

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：顧野松

酵素法催化苯胺聚合之探討

Optimizing the enzymatic polymerization of  
aniline

研究生：阮治瑋 撰

中華民國 98 年 6 月

## 摘 要

導電性高分子聚苯胺 (polyaniline, PANi) 近年來引起很多人研究，主要是因為聚合方法簡單、具有良好的穩定性、可調節的導電度與顏色，為最廣泛研究的導電性高分子之一。目前常用的化學法會在聚合苯胺時使用大量的強酸，以及極強的氧化劑，兩者的回收與處理皆不容易。

為改善對環境的影響，使用酵素來催化苯胺分子形成自由基陽離子 (radical cation) 分子，再輔以高分子量之負電模板 (templates) 引導苯胺陽離子自由基分子排列，最終可形成導電性聚苯胺，酵素已被建議為使用辣根過氧化酶 (horseradish peroxidase, HRP)。在本研究裡，我們需要在較溫和的環境中以酵素催化苯胺分子，反應使用能自行分解的過氧化氫作為氧化劑，並以牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 配合界面活性劑—十二烷基磺酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 形成負電模板來幫助聚合。反應過程使用溫和的緩衝液環境 (pH 4.0 的檸檬酸—磷酸鹽緩衝液)，過氧化氫以避免有害氧化劑副產物，而聚合產物為墨綠色的聚苯胺粉末。

本論文通過分析會影響催化過程中辣根過氧化酶最佳活性的條件，如檸檬酸—磷酸鹽緩衝溶液 pH 值、過氧化氫濃度、十二烷基磺

酸鈉濃度等變因，獲得較佳的催化條件。結果顯示使用 pH 值為 4.0 的檸檬酸－磷酸鹽緩衝液，過氧化氫濃度低於 10 mM，十二烷基磺酸鈉濃度小於 2.0 mM 情況下，此時辣根過氧化酶能保有最佳活性。本論文中，最佳聚合苯胺的條件是 4 mM 苯胺單體溶液(以 pH 4.0 檸檬酸－磷酸鹽緩衝液配製)，混合 1.8 mM 十二烷基磺酸鈉與 0.4 mg/ml 牛血清蛋白後，以 0.05 mg/ml 辣根過氧化酶配合 5 mM 過氧化氫來催化聚合，此時能於紫外光可見光光譜中有最大的 750 nm 吸收峰，能夠判斷為獲得鹽式中間氧化態聚苯胺，並可由霍式轉換紅外線光譜儀證實，藉由循環伏安法也能確定聚合的聚苯胺具有導電性。

關鍵字：聚苯胺、辣根過氧化酶、牛血清蛋白、十二烷基磺酸鈉

## Abstract

Polyaniline, a kind of conductive polymer, has drawn much attention in recent years. The major advantages of polyaniline are its easy synthesis, good stability, and controllable conductivity. At present, polyaniline is commonly synthesized by chemical approaches, however, strong oxidants are normally required, and the products are lack of good processibility.

On the other hand, the enzyme catalyzed method provides aniline polymerization with an environmental benign process. In this study, we have proposed to employ the anionic uncoiled protein chain as the template to attract the cationic aniline radical to form the polyaniline, in which was catalyzed by horseradish peroxidase. In order to generate the anionic template, sodium dodecyl sulfate (SDS) was applied and its concentration was optimized. Meanwhile, the effects of hydrogen peroxide concentration and buffer pH on the polymerization were investigated and a better reaction condition was established. Finally, the conductive polyaniline was characterized by UV-vis spectrophotometer, Fourier transform infrared spectrometer, and cyclic voltammetry.

Keywords : polyaniline, horseradish peroxidase, bovine serum albumin, sodium dodecyl sulfate

## 誌 謝

在這裡要感謝我的每一位家人，他們四年來的支持與包容，讓我可以安心的完成學業。再來要感謝我的指導教授顧野松老師，在我學習的過程中，他提供許多的研究方針引領我研究，幫助我學習如何去尋找有助於實驗的方法，並且引導我建立未來的人生方向。感謝每位口試委員杜景順老師、王擘老師、吳明宗老師與蔡明瞭老師，也感謝喬緒明老師的到來，他們犧牲他們的假期時間來給予我指正，讓我的論文能夠更加充分與嚴謹。

感謝讀研究所四年來給予我幫助的每一個人，感謝建中學長在研究與實驗方面給予的支持、幫助與教導，以及感謝東柏學長、華良學長在我一些儀器操作與額外資訊上的指導，還有感謝怡婷學姊和筱惇學長給予的支持，感謝 Kenji、方亭與孟村讓我學習到很多待人處世所需要面對的問題，感謝士豪在我軟弱的時候給予我心靈上的支持，感謝滷蛋、小綠、亮均、佳霖與政峰等學弟妹們給予我很多方面的支持，感謝這四年裡我所帶過與遇過的每個專題生。

最後，我要再次感謝我的父母，感謝他們在不願意讓我讀私立大學的之後，還依然願意支持我繼續讀完研究所，希望可以在此分享這喜悅給每個支持與幫助我的人。

# 目 錄

|                      |     |
|----------------------|-----|
| 中文摘要 .....           | III |
| 英文摘要 .....           | V   |
| 誌 謝 .....            | VI  |
| 目 錄 .....            | VII |
| 表 目 錄 .....          | X   |
| 圖 目 錄 .....          | X   |
| 論文本文                 |     |
| 第 一 章 緒論.....        | 1   |
| 1-1 前言.....          | 1   |
| 1-1.1 導電性高分子簡介.....  | 1   |
| 1-1.2 導電原理—能帶理論..... | 4   |
| 1-2 文獻回顧.....        | 6   |
| 1-2.1 聚苯胺簡介.....     | 6   |
| 1-2.2 聚苯胺的結構.....    | 7   |
| 1-2.3 聚苯胺的合成.....    | 11  |
| 1-3 辣根過氧化酶簡介.....    | 16  |



|       |                       |    |
|-------|-----------------------|----|
| 1-4   | 模板的功用.....            | 19 |
| 1-4.1 | 牛血清蛋白簡介.....          | 20 |
| 1-4.2 | 界面活性劑簡介.....          | 21 |
| 1-5   | 研究動機.....             | 23 |
| 第 二 章 | 實驗與分析方法.....          | 25 |
| 2-1   | 實驗藥品.....             | 25 |
| 2-2   | 實驗儀器設備.....           | 26 |
| 2-3   | 聚苯胺製備.....            | 28 |
| 2-4   | 分析方法.....             | 33 |
| 2-4.1 | 紫外光可見光光譜儀.....        | 33 |
| 2-4.2 | 霍氏轉換紅外線光譜儀.....       | 35 |
| 2-4.3 | 熱重分析儀.....            | 36 |
| 2-4.4 | 場發式掃描電子顯微鏡.....       | 36 |
| 2-4.5 | 循環伏安法.....            | 37 |
| 第 三 章 | 實驗結果與討論.....          | 38 |
| 3-1   | 紫外光可見光光譜儀分析.....      | 38 |
| 3-1.1 | 關於辣根過氧化酶活性影響條件分析..... | 38 |
| 3-1.2 | 聚苯胺分析.....            | 50 |
| 3-2   | 霍氏轉換紅外線光譜儀分析.....     | 70 |

|         |                   |     |
|---------|-------------------|-----|
| 3-3     | 熱重分析儀分析.....      | 80  |
| 3-4     | 場發式掃描電子顯微鏡分析..... | 82  |
| 3-5     | 循環伏安法分析.....      | 96  |
| 第 四 章   | 結 論 與 建 議.....    | 99  |
| 參 考 文 獻 | .....             | 101 |
| 簡 歷     | .....             | 105 |





## 表 目 錄

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 表 2.1 實驗藥品一覽表.....             | 25 |
| 表 2.2 實驗儀器設備表.....             | 26 |
| 表 2.3 聚苯胺主要官能基與結構之吸收峰.....     | 36 |
| 表 3.1 不同聚苯胺型態之吸收波長.....        | 50 |
| 表 3.2 未添加模板變更酵素濃度聚合之產物重差別..... | 85 |



