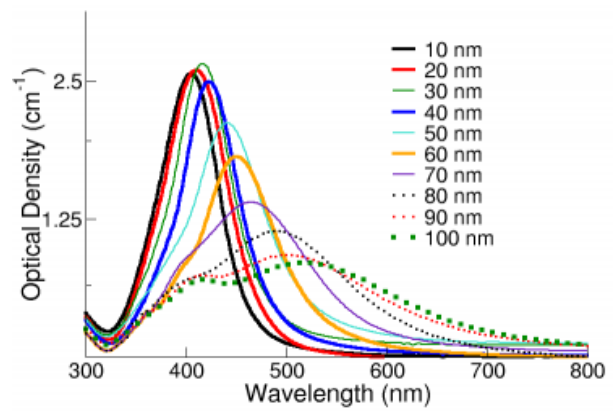
由於奈米金屬之表面電漿共振效應會吸收特定波段，因此能以 UV-Visible spectrometer 測量合成之奈米金屬粒徑大小，由於缺少各奈米金屬不同粒徑的吸收係數資料，因此無法以比爾定律代入計算。將奈米金屬粒子近似為球形估算單位溶液體積內的粒子數。圖(十二)為 UV-Visible spectrometer 測量奈米銀的吸光波段，再由圖(十三)(Paramelle et al., 2014)可對應找出奈米銀的粒徑，奈米銅和奈米氧化鐵的平均粒徑數據由文獻(參考資料七、八、九)得出，最後帶入濃度計算公式：

$$\text{濃度計算公式: } C = \frac{6W}{\pi R^3 D N_A V}$$

C:濃度 W:金屬質量 R:金屬粒徑 D:金屬堆積密度 V:溶液體積  $N_A:6.022 \times 10^{23}$



圖(十二) 奈米銀的吸光光譜



圖(十三)不同粒徑奈米銀的吸光光譜

(五) 計算結果:

1. 奈米銀:粒徑 30nm, 濃度  $C = \frac{6 \times 10^{-3} \times 0.005 \times 107.87}{3.141 \times (3 \times 10^{-6})^3 \times 0.312 \times 6.022 \times 10^{23} \times 0.25} = 8.1 \times 10^{-10} \text{M}$
2. 奈米銅:粒徑 30nm, 濃度  $C = \frac{6 \times 5 \times 10^{-3} \times 0.1 \times 63.55}{3.141 \times (3 \times 10^{-6})^3 \times 0.35 \times 6.022 \times 10^{23} \times 0.2} = 5.3 \times 10^{-8} \text{M}$
3. 奈米氧化鐵:粒徑 50nm, 濃度  $C = \frac{6 \times 3.1}{3.141 \times (5 \times 10^{-6})^3 \times 0.84 \times 6.022 \times 10^{23} \times 0.28} = 4.7 \times 10^{-7}$
4. 後續實驗將使用此三種奈米金屬溶液, 並配置成不同濃度進行反應。

四、 收集 luminol 發光強度數據

(一) Luminol 的基本反應

1-1. 不同赤血鹽濃度對 luminol 發光現象的影響

(1) 配置下表中的各溶液, 並以微量滴管依下表所示吸取特定體積溶液:

赤血鹽濃度和 luminol 濃度比	1.0:3.0	1.0:2.5	1.0:2.0	1.0:1.5	1.0:1.0	1.5:1.0	2.0:1.0
赤血鹽溶液 (M)	0.0013	0.0016	0.0020	0.0027	0.0040	0.0060	0.0081

- (2) 取 0.023M luminol 和 0.499M 氫氧化鈉水溶液 0.5ml 以及 0.5% 雙氧水溶液 0.5ml 和水 0.5ml 在比色管內充分混合
- (3) 將 1.5ml 各濃度赤血鹽水溶液以滴管從同高度滴入上述溶液中並測量光敏電阻數據

1-2. 不同雙氧水濃度對 luminol 發光現象的影響

- (1) 取 luminol 0.2g、氫氧化鈉 0.998g 配製成 7 瓶 50 ml 水溶液
- (2) 取赤血鹽 0.1g 配製成 100ml 水溶液
- (3) 配製 5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.25% 的過氧化氫溶液各 5ml
- (4) 使 luminol 和氫氧化鈉混和水溶液和各濃度過氧化氫溶液充分混合

(5) 將赤血鹽水溶液滴入上述溶液中並測量光敏電阻數據

### 1-3. 不同總溶液體積對 luminol 發光現象的影響

(1) 依下表配製各組溶液：

	1.0 毫升組	1.5 毫升組	2.0 毫升組	2.5 毫升組	3.0 毫升組
0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5%雙氧水混合水溶液	0.33ml	0.50ml	0.66ml	0.83ml	1.00ml
0.006M 赤血鹽水溶液	0.50ml	0.75ml	1.00ml	1.25ml	1.50ml
水	0.16ml	0.25ml	0.33ml	0.41ml	0.50ml

(2) 將赤血鹽水溶液滴入各組 luminol、氫氧化鈉和雙氧水混合水溶液中，並測量光敏電阻數據。

### 1-4. 不同溫度對 luminol 發光現象的影響

(1) 將 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5%雙氧水混合水溶液、0.006M 赤血鹽水溶液、及水放入恆溫水浴槽，並分別加熱至 20°C、30°C、40°C、50°C、60°C。

(2) 將 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5%雙氧水混合水溶液共 1.0ml 與水 0.5ml 充分混合。

(3) 將赤血鹽水溶液 1.5ml 加入上述溶液中，並測量光敏電阻數據

### 1-5. 不同 pH 值對 luminol 發光現象的影響

(1) 依下表配製各組溶液：

x	pH=13	pH=13.25	pH=13.5	pH=13.75	pH=14
0.023M luminol、xM 氫氧化鈉、和 0.5%雙氧水混合水溶液	0.10M	0.17M	0.32M	0.56M	1.00M

(2) 將 0.006M 赤血鹽水溶液滴入各組 luminol、氫氧化鈉和雙氧水混合水溶液中，並測量光敏電阻數據。

## (二) 添加奈米金屬的 luminol 發光增強實驗

### 2-1. 奈米金屬作為催化劑對 luminol 發光現象的影響。

(1) 配置  $10^{-10}$ M 之奈米銀、奈米銅、奈米氧化鐵和 0.006M 赤血鹽水溶液。

(2) 將 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5%雙氧水之混合水溶液共 1.0ml 與水 0.5ml 充分混合。

(3) 將  $10^{-10}$ M 之奈米銀、奈米銅、奈米氧化鐵溶液或 0.006M 赤血鹽水溶液 1.5ml 分別加入上述溶液中，並測量光敏電阻數據

## 2-2. 不同奈米金屬濃度對 luminol 發光現象的影響

- (1) 配置  $10^{-10}$ M、 $0.5 \times 10^{-10}$ M、 $0.25 \times 10^{-10}$ M、 $0.125 \times 10^{-10}$ M 之奈米銀、奈米銅、奈米氧化鐵溶液。
- (2) 將 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5% 雙氧水之混合水溶液共 1.0ml 與各濃度奈米金屬溶液 0.5ml 充分混合。
- (3) 將 0.006M 赤血鹽水溶液 1.5ml 加入上述溶液中，並測量光敏電阻數據

## 2-3. 不同溫度對添加 $0.25 \times 10^{-10}$ M 奈米銀的 luminol 發光現象的影響

- (1) 配置  $0.25 \times 10^{-10}$ M 之奈米銀溶液。
- (2) 將 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5% 雙氧水溶液、 $0.25 \times 10^{-10}$ M 之奈米銀溶液和 0.006M 赤血鹽水溶液在恆溫水浴槽中加熱至  $20^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $40^{\circ}\text{C}$ 、 $50^{\circ}\text{C}$ 、 $60^{\circ}\text{C}$ 。
- (3) 將 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5% 雙氧水之混合水溶液共 1.0ml 與  $0.25 \times 10^{-10}$ M 之奈米銀溶液 0.5ml 充分混合。
- (4) 將 0.006M 赤血鹽水溶液 1.5ml 加入上述溶液中，並測量光敏電阻數據

## 2-4. 不同溫度對添加 $0.5 \times 10^{-10}$ M 奈米銅的 luminol 發光現象的影響

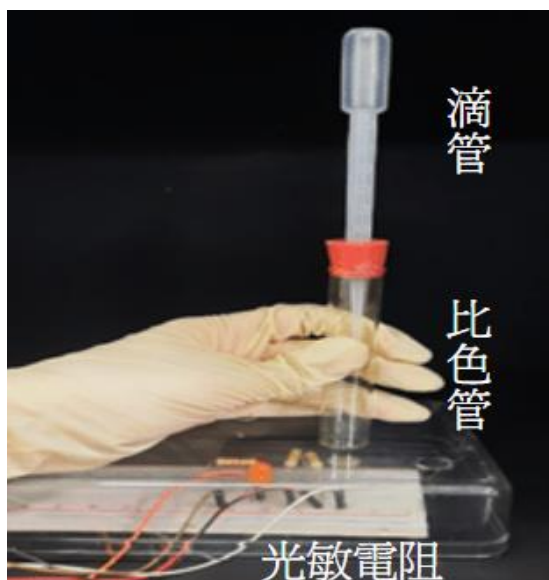
- (1) 配置  $0.5 \times 10^{-10}$ M 之奈米銅溶液。
- (2) 將 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、0.5% 雙氧水溶液、 $0.5 \times 10^{-10}$ M 之奈米銅溶液和 0.006M 赤血鹽水溶液在恆溫水浴槽中加熱至  $20^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $40^{\circ}\text{C}$ 、 $50^{\circ}\text{C}$ 、 $60^{\circ}\text{C}$ 。
- (3) 將 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5% 雙氧水之混合水溶液共 1.0ml 與  $0.5 \times 10^{-10}$ M 之奈米銅溶液 0.5ml 充分混合。
- (4) 將 0.006M 赤血鹽水溶液 1.5ml 加入上述溶液中，並測量光敏電阻數據

