

利用一鍋水熱法合成的兩種配體金奈米團簇檢測鉛離子

江晨寧、黃博暉、胡焯淳*

國立臺東大學應用科學系

摘要

本研究使用蛋白質與硫醇來合成兩種配體金奈米團簇，並利用此金團簇檢測真實樣品中之鉛離子含量。經過調節 4-巰基苯基硼酸 (MPBA)、牛血清白蛋白 (BSA) 和氫氧化鈉 (NaOH) 的比例，可合成具有紅色螢光的金奈米團簇。與單配體之團簇相比，兩種配體的金奈米團簇可以更靈敏地檢測鉛離子。添加鉛離子後，團簇上之 MPBA 會與鉛離子產生吸引力，導致金奈米團簇之聚集，此聚集造成金團簇之螢光淬滅。利用加入鉛離子後金奈米團簇之螢光強度會明顯下降之特性檢測水樣中之鉛離子。研究結果顯示其線性範圍為 1 -30 μM ， R^2 為 0.998，偵測極限為 0.16 μM ，並可應用於實際水樣中的鉛離子檢測。

關鍵字: 金奈米團簇、兩種配體、牛血清白蛋白 (BSA)、4-巰基苯基硼酸 (MPBA)、鉛離子

江晨寧，國立臺東大學應用科學系學生。E-mail: lydia071979@gmail.com

黃博暉，國立臺東大學應用科學系學生。E-mail: crazy17935@gmail.com

胡焯淳(通訊作者)，國立臺東大學應用科學系教授。E-mail: cchu@nttu.edu.tw

One-pot hydrothermal synthesis of biligand gold nanoclusters for the detection of lead ions

Chen-Ning Jiang, Bo-Wei Huang, Cho-Chun Hu*

Department of Applied Science, National Taitung University.

Abstract

In this study, protein and thiol were used to synthesize biligand gold nanoclusters, and the gold nanocluster was used to detect the lead ion in the real samples. After adjusting the ratio of 4-mercaptophenylboronic acid (MPBA), bovine serum albumin (BSA) and sodium hydroxide (NaOH), gold nanoclusters with red fluorescence can be synthesized. Compared with the single ligand gold nanoclusters, our biligand gold nanoclusters can detect lead ions more sensitively. After the lead ion is added, the MPBA on the cluster will generate a new attraction with the lead ion. This attraction causes the aggregation of gold nanoclusters, and the quenching of fluorescence. This characteristic could be used to monitor the lead ions in water samples. The results exhibit that the linear range is 1-30 μM , R^2 is 0.998, and the detection limit is 0.16 μM . The sensor also could be applied to the detection of lead ions in the real water samples.

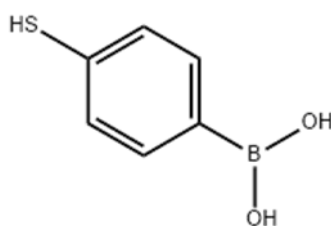
Keywords: gold nanocluster, Bi-ligand, Bovine Serum Albumin (BSA), lead ion, 4-mercaptophenylboronic acid (MPBA).

Chen-Ning Jiang, Department of Applied Science, National Taitung University, E-mail : lydia071979@gmail.com
Bo-Wei Huang, Department of Applied Science, National Taitung University, E-mail : crazy17935@gmail.com
Cho-Chun Hu, Department of Applied Science, National Taitung University, E-mail : cchu@nttu.edu.tw

壹、前言

奈米團簇通常為數十個金離子所組成，與奈米粒子不同，奈米團簇經過 UV 燈照射後 (Joseph & Geckeler, 2014)，會有不同的螢光特性。可能原因是量子效應所影響的，當材料大小在奈米等級時，會有重大的物理及化學性質的改變，能階狀態也會從連續轉變成不連續，因此經過 UV 燈的照射後，會有螢光的產生 (Peng et al., 2019; Yadav et al., 2020)。本研究中我們以 4-巰基苯硼酸 (4-mercaptophenylboronic acid, MPBA) 與牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 兩種配體來合成新型金奈米團簇，並利用此團簇成功開發出檢測出鉛離子的方法。以下先對此兩種配體以及檢驗之鉛元素進行介紹。

一、4-巰基苯硼酸 (4-mercaptophenylboronic acid, MPBA)



在包括材料科學、超分子化學、分析化學、醫學、生物學和催化在內的許多實際應用中，含有硼酸的化合物及其衍生物均具有廣泛的應用。4-MPBA 是典型的苯基硼酸衍生物。在有機合成、奈米粒子科學與工程中，它被廣泛用作起始材料，它還用於製備不同類型的葡萄糖感測器 (Su et al., 2017)。

二、牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA)

BSA 是牛血清中的一種球蛋白，包含 583 個胺基酸殘基，分子量 66.5 kDa，等電點為 4.7。牛血清白蛋白在生化實驗中有廣泛的應用。此蛋白質能夠攜帶金屬離子及脂肪酸，而其中的多肽能促進細胞增殖，對細胞增長有一定的作用。

三、鉛離子 (Lead ions)

鉛是一種具有毒性的元素，會影響神經系統，導致憂鬱和學習障礙。此外，它會累積在牙齒和骨骼中，會隨著時間的推移堆積在人體內，可以通過測量人體血清樣品中的血液進行評估。燃燒含鉛汽油、化石燃料、採礦和使用含鉛塗料，會釋放大量的含鉛廢物。此外，鉛最大的使用量來自於製造機動車輛的鉛酸電池，當其被不當丟棄時，其內的鉛容易在酸性自然環境中氧化成鉛離子，並滲入土壤，水甚至進入食物鏈中造成廣泛的污染 (Bhamore et al., 2020)。

貳、文獻探討

金屬奈米團簇的合成有許多方法，像是 DNA 或蛋白質的合成、聚合物模板的合成以及硫醇小分子的合成，下列將整理近幾年之相關研究。

2019 年由 Junwei Di 教授團隊以牛血清白蛋白為模板合成了平均粒徑為 1.5 nm 的 AuAg nano clusters (AuAg NCs)，激發在 470 nm，放射在 650 nm。隨著 Cys 濃度的增加，AuAg NCs 的螢光波長發生紅移。線性範圍在 2 μ M - 100 μ M 之間， $R^2 = 0.999$ ，LOD = 1.1 μ M。並將其成功應用於人體血漿中生物硫醇的檢測，其回收率在 93.40 % - 102.50