## 圖 目 錄

|   |   |
|---|---|
| 圖 1 金屬、半導體、絕緣體與高分子之導電率比較圖， <i>d</i> 表示有添加<br>摻雜物..... | 3 |
| 圖 2 金屬、半導體、絕緣體的電子能帶理論示意圖.....                         | 5 |
| 圖 3 導電性高分子摻雜後的能帶理論示意圖.....                            | 5 |
| 圖 4 聚苯胺基本結構.....                                      | 7 |
| 圖 5 化學分類的五種聚苯胺型態.....                                 | 8 |
| 圖 6 鹽式中間氧化態聚苯胺結構.....                                 | 9 |

|   |    |
|---|----|
| 圖 7 電化學中聚苯胺的四種型態之氧化還原模式.....                              | 9  |
| 圖 8 聚苯胺的電聚合機制.....  | 13 |
| 圖 9 酵素合成聚苯胺簡圖.....  | 14 |
| 圖 10 辣根過氧化酶結構式.....                                       | 17 |
| 圖 11 循環伏安法碳糊電極放置示意圖.....                                  | 37 |
| 圖 12 pH 值對 HRP-ABTS 活性分析之影響.....                          | 39 |
| 圖 13 pH 值對 HRP 酵素活性之影響.....                               | 40 |
| 圖 14 過氧化氫濃度對 HRP-ABTS 活性分析之影響.....                        | 42 |
| 圖 15 過氧化氫濃度對 HRP 酵素活性之影響.....                             | 42 |
| 圖 16 SDS 濃度對 HRP ( $5 \times 10^{-4}$ mg/ml) 酵素活性之影響..... | 44 |
| 圖 17 SDS 濃度對 HRP ( $10^{-5}$ mg/ml) 酵素活性之影響.....          | 45 |
| 圖 18 在 SDS 濃度為 1.5 mM 時,BSA 濃度對 HRP 酵素活性之影響...<br>.....   | 47 |
| 圖 19 在 SDS 濃度為 1.8 mM 時,BSA 濃度對 HRP 酵素活性之影響...<br>.....   | 47 |
| 圖 20 在 SDS 濃度為 2.0 mM 時,BSA 濃度對 HRP 酵素活性之影響...<br>.....   | 48 |

|   |    |
|---|----|
| 圖 21 不同 BSA 濃度混合 1.8 mM SDS 與 SDS 對於 HRP 活性之影響<br>比較圖.....  | 49 |
| 圖 22 比較無模板聚合後使用酸鹼處理的差別之吸收光譜圖.....                           | 51 |
| 圖 23 添加 0.2 mg/ml BSA 對聚合產物之吸收光譜圖的影響.....                   | 53 |
| 圖 24 以不同的 pH 值配合 0.2 mg/ml BSA 聚合之吸收光譜圖.....                | 53 |
| 圖 25 以不同的 pH 值添加 0.2 mg/ml BSA 與否聚合之吸收光譜圖....<br>.....      | 54 |
| 圖 26 以不同的 pH 值添加 0.2 mg/ml BSA 與 5 mM SDS 聚合之吸收<br>光譜圖..... | 56 |
| 圖 27 不同 SDS 濃度混合 0.2 mg/ml BSA 聚合反應之吸收光譜圖..                 | 57 |
| 圖 28 比較有否混合 BSA 與添加不同 SDS 濃度聚合反應之吸收光譜<br>圖.....             | 58 |
| 圖 29 幾種模版聚合顏色圖.....   | 58 |
| 圖 30 比較混合 BSA 與添加 0.5 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖..                   | 60 |
| 圖 31 比較混合 BSA 與添加 0.8 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖..                   | 60 |
| 圖 32 比較混合 BSA 與添加 1.0 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖..                   | 61 |
| 圖 33 比較混合 BSA 與添加 2.0 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖..                   | 61 |

|   |    |
|---|----|
| 圖 34 比較四種情況聚合之吸收光譜圖.....  | 63 |
| 圖 35 比較混合 BSA 與添加 1.5 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖..                           | 64 |
| 圖 36 比較混合 BSA 與添加 1.8 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖..                           | 65 |
| 圖 37 比較混合 BSA 與添加 2.0 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖..                           | 65 |
| 圖 38 比較使用不同濃度之 HRP，於 0.4 mg/ml BSA 與 1.8 mM SDS<br>條件下聚合之吸收光譜圖..... | 66 |
| 圖 39 比較使用不同濃度之過氧化氫，於 0.4 mg/ml BSA 與 1.8 mM<br>SDS 條件下聚合之吸收光譜圖..... | 67 |
| 圖 40 反應溶液稀釋 10 倍顏色圖.....  | 68 |
| 圖 41 比較不同情況下(反應液與粉末溶液)聚苯胺之吸收光譜圖(石<br>英比色槽).....                     | 69 |
| 圖 42 以 pH 4.3 的磷酸鹽緩衝液配備，未添加模板聚合之 FTIR 圖....<br>.....                | 71 |
| 圖 43 以 pH 4.0 的檸檬酸－磷酸鹽緩衝液配備，未添加模板聚合之<br>FTIR 圖.....                 | 72 |
| 圖 44 以 pH 4.0 的檸檬酸－磷酸鹽緩衝液配備，添加模板聚合之 FTIR<br>圖.....                  | 73 |
| 圖 45 未添加模板聚合之 FTIR 圖.....   | 74 |

|   |    |
|---|----|
| 圖 46 添加 1.8 mM SDS 聚合之 FTIR 圖.....  | 75 |
| 圖 47 添加 0.4 mg/ml BSA 聚合之 FTIR 圖.....   | 75 |
| 圖 48 添加 0.4 mg/ml BSA-1.8 mM SDS 聚合之 FTIR 圖.....  | 76 |
| 圖 49 添加模板聚合乾燥後鹽酸處理之 FTIR 圖.....   | 78 |
| 圖 50 添加模板聚合再以氨水與鹽酸處理之 FTIR 圖.....   | 79 |
| 圖 51 添加模板與否聚合之 TGA 圖.....   | 80 |
| 圖 52 未添加模板以 HRP 濃度為 0.05 mg/ml 聚合之 SEM 圖.....   | 82 |
| 圖 53 未添加模板以 HRP 濃度為 0.1 mg/ml 聚合之 SEM 圖.....  | 83 |
| 圖 54 未添加模板以 HRP 濃度為 0.2 mg/ml 聚合之 SEM 圖.....  | 83 |
| 圖 55 未添加模板以 HRP 濃度為 0.3 mg/ml 聚合之 SEM 圖.....  | 84 |
| 圖 56 未添加模板以 HRP 濃度為 0.4 mg/ml 聚合之 SEM 圖.....  | 84 |
| 圖 57 未添加模板以 HRP 濃度為 0.5 mg/ml 聚合之 SEM 圖.....  | 85 |
| 圖 58 未添加模板變更酵素濃度聚合之產物重差別.....   | 86 |
| 圖 59 未添加模板以不同苯胺濃度聚合沉澱圖.....   | 87 |
| 圖 60 酵素每次添加 10 $\mu$ l 直到 250 $\mu$ l，反應總體積 6 ml，未添加模<br>板聚合之 SEM 圖(pH 4.3 磷酸鹽緩衝液)..... | 88 |

|   |    |
|---|----|
| 圖 61 酵素每次添加 50 $\mu$ l 直到 250 $\mu$ l，反應總體積 6 ml，未添加模<br>板聚合之 SEM 圖 (pH 4.3 磷酸鹽緩衝液).....  | 88 |
| 圖 62 酵素每次添加 125 $\mu$ l 直到 250 $\mu$ l，反應總體積 6 ml，未添加模<br>板聚合之 SEM 圖 (pH 4.3 磷酸鹽緩衝液)..... | 89 |
| 圖 63 酵素直接添加 250 $\mu$ l，反應總體積 6 ml，未添加模板聚合之 SEM<br>圖 (pH 4.3 磷酸鹽緩衝液).....                 | 89 |
| 圖 64 未添加模板聚合之 SEM 圖 (pH 4.0 檸檬酸-磷酸鹽緩衝液).....  | 91 |
| 圖 65 添加模板 0.2 mg/ml BSA 聚合之 SEM 圖 (pH 4.0 檸檬酸-磷酸<br>鹽緩衝液).....                            | 91 |
| 圖 66 添加模板 0.2 mg/ml BSA-1 mM SDS 聚合之 SEM 圖 (pH 4.0 檸<br>檬酸-磷酸鹽緩衝液).....                   | 92 |
| 圖 67 添加模板 0.2 mg/ml BSA-5 mM SDS 聚合之 SEM 圖 (pH 4.0 檸<br>檬酸-磷酸鹽緩衝液).....                   | 92 |
| 圖 68 添加模板聚合 4 小時之 SEM 圖.....  | 93 |
| 圖 69 將聚苯胺溶液直接滴上白金電極乾燥後之 SEM 圖.....  | 94 |
| 圖 70 將聚苯胺混合戊二醛的溶液滴上白金電極乾燥後之 SEM 圖.....  | 94 |

|  |    |
|--|----|
| 圖 71 將聚苯胺溶液滴上白金電極乾燥，再滴上戊二醛乾燥後之 SEM 圖.....  | 94 |
| 圖 72 將聚苯胺溶液直接滴上白金電極乾燥，再以相同體積之聚苯胺溶液滴上白金電極乾燥後之 SEM 圖.....  | 95 |
| 圖 73 比較碳糊電極感測 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ 之 CV 圖，(a) 純碳糊電極；(b) 石墨粉：摻雜的聚苯胺=9：1；(c) 石墨粉：摻雜的聚苯胺=4：1.....                    | 96 |
| 圖 74 比較碳糊電極感測 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ 之 CV 圖，(a) 純碳糊電極；(b) 石墨粉：未摻雜的聚苯胺=9：1；(c) 石墨粉：未摻雜的聚苯胺=4：1；(d) 碳糊與 BSA 混合電極..... | 97 |
| 圖 75 比較碳糊電極感測 1 M HCl 之 CV 圖，(a) 純碳糊電極；(b) 石墨粉：摻雜的聚苯胺粉末=1：1.....   | 98 |