## 2-5. 是否添加自由基抑制劑對無添加奈米金屬的 luminol 發光現象的影響

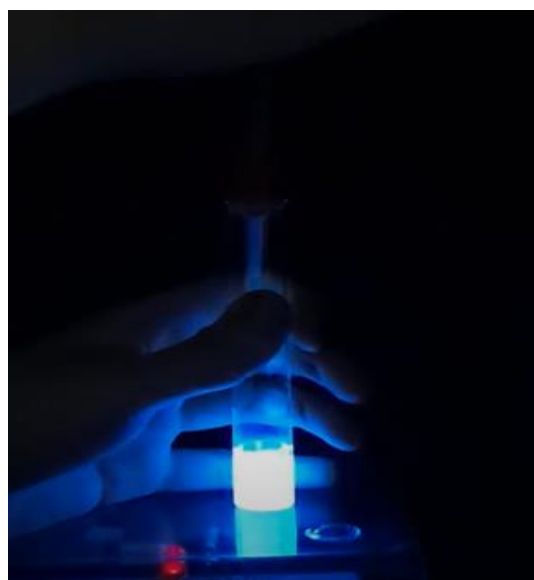
- (1) 配置 50mM 的 D-甘露醇(自由基抑制劑)水溶液(Ghimire et al., 2018)。
- (2) 將 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5% 雙氧水之混合水溶液共 1.0ml 與  $5 \times 10^{-2}$ M 的 D-甘露醇水溶液充分混合。
- (3) 將 0.006M 赤血鹽水溶液 1.5ml 加入上述溶液中，並測量光敏電阻數據。

## 2-6. 是否添加自由基抑制劑對添加最佳濃度之奈米金屬的 luminol 發光現象之影響

- (1) 配置  $0.25 \times 10^{-10}$ M 之奈米銀及  $5 \times 10^{-2}$ M 的 D-甘露醇(自由基抑制劑)水溶液。
- (2) 將 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5% 雙氧水混合水溶液共 1.0ml 與  $0.25 \times 10^{-10}$ M 之奈米銀及 50mM 的 D-甘露醇水溶液之混合溶液共 0.5ml 充分混合。
- (3) 將 0.006M 赤血鹽水溶液 1.5ml 加入上述溶液中，並測量光敏電阻數據。
- (4) 將奈米銀改為奈米銅  $0.50 \times 10^{-10}$ M 重複步驟(2)~(3)



圖(十四)操作示意圖



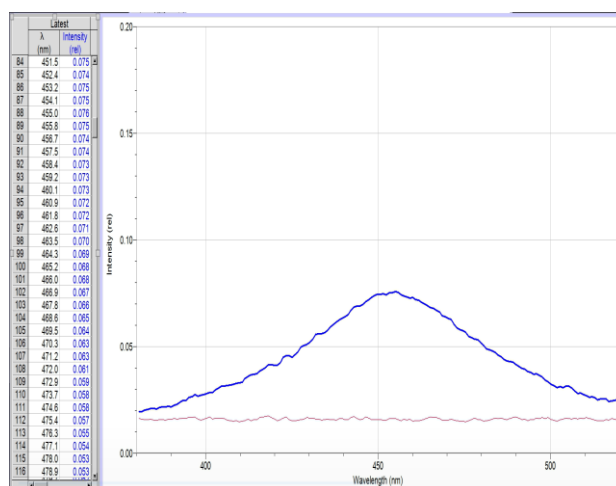
圖(十五)發光示意圖

### 2-7. 添加奈米金屬對 luminol 之光譜的影響

- (1) 配置  $0.25 \times 10^{-10} \text{M}$  之奈米銀水溶液。
- (2) 將 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5% 雙氧水混合水溶液共 1.0ml 與  $0.25 \times 10^{-10} \text{M}$  之奈米銀水溶液共 0.5ml 充分混合。
- (3) 將 0.006M 赤血鹽水溶液 1.5ml 加入上述溶液中，並以數位分光光度計測量光譜數據。
- (4) 將奈米銀改為奈米銅  $0.50 \times 10^{-10} \text{M}$  重複步驟(2)~(3)



圖(十六)操作示意圖



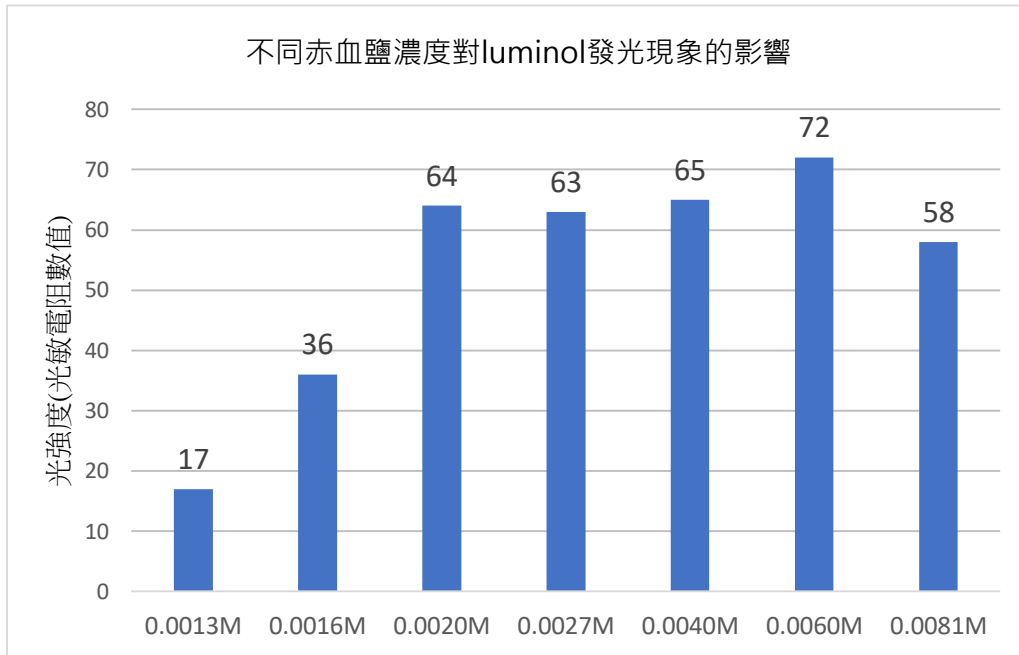
圖(十七)數位分光光度計-Logger pro 分析

光譜圖分析說明:

以 Logger pro app 記錄由數位分光光度計所蒐集的發光數據，並加以分析最大亮度時的光譜圖，圖(十七)中的紅線為背景亮度，藍線則顯示加入 luminol 及其餘藥品時的光譜變化，縱軸亮度的相對強度範圍為 0 到 1。

## 伍、研究結果

### 一、不同赤血鹽濃度對 luminol 發光現象的影響

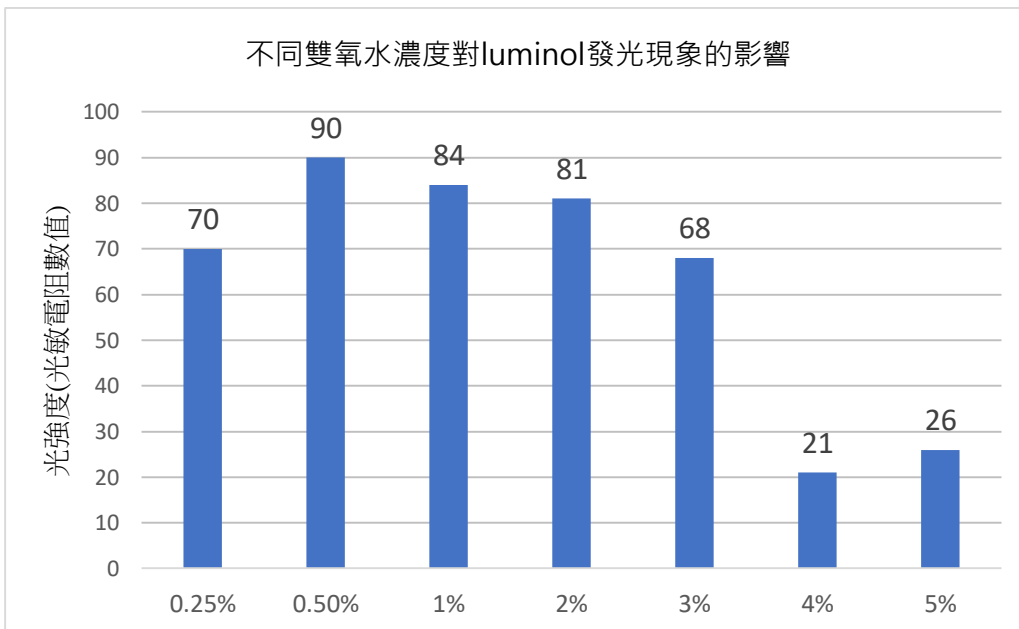


圖(十八)