% 間，RSD 值小於 5 %。該方法的應用在藥物和臨床分析中具有廣闊的前景 (Feng, Chen, Feng, Yan, & Di, 2019)。

2020 年由 Tae Jung Park 教授團隊，利用 His 和 GSH 作為還原劑和保護劑，製備了平均粒徑為 2.2 nm 的亮綠色 GSH-AuNCs@His，激發在 420 nm，放射在 502 nm。隨著 Pb^{2+} 的增加，GSH-AuNCs@His 的螢光會跟著淬滅，平均粒徑會由 2.2 nm 增加到 7.25 nm，線性範圍在 0.005 - 1.0 μM 之間， $R^2=0.9853$ ，LOD = 1.0 nM。本篇利用 GSH-AuNCs@His 靈敏地檢測水樣中的 Pb^{2+} ，回收率在 98.63 % - 102.57 % 之間，RSD 值皆小於 1.98% (Bhamore et al., 2020)。

2021 年由 Jian Ling 和 Qiue Cao 教授團隊利用 L-methionine 當作保護劑，開發了一種添加 Ag (I) 來調節 Met-Au NCs 的放射和顏色的分析方法，激發為 424 nm，放射為 538 nm。隨著 Ag (I) 的增加，放射峰會從 538 nm 轉變為 590 nm，團簇的顏色會從黃綠色變為橙色。線性範圍在 18.0 μM - 210.0 μM 之間， $R^2=0.96$ ，LOD = 1.01 μM 。本篇 Met-Au NCs 成功應用於視覺檢測環境水樣中的 Ag (I)，回收率在 97.6 % - 101.1 % 之間，RSD 值皆小於 3.8 % (Y.-L. Hu et al., 2021)。

2021 年由 Chang Chun Hao 教授團隊利用 BSA 當保護劑，開發了平均粒徑為 3.7 nm 的 BSA-Au NCs 和平均粒徑為 4.93 nm 的 BSA-Cu NCs。BSA-Au NCs 的激發在 365 nm，放射在 616 nm，BSA-Au NCs 的激發在 320 nm，放射在 398 nm。隨著 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} 的增加，螢光強度會跟著降低， Cu^{2+} 的線性範圍在 0.1 - 1 μM ， $R^2=0.99536$ 和 1 - 5 μM ， $R^2=0.99853$ ，LOD = 23.4 nM。 Hg^{2+} 的線性範圍在 0.06 - 1 μM ， $R^2=0.99802$ 和 1 - 4 μM ， $R^2=0.998$ ，LOD = 19.4 nM。本篇利用 Au NCs/Cu NCs 來檢測水樣中的 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} ， Cu^{2+} 的回收率在 97.3 % - 105.57 %，RSD 值皆小於 0.46 %。 Hg^{2+} 的回收率在 97.6 % - 106.3 %，RSD 值皆小於 0.47 % (Zhong, Hao, Liu, Yang, & Sun, 2021)。

2021 年由 Jilin Yan 教授團隊利用 BSA 作為穩定劑和還原劑，合成出金銀奈米團簇來檢測多巴胺，平均粒徑為 3 nm，激發在 328 nm，放射分別在 440 nm 和 580 nm。隨著多巴胺的濃度增加，由於氧化還原的作用，螢光強度會跟著增加。多巴胺低濃度的線性範圍在 0.01 - 1.7 μM ， $R^2=0.99406$ ，LOD = 6.9 $nmol \cdot L^{-1}$ ；高濃度的線性範圍在 1.7 - 10 μM ， $R^2=0.99927$ 。本篇利用金銀奈米團簇來檢測人體血清樣品中的多巴胺，回收率為 96.5 % - 100.5 % (Zhou, Su, Tu, & Yan, 2021)。

由以上的文獻整理顯示利用金屬團簇檢驗樣品中之重金屬或有機小分子為一重要且熱門的研究主題。

參、研究方法

一、藥品與試劑

四氯金酸 (Chloroauric acid, $HAuCl_4 \cdot H_2O$) 其他金屬離子皆購自美國 Sigma 公司。磷酸 (H_3PO_4)、磷酸二氫鈉 (NaH_2PO_4)、磷酸氫二鈉 (Na_2HPO_4)、磷酸三鈉 (Na_3PO_4) 購自美國 Acros 公司。4-巰基苯硼酸 (4-mercaptophenylboronic acid, MPBA) 購自美國 Sigma。牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 購自美國 Sigma、氫氧化鈉 (NaOH) 購自 Honeywell。

二、儀器

螢光光譜儀 (RF-6000) 購自日本島津科學儀器股份有限公司。紫外光-可見光光譜儀 (U-2900) 購自日本 HITACHI。傅利葉轉換紅外線光譜儀 (FTIR) 購自品牌 Thermo Fisher Scientific。高速離心機 (3K30) 購自德國 Sigma。超純水製造機 (Purity-SP) 購自臺灣華夏科學有限公司。電子天平 (PX224) 購自 OHAUS。紫外燈 (Compact UV Lamps) 購自美國 UVP 公司。酸鹼指示計 (sp-701) 購自台灣 Suntex 公司。

三、金奈米團簇合成步驟

先將 10 mM 2 mL HAuCl₄ 與 50 mg/mL 2 mL BSA 混和於樣品瓶中，反應五分鐘後 (L. Hu et al., 2012)，再依序加入 10 mM 2 mL MPBA、0.2 M 1 mL NaOH、3 mL ddH₂O 置於樣品瓶內，反應完後將上述溶液在 70 °C 下加熱 2 hr 之後離心 10000 rpm 10 min 取上清液，得到紅色螢光團簇，並將其保存在 4 °C 冰箱中。

四、金奈米團簇金屬離子選擇性與遮蔽劑之選擇

在 2 mL 離心管中加入 1500 μL ddH₂O，pH = 7 磷酸緩衝溶液 (0.1M 200 μL)，金奈米團簇溶液 (100 μL)，之後加入不同的金屬離子溶液 (共 18 種 10⁻³ M 200 μL)，於搖晃機上反應 30 分鐘，上機檢測金奈米團簇 (λ_{ex} : 330 nm)。

將 200 μL 的 Pb²⁺ 和 Cu²⁺ 個別加入 200 μL 的甘胺酸 (Gly) 後，混和攪拌 15 分鐘，再加入 100 μL 的金奈米團簇、200 μL pH7 buffer 和 1300 μL ddH₂O，混和攪拌 30 分鐘後上機檢測 (Zhong et al., 2021)。

五、真實水樣檢測

真實水樣的自來水從實驗室外水龍頭流動五分鐘後取得，飲用水來自便利商店的市售瓶裝水。將 9.9 mL 真實水樣分別添加 100 μL 不同濃度之 Pb²⁺，通過 10000 rpm 離心 10 分鐘後，取上清液用 0.22 μm 的過濾膜過濾。將處理過後的真實水樣取 200 μL，加入含有 1500 μL 的 ddH₂O、200 μL 的 pH = 7 磷酸緩衝溶液 (0.1 M) 及 100 μL 的金奈米團簇溶液中，於搖晃機上反應 30 分鐘，上機檢測 (λ_{ex} : 330 nm)。