# 第一章 緒 論

## 1-1 前言

### 1-1.1 導電性高分子簡介

在以往的高分子研究裡，聚合所得的高分子材料大部分為非常良好的絕緣材料。然而，在日漸深入的研究中，具有導電性的高分子意外被發現，並逐漸受到研究人員的重視。

最初的有機導電性高分子，於1958年由Natta以Ziegler-Natta觸媒合成的聚乙炔（polyacetylene, PA,  $(\text{CH}_2)_n$ ），為一種不溶於一般有機溶劑的黑色粉末。後來，在1971年日本的Shirakawa使用高濃度之Ziegler-Natta觸媒，成功合成出具金屬光澤之膜狀聚乙炔。隨後在1977年，美國的MacDiarmid和Heeger將碘和五氟化砷與聚乙炔摻雜，有效的增加其導電度，並獲得P(+)及N(-)型半導體，開啟了對導電性高分子更深入的探討與應用。<sup>[1-2]</sup>

自從聚乙炔於添加摻雜物被證實具有導電性後，隨後許多摻雜物與聚合方法被成功嘗試。研究目標亦轉向其他可能具有導電性的高分子，因此許多具有導電性的高分子隨之被研究出來，如：聚吡咯（polypyrrole, PPy）、聚對苯（poly-para-phenylene, PPP）、聚噻吩



(polythiophene, PT)、聚呋喃 (polyfuran, PF)、聚(3,4-二氧乙基塞吩) (poly(3,4-ethylenedioxythiophene), PEDOT)、聚苯基乙烯 (poly(phenylenevinylene), PPV)<sup>[3]</sup>及聚苯胺 (polyaniline, PANi)<sup>[4-9]</sup>等。

一般常見的高分子材料並不具有導電性，乃是由於其結構是以碳氫化合物為主，並為共價鍵鍵結的長鏈分子，因此通常為絕緣體。經過研究發現，一般高分子材料添加其他導電性材料亦能獲得導電性。然而，導電性高分子為自身能導電的高分子，此類高分子材料通常由主鏈上共軛的單鍵及雙鍵交替鍵結而成，電子可順沿分子鏈或躍過分子鏈來移動，因此具有導電性。若是將導電性高分子經過摻雜，可更大幅提高其導電度。<sup>[2]</sup>目前依據物質的導電性可將聚合物概分為絕緣體、半導體、導體及超導體四類，圖1比較了常見的金屬、半導體與導電性高分子的導電度，明確的顯示出導電性高分子摻雜後，高分子的導電度能提高與金屬、半導體相近。<sup>[10]</sup>

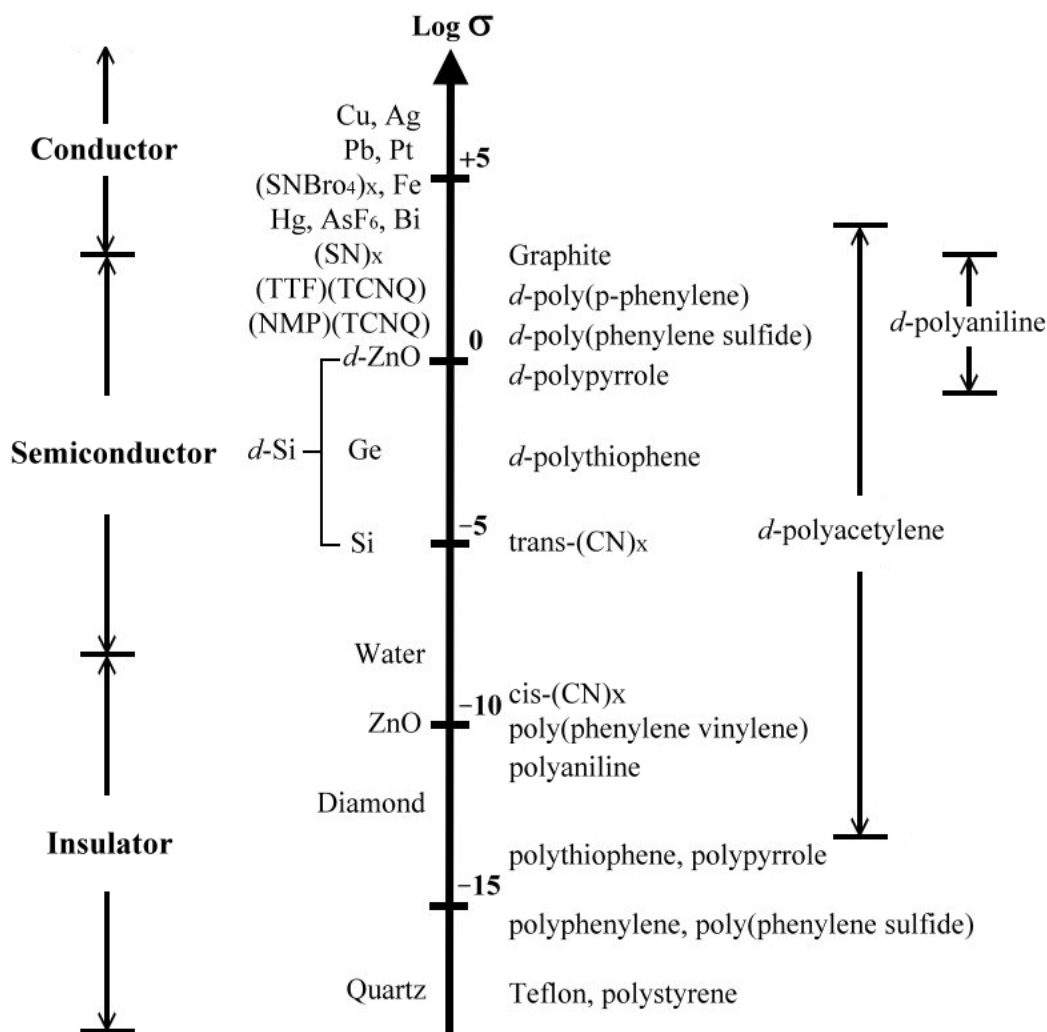


圖 1 金屬、半導體、絕緣體與高分子之導電率比較圖，*d*表示有添加  
 摻雜物<sup>[10]</sup>

聚苯胺 (polyaniline, PANi) 是一種有機導電性高分子。近年來，  
 能夠引起很多研究人員的關注，主要原因有四<sup>[11]</sup>，一是聚合方法操作  
 簡單，基本上，只要將苯胺單體混合質子酸溶液，再經過氧化劑催化  
 即可使之產生聚合；二是苯胺聚合後具有良好的穩定性，環境中空氣  
 及水對聚苯胺所造成的氧化影響低<sup>[12]</sup>；三是聚苯胺特別的氧化還原型

態，藉由改變其氧化還原程度可以調節其導電度，當聚苯胺經過質子酸進行摻雜後，也能大幅增加並改善其導電度<sup>[13]</sup>；四是不同的聚苯胺氧化還原型態有其各自的顏色，倘若施加不同的電壓差，可以調節聚苯胺產生不同的顏色<sup>[14]</sup>。因此，聚苯胺作為導電性高分子成為目前最廣泛研究的導電性高分子之一。

### 1-1.2 導電原理—能帶理論<sup>[2]</sup>

基於能隙理論，任何材料包括絕緣體、半導體及導體皆有價電帶、傳導帶與能隙（band gap），三者間的差別取決於電子躍遷的能力，絕緣體電子不易躍遷，而導體則相反，主要的原因在於絕緣體具有較高能階的傳導帶，導致有一寬大的能隙處在其價電帶之間，因此外來能量不易激發電子由價電帶躍遷到傳導帶；而導體如金屬，價電帶與傳導帶間並無能隙存在，隨時可以激發電子由價電帶躍遷至傳導帶；半導體則介於兩者之間，其能隙比起絕緣體來說狹窄很多，只要能夠給予電子足夠的躍遷能量，如熱、電、力與光等，就能使半導體導電，故常溫下仍能使電子躍遷至傳導帶。圖2為金屬、半導體、絕緣體的電子能帶理論（band theory）示意圖。

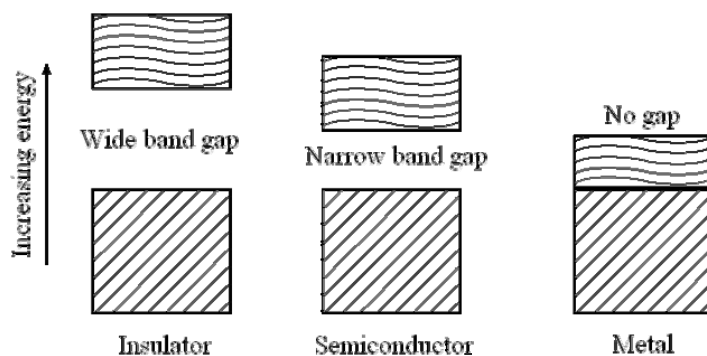


圖 2 金屬、半導體、絕緣體的電子能帶理論示意圖

一般情形下，導電性高分子的導電方式類似半導體，不過若是經過摻雜後，會在能隙間產生自由基陽離子（radical cation），在固態物理學上又稱其為極子（polaron），隨著摻雜的程度加深，極子有可能會轉變成雙極子（bipolaron）。極子及雙極子皆非固定不動的，可在共軛高分子鏈上作非定域化的移動，當雙極子數增多時，它們所形成的能階會產生堆疊，形成新的能帶（如圖 3 最右邊黑色區塊），進而縮短能隙。圖 3 為導電性高分子摻雜後的能帶理論示意圖。