實驗結果：

赤血鹽水溶液 0.0060M 組最大發光強度最大，後續實驗將以此比例進行。

### 二、不同雙氧水濃度對 luminol 發光現象的影響



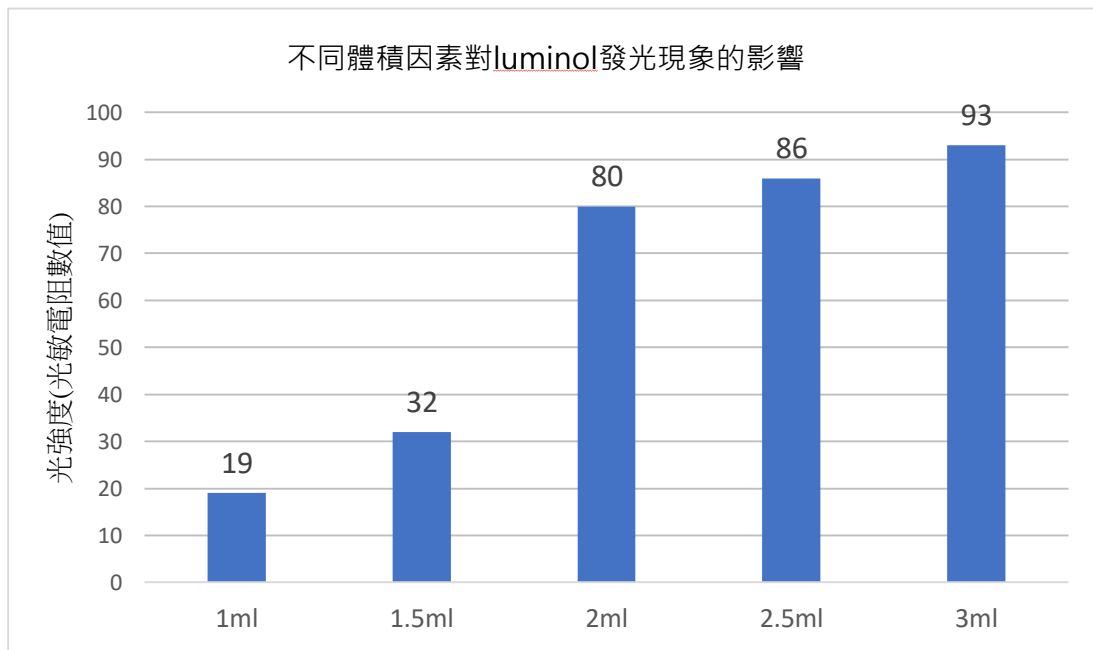
圖(十九)

實驗結果：

以 0.5%過氧化氫溶液組有最大發光強度，後續實驗將以此為濃度配製。



三、 不同試劑體積因素對 luminol 發光現象的影響

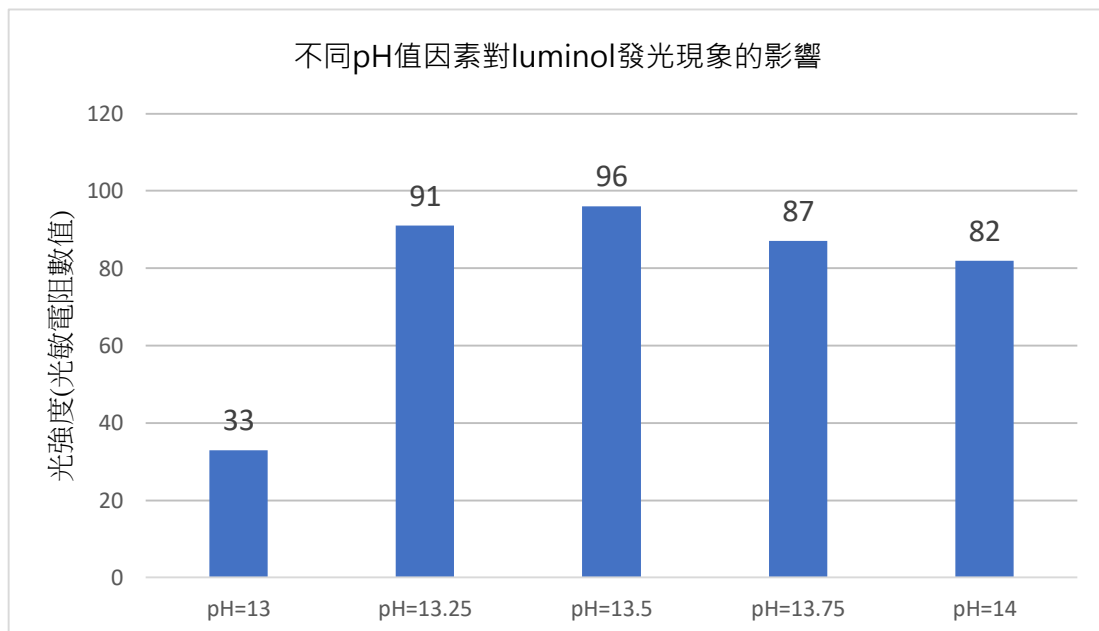


圖(二十)

實驗結果：

隨著試劑體積越大，最大發光強度也越大。往後實驗將以 3ml 為基準進行。

四、 不同 pH 值因素對 luminol 發光現象的影響



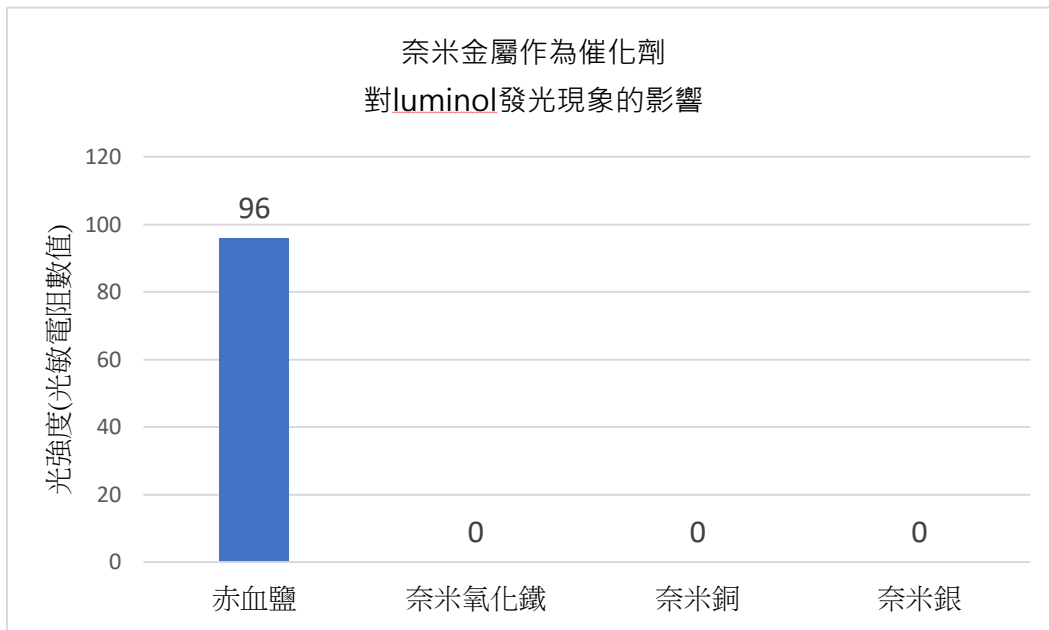
圖(二十一)

實驗結果：

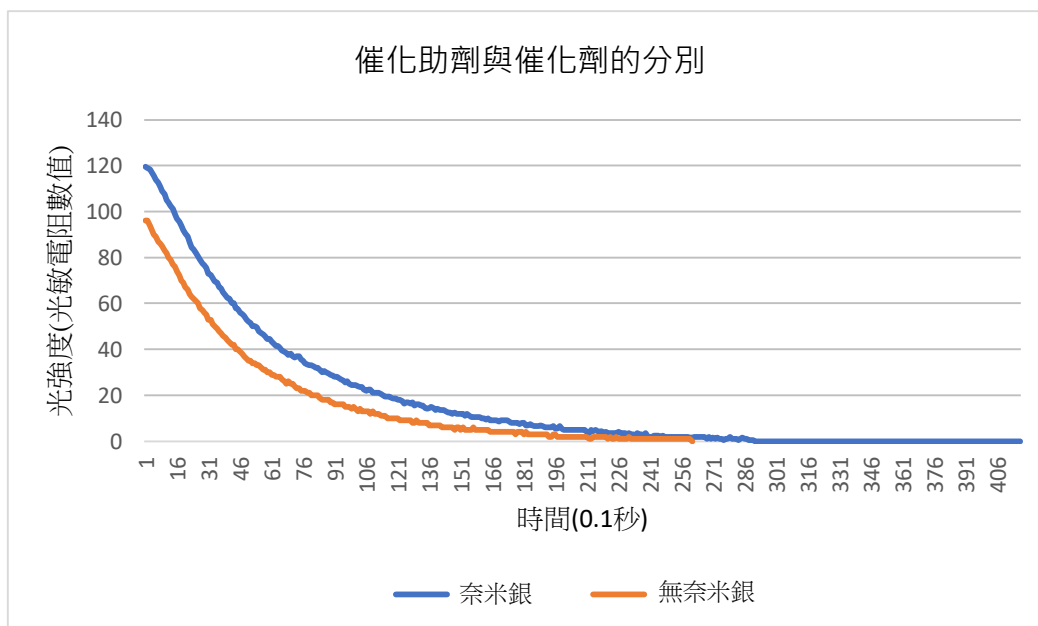
最大發光強度以 pH=13.5 組最大，但除 pH=13 組外差距不大。

五、 不同奈米金屬濃度對 luminol 發光現象的影響

1. 奈米金屬作為催化劑對 luminol 發光現象的影響



圖(二十二)