肆、結果與討論

結果與討論分為五段，其中包含金奈米團簇之基本性質鑑定、穩定性探討、選擇性、檢測 Pb²⁺ 之應用以及檢測 Pb²⁺ 之機制，以下分段說明本實驗之數據結果。

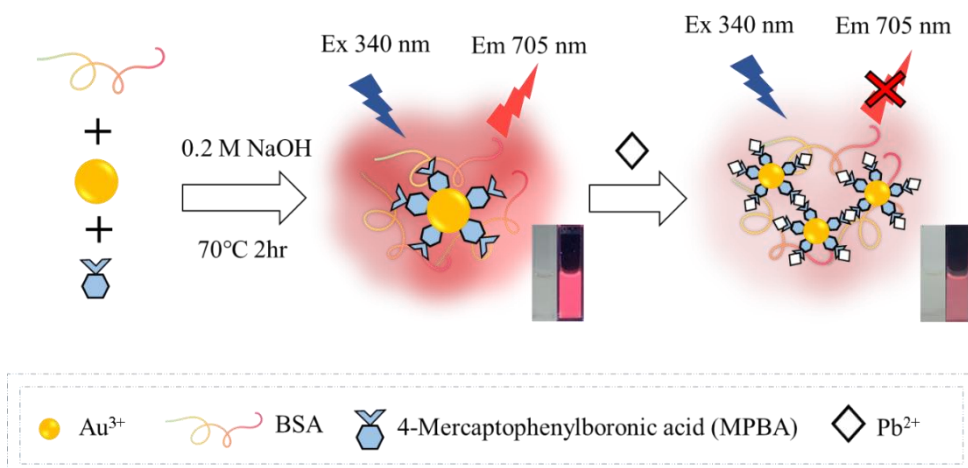
一、MPBA-BSA@AuNCs 基本性質鑑定

Scheme 1 為本篇機制圖，將 BSA、MPBA、HAuCl₄ 混合後，只需反應兩小時即能完成此探針。推測是金奈米團簇會先與 MPBA 上的硫醇接合，在加入鉛離子後，鉛離子會與 MPBA 上的 O-H 做反應，造成金奈米團簇的表面電荷減少，而使金奈米團簇產生聚集導致螢光之淬滅，因此加入 Pb²⁺ 後螢光強度會明顯的下降。

Figure 1 為 MPBA-BSA@AuNCs 之 UV-Vis 吸收光譜。在 280 nm 有一個特徵吸收峰，為蛋白質的吸收峰 (T. Li, Cheng, Cao, Jiang, & Fan, 2016)。在 330 nm 激發下，放射在 706 nm 有最好的螢光強度，會發出紅色螢光，因此本篇選擇 330 nm 作為最佳激發。圖中右上方的的小圖為可見光燈下的照片，為淡淡的黃色；在 UV 燈 (365 nm) 下則有強烈的紅色螢光。

從 FT-IR 圖可得知團簇上是否具有配位基之官能基。Figure 2 為 MPBA-BSA@AuNCs 的 FT-IR 圖，從 MPBA (Chen, Li, Chen, Huang, & Lou, 2016) (Yao et al., 2009) 和 BSA (Retnakumari et al., 2009) (Yu, Laromaine, & Roig, 2014) (Huang, Li, Hu, & Cui, 2010) 的 FT-IR 上可以發現在 $3200 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ 有 N-H 與 O-H 的伸縮振動，而在 2352 cm^{-1} 有 BSA 的 S-H 振動。但合成出 MPBA-BSA@AuNCs 卻不見 S-H 振動，表示有 Au-S 的形成。在 1655 cm^{-1} 可以發現與 BSA 相符的 C=O 的振動。單純 MPBA 粉末有一個 B-OH 峰，而在合成團簇後，在 1632.8 cm^{-1} 的峰消失了，文獻指出，硼酸會在鹼性下會逐漸水解成三個相鄰的 O-H 相關結構，而經過脫水過程逐漸形成酸酐(Su et al., 2017)，證實了 MPBA-BSA@AuNCs 有成功的合成出來。

XPS 圖可以得知團簇有哪些元素，Figure 3(a) 可以看到有 C、N、O、S、Au 的訊號峰，這些訊號峰並與 AuNCs 之前驅物符合。Figure 3(b) 為 Au $4f_{7/2}$ 與 Au $4f_{5/2}$ ，其鍵能分別是 84.0 eV 以及 87.7 eV 為 Au (0) (Ju et al., 2018) (Govindaraju, Ankireddy, Viswanath, Kim, & Yun, 2017)。Figure 3(c) 為 O 1s 譜，在 531.32 eV 有發現 C=O。Figure 3(d) 為 C 1s 譜，有三個峰為 284.88 eV 和 287.99 eV ，分別對應到 C-C 和 C=O (Ma et al., 2020)。Figure 3(e) 為 N 1s 譜，在 400.62 eV 有發現 N-H。



Scheme 1. The schematic illustration of the synthetic method of MPBA-BSA@AuNCs and detection of Pb^{2+} .

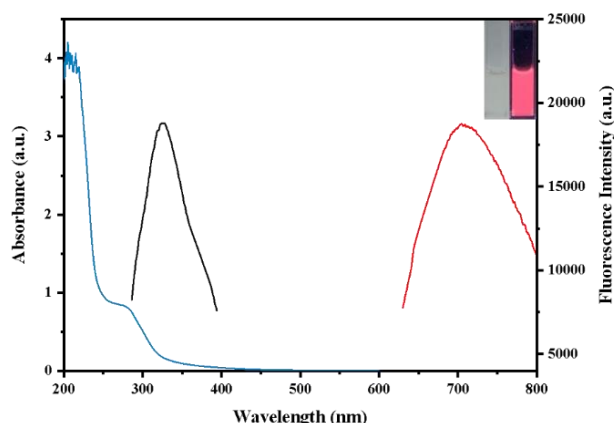


Figure 1. The UV-vis absorption (Abs, blue line), fluorescence excitation (Ex, black line) and emission (Em, red line) spectra of MPBA-BSA@AuNCs