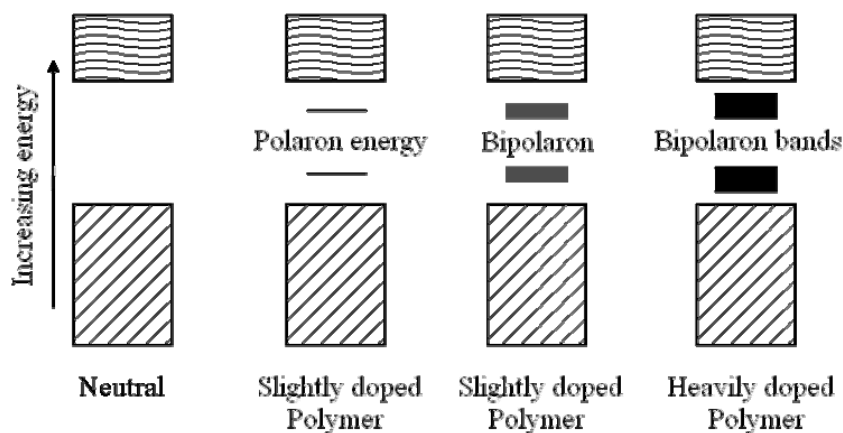


圖 3 導電性高分子摻雜後的能帶理論示意圖

## 1-2 文獻回顧

### 1-2.1 聚苯胺簡介

聚苯胺於 1834 年被 Runge<sup>[15]</sup> 發現時被稱為苯胺黑 (aniline black)，並未受到重視。後來，在 1862 年發表的聚苯胺合成是將苯胺在酸性條件下，利用氧化劑合成出來的藍色產物。在二十世紀初，最初斷斷續續的有文章發表聚苯胺的型態、性質與結構，後來周期性的發表文章直到 1980 年。<sup>[16]</sup> 但是聚苯胺逐漸受到重視，則是在 1977 年所發表的經摻雜之聚乙炔具有導電性後。

有別於一般導電性高分子，聚苯胺具有數種氧化還原態，而且它的氧化還原型態可以藉由添加酸、鹼以及電位變換來轉換。當聚苯胺的氧化程度不同，導電度也會不同，其中完全還原態、完全氧化態與所有的鹼式聚苯胺都是絕緣物質，而鹼式聚苯胺之各種氧化程度皆可經過質子酸摻雜，然後獲得各自的鹽式聚苯胺，其中以氧化程度 50% 的鹽式中間氧化態有最佳導電性，藉著質子酸摻雜程度增加，更能大幅提它的高導電度。<sup>[17]</sup>

鹽式中間氧化態聚苯胺在空氣與水中的穩定性佳，能適應很多環境，目前研發的材料著重在利用其特殊的氧化還原變色性質（電變色性質）與導電性質，近幾年已研發許多應用方式，已可見的應用如：

充電電池<sup>[18]</sup>、致電變色裝置<sup>[19]</sup>、感測器<sup>[20]</sup>、電激發光裝置<sup>[21]</sup>、抗腐蝕塗料與抗靜電材料<sup>[2,17]</sup>等。不過，鹽式中間氧化態聚苯胺在加工應用上有一定的難度，由於其分子鏈的長度與結構，導致聚苯胺的分子難以被任何的溶劑吸引包容，使其在大部分溶劑中的溶解性差，造成加工性不良。因此，目前許多研究著重於提升其加工性，如水溶性聚苯胺<sup>[22,23]</sup>與具較佳溶解性之聚苯胺-烷基共聚物<sup>[24]</sup>；在本研究中，酵素的聚合使用也已被證實能夠解決此問題<sup>[4,5,25]</sup>。

## 1-2.2 聚苯胺的結構

聚苯胺的結構主要分為兩個部份，一個是包含兩個亞胺(imine)、一個苯環(benzenoid)與一個醌環(quinoid)的氧化單位，另一個是含有兩個胺(amine)與兩個苯(benzenoid)的還原單位，如圖4所示。通常就應用情形來分類，聚苯胺有五種化學型態與四種電化學型態。

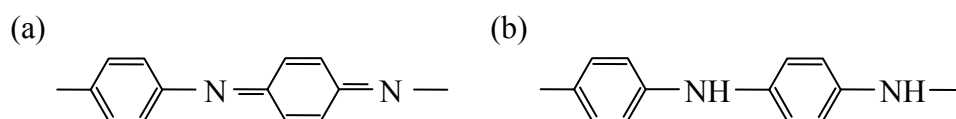


圖 4 聚苯胺基本結構，(a)氧化單位，(b)還原單位<sup>[2]</sup>

在化學應用上，聚苯胺型態依其氧化程度，有五種型態，分別是  
 完全為還原單位的leucoemeraldine(完全還原態聚苯胺，呈灰白褐色，  
 高純度時則為白色)、佔3/4還原與1/4氧化單位的protoemeraldine(鹼  
 式呈紫色，鹽式呈淡黃綠色)、還原與氧化單位各佔1/2的emeraldine  
 (中間氧化態聚苯胺，鹼式呈紫藍色，鹽式呈綠色)、佔1/4還原與  
 3/4氧化單位的nigraniline(鹼式呈深藍色，鹽式呈藍色)與完全為氧  
 化單位的pernigraniline(完全氧化態聚苯胺，鹼式與鹽式皆呈紫紅  
 色)，其結構如圖5所示。

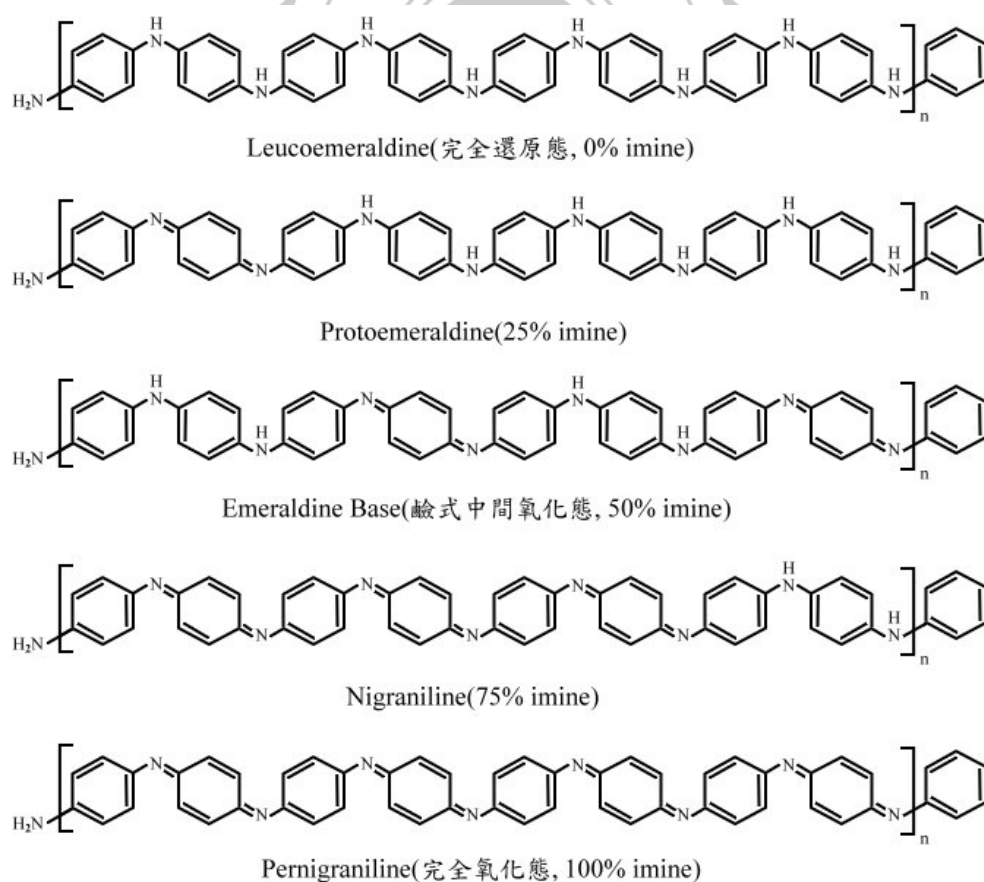


圖 5 化學分類的五種聚苯胺型態<sup>[26]</sup>

然而，在電化學應用上，以其應用方式整合出四型態的氧化還原模式，以中間氧化態聚苯胺的emeraldine base (EB，鹼式，如圖5) 與emeraldine salt (ES，鹽式，如圖6) 為主，再加進完全還原態與完全氧化態聚苯胺兩者，它們的電化學型態可藉由酸鹼與電子變化來轉換，其模式如圖7所示。