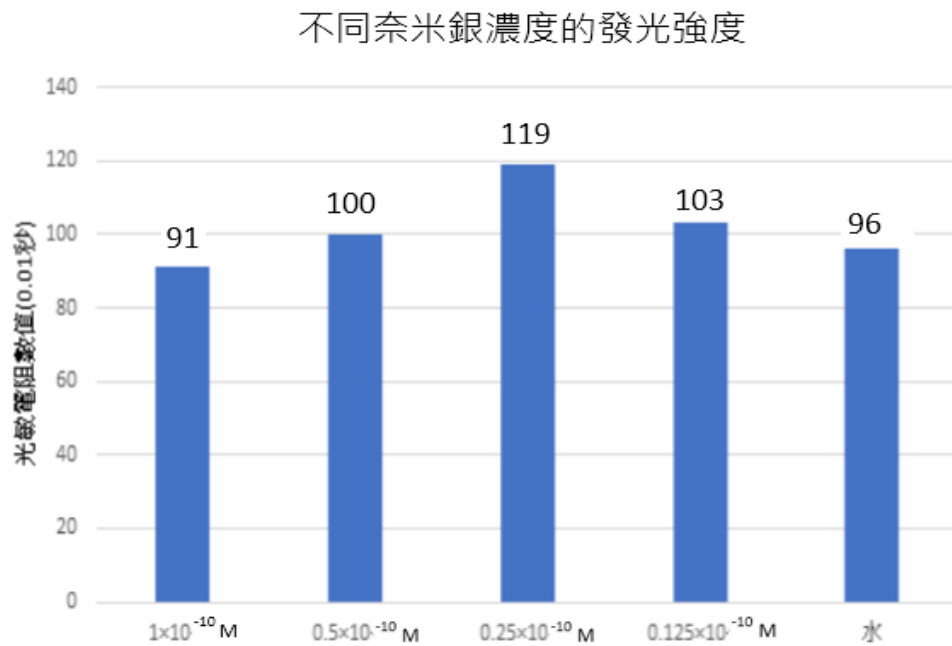


圖(二十三)

實驗結果：

由圖(二十二)可知以奈米金屬取代赤血鹽，將無法觀察到發光反應，表示奈米金屬在 luminol 發光系統中不作為催化劑，後續實驗之唯一催化劑為赤血鹽。而在圖(二十三)可以觀察到在加入奈米金屬後，催化劑的效果有所增強，故奈米金屬應扮演催化助劑的角色。

2. 不同奈米銀濃度的發光強度

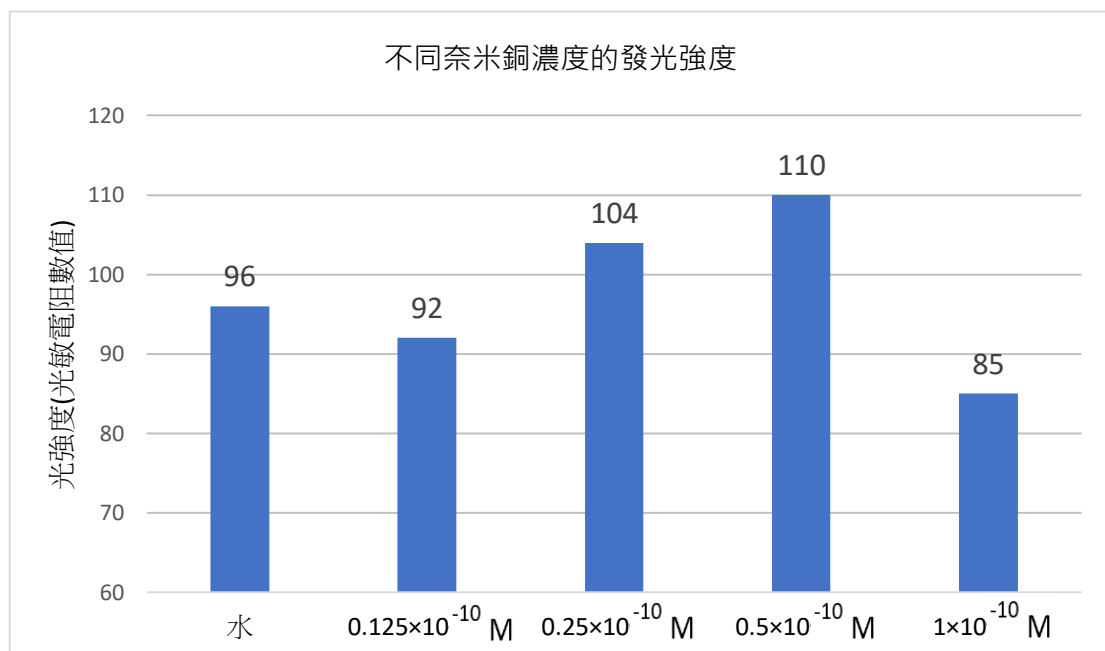


圖(二十四)

實驗結果：

$0.25 \times 10^{-10} \text{ M}$  組之奈米銀溶液有最大的發光強度。

3. 不同奈米銅濃度的發光強度

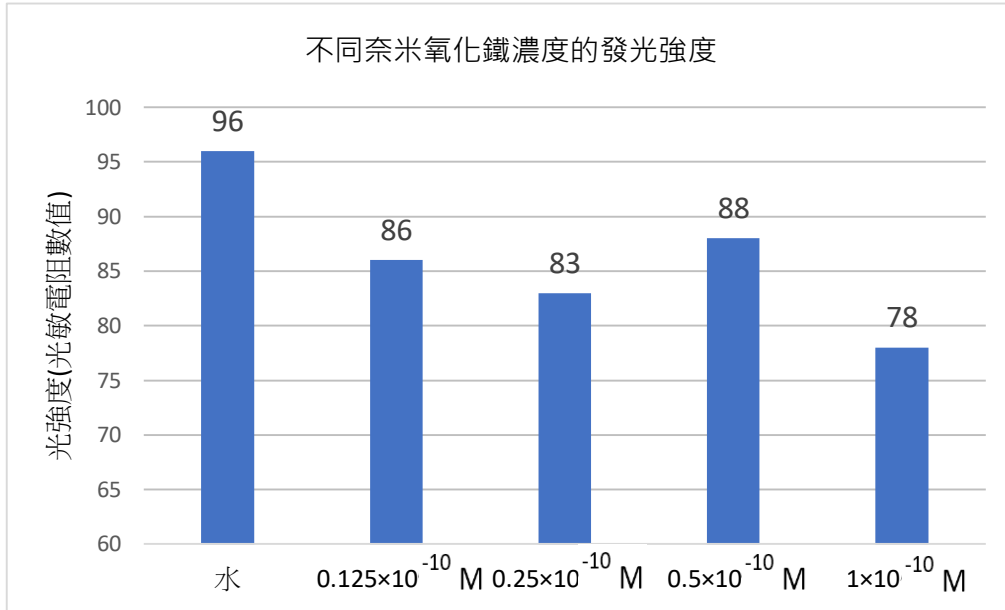


圖(二十五)

實驗結果：

$0.5 \times 10^{-10} \text{ M}$  組之奈米銅溶液有最大的發光強度。

#### 4. 不同奈米氧化鐵濃度的發光強度

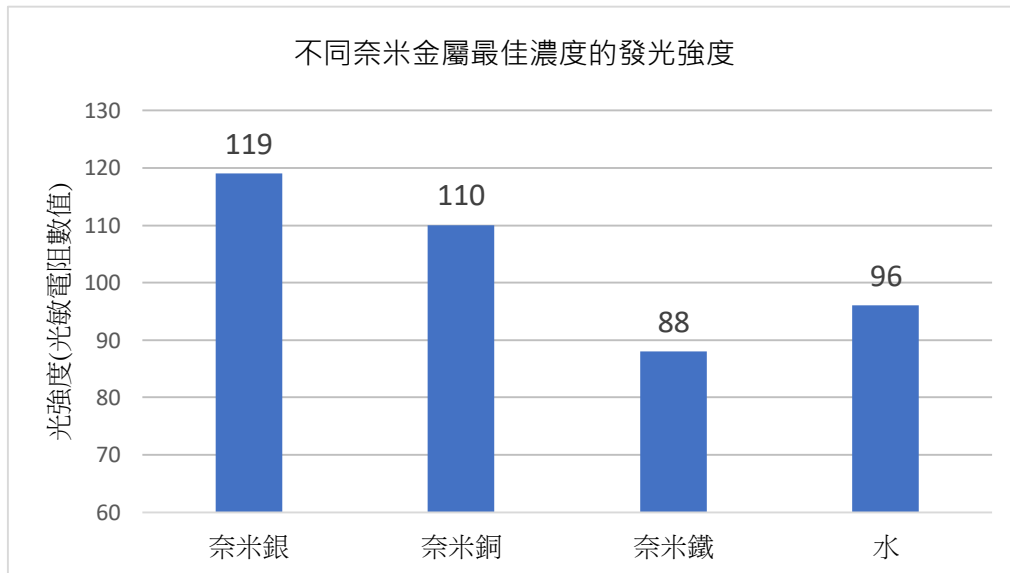


圖(二十六)

實驗結果：

$0.5 \times 10^{-10}$  M 組之奈米氧化鐵溶液有最大的發光強度，但各濃度的發光強度皆較純水組小，得知奈米氧化鐵無增強發光的効果，因此後續實驗無討論奈米氧化鐵，主要探討有發光增強現象的奈米銀和奈米銅。

