

## [ 研究成果報導 ]

## 汞離子奈米感測器之開發與應用

台灣大學化學系 張煥宗 林泱蔚 黃志清

## 一、前言

汞污染不但會造成生態環境的破壞，直接或間接地也會影響人類健康。自然界主要的含汞原礦為本底辰砂及其多晶體偏辰砂[1,2]。在風化作用下，汞以固體微粒形態進入環境。在人為汞污染方面，水中的汞污染主要來自氯鹼、塑膠、電池和電子工業排放的廢水；使用含汞的農藥或肥料則造成土壤污染；大氣中的汞污染，則來自垃圾焚化爐、燃煤發電廠等。汞離子進入人體後，藉由 Hg-S 鍵與體細胞之物質結合，而影響蛋白質及/或酵素功能性，進而造成腎臟、神經系統麻痺，甚至畸形兒童等病變 [3,4]。有鑒於汞的毒性與對人體的危害，其感測器的開發是刻不容緩的。

原子吸收/放射光譜 (atomic absorption/emission spectroscopy)、冷原子螢光光譜 (cold vapor atomic fluorescence spectroscopy) 和感應耦合電漿質譜 (inductively coupled plasma-mass spectrometry) 為目前測量重金屬含量主要技術 [5]，但受限於造價昂貴、樣品處理複雜、不適合及時分析等缺點。利用有機小分子 [6]、DNA 酵素 [7]、蛋白質 [8] 與核甘酸 [9] 等開發而成之化學感測器已陸續被應用於重金屬汞離子之偵測，然而這些化學感測器受限於水溶性、選擇性、靈敏度與其它物質干擾等限制，因此其被應用於定量真實樣品如湖水、土壤、電池與生物樣品中汞離子濃度的成功例子相當有限。

奈米感測器已廣泛被應用偵測生物大分子及有機小分子 [10,11]。近來，用於檢測溶液中金屬含量之應用也漸漸受到重視。金奈米粒子 (gold nanoparticles, Au NPs) 是目前受歡迎奈米材料之一，因其具備生物安全性、穩定性、特殊光學活性、高的表面電漿共振 (surface plasmon resonance, SPR) 吸收係數 ( $10^8-10^{10} \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ )、消光 (quenching) 及表面易於被辨識分子修飾 (和硫醇

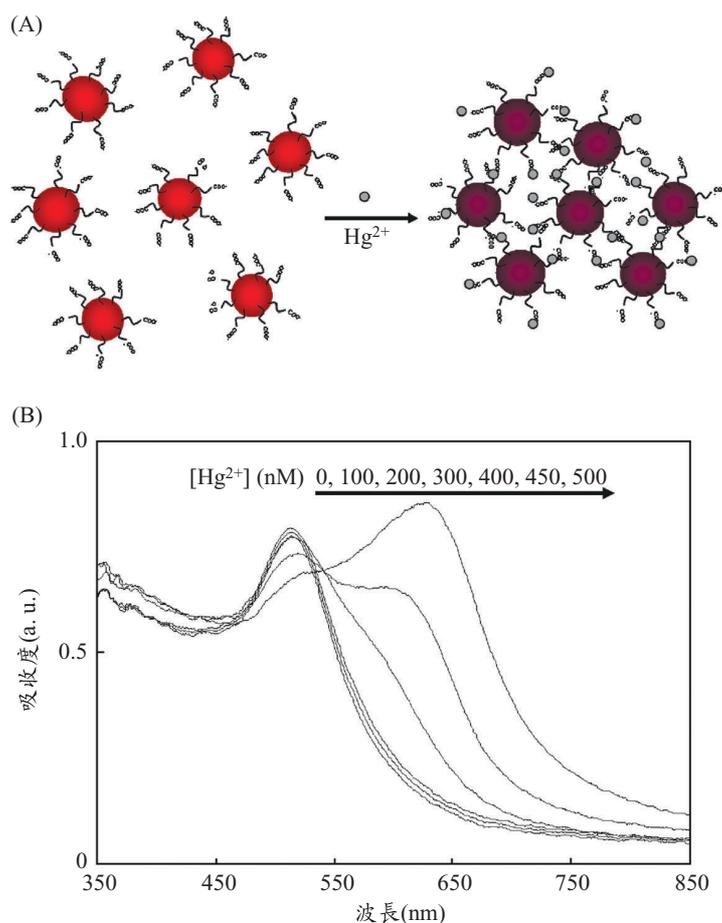
分子間有較強的 Au-S 作用力) 等優勢。近年來，我們已開發許多以金為主之奈米感測器 [12-17]，並利用於湖水和電池等實際樣品中汞含量之偵測。另外，我們也提出未經修飾之特殊 DNA 序列的觀念來偵測汞離子。