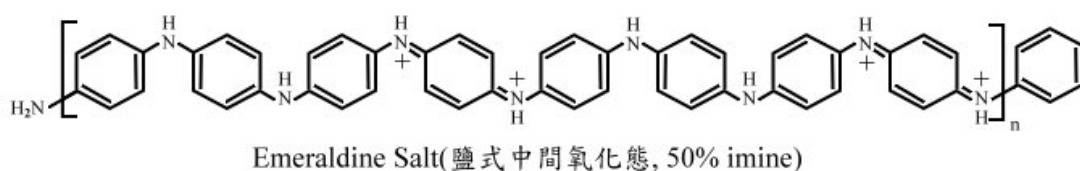


圖 6 鹽式中間氧化態聚苯胺結構<sup>[26]</sup>

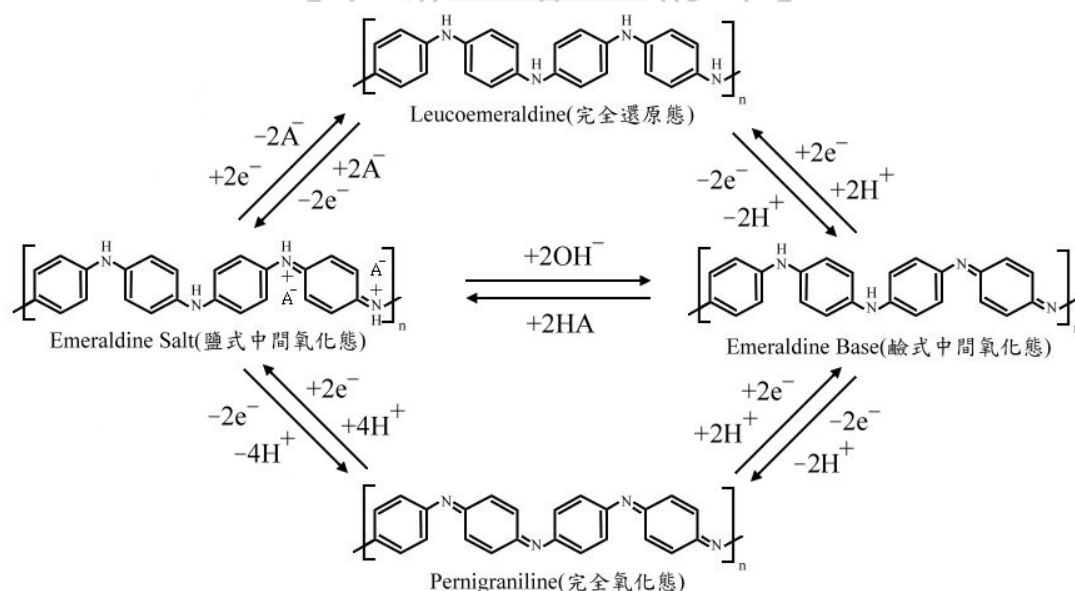


圖 7 電化學中聚苯胺的四種型態之氧化還原模式<sup>[17]</sup>



完全還原態聚苯胺完全不溶於任何溶劑中，穩定性較低，可以很容易就被氧氣與過氧化氫等氧化劑所氧化，使其結構穩定且接近中間氧化態；佔25%氧化單元的聚苯胺穩定性一般；中間氧化態聚苯胺其鹽式穩定性高，可以穩定的存在於空氣與水中，但因為具有共軛分子鏈，結構相當堅固，導致機械性質差加工不易，而鹼式在空氣中會緩慢的繼續氧化；佔75%氧化單元的聚苯胺其鹼式穩定性佳，但是鹽式則非常不穩定；完全氧化態聚苯胺非常不穩定，在乾燥狀態下依然很容易會還原分解，其結構亦會趨向中間氧化態而達穩定，因此只能保存於溶劑中。<sup>[17,26,27]</sup>不管依哪種應用分類方式，幾種型態裡最重要的是中間氧化態，尤其是以墨綠色呈現的鹽式中間氧化態聚苯胺，因為摻雜後含有自由基陽離子 (radical cation)，能夠縮短能隙 (band gap) 使電子躍遷變得容易，故能擁有較佳導電性，並且藉由質子酸的摻雜與去摻雜，它可以調節其導電度與顏色。

鹽式中間氧化態聚苯胺處在一個特殊的位置上，因為可以藉由環境的調節，將其型態進行轉變，並且會有明顯的顏色變化。倘若將其處於劇烈氧化條件下，並進一步以強鹼處理，將會導致剩餘的還原單位完全氧化，產生呈現紫紅色的完全氧化態聚苯胺，此型態並不具有導電的特性。倘若將鹽式中間氧化態聚苯胺直接以鹼處理，當pH值提高到一定程度，此時聚苯胺會因為去摻雜行為而轉變型態，其顏色

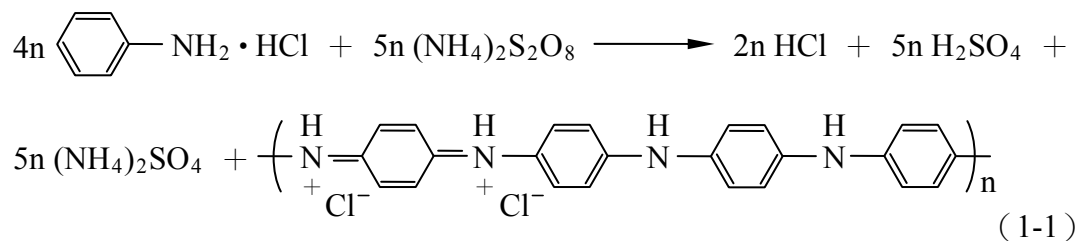
會由墨綠色轉變為深藍色，轉換成不具有導電性的鹼式中間氧化態。同樣地，中間氧化態聚苯胺也可經由還原反應，進而轉變為白色亦不具導電性的完全還原態聚苯胺。由於鹽式中間氧化態聚苯胺能轉換成所有其他型態，而且在各個聚苯胺型態中有最高穩定性與導電性，因此具有最廣的應用性與調節性。

### 1-2.3 聚苯胺的合成

目前研究中，聚苯胺主要有三種合成方式，一是化學法，二是電化學法，三是近來相關研究較多的酵素法。前兩種是現在實際應用時的常用合成法，末者主要仍在研究探討中，本研究亦是使用第三種進行合成。方法如下：

#### (1) 化學法<sup>[26,27]</sup>

苯胺的化學聚合是一種氧化縮合反應，通常是將苯胺單體溶解在大量低 pH 值 (pH 0~2) 的質子酸溶液 (如 1 M 鹽酸) 中，再慢慢的將氧化劑 (如過硫酸銨或重鉻酸鉀) 逐漸添加進去，苯胺就會緩慢進行氧化聚合，溶液顏色由淡藍色慢慢轉深藍，然後再轉深綠，最終可獲得墨綠色的鹽式中間氧化態聚苯胺，反應機構如下 (1-1) 式。



收集方式是利用布式漏斗 (Buchner funnel) 抽氣過濾，先用大量的 1 M 鹽酸沖洗，再用去離子水與甲醇沖洗，直到濾液澄清，去除剩餘的寡聚物 (oligomer)、單體與氧化劑，最後用氨水水溶液將產物去摻雜，形成的鹼式中間氧化態聚苯胺，最後使用質子酸進行再摻雜轉換回穩定的鹽式中間氧化態聚苯胺。

## (2) 電化學法<sup>[28,29]</sup>

如化學法般，也需要將苯胺溶解於質子酸溶液中，但不需添加氧化劑，在  $-0.2\text{V} \sim +0.8\text{V}$  (SCE) 電位範圍條件下，以循環伏安法連續循環掃描數圈，苯胺會在金屬 (如白金或金) 電極上聚合，成形時會直接沉積在電極表面上，呈網狀結構。

電化學的聚合反應機制，如下圖 8，苯胺單體會先脫去電子，形成帶正電荷之具自由基中間體 (Intermediate A)，同時中間體會因為電子共振性，產生不穩定雙鍵共軛中間體 (Intermediate B)，然後兩種中間體結合，隨著電位變化，氧化還原重複發生著，引導苯胺單體脫去電子，再藉自由基的不穩定性快速反應結合，此連續聚合的過程