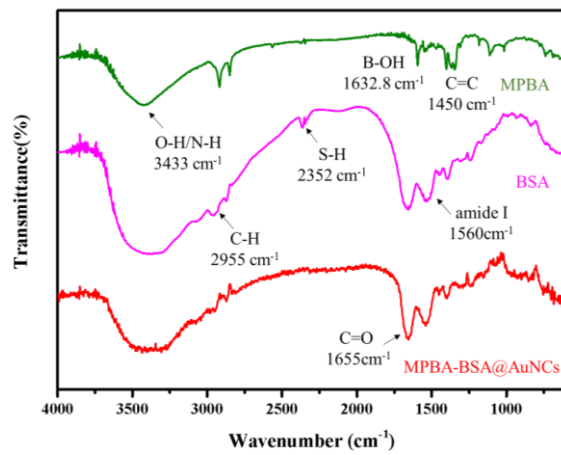


Figure 2. FT-IR spectra of MPBA , BSA, MPBA-BSA@AuNCs

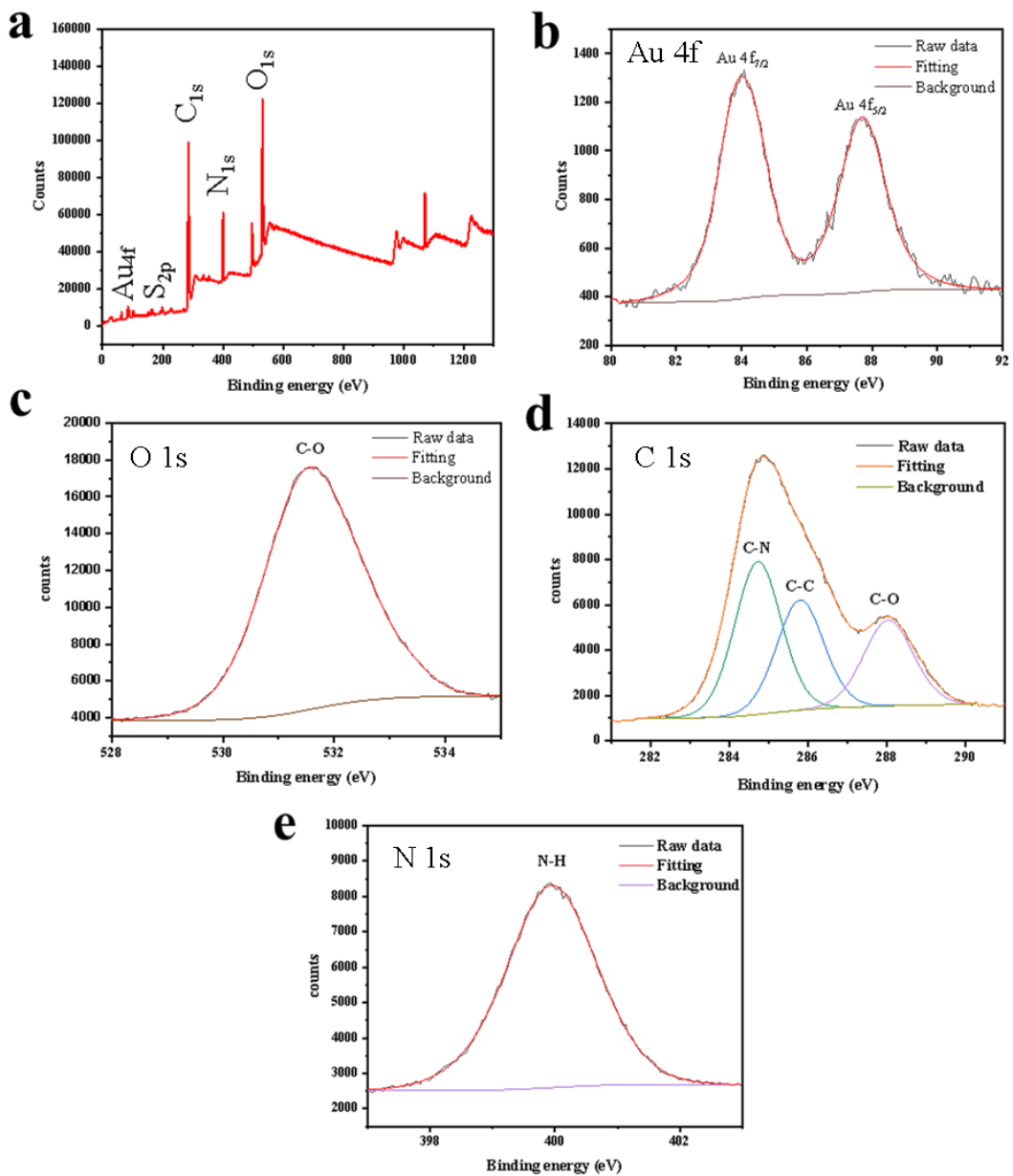


Figure 3. XPS survey of (a)MPBA-BSA@AuNCs (b)Au 4f (c)O 1s (d)C 1s (e)N 1s.

二、MPBA-BSA@AuNCs 穩定性探討

由於當 pH 值不同時，螢光強度會改變，因此需要調控 pH 值。Figure 4 可以看到，未加入 MPBA 的 BSA@AuNCs 螢光在 pH 7 – pH 11 下降了 38%，而 MPBA-BSA@AuNCs 下降了高達 55.9%，表示 MPBA 有成功合成上去，本篇最後選擇 pH 7 作為最佳條件。pH 4 和 pH 5 沒有做比較是由於牛血清白蛋白(BSA) 在等電點為 4.7 時，其溶解度很小，因此蛋白質分子會以兩性離子形式存在，此時蛋白質分子顆粒在溶液中會因為沒有相同電荷而互相排斥，導致分子之間的作用力減弱，因此在 pH 4 和 pH 5 時，顆粒極易碰撞、凝聚而產生沉澱，導致螢光值不準確。

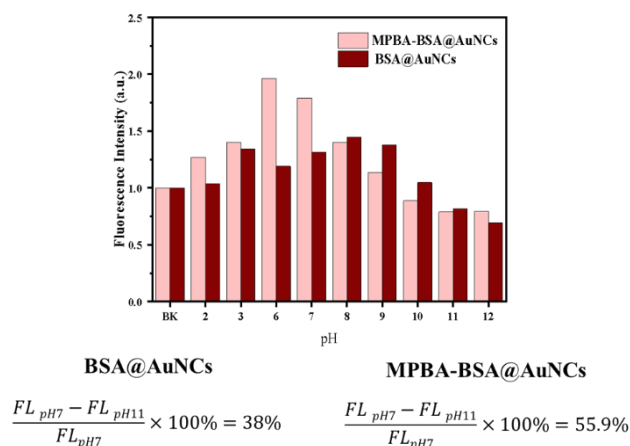


Figure 4. Fluorescence intensity changes of BSA@AuNCs and MPBA-BSA@AuNCs at different pH.