#### 5. 不同奈米金屬最佳濃度的發光強度



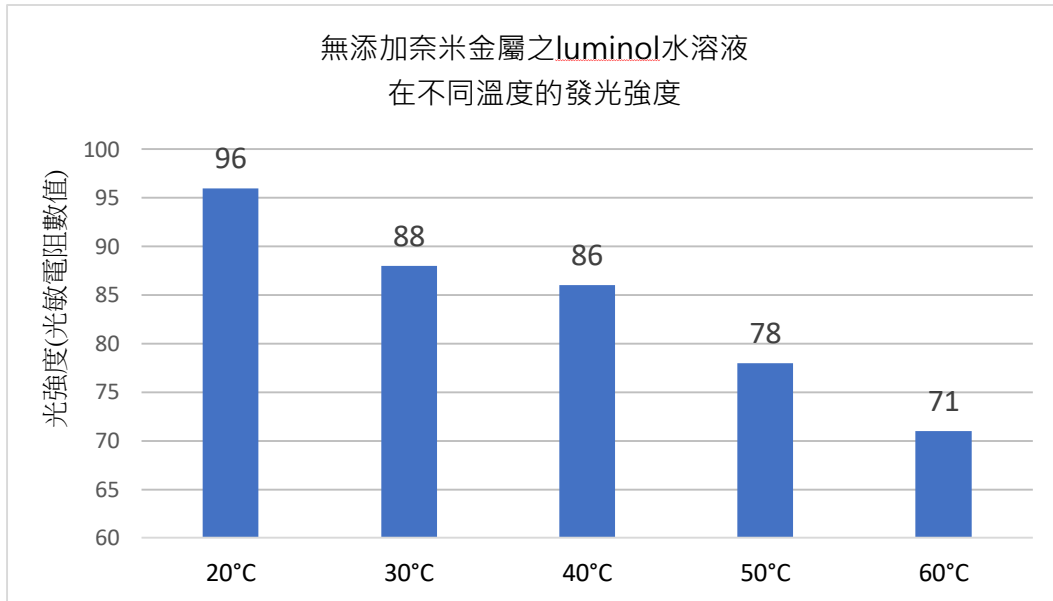
圖(二十七)

實驗結果：

$0.25 \times 10^{-10}$  M 奈米銀溶液有最大的發光強度， $0.5 \times 10^{-10}$  M 奈米銅溶液次之。

六、 不同溫度因素對 luminol 發光現象的影響

1. 無添加奈米金屬之 luminol 水溶液在不同溫度的發光強度

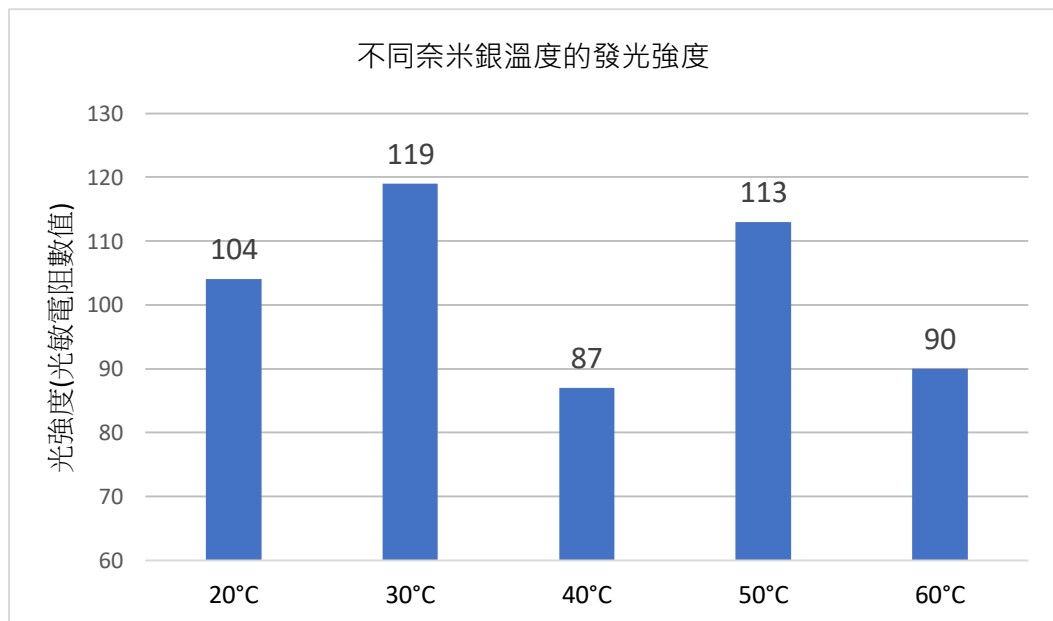


圖(二十八)

實驗結果：

無添加奈米金屬之 luminol 水溶液在 20°C 下有最大的發光強度。

2. 不同奈米銀溫度的發光強度

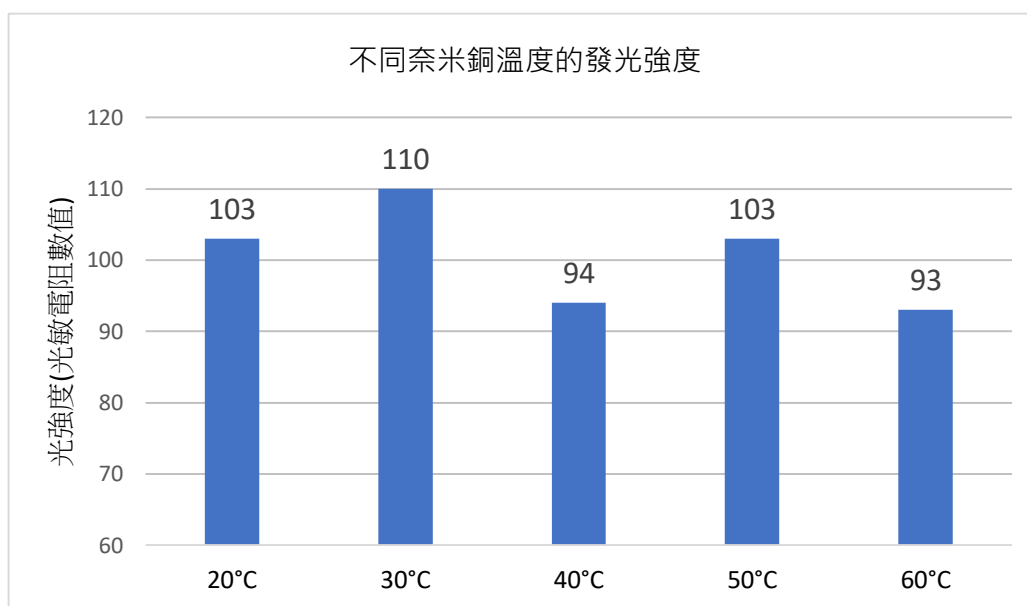


圖(二十九)

實驗結果：

$0.25 \times 10^{-10} \text{M}$  之奈米銀溶液在 30°C 下有最大的發光強度。

### 3. 不同奈米銅溫度的發光強度

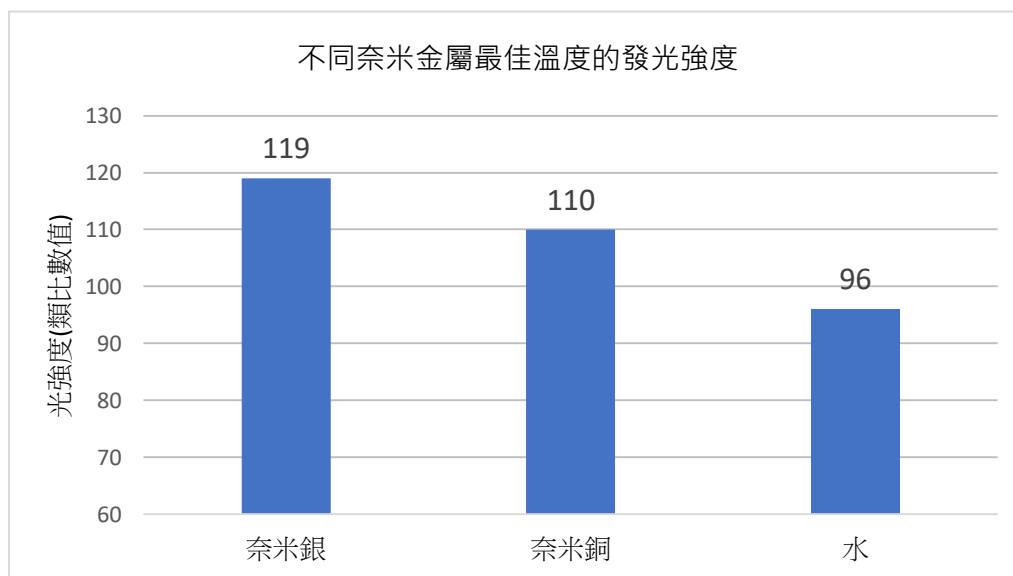


圖(三十)

實驗結果：

$0.5 \times 10^{-10} \text{M}$  之奈米銅溶液在  $30^\circ\text{C}$  下有最大的發光強度。

### 4. 不同奈米金屬最佳溫度的發光強度



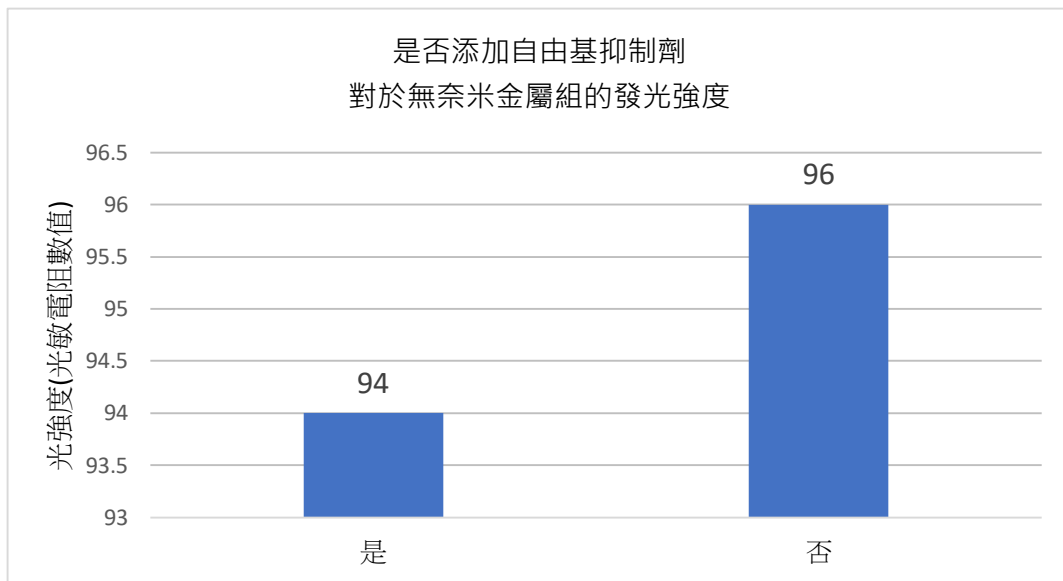
圖(三十一)