## 二、汞離子感測器

我們以 Au NPs 所開發之汞離子感測器，主要利用其三種特性：(1) 當汞離子和 Au NPs 所修飾之辨識分子作用時，造成 Au NPs 交聯聚集而產生表面電漿共振吸收峰變化，即聚集時會造成表面電漿共振吸收峰發生紅位移現象，可直接藉由肉眼觀測溶液顏色改變。(2) 是利用 Au NPs 之高消光特色，即藉由 Au NPs 具有較大的表面電漿共振吸收係數結合螢光共振能量轉移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 之機制來偵測汞離子。(3) 利用螢光金奈米粒子 (fluorescent Au nanodots,  $F_{\text{AuNDs}}$ ) 與汞離子結合後，由螢光變化來偵測汞離子。

由於羧酸基 (carboxylate) 和重金屬 (鉛、鎘、汞離子等) 皆有不錯的鍵結能力，因此將 3-巰基丙酸 (3-mercaptopropionic acid, MPA) 修飾在 13-nm Au NPs (MPA-Au NPs) 上後，當溶液中含這些重金屬離子時，便會使 MPA-Au NPs 因交聯產生聚集並造成顏色變化 (由酒紅色轉變為藍紫色)。為了增加此金奈米感測器對汞離子之選擇性，於溶液中加入和汞離子有較強鍵結之 2,6-吡啶二甲酸試劑 (2,6-pyridinedicarboxylic acid, PDCA)。由於 PDCA 和汞離子之結合常數高達  $10^{20,28}$ ，因此我們可以藉由此方式，除去鉛及鎘離子之干擾，達到對汞離子具專一性之偵測，其偵測極限 (limit of detection; LOD) 為 100 nM (圖一) [12]。

利用 Au NPs 之強消光特性結合螢光共振能量轉移之機制，亦可開發高靈敏度之感測器。當染料鹽基桃紅精 (rhodamine B, RB) 吸附於 Au



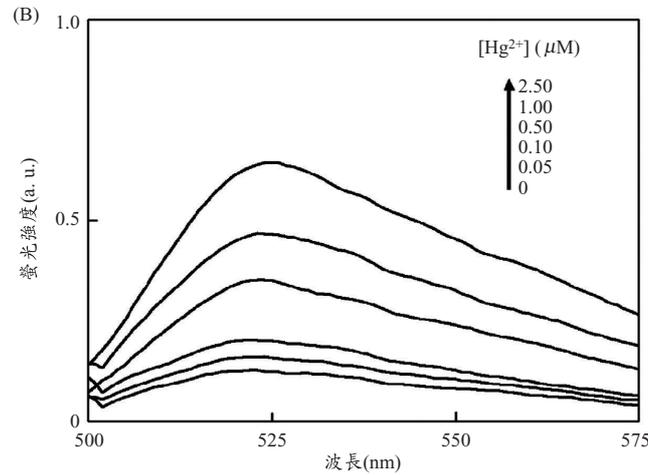
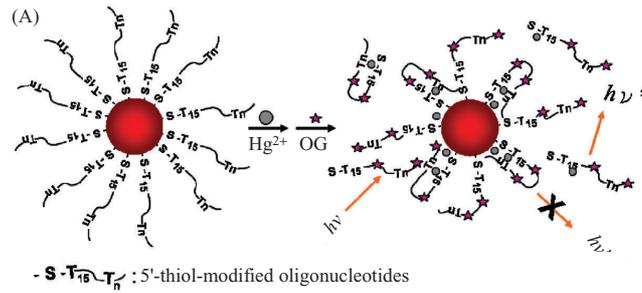
圖一 (A) 利用 MPA-Au NPs 以吸收光譜法偵測汞離子之機制圖。(B) 汞離子濃度對 MPA-Au NPs 吸收圖譜之變化