為了得知 MPBA-BSA@AuNCs 的穩定性，探討了存放的穩定性、耐鹽性以及光穩定性，本篇測了以下數據。Figure 5(a) 可以看到團簇在 4°C 冰箱下放置 7 天後螢光強度皆不會改變。Figure 5(b) 表示，在加入 0.05 M- 1 M NaCl 後，螢光也不會受到干擾，具有良好的鹽類耐受性，可知本研究所開發之探針可應用於高離子強度之樣品中，如環境樣品或生物樣品。而 Figure 5(c) 可以看到，團簇在照射紫外光 60 分鐘內，螢光強度變化很小。因此可以得知本探針能放置至少一星期的時間，節省材料的耗損，並且可適用於高離子強度的實際樣品中測定，且對紫外光具有良好之耐受度。

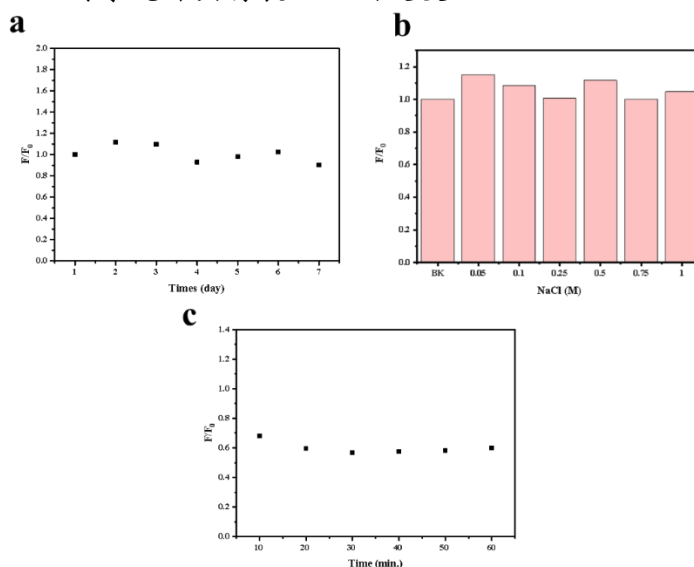


Figure 5. (a) The fluorescence stability MPBA-BSA@AuNCs in 7 days. (b) Effect of the concentration of NaCl on the MPBA-BSA@AuNCs. (c) Light stability of MPBA-BSA@AuNCs

三、MPBA-BSA@AuNCs 對金屬離子之選擇性

(一)金屬離子選擇性

Figure 6 為 MPBA-BSA@AuNCs 及 BSA@AuNCs 的金屬選擇性，可以看到在眾多金屬中，能有效的檢測 Pb^{2+} 與 Cu^{2+} ，但由於 Pb^{2+} 毒性較高，因此本篇選擇檢測 Pb^{2+} ，並且後面也有使用遮蔽劑來遮蔽 Cu^{2+} 的干擾。

Figure 7 可以看到 MPBA-BSA@AuNCs 加入 Pb^{2+} 後，可以淬滅高達 78%，而 BSA@AuNCs 加入 Pb^{2+} 後只能淬滅 40%。相比之下，MPBA-BSA@AuNCs 檢測 Pb^{2+} 的靈敏度高於 BSA@AuNCs 許多。原因推測是金奈米團簇表面的 MPBA 與鉛離子作用之後，會造成金奈米團簇的表面電荷減少，使金奈米團簇產生聚集的現象。

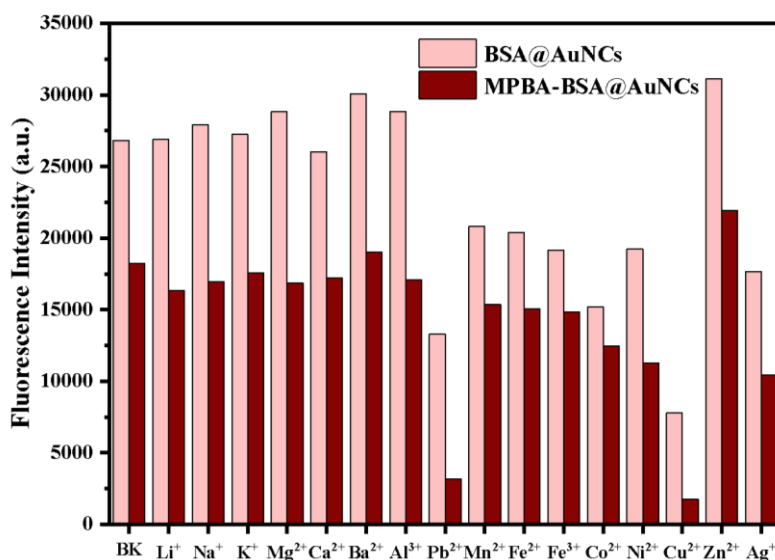


Figure 6. The selectivity of the BSA@AuNCs and MPBA-BSA@AuNCs to different metal ions.

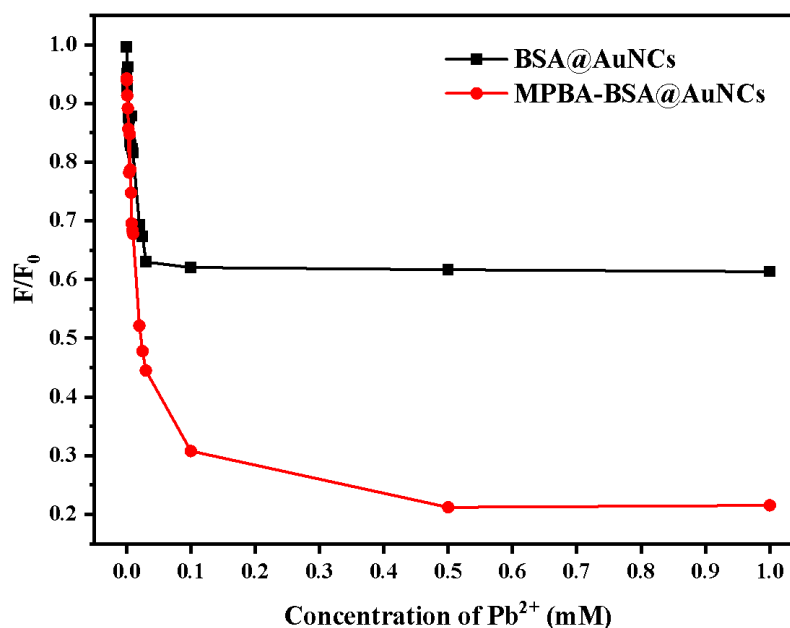


Figure 7. Fluorescence emission spectra of BSA@AuNCs and MPBA-BSA@AuNCs with Pb^{2+} in the concentration range of 0.001 mM - 1 mM.

(二) 遮蔽劑

由於 Pb^{2+} 的毒性相較於 Cu^{2+} 來的高，因此本篇選擇檢測 Pb^{2+} ，所以需要利用遮蔽劑來遮蔽 Cu^{2+} ，以便我們檢測 Pb^{2+} 。如 Figure 8，使用甘胺酸 (Gly) 當作遮蔽劑來遮蔽 Cu^{2+} ，加入甘胺酸 (Gly) 後， Cu^{2+} 的螢光會回升至 68%，因此檢測 Pb^{2+} 時可以加入甘胺酸 (Gly) 來遮蔽掉 Cu^{2+} 的干擾。

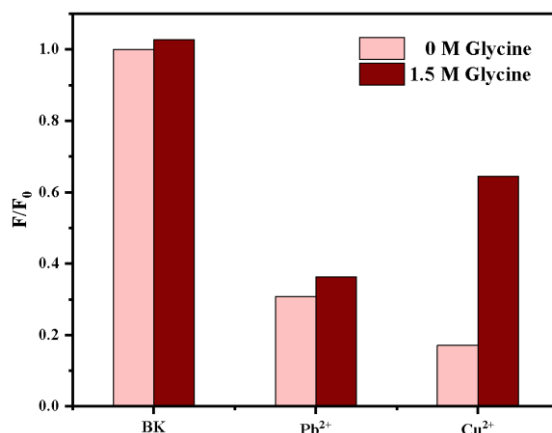


Figure 8. Fluorescence responses of the MPBA-BSA@AuNCs to Pb^{2+} and Cu^{2+} in the presence and absence of Glycine.