實驗結果：

在各自的最佳反應溫度中， $0.5 \times 10^{-10} \text{M}$  之奈米銅溶液和  $0.25 \times 10^{-10} \text{M}$  之奈米銀溶液皆以  $30^\circ\text{C}$  有最大發光強度，其中以  $0.25 \times 10^{-10} \text{M}$  之奈米銀溶液最好，而  $0.5 \times 10^{-10} \text{M}$  之奈米銅溶液次之。

七、 不同奈米金屬對 luminol 發光機制的影響

1. 是否添加自由基抑制劑對於無奈米金屬組的發光強度

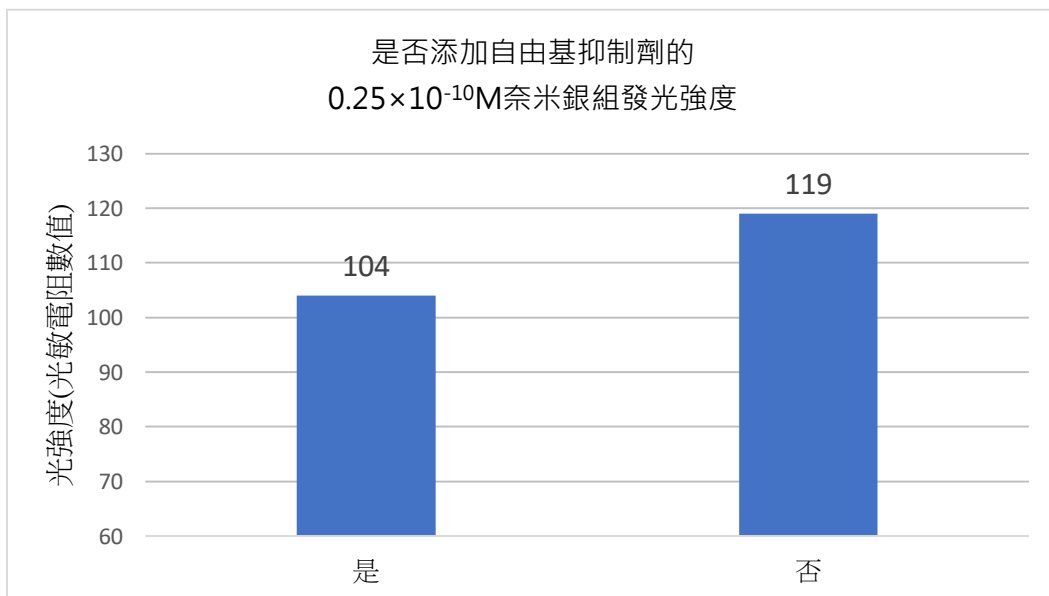


圖(三十二)

實驗結果：

純水組在有無抑制劑的條件下，發光強度未有顯著不同。

2. 是否添加自由基抑制劑的  $0.25 \times 10^{-10} \text{M}$  奈米銀組發光強度



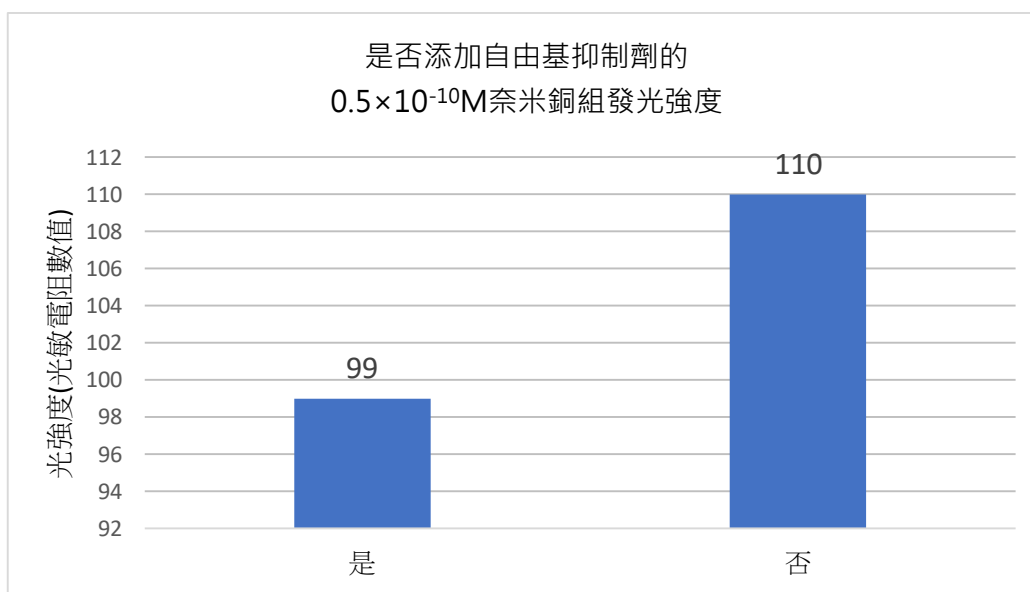
圖(三十三)

實驗結果：

$0.25 \times 10^{-10} \text{M}$  奈米銀組在有抑制劑的條件下，發光強度較弱。



3. 是否添加自由基抑制劑的  $0.5 \times 10^{-10} \text{M}$  奈米銅組發光強度

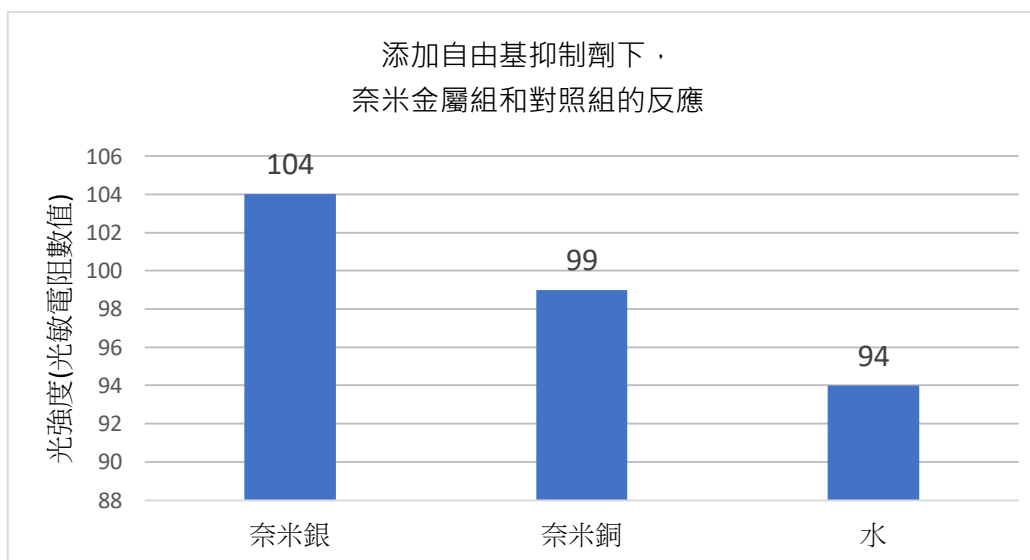


圖(三十四)

實驗結果：

$0.5 \times 10^{-10} \text{M}$  奈米銅組在有抑制劑的條件下，發光強度較弱。

4. 添加自由基抑制劑下，奈米金屬組和對照組的反應



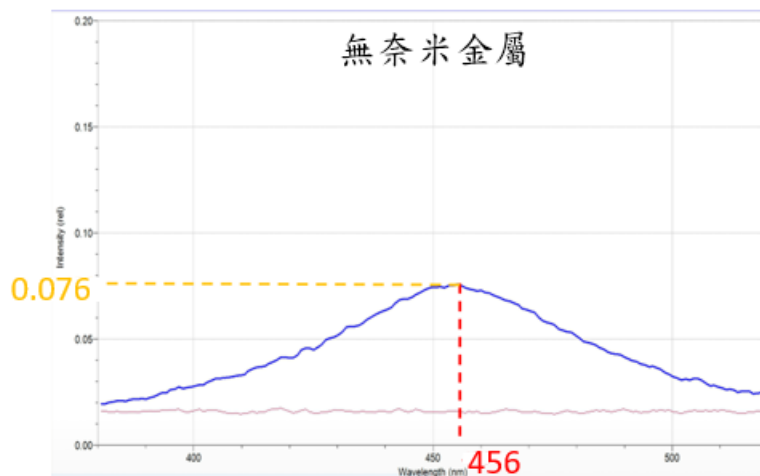
圖(三十五)