形成緻密的導電性聚苯胺薄膜。

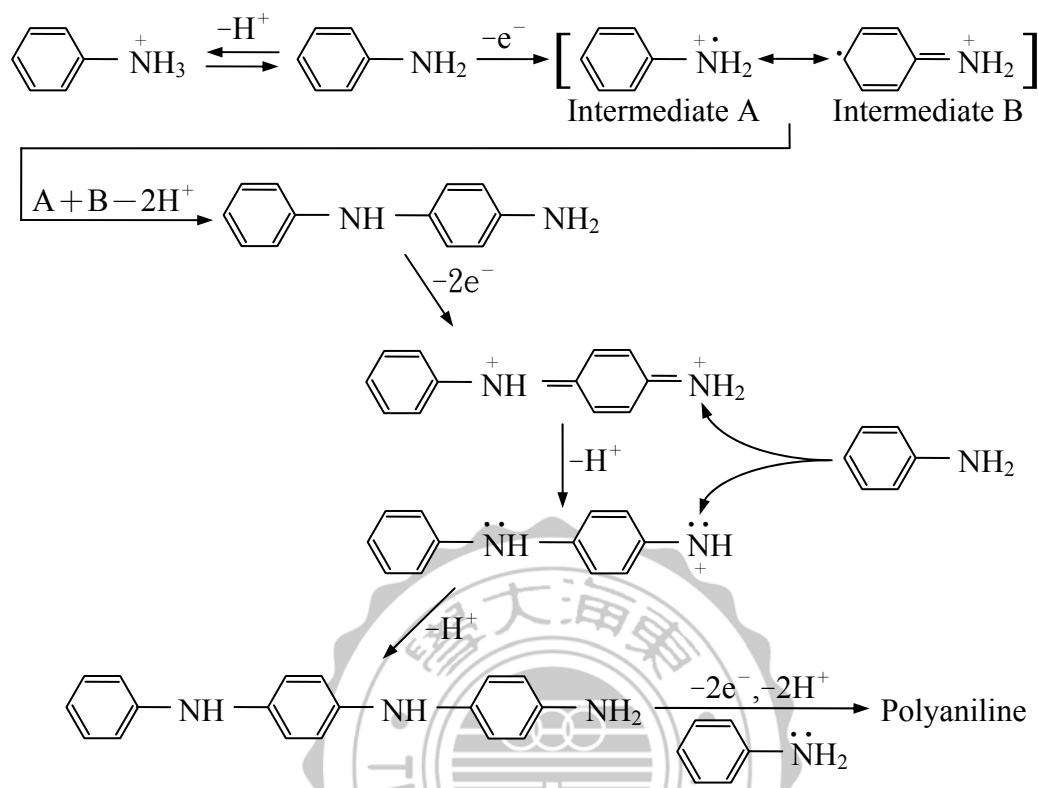


圖 8 聚苯胺的電聚合機制<sup>[30]</sup>

### (3) 酵素法<sup>[4,5,25]</sup>

不同於化學法與電化學法，苯胺單體並不一定需溶於質子酸溶液中，因此，通常會根據所使用的酵素最佳活性 pH 值，調整反應環境的 pH 值，之後將酵素投入反應溶液中，再慢慢添加定量氧化劑（一般皆使用可自行分解的過氧化氫），直到與苯胺單體莫爾比為 1 : 1，在短暫的時間裡即可聚合完成，經過甲醇與質子酸水溶液清洗後，冷凍乾燥可以獲得聚苯胺產物。

在大多數情狀下，直接使用酵素並無法製造出具導電性的聚苯胺，這時必須配合使用其他物質作為模板 (templates)。一般能作為模板的物質必須是具有較高分子量之物質，並且此物質還要能在溶劑中帶有電解質的特性，故為聚電解質模板 (polyelectrolyte templates)，如 SPS (sulfonated polystyrene)、PVPA (poly(vinylphosphonic acid)) 與 DNA (deoxyribonucleic acid) 等，而這些能夠使用的模板都有一共通點——為帶有負電荷的直鏈高分子。圖 9 簡單表示酵素聚合之情況。

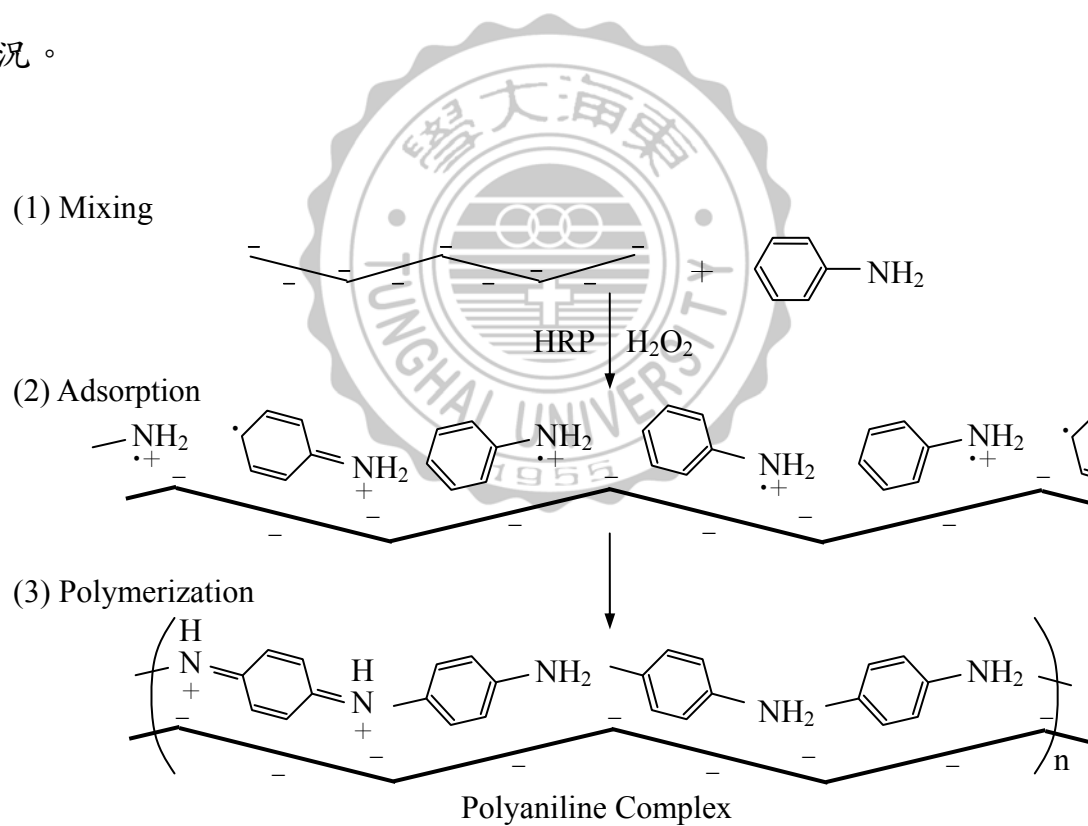


圖 9 酵素合成聚苯胺簡圖

模板本身所帶有之負電荷與規則的結構，能提供並吸引苯胺單體

形成的帶正電荷之自由基分子，使分子進行對位 (para) 向排列，讓其聚合時有可頭尾連接的環境，因此在適合的 pH 值環境條件下，若加以適量的氧化劑，酵素即可在模板上產生墨綠色具導電性之聚苯胺。

導電性高分子的應用跟其所能加工的能力有關，一般來說，分子量越大者其分子鏈越長，反而導致加工能力變差，主要是因為鏈越長越不容易被各種溶劑溶解，只能以合成時的狀態進行加工，導致僅能在有限的範圍中應用。

比較三者間的差別，化學法合成的聚苯胺與電化學法相比，具有較佳的溶解性與加工性，因為其分子量分布範圍廣（需低於 0°C 下合成，分子量可達 30,000 至 50,000 Dalton），即使酵素法也無法超過此範圍，所以目前最常應用的製程都以化學法製造。而且，化學法還能再提高聚苯胺的分子量，只要將反應時的溫度再大幅降低後（-40°C 以下），再耗費較長的反應時間（48 小時），就能更加提高聚苯胺的分子量（可達 200,000 至 380,000 Dalton）。<sup>[26]</sup> 總的來說，化學法要增加導電性需要使用大量的強酸，要提升反應速度則需要使用極強的氧化劑，要提高分子量就需要大幅降低反應的溫度，因此整體製程對環境有巨大的影響。

電化學法所製成的聚苯胺其溶解性比較差，主要是因為合成時形成的網狀結構，雖此結構有助於其在某些方面的應用（如感測器），但是聚苯胺只能在導電基材上形成，而逐漸增厚的聚合層亦會阻礙電子的傳遞，大幅影響到產物的導電度，因此合成的聚苯胺之分子量都不高（一般都在 10,000 Dalton 以下），導致其應用上的侷限性。

酵素法的溶解性與加工性跟它所共聚的模板有很大的關係，模板性質直接的影響了聚苯胺的加工與導電能力。模板的可溶性會對合成後的聚苯胺產生影響，因此聚苯胺能溶解於水溶劑或有機溶劑中，方便進行加工，然而模板亦會大幅影響聚苯胺的導電性質，所以需要挑選合適的高分子模板，降低模板所造成的導電性下降問題。因此，使用酵素法合成聚苯胺時，因為酵素是具有活性中心的特殊結構，苯胺單體可以快速的轉換成自由基陽離子分子，大幅提高聚合速度縮短反應時間，並且反應過程中不需要太強的氧化劑，反應溶液也不需要過低的酸性環境下進行，故不用擔心酵素造成的影響，只要挑選合適的模板，或是提高模板的消除比例，即可改善其應用性。

### 1-3 辣根過氧化酶簡介<sup>[31-33]</sup>

酵素法是運用酵素與苯胺結合，使苯胺脫去一個氫形成自由基陽離子，本研究使用的酵素是辣根過氧化酶（horseradish peroxidase，

HRP, EC.1.11.1.7, 結構如圖 10), 乃是從山葵 (horseradish) 這種植物裡抽取出來的過氧化分解酶 (peroxidase), 其分子量則是具有約數萬 (約在 40,000 Dalton 左右) 的蛋白質分子, 乃是一種含血紅素結構的過氧化酶, 可藉過氧化物進行催化反應。