四、MPBA-BSA@AuNCs 檢測 Pb^{2+} 之應用

如 Figure 9(a) 在激發 330 nm，放射 705 nm 下，檢測了加入不同濃度 Pb^{2+} 的螢光強度，隨著 Pb^{2+} 的濃度上升，螢光會跟著淬滅。Figure 9(b) 所示，最終濃度在 $1\mu\text{M}$ - $30\mu\text{M}$ 會有最好的線性範圍，利用方程式 $y = -289970.5x + 18046.6$ 算出 $R^2 = 0.998$ ，並且用 3 倍標準偏差與線性斜率的比值 ($\frac{3\sigma}{k}$) 來計算，LOD 為 $0.16\mu\text{M}$ 。此探針合成方便、快速，並且可以從 Table 1 看到，相較於其他文獻，本篇的偵測極限最低，可以在極短的時間內靈敏的檢測 Pb^{2+} ，表明合成之探針對於 Pb^{2+} 具有良好的檢測能力。Table 2 為利用合成之 MPBA-BSA@AuNCs 來檢測自來水及飲用水中的 Pb^{2+} 濃度。實驗結果所示，RSD 值皆小於 4.8%，回收率介於 95.6% - 102.8%，從 RSD 值與回收率能看到，本研究所開發之探針在實際水樣中也有良好的檢測能力。

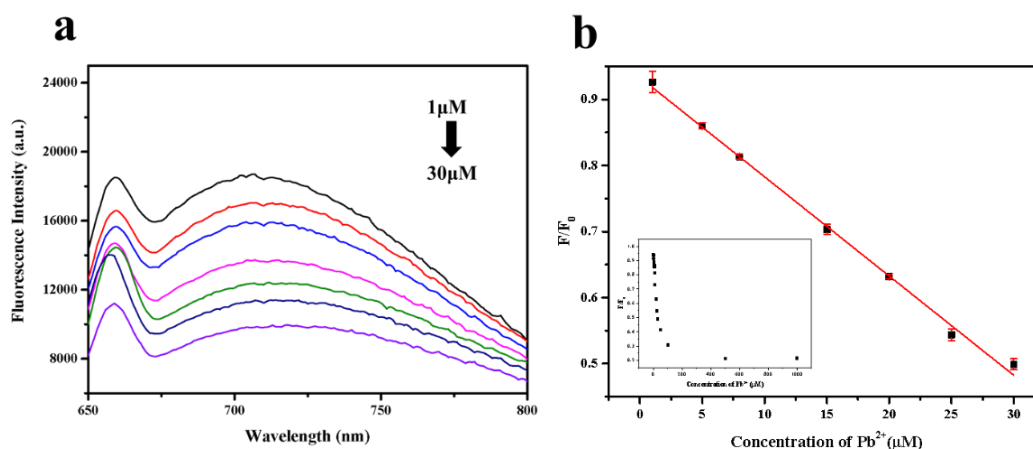


Figure 9. Fluorescence emission spectra of MPBA-BSA@AuNCs with different concentrations of Pb^{2+} (λ_{ex} : 330 nm) (b) Plot of fluorescence intensity versus Pb^{2+} concentration in the range of $1\mu\text{M}$ - $30\mu\text{M}$.

Table 1. Comparison proposed method with other analytical methods for Pb²⁺ detection.

Probe	Liner range	LOD	References
BD-NCD	1 μM - 22.5 μM	1.34 μM	(Nurhayati, Juang, Hu, & Muniyadi, 2015)
Chit-CNT	1.9 μM - 11.2 μM	1.8 μM	(Xiao, Rowe, & Plaxco, 2007)
PVA/AgNPs	0.03 M - 30 M	3 M	(Shrivastava, Jain, Kumar, Jain, & Nagpal, 2021)
PVA/chitosan	3 mM - 150 mM	0.15 mM	(Nguyen et al., 2021)
SPGE-AuNPs	0.06 M - 0.6 M	6.6 mM	(Wan et al., 2015)
Nafion-graphene	1.5 mM - 150 mM	0.06 mM	(J. Li, Guo, Zhai, & Wang, 2009)
RGO/Bi nanocomposite	0.06 M - 0.36 M	1.7 mM	(Sahoo et al., 2013)
BiOCl/MWCNT	15 mM - 150 mM	1.7 mM	(Cerovac et al., 2015)
MPBA-BSA@AuNCs	1 μM - 30 μM	0.16 μM	This work

Table 2. Analytical results of Pb²⁺ in real sample. (n = 3).

Sample	Add (μM)	Found (μM)	Recovery (%)	RSD (%)
Drink water	10.0	10.3	102.8	3.2
	20.0	2.0	100.0	1.4
	30.0	29.9	99.9	1.6
Tap water	10.0	9.7	97.8	4.8
	20.0	19.1	95.6	4.2
	30.0	30.3	101.1	1.0

五、MPBA-BSA@AuNCs 加 Pb²⁺之機制探討

從 TEM 以及 Zeta 電位能看出團簇會發生聚集的現象，Figure 10(a) 為 MPBA-BSA@AuNCs 的 TEM 圖，Figure 10(b) 為 MPBA-BSA@AuNCs 加入 Pb²⁺ 後的 TEM 圖。可以看到原本團簇的平均粒徑為 4.1 nm，在加入 Pb²⁺ 後平均粒徑變為 6.1 nm，表示有聚集的發生。Figure 11(a) MPBA-BSA@AuNCs 的 Zeta 為 -18.9 mV，Figure 11(b) 可以看到 MPBA-BSA@AuNCs 在加入 Pb²⁺ 後，Zeta 變為 -0.4 mV。Zeta 電位表示對顆粒之間相互排斥或吸引力的強度，分子或分散粒子越小，Zeta 電位的絕對值（正或負）越高，反之，Zeta 電位的絕對值（正或負）越低，越傾向於聚集，即吸引力超過了排斥力，由此也能證明加入 Pb²⁺ 後會有聚集的現象，這與 TEM 的平均粒徑是符合的。因此本篇推測，Pb²⁺ 會與 MPBA 產生反應，造成金奈米團簇的表面電荷減少，使金奈米團簇聚集而導致淬滅。