實驗結果：

奈米銀和奈米銅溶液在有添加自由基抑制劑的條件下，發光強度均較弱，但和純水組相比仍有發光增強的效果。

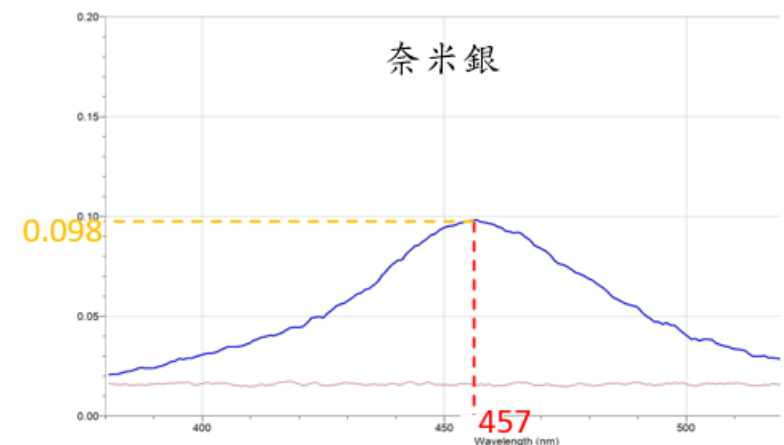
八、 奈米銀與奈米銅對 luminol 之發射光譜的影響

1. 無添加奈米金屬的 luminol 發射光譜



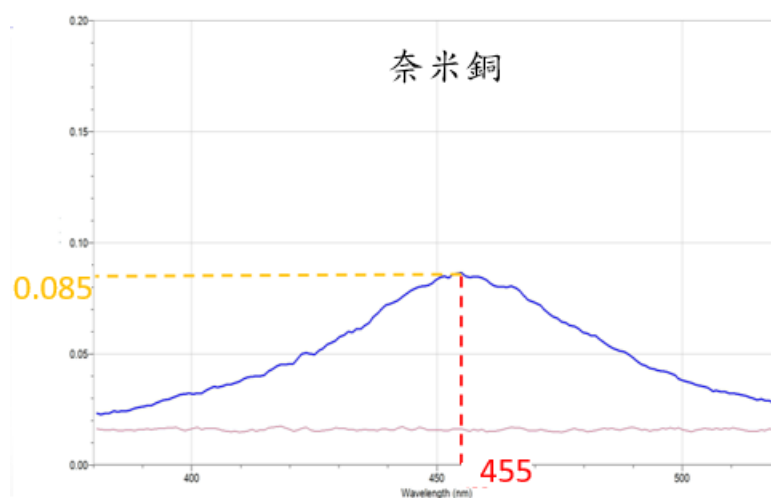
圖(三十六)

2. 添加奈米銀的 luminol 發射光譜



圖(三十七)

3. 添加奈米銅的 luminol 發射光譜



圖(三十八)

實驗結果:

由圖(三十六)~(三十八)得知,加入 $0.25 \times 10^{-10}$ M 奈米銀和 $0.5 \times 10^{-10}$ M 奈米銅後,亮度的峰值皆有所提升,顯示奈米銀和奈米銅確實有增強發光的效果,且以奈米銀的增強效果優於奈米銅,而出現最大亮度的波長並無顯著差異,大約落在 455 奈米到 457 奈米的藍光範圍。

## 陸、討論

### 一、不同雙氧水濃度對 luminol 發光現象的影響

雙氧水在 0.5% 下有最大的發光強度,推測 0.5% 雙氧水已達能和 luminol 反應的最大比例,濃度更高的雙氧水反而無更大的發光強度,可能是過多的氧氣阻礙其他反應分子的碰撞。

### 二、不同赤血鹽濃度對 luminol 發光現象的影響

赤血鹽做為此發光反應的催化劑,經實驗得知赤血鹽的濃度越大使發光強度越大,推測其在此發光反應的速率定律式中,濃度上升其催化雙氧水分解速率也隨之增加。

### 三、不同試劑體積對 luminol 發光現象的影響

當比色管中溶液體積越大時(1~3ml),放光程度也越強,推測原因:溶液內反應的分子數越多,使發光系統單位時間內放出的光子數越多,即放光程度越強。

### 四、不同 pH 值對 luminol 發光現象的影響

luminol 須在鹼性環境下才可完全溶解於水溶液,且在 pH=13.5 時有最大亮度,推測 pH=13~13.5 時,產生的 luminol 雙陰離子濃度與 OH 濃度有正相關,而 pH >13.5 時亮度下降,推測改變了雙氧水的分解速率,並影響氧化劑的還原電位,使其亮度不如 pH=13.5。

### 五、不同奈米金屬濃度對 luminol 發光現象的影響

當 luminol 發光系統僅加入奈米金屬、雙氧水和 luminol 溶液,而無赤血鹽(催化劑)存在下,無觀察到發光反應發生,表示奈米金屬不能作為催化雙氧水產生氧的催化劑,而作為增強劑的角色,但加入奈米氧化鐵則無顯著差異,推測是不同奈米金屬粒子固有性質的差異所致,也可能是合成出的奈米氧化鐵粒徑過大,影響其奈米金屬螢光增強中

的局部場增強效應(黃珮瑜, 2020)。奈米銀和奈米銅的增強效應主要原因有二:其一, 由實驗 2-5 和 2-6 可知, 奈米金屬能使雙氧水形成活性氧物種(本實驗主要驗證氫氧自由基之存在), 氫氧自由基比氧氣有更高的反應活性, 能使發光強度增強, 其次, 奈米金屬透過金屬螢光增強效應增加發光強度。對於奈米銅和奈米銀各自存在最佳濃度即是因為上述兩原因所致, 即在最佳濃度下能產生最多的有效自由基, 濃度太稀產生自由基太少, 而太濃, 則可能發生自由基互撞, 同時最佳濃度也等效於奈米金屬螢光增強效應的最佳距離。

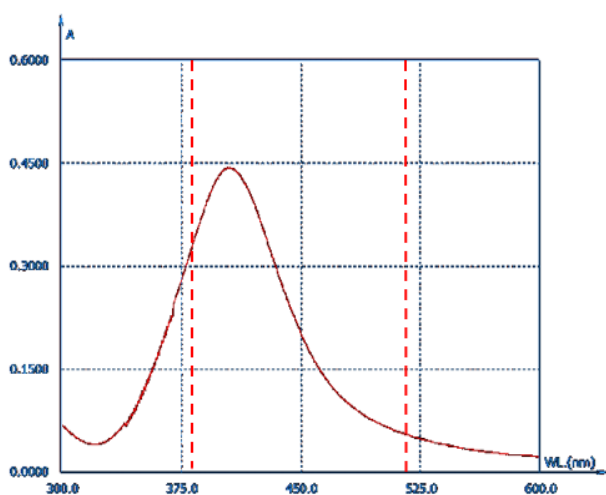
#### 六、不同溫度因素對 luminol 發光現象的影響

無加入奈米金屬的 luminol 水溶液之發光強度, 在 20°C~60°C 間皆隨溫度上升而下降, 推測原因:溫度上升使雙氧水分解越快, 單位時間內產生的氧氣量越多, 但同時也讓溶氧量下降, 使 luminol 無法與足量的氧氣反應, 其次, luminol 透過碰撞(非輻射)等分子運動方式轉移能量, 使發光(輻射)比率下降。而添加奈米金屬的 luminol 水溶液之發光強度, 在 20°C~60°C 間也皆隨溫度上升而下降, 推測原因:由奈米金屬催化產生之自由基運度速率上升, 使碰撞頻率增加, 導致自由基在溶液中或是奈米粒子表面互撞, 造成自由基數量減少, 另外溫度上升使分子運動加快, 致使奈米金屬粒子與 luminol 分子間的距離變化大, 即無法維持奈米金屬螢光增強效應的最佳距離。

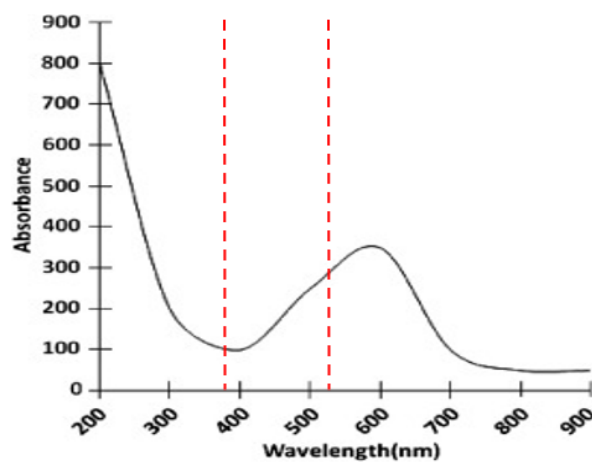
#### 七、不同奈米金屬對 luminol 發光機制的影響

由文獻資料得知, 奈米金屬能使雙氧水形成活性氧物種(Chen et al., 2007), 推測其增強發光原因與活性氧物種有關, 本實驗主要探討氫氧自由基之影響, 從文獻發現維生素 C 和 D-甘露醇皆可做為氫氧自由基抑制劑(Ghimire et al., 2018), 但選用 D-甘露醇則是考慮到維生素 C 較 D-甘露醇為更強的還原劑, 可能對實驗產生更多的變因。經實驗得知加入 D-甘露醇於奈米金屬與 luminol 的混合溶液中, 確實有顯著的發光強度下降現象, 且純水組發光強度並無差異, 成功驗證氫氧自由基在奈米金屬存在下產生, 此外由圖(三十五)發現與水作為對照組仍有差異, 推測為奈米金屬螢光增強效應所致。

## 八、奈米銀與奈米銅對 luminol 之光譜的影響

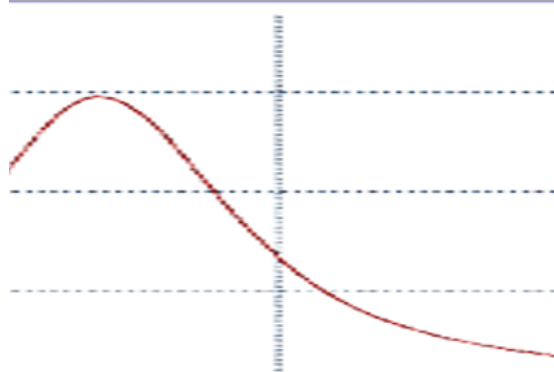
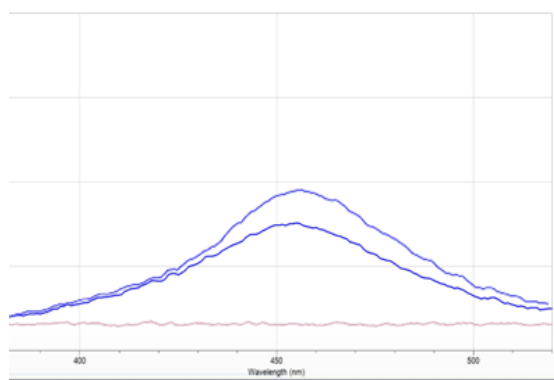