NP 表面 (RB-Au NPs) 時，由於螢光完全被 Au NPs 消光，因此並無螢光產生。溶液中汞離子會取代 Au NPs 表面的 RB 並使其螢光增加。在 PDCA 存在下，利用 RB-Au NPs 可選擇性測得濃度低至 10 nM 的汞離子。應用於真實樣品水銀電池的定量上也得到高度之準確性；和 ICP-MS 測定值比較，F-測試值小於 1.6 [13]。

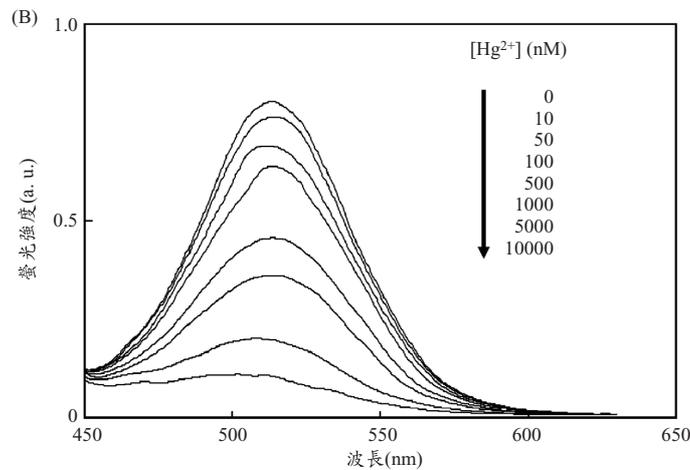
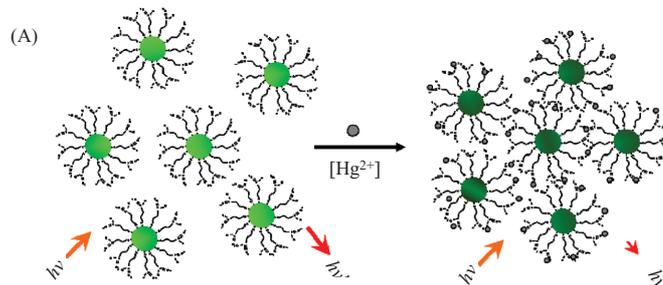
我們將具有硫醇官能基之特殊 DNA 序列修飾於 Au NPs 表面，在含有染料分子(Oli Green, OG)存在下，由於 OG-DNA 螢光完全被 Au NPs 消光，因此無法偵測到染料分子之螢光。溶液中汞離子藉由 T-Hg<sup>2+</sup>-T 作用力和 DNA 作用，會讓 Au NPs 表面之部分 DNA 脫附至溶液中，造成螢光變強。OG-DNA 螢光強度與汞離子濃度 (0.05–2.5 μM) 呈線性關性，其 LOD 為 25 nM (圖二)。應用於湖水的定量上，其回收率高達 96-102%，證明此 Au NP 感測器具備高靈敏度及低基質干擾之優勢 [14]。

此外，利用 11- 巰基十一酸 (11-mercaptoundecanoic acid) 修飾 F<sub>AuNDs</sub> (11-MUA-F<sub>AuNDs</sub>) 與汞離子結合聚集後螢光下降之特性，亦可開發出另一種汞離子感測器。在 PDCA 存在下，11-MUA-F<sub>AuNDs</sub> 藉由羧酸基和汞離子作用，致使聚集產生，而產生螢光下降。伴隨著汞離子濃度之增加，11-MUA-F<sub>AuNDs</sub> 產生聚集程度增加而使螢光逐漸下降，其 LOD 為 5 nM (圖三)。利用標準添加法，我們可測得湖水中之汞金屬離子含量為 3.49 ppb (ICP-MS 定量為 3.20 ppb)，回收率為 95-98% [15]。雖 11-MUA-F<sub>AuNDs</sub> 之螢光量子產率 (< 4%) 較一般半導體量子點低，但其具低毒性、易於合成及修飾上辨識分子等特性，故其在分析 (尤其是生物分析) 應用方面具有極高之潛力。