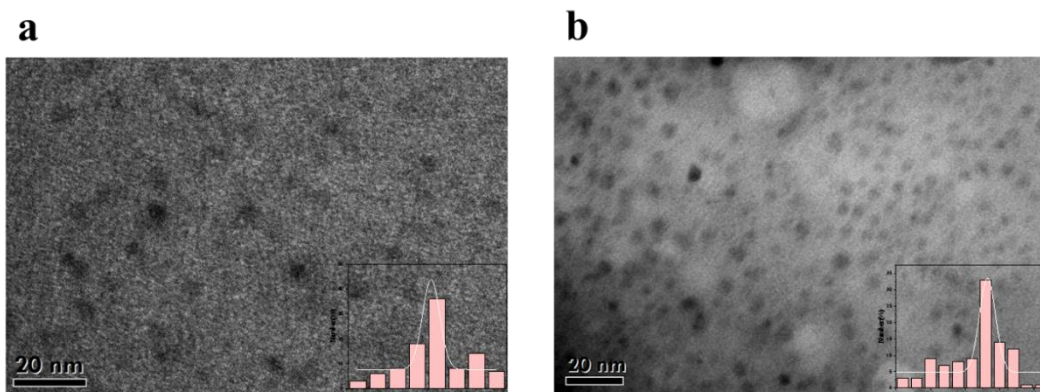


Figure 10. TEM image of the synthesized (a)MPBA-BSA@AuNCs (b)MPBA-BSA@AuNCs with Pb^{2+} .

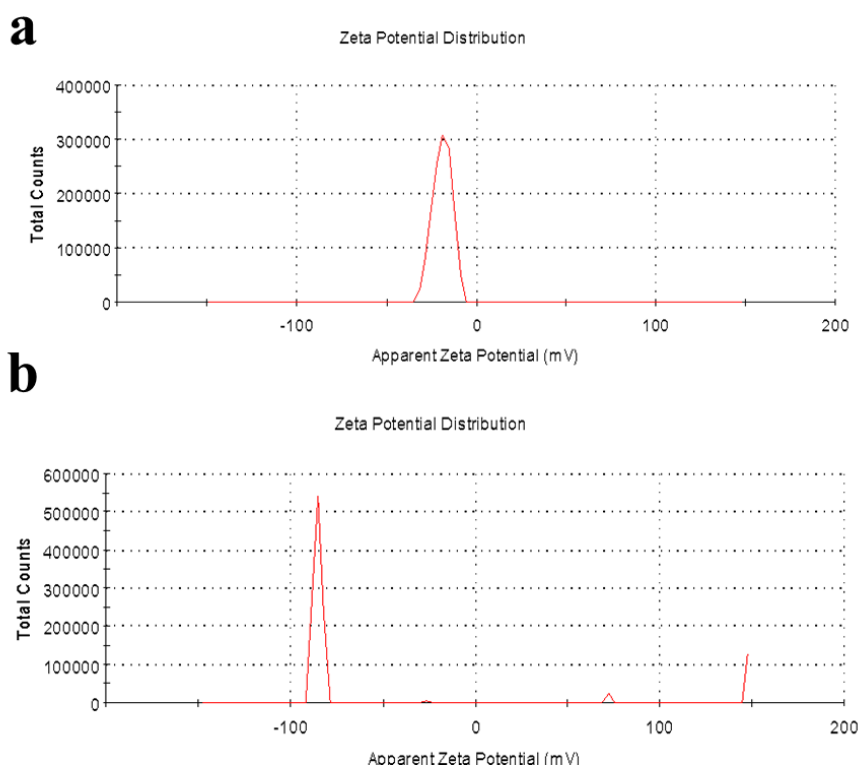


Figure 11. Zeta potential measurements of (a) MPBA-BSA@AuNCs (b) MPBA-BSA@AuNCs with Pb^{2+} .

伍、結論

本篇使用 4-巰基苯硼酸 (MPBA) 及牛血清白蛋白 (BSA) 來合成兩種配體金奈米團簇，製備過程簡單、快速。所得之金奈米團簇平均粒徑為 4.1 nm，激發在 330 nm，放射在 706 nm。在 10 mM MPBA、50 mg/mL BSA、0.2 M NaOH 這些條件下會有最好的螢光，並且有良好的耐鹽性、光穩定性及螢光穩定性。由於 Pb^{2+} 的毒性比 Cu^{2+} 更強，因此本篇選擇檢測 Pb^{2+} 。而此兩種配體團簇相較於單配體團簇來檢測 Pb^{2+} 具有更加靈敏的優勢。加入 Pb^{2+} 後，由 TEM 測得之團簇的平均粒徑增加為 6.1 nm，推測是由於金奈米團簇上的 MPBA 會與鉛離子作用，而使金奈米團簇產生聚集誘導淬滅。隨著 Pb^{2+} 的濃度上升，螢光會跟著淬滅。檢測 Pb^{2+} 的線性範圍在 1 μ M - 30 μ M， $R^2 = 0.998$ ， $LOD = 0.16$ μ M。 Pb^{2+} 在真實水樣中的 RSD 值皆小於 4.8 %，回收率介於 95.6 % - 102.8 %，相較於其他文獻，本篇的偵測極限最低，表明合成之探針對於 Pb^{2+} 具有良好的檢測能力。