圖(三十九)

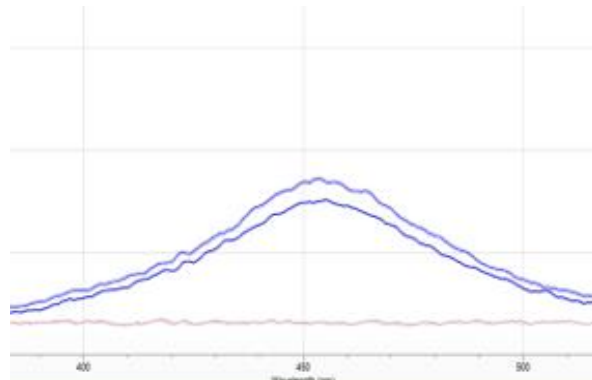


圖(四十)

圖(三十九)和圖(四十)(V.Suramwar et al., 2012)分別為奈米銀和奈米銅的吸收光譜，為探討奈米金屬的吸收光譜對 luminol 發射光譜的影響，將聚焦於波長範圍 380 奈米到 520 奈米之光譜波段進行討論。



圖(四十一)



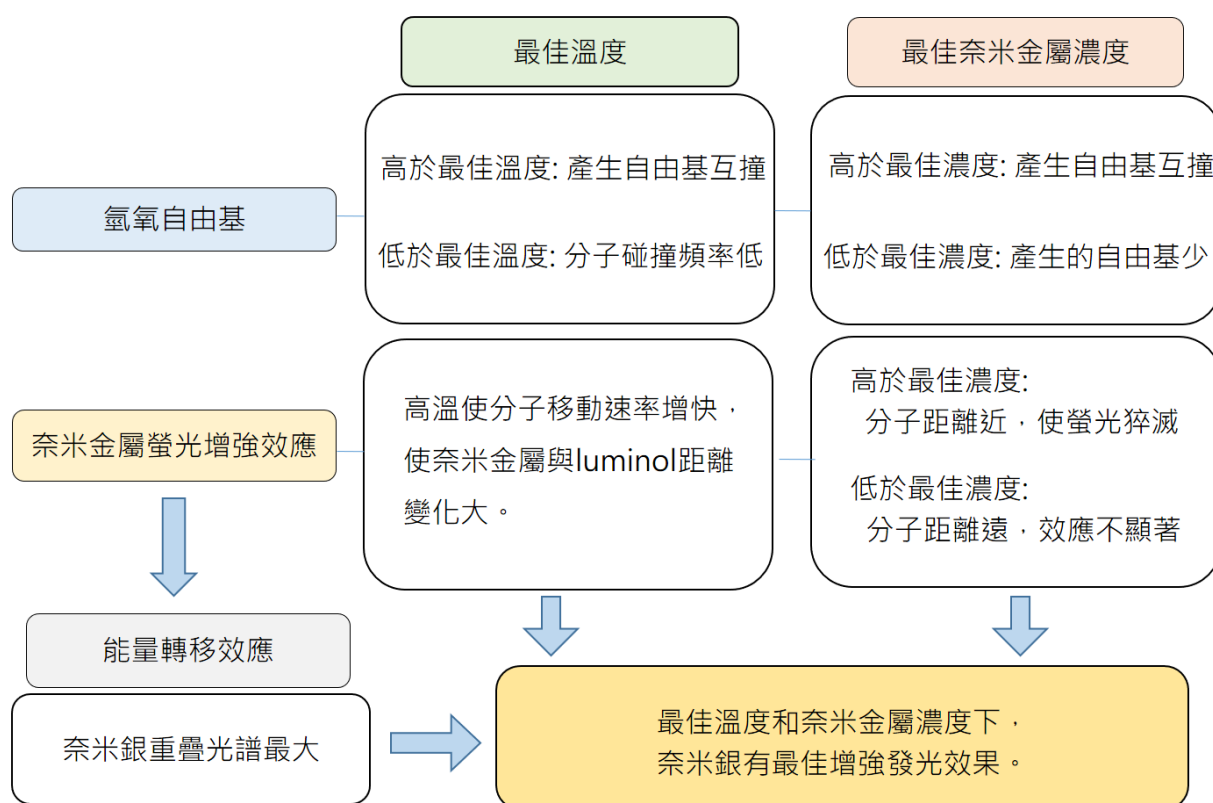
圖(四十二)

將圖(三十六)和圖(三十七)合併後加上奈米銀的吸收波段(圖(三十九))得圖(四十一)，並合併圖(三十六)和圖(三十八)加上奈米銅的吸收波段(圖(四十))得圖(四十二)，其中奈米銀的吸收光譜之峰值在 405 奈米，而奈米銅的吸光峰值在 590 奈米，實驗得知 luminol 的放光峰值之波長在 456 奈米附近。奈米銀擁有更佳的增強發光效果除了可能產生更多氫氧自由基的因素外，可由奈米金屬螢光增強效應中的能量轉移效應(圖四)( YoonJeong et al., 2018)討論，能量轉移效應中提到當光譜重疊程度越大對螢光有愈顯著的增強，相較於奈米銅(590 奈米)，奈米銀(405 奈米)吸收光譜之峰值和 luminol 的放光峰值較接近，有更大的光譜重疊，因此展現出更好的螢光增強效應。

## 柒、結論

- 一、自製螢光裝置相較於光度計能蒐集更精確的發光強度數據。
- 二、未添加奈米金屬的組別中，我們得知以 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5% 雙氧水混合水溶液共 1.0ml 與 0.5ml 水組，加入 0.006M 赤血鹽水溶液 1.5ml 在 30°C 條件下有最大發光強度。
- 三、有添加奈米金屬的組別中，觀察到發光增強的現象，如以奈米金屬取代赤血鹽則無法發光，顯示其為增強劑而非催化劑，且以 0.023M luminol、0.499M 氫氧化鈉、和 0.5% 雙氧水混合水溶液共 1.0ml 與  $0.25 \times 10^{-10}$ M 奈米銀 0.5ml 組，加入 0.006M 赤血鹽水溶液 1.5ml 在 30°C 下有最大發光強度，而加入  $0.5 \times 10^{-10}$ M 奈米銅 0.5ml 組在 30°C 下效果次之。
- 四、在添加 D-甘露醇作為自由基抑制劑的實驗中，驗證氫氧自由基為奈米金屬增強發光的原因之一，此外奈米金屬螢光增強效應也為原因之一。
- 五、在分析奈米銀和奈米銅的吸收光譜與 luminol 的發射光譜之實驗中，奈米銀有最佳的增強發光效果且和 luminol 的光譜有較大重疊，實驗結果符合奈米金屬螢光增強效應中的能量轉移效應。

## 六、奈米金屬增強 luminol 發光的綜合整理



## 捌、展望

- 一、製備不同粒徑大小和形貌的奈米金屬，並探討對 luminol 發光現象的影響。
- 二、設計一可行實驗以 luminol 發光系統測量血氧和血糖濃度。
- 三、在不同的溶劑下探討奈米金屬對 luminol 發光現象的影響。
- 四、設計一實驗方法和裝置能精確收集到 luminol 的發光時間。
- 五、提出更加完整的機制說明自由基如何影響增強發光。
- 六、將發光增強的應用發揮在藥物和天然物分析上。

## 玖、參考文獻資料

1. 黃冠維、張原嘉(2018)。暗箱來找「茶」——利用自製暗箱偵測溶液的抗氧化能力。中華民國第 58 屆中小學科學展覽會。
2. 曾湜雯(2003)。利用 Luminol-Ferric/ferrocyanide 化學冷光系統對蔗糖的流動注射分析。國立中山大學化學研究所碩士論文。



3. 黃珮瑜(2020)。化學鍍法製備銅奈米島狀薄膜及其螢光增強特性分析。國立台灣師範大學化學系碩士論文。
4. 張家瑜(2019)。表面電漿現象及其應用。• 台中:東海大學化學系
5. YoonJeong, Yun-MinKook, KangwonLee, Won-GunKoh(2018).Metal Enhanced Fluorescence (MEF) for Biosensors: General Approaches and A Review of Recent Developments, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea
6. 魏廷伊、蘇玟萍、蔡佩汝、林慧宣(2009)。製備奈米銀之最佳條件與性質探討。中華民國第49屆中小學科學展覽會
7. 林翠郁(2005)。以化學還原法製備奈米銅粒子。國立清華大學博碩士論文全文系統。
8. 朱榮聰、丁永強(2000)。奈米氧化鐵粉末之製作。遠東學報第二十七卷第四期
9. A. Shokuhfar, S. Alibeigi, M.R. Vaezi<sup>2</sup> and S.K. Sadrnezhad (2008), Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Prepared by Various Surfactants and Studying their Characterizations.
10. Alina Karabchevsky, Ali Mosayyebi and Alexey V Kavokin(2016), Tuning the chemiluminescence of a luminol flow using plasmonic nanoparticles.
11. Bhagirath Ghimire, Geon Joon Lee, Sohail Mumtaz, and Eun Ha Choia(2018), Scavenging effects of ascorbic acid and mannitol on hydroxyl radicals generated inside water by an atmospheric pressure plasma jet.
12. D. Paramelle, A.Sadovoy, S. Gorelik, P. Free, J. Hogleya and D. G. Fernigb (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra.
13. Hao Chen, Feng Gao, Rong He, Daxiang Cui(2007). Chemiluminescence of luminol catalyzed by silver nanoparticles.
14. Nikhil V.Suramwar, Sanjay R.Thakare, Niraj T.Khaty(2012). One pot synthesis of copper nanoparticles at room temperature and its catalytic activity.