當待測溶液中汞離子與 poly T<sub>33</sub> ss-DNA 藉由 T-Hg<sup>2+</sup>-T 作用而結合後，會使 DNA 構形改變並降低其對 Au NPs 保護能力，故在較高鹽類 (如



圖二 (A)利用特殊 DNA 序列修飾於 Au NPs 以螢光光譜法偵測汞離子之機制圖。(B) 汞離子濃度對 OG-DNA 之螢光圖譜變化



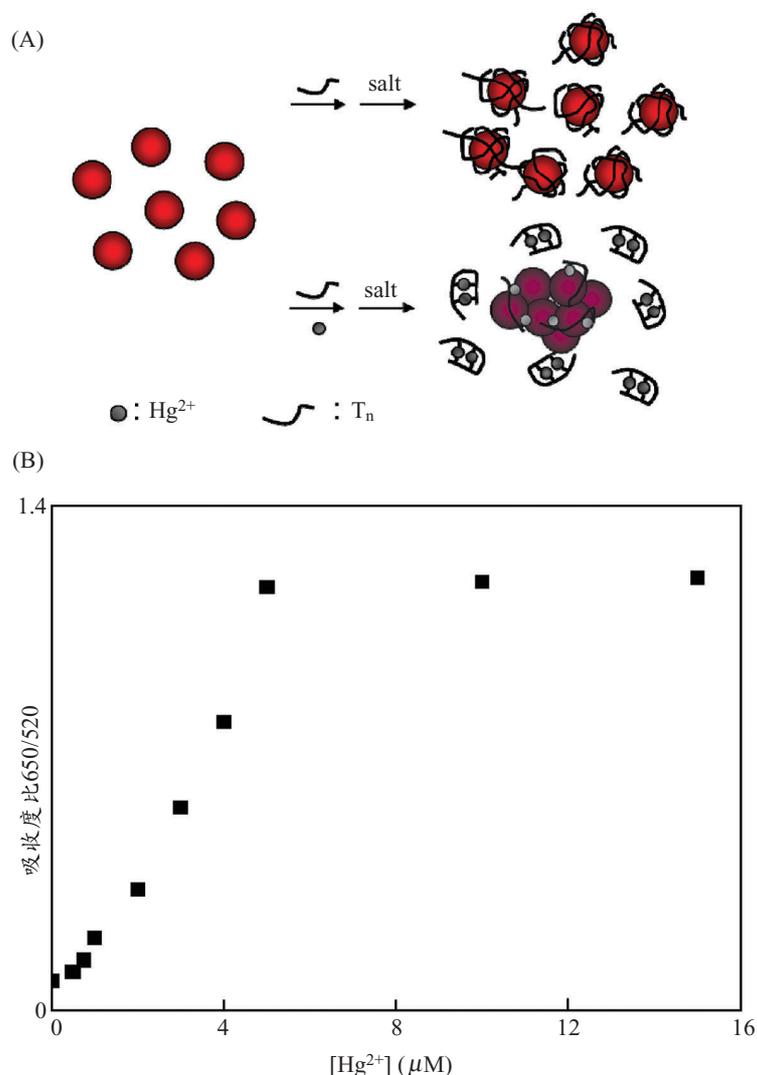
圖三 (A)利用 11-MUA-F<sub>AuNDs</sub> 以螢光光譜法偵測汞離子之機制圖。(B) 汞離子濃度對 11-MUA-F<sub>AuNDs</sub> 之螢光圖譜變化