陸、參考文獻

- Bhamore, J. R., Gul, A. R., Chae, W.-S., Kim, K.-W., Lee, J. S., Park, H., . . . Park, T. J. (2020). One-pot fabrication of amino acid and peptide stabilized gold nanoclusters for the measurement of the lead in plasma samples using chemically modified cellulose paper. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 322, 128603. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128603>
- Cerovac, S., Guzsvány, V., Kónya, Z., Ashrafi, A. M., Švancara, I., Rončević, S., Vytřas, K. (2015). Trace level voltammetric determination of lead and cadmium in sediment pore water by a bismuth-oxychloride particle-multiwalled carbon nanotube composite modified glassy carbon electrode. *Talanta*, 134, 640-649. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.002>
- Chen, G., Li, Y., Chen, Y., Huang, L., & Lou, B. (2016). Creating BHb-Imprinted core-shell magnetic nanoparticles with Multi Binding Sites. *The Analyst*, 142. doi:10.1039/C6AN02121B
- Feng, T., Chen, Y., Feng, B., Yan, J., & Di, J. (2019). Fluorescence red-shift of gold-silver nanoclusters upon interaction with cysteine and its application. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 206, 97-103. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.07.087>
- Goswami, N., Giri, A., Bootharaju, M. S., Xavier, P. L., Pradeep, T., & Pal, S. K. (2011). Copper Quantum Clusters in Protein Matrix: Potential Sensor of Pb²⁺ Ion. *Analytical Chemistry*, 83(24), 9676-9680. doi:10.1021/ac202610e
- Govindaraju, S., Ankireddy, S. R., Viswanath, B., Kim, J., & Yun, K. (2017). Fluorescent Gold Nanoclusters for Selective Detection of Dopamine in Cerebrospinal fluid. *Scientific Reports*, 7(1), 40298. doi:10.1038/srep40298
- Hu, L., Han, S., Parveen, S., Yuan, Y., Zhang, L., & Xu, G. (2012). Highly sensitive fluorescent detection of trypsin based on BSA-stabilized gold nanoclusters. *Biosensors and Bioelectronics*, 32(1), 297-299. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.12.007>
- Hu, Y.-L., Liu, A.-Y., Wu, B.-C., Zhao, R.-X., Pu, Z.-F., Ling, J., & Cao, Q. (2021). Modulating fluorescence emission of l-methionine-stabilized Au nanoclusters from green to red and its application for visual detection of silver ion. *Microchemical Journal*, 166, 106198. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106198>
- Huang, P., Li, Z., Hu, H., & Cui, D. (2010). Synthesis and Characterization of Bovine Serum Albumin-Conjugated Copper Sulfide Nanocomposites. *Journal of Nanomaterials*, 2010, 641545. doi:10.1155/2010/641545
- Joseph, D., & Geckeler, K. E. (2014). Synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters using egg white proteins. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 115, 46-50. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.11.017
- Ju, Y. J., Li, N., Liu, S. G., Han, L., Xiao, N., Luo, H. Q., & Li, N. B. (2018). Ratiometric fluorescence method for malachite green detection based on dual-emission BSA-protected gold nanoclusters. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 275, 244-250. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.08.052>

- Li, J., Guo, S., Zhai, Y., & Wang, E. (2009). High-sensitivity determination of lead and cadmium based on the Nafion-graphene composite film. *Analytica Chimica Acta*, 649(2), 196-201. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.030>
- Li, T., Cheng, Z., Cao, L., Jiang, X., & Fan, L. (2016). Data of fluorescence, UV-vis absorption and FTIR spectra for the study of interaction between two food colourants and BSA. *Data in Brief*, 8, 755-783. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.06.025>
- Li, W., Hu, X., Li, Q., Shi, Y., Zhai, X., Xu, Y., . . . Kang, S. (2020). Copper nanoclusters @ nitrogen-doped carbon quantum dots-based ratiometric fluorescence probe for lead (II) ions detection in porphyra. *Food Chemistry*, 320, 126623. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126623>
- Ma, X., Li, S., Hessel, V., Lin, L., Meskers, S., & Gallucci, F. (2020). Synthesis of N-doped carbon dots via a microplasma process. *Chemical Engineering Science*, 220, 115648. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.115648>
- Nguyen, L. D., Doan, T. C. D., Huynh, T. M., Nguyen, V. N. P., Dinh, H. H., Dang, D. M. T., & Dang, C. M. (2021). An electrochemical sensor based on polyvinyl alcohol/chitosan-thermally reduced graphene composite modified glassy carbon electrode for sensitive voltammetric detection of lead. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 345, 130443. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130443>
- Nurhayati, E., Juang, Y., Hu, C.-C., & Muniyadi, R. (2015). Effects of dynamic polarization on boron-doped NCD properties and on its performance for electrochemical-analysis of Pb (II), Cu (II) and Hg (II) in aqueous solution via direct LSV. *Separation and Purification Technology*, 156. doi:10.1016/j.seppur.2015.07.022
- Peng, H., Huang, Z., Wu, W., Liu, M., Huang, K., Yang, Y., . . . Chen, W. (2019). Versatile High-Performance Electrochemiluminescence ELISA Platform Based on a Gold Nanocluster Probe. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(27), 24812-24819. doi:10.1021/acsami.9b08819
- Retnakumari, A., Setua, S., Menon, D., Prasanth, R., Madathumpady Abubaker, H. M., Thalappil, P., . . . Koyakutty, M. (2009). Molecular-receptor-specific, non-toxic, near-infrared-emitting Au cluster-protein nanoconjugates for targeted cancer imaging. *Nanotechnology*, 21, 055103. doi:10.1088/0957-4484/21/5/055103
- Sahoo, P. K., Panigrahy, B., Sahoo, S., Satpati, A. K., Li, D., & Bahadur, D. (2013). In situ synthesis and properties of reduced graphene oxide/Bi nanocomposites: As an electroactive material for analysis of heavy metals. *Biosensors and Bioelectronics*, 43, 293-296. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.031>
- Shrivastava, P., Jain, S. K., Kumar, N., Jain, V. K., & Nagpal, S. (2021). Handheld device for rapid detection of lead (Pb²⁺) in gunshot residue for forensic application. *Microchemical Journal*, 165, 106186. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106186>
- Su, H., Wang, Y., Yu, Z., Liu, Y., Zhang, X., Wang, X., . . . Zhao, B. (2017). Surface-enhanced Raman spectroscopy study on the structure changes of 4-Mercaptophenylboronic Acid under different pH conditions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 336-342. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.068>

- Wan, H., Sun, Q., Li, H., Sun, F., Hu, N., & Wang, P. (2015). Screen-printed gold electrode with gold nanoparticles modification for simultaneous electrochemical determination of lead and copper. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209, 336-342. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.127>
- Xiao, Y., Rowe, A. A., & Plaxco, K. W. (2007). Electrochemical Detection of Parts-Per-Billion Lead via an Electrode-Bound DNzyme Assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 129(2), 262-263. doi:10.1021/ja067278x
- Yadav, A., Verma, N. C., Rao, C., Mishra, P. M., Jaiswal, A., & Nandi, C. K. (2020). Bovine Serum Albumin-Conjugated Red Emissive Gold Nanocluster as a Fluorescent Nanoprobe for Super-resolution Microscopy. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 11(14), 5741-5748. doi:10.1021/acs.jpcllett.0c01354
- Yao, G., Zhang, H., Deng, C., Lu, H., Zhang, X., & Yang, P. (2009). Facile synthesis of 4-mercaptophenylboronic acid functionalized gold nanoparticles for selective enrichment of glycopeptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 23(22), 3493-3500. doi:10.1002/rcm.4258
- Yu, S.-M., Laromaine, A., & Roig, A. (2014). Enhanced stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biological media using a pH adjusted-BSA adsorption protocol. *Journal of Nanoparticle Research*, 16. doi:10.1007/s11051-014-2484-1
- Zhong, K., Hao, C., Liu, H., Yang, H., & Sun, R. (2021). Synthesis of dual-emissive ratiometric probe of BSA-Au NCs and BSA-Cu NCs and their sensitive and selective detection of copper and mercury ions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 408, 113100. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.113100>
- Zhou, T., Su, Z., Tu, Y., & Yan, J. (2021). Determination of dopamine based on its enhancement of gold-silver nanocluster fluorescence. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 252, 119519. doi:<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119519>