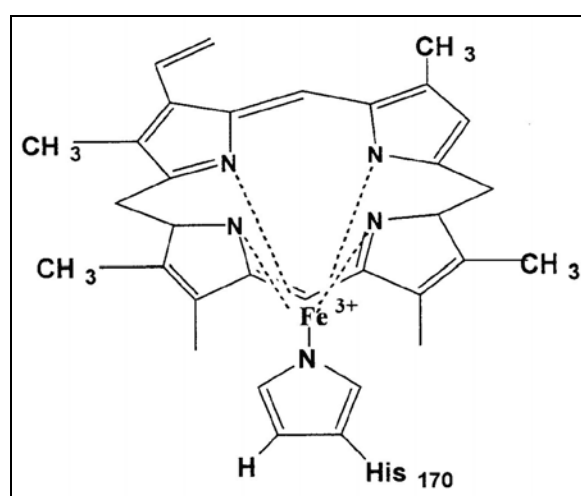
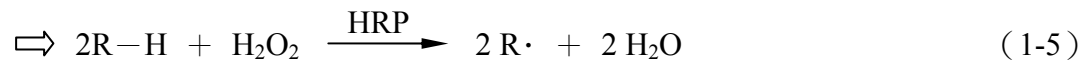
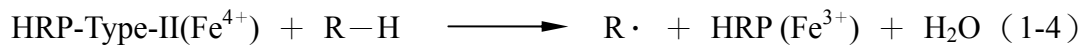
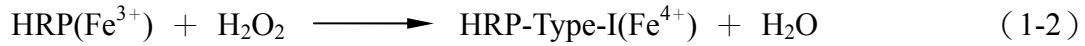


圖 10 辣根過氧化酶結構式<sup>[34]</sup>

辣根過氧化酶有一循環的催化過程, 首先在有過氧化物的情形下, 如過氧化氫, 帶正三價鐵離子活性中心之靜態酶 ( $\text{HRP}(\text{Fe}^{3+})$ ) 會與過氧化氫發生反應, 會產生帶正四價鐵離子之化合物一 ( $\text{HRP-Type-I}(\text{Fe}^{4+})$ ), 接著若有分子還原性底物 ( $\text{R-H}$ ) 加入, 如高分子單體 (包含芳香族化合物、酚類化合物、胺類和磺酸鹽等), 化合物一會跟高分子單體反應, 單體分子會脫去一氫形成自由基 ( $\text{R}\cdot$ ), 而化合物一則衍生成化合物二 ( $\text{HRP-Type-II}(\text{Fe}^{4+})$ ), 之後化合物二會



再次與高分子單體反應，產生自由基與水，不過會將自身還原為帶正三價鐵離子活性中心之靜態酶。其催化循環反應機構如下(1-5)式。



在聚合反應情況下，兩個含自由基單體就會自行與其他單體快速進行反應，然後再重複形成自由基與聚合即可形成高分子。

當反應時若具有過高的過氧化氫濃度時，過氧化氫會與辣根過氧化酶生成額外的的兩個反應，兩個額外的化合物皆會導致酵素失活，其反應機構如下(1-6)與(1-7)式<sup>[35]</sup>。



其中，(1-6)式是過氧化氫直接影響化合物一的結構，導致酵素無法發揮功用；(1-7)式則是過氧化氫氧化酵素形成另一中間體化合物三(HRP-Type-III)，此中間體會引起其他反應，使酵素表現出部分活性消失。

## 1-4 模板的功用<sup>[22]</sup>

酵素法中常常使用模板來配合進行苯胺的聚合，模板需要具有較高分子量，並且帶有負電荷的直鏈高分子物質。模板因為帶有均勻分布的負電荷，還有規則的直鏈分子結構，所以當酵素將苯胺單體形成帶正電荷之自由基分子後，帶正電自由基苯胺可因正負電相吸而自動進行定向排列，故苯胺在聚合過程中更容易以對位向進行縮合聚合，減少苯胺在其他方位衍生物的聚合機會，這樣在模板上所產生的聚苯胺，即會以墨綠色呈現的鹽式中間氧化態表現。

使用模板的缺點主要有兩個，一個是很難獲得在模板上的聚苯胺分子量，因為兩者通常都很緊密的連結著，故很難單獨取得聚苯胺的鏈長與分子量；另一個則跟導電度有關，模板的使用雖然大大的幫助鹽式中間氧化態聚苯胺的形成，但是過高分子量以及兩者間緊密連接亦影響到電子傳遞，使聚苯胺導電能力變差。因此，選擇一個可較容易被去除或是不會影響電子傳遞的模板是很重要的。

本研究中，選擇惰性的牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 並經過加熱解開摺疊 (unfolded) 使其形成直鏈結構，並添加界面活性劑十二烷基磺酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 使其帶負電性質，以此作為聚合模板。這樣的選擇主要原因有三，一是相較於其他蛋白質，牛血清蛋白成本較低，也方便取得；二是牛血清蛋白可以完全溶

解於水溶液中，其為惰性蛋白但不會影響聚合時酵素的催化環境，反而能在一定程度上穩定酵素活性；三是聚合後，利用酸鹼溶液進行處理的過程中，牛血清蛋白會因為鹼與酸的影響，破壞它與聚苯胺之間的連接，使其溶解於溶液中，故可大幅度去除牛血清蛋白模板。

#### 1-4.1 牛血清蛋白簡介<sup>[36,37]</sup>

血清蛋白是動物血液裡的主要成分（38g/100ml），而牛血清蛋白一般是來源是由健康小牛，是一種熱易變性蛋白質，一些有機溶劑（如乙腈）已可使之變性，其分子量約在 67,000 Dalton 左右，等電點（pI 值）在 4.7 左右，由 581 個氨基酸組成一單胺基酸鏈，其中有 17 個二硫鍵，可與很多陰陽離子或小分子物質結合。

牛血清蛋白為熱變性蛋白，在經過加熱處理後，蛋白分子內部大部分的氫鍵與二硫鍵會被打斷，而分子表面的巰基（又稱氫硫基，由一個硫和一個氫兩原子相連組成的一價原子團）含量下降，因此破壞原本摺疊的結構並形成直鏈的分子。在本研究中，聚合反應的環境其 pH 值在 4.0，使用此緩衝液 pH 值是因為在此環境下，辣根過氧化酶能有極佳活性。由於高於牛血清蛋白的等電點 4.7 的環境，雖能使變性的牛血清蛋白分子鏈上大部份帶有負電荷，卻無法使大部分的苯胺單體以對位向排列聚合，也會因為分子鏈上所帶有的少量正電荷中斷

聚合，造成聚苯胺分子鏈長度有限；而若是低於等電點的環境，此時變性的牛血清蛋白分子鏈上會大部份帶有正電荷，因此在聚合過程中，僅能提供少量的負電來吸引苯胺，導致無法突顯負電荷模板的功用。所以造成單純使用牛血清蛋白，對於聚合鹽式中間氧化態聚苯胺沒有任何效益，因此，為提升於 pH 4.0 的環境條件下牛血清蛋白的負電荷量，故必須添加界面活性劑來改變電荷性質，界面活性劑會包覆蛋白質分子鏈上的胺基酸所帶之正電荷，讓整個模板表現出更完整的負電荷層，最終而能勝任成為模版。

#### 1-4.2 界面活性劑簡介<sup>[38]</sup>

界面活性劑（Surface active agent 或 Surfactant）是一種可產生濕潤、滲透、分散、乳化與清潔等作用的物質，由它分子的構造可以知道，任何化合物若其一端擁有一COO<sup>-</sup>、—SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、—OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>、各級胺基或一些弱親水基，另一端又具有烷基時，倘若分子鏈上可以具有很強的親水性，同時卻又擁有親油疏水的性質，兩種性質間達適當的平衡時，該化合物即為界面活性劑。

在界面同類分子間的引力即是界面張力，而所謂的界面活性是指能夠引起界面張力減少的情形。若一個化合物其分子中具有親水（如—OH）與疏水（如烷基）的官能基，而其親水傾向遠比疏水傾向來

的強烈時，該化合物會被拉進水中，即為溶解，但是由於疏水官能基的影響，導致溶解不均勻，這樣使得該化合物的部份分子鏈被排出水面，疏水的官能基伸出於空中做整齊的排列（也能說是它們吸附於表面），因此減少掉界面分子間的引力，疏水的官能基越長，吸附於表面的分子也越多，減少界面張力也就愈大，而疏水的官能基越長分子越大，對水的溶解性越差，因此無法當作界面活性劑。不過，醇類和硫酸反應成為硫酸鹽之後，以及羧酸和氫氧化鈉中和而成的一COO<sup>-</sup>離子態，都能夠大幅提高親水性，配合上適當的烷基即能當界面活性劑使用。

目前最常被應用的醇類磺酸鹽，具有十二個碳原子和一OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>達到親水基與疏水基間的平衡，為陰離子性的界面活性劑叫十二烷基磺酸鈉，本研究中即是使用此界面活性劑來改變變性的牛血清蛋白之帶電荷狀態，當兩者混合後，十二烷基磺酸鈉會吸附到變性的蛋白上之胺基酸基團表面，使原本變性的蛋白直鏈上所帶的正負電荷相間的情形，大部分轉變為帶負電荷，不過，由於此行為並非共價鍵鍵結，因此此在溶液混合過程中，若混合體積大量增加時，攪拌可能會引起十二烷基磺酸鈉的脫離，因而影響到接續加入之酵素的活性，因此十二烷基磺酸鈉的濃度還有模板與單體混合的攪拌時間，兩者是必須控制適當以降低影響。