50 mM NaCl) 存在下會使得 Au NPs 聚集而發生顏色變化 (圖四)。我們發現 poly T<sub>33</sub> ss-DNA 對汞離子具有專一性, 其 LOD 為 250 nM, 應用於真實樣品湖水的定量上, 其回收率高達 90-110% [16]。此方法不需任何染料的化學修飾, 且由肉眼的顏色變化便可初估汞離子濃度, 故提供了相當便宜與簡易的檢測技術。利用類似概念, 我們在沒有 Au NPs 存在下, 利用 poly T<sub>33</sub> ss-DNA 和螢光染料 TOTO-3 來偵測汞離子。汞離子藉由 T-Hg<sup>2+</sup>-T 作用力與 poly T<sub>33</sub> ss-DNA 結合, 並產生髮夾(hairpin)構形, 增加 poly T<sub>33</sub> ss-DNA 與螢光染料 TOTO-3 結合能力 (圖五)。螢光強度與汞離子(10–200 nM)有良好線性關係( $R^2$  0.98), 其

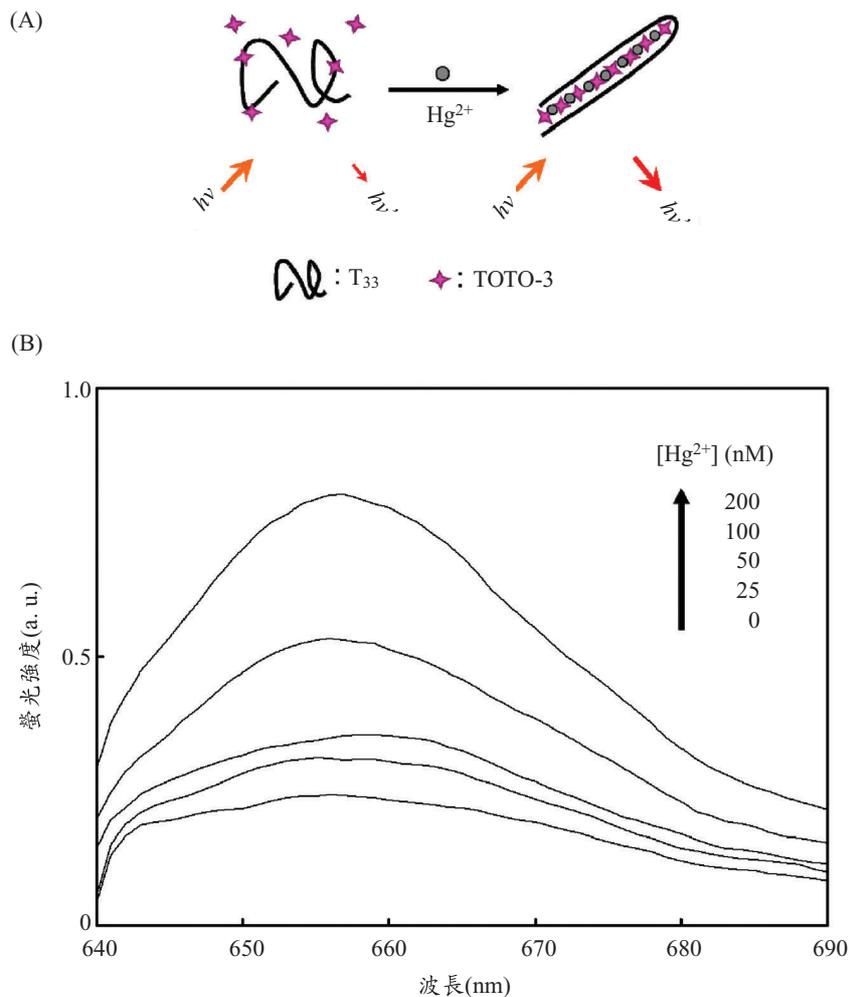
LOD 為 3.0 nM, 對其它金屬離子選擇性高達 265 倍以上[17]。

### 三、總結

我們開發許多偵測實際樣品如湖水和電池中汞離子的技術, 這些奈米感測器具有相當好的水溶性, 偵測靈敏度大部分都可達 nM 等級, 線性範圍在一個數量級以上, 對於其它離子選擇性高達 100 倍以上, 偵測時間皆少於一小時。若改變 Au NP 表面修飾官能基或 DNA 序列, 相信可應用於其它重金屬離子的研究。另外, 我們也已進一步證明經不同序列 DNA 修飾之 Au NPs 亦可適用於生物分子的偵測, 例如我們已成功開發



圖四 (A)利用 Au NPs 及 poly T<sub>33</sub> ss-DNA 吸收光譜法偵測汞離子之機制圖。(B)汞離子濃度對 Au NPs 吸收度比(A<sub>650</sub>/A<sub>520</sub>)之變化。



圖五 (A)利用 poly T<sub>33</sub> ss-DNA 及 TOTO-3 染料以螢光光譜法偵測汞離子之機制圖。(B) 汞離子濃度對 DNA-TOTO-3 錯合物之螢光圖譜變化

含適合體(apptamers)之 Au NPs 來偵測蛋白質及 ATP 等[18-20]。我們首次開發之 Au NDs 更因其生物相容性高之優點，在生物分析應用方面之潛力極高，例如我們已成功開發用適合體修飾之 Au NDs 來偵測癌症因子和用醣類修飾之 Au NDs 來偵測醣蛋白和細菌等。在未來的數年內，我們將繼續致力於開發綠色合成法來合成具量子產率高、穩定性佳、辨識力好及生物相容性優之螢光奈米物質（如 Au NDs, Ag NDs 和 Au-Ag NDs 等）並將之應用於生物分析如癌症因子、神經傳導物質、癌細胞及神經細胞等之偵測。

#### 參考文獻

- [1] F. M. M. Morel, A. M. L. Kraepiel and M. Amyot, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **29**, 543 (1998).
- [2] P. B. Tchounwou, W. K. Ayensu, N. Ninashvili and D. Sutton, *Environ. Toxicol.*, **18**, 149 (2003).
- [3] F. Zahir, S. J. Rizwi, S. K. Haq and R. H. Khan, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **20**, 351 (2005).
- [4] A. H. Stern, *Environ. Res.*, **98**, 133 (2005).
- [5] O. T. Butler, J. M. Cook, C. F. Harrington, S. J. Hill, J. Rieuwerts and D. L. Miles, *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**, 217 (2006).
- [6] E. M. Nolan and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14270 (2003).
- [7] J. M. Thomas, R. Ting and D. M. Perrin, *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 307 (2004).
- [8] I.-B. Kim and U. H. F. Bunz, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2818 (2006).
- [9] A. Ono and H. Togashi, *Angew. Chem. Int.*

- Ed.*, **43**, 4300 (2004).
- [10] C.-C. Huang, Y.-F. Huang, Z. Cao, W. Tan and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **77**, 5735 (2005).
- [11] W.-L. Tseng, K.-H. Lee and H.-T. Chang, *Langmuir*, **21**, 10676 (2005).
- [12] C.-C. Huang and H.-T. Chang, *Chem. Commun.*, **12**, 1215 (2007).
- [13] C.-C. Huang and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **78**, 8332 (2006).
- [14] C.-W. Liu, C.-C. Huang and H.-T. Chang, *Langmuir*, submitted.
- [15] C.-C. Huang, Z. Yang, K.-H. Lee and H.-T. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 6824 (2007).
- [16] C.-W. Liu, Y.-T. Hsieh, C.-C. Huang, Z.-H. Lin and H.-T. Chang, *Chem. Commun.*, DOI:10.1039/b719856f (2008).
- [17] C.-K. Chiang, C.-C. Huang and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, DOI:10.121/ac800142k (2008).
- [18] C.-C. Huang, S.-H. Chiu, Y.-F. Huang and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **79**, 4798 (2007).
- [19] C.-C. Huang, C.-K. Chiang, Z.-H. Lin, K.-H. Lee and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **80**, 1497 (2008).
- [20] S.-J. Chen, Y.-F. Huang, C.-C. Huang, K.-H. Lee, Z.-H. Lin and H.-T. Chang, *Biosens. Bioelectron.*, DOI:10.1016/j.bios, 2008.02.08.