## 1-5 研究動機

近幾年來，隨著導電性高分子的研究開發與應用，許多新科技產品與技術皆會運用到導電性高分子，如電極、電池、防靜電材料與電子物件等，因此有很高的應用價值。現在，導電性高分子聚苯胺的聚合方法中，使用的氧化劑與合成環境兩者皆會造成一些困擾，像是反應後常會產生許多有害的氧化劑副產物，而合成的過程中必須使用大量強酸，兩者於反應後的回收與處理並不容易，因此整體合成製程的後續若沒處理好會對環境造成危害。

隨著環保意識的增進，研究人員開始找尋替代方案，其中利用酵素聚合最具有前瞻性，因為酵素是一種強力的生物催化劑，具有高專一性，只與特定結構的還原性底物結合反應，如芳香族化合物、酚類化合物、胺類和磺酸鹽等。酵素催化反應時對環境 pH 值有一定的要求，雖不需要極端的 pH 值環境，而且也無需太過於強大的氧化劑，只需要再摻雜時使用少量強酸，因此對環境危害較輕，最重要的是酵素能夠提高催化反應的速度。

本研究要點，是以十二烷基磺酸鈉混合經煮沸變性的牛血清蛋白當模板，再利用辣根過氧化酶，聚合出具導電性的聚苯胺。這是由於直接使用酵素無法產生導電性聚苯胺，因此添加帶負電荷的模板，藉由模板可以引導苯胺單體進行規則排列，並使聚苯胺在聚合同時帶正

電荷。而且聚合過程中，選擇對環境影響較低的緩衝液作溶劑，pH 值則調整在酵素活性較佳的範圍中，再以過氧化氫為氧化劑，使反應過程中獲得的氧化劑副產物為水，避免了有害氧化劑副產物，最終可獲得墨綠色的聚苯胺粉末，再對以變性牛血清蛋白聚合的聚苯進行紫外光可見光光譜儀 (UV-vis spectro.)、熱重分析儀 (TGA)、霍式轉換紅外線光譜儀 (FT-IR)、場發式掃描電子顯微鏡 (FE-SEM) 與循環伏安法等分析，以了解其性質、結構與未來應用方向。



## 第二章 實驗與分析方法

### 2-1 實驗藥品

本研究所用之藥品如下表所示：

表 2.1 實驗藥品一覽表

| 藥品名稱                           | 廠商     | 產品序號      | 藥品等級/純度       |
|--------------------------------|--------|-----------|---------------|
| 1-Step™ ABTS                   | PIERCE | 37615     |               |
| Albumin bovin (BSA)            | SIGMA  | A-7030    | 98%           |
| Ammonia solution               | SHOWA  | 0128-3150 | 28% ~ 30%     |
| Aniline                        | MERCK  | 1.01261   | ≥99.5%        |
| Citric acid                    | SIGMA  | C0759     | Reagent Grade |
| Dipotassium hydrogen phosphate | SHOWA  | 1645-8150 | 99.0%         |
| Disodium hydrogen phosphate    | KANTO  | 37243-00  | 99.0%         |
| Horseradish peroxidase (HRP)   | SIGMA  | P8250     | 181 units/mg  |
| Hydrogen chloride              | MERCK  | 1.00317   | 30% ~ 37%     |
| Hydrogen peroxide              | MERCK  | 1.08600   | 35% ~ 36.5%   |
| N-methyl pyrrolidinone (NMP)   | SIGMA  | M6762     |               |
| Potassium dihydrogen phosphate | KANTO  | 32379-00  | 99.0%         |
| Sodium dodecyl sulfate (SDS)   | USB    | US75819   | 99.8%         |



## 2-2 實驗儀器設備

本研究所使用之儀器設備如下表所示：

表 2.2 實驗儀器設備表

| 儀器名稱            | 製造商名稱           | 型號                       |
|-----------------|-----------------|--------------------------|
| 一般冰箱 (4°C)      | 東元              | RE7222                   |
| 大型冰箱 (4°C)      | 均泰              | 1000L                    |
| 低溫冰箱 (-20°C)    | Fisher & Paykel | Standard H160            |
| 低溫冰箱 (-80°C)    | Thermo          | Forma-86 ULT Freezer     |
| 微量吸取器 (pipette) | Eppendorf       | Research 1000/200/100/20 |
| 微量電子天秤          | MITTLER TOLEDD  | AB54-S                   |
| 電子天秤            | OHAUS           | AR1530                   |
| 電子天秤            | Sartorius       | BT 423 S                 |
| 攪拌加熱器           | CORNING         | PC-420                   |
| 冷凍乾燥機           | 泛群              | CT-5000                  |
| 高速離心機           | National Labnet | C0160-P                  |
| 高速離心機           | Eppendorf       | Centrifuge 5415 D        |
| 高速離心機           | Eppendorf       | Centrifuge 5804 R        |

| 儀器名稱  | 製造商名稱                  | 型號                      |
|---|------------------------|-------------------------|
| pH meter (酸鹼度計)   | Suntex                 | SP-701                  |
| Ultrapure water system<br>(超純水機)  | Barnstead              | D11901                  |
| Fourier transform infrared<br>spectrometer (FT-IR)<br>(霍式轉換紅外線光譜儀)      | Bomem (清華化學)           | DA8.3                   |
| Field emission-scanning<br>electron microscope (FE-SEM)<br>(場發式掃描電子顯微鏡) | JEOL (東海化工)            | JSM-7000                |
| Ultraviolet-visible<br>spectrophotometer<br>(紫外光可見光光譜儀)                 | Spectronic instruments | Genesys2                |
| Electrochemical Analyzer<br>(交流阻抗電分析儀)                                  | CH Instruments         | Model 621B<br>(CHI621B) |
| Thermogravimetric analyzer<br>(TGA)(熱重分析儀)                              |                        | Q50                     |
| Ultrasonic cleaner  | DELTA                  | DC150H                  |
| VORTEX-GENIE 2  | Scientific Industries  | G560                    |
| 電磁攪拌器   | Fargo                  | MS-90                   |

## 2-3 聚苯胺製備

### 實驗溶液預備：

#### A. pH 4.0 的檸檬酸－磷酸鹽緩衝液

1. 秤取 19.212 g 檸檬酸粉末溶於 1 L 去離子水中，配成 0.1 M 的檸檬酸溶液。
2. 秤取 28.392 g 磷酸氫二鈉粉末溶於 1 L 去離子水中，配成 0.2 M 的磷酸氫二鈉溶液。
3. 取 61.45 ml 的檸檬酸溶液 (0.1 M) 與 38.55 ml 的磷酸氫二鈉溶液 (0.2 M) 混合，即可配成 pH 4.0 的檸檬酸－磷酸鹽緩衝液。

#### B. 苯胺單體溶液

將 46  $\mu$ l 苯胺溶液 (將貯存濃度視為 100%) 加到 10 ml 檸檬酸－磷酸鹽緩衝液 (pH 4.0) 中，配成 50 mM 的苯胺單體溶液。

#### C. BSA－SDS 模板溶液

1. 秤取 300 mg BSA 粉末溶於 30 ml 去離子水中，放入沸水中煮 5 分鐘，配成 10 mg/ml 的 BSA 溶液。
2. 秤取 288.38 mg SDS 粉末溶於 10 ml 去離子水中，配成 100 mM 的 SDS 溶液。
3. 取 4 ml 的 BSA 溶液 (10 mg/ml)、1.8 ml 的 SDS 溶液 (100 mM) 與 4.2 ml 去離子水混合，配成 4 mg/ml BSA－18 mM SDS 的混合溶液。

D. HRP 酵素溶液 (實驗前才配製)

1. 將存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的  $22\ \mu\text{l}$  的 HRP 酵素原溶液 ( $139\ \text{mg/ml}$ , HRP 粉末溶於  $0.1\ \text{M}$  pH 6.0 的磷酸鹽緩衝液中) 置於冰浴中退冰凍 (約 30 分鐘)。
2. 預備  $0.1\ \text{M}$  pH 6.0 的磷酸鹽緩衝液於冰浴中。
3. 當退冰後, 取  $20\ \mu\text{l}$  的 HRP 酵素原溶液 ( $139\ \text{mg/ml}$ ) 與  $2.76\ \text{ml}$   $0.1\ \text{M}$  pH 6.0 的磷酸鹽緩衝液混合, 配成  $1\ \text{mg/ml}$  的 HRP 酵素溶液備用。

E. 過氧化氫溶液 (氧化劑, 實驗前才配製)

1. 預備去離子水於冰浴中。
2. 取置於  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中的  $35\%(\text{v/v})$  的過氧化氫溶液 ( $\sim 10\ \text{M}$ )  $30\ \mu\text{l}$  與  $2.97\ \text{ml}$  去離子水混合, 配成  $0.35\%(\text{v/v})$  的過氧化氫溶液 ( $\sim 100\ \text{mM}$ ) 備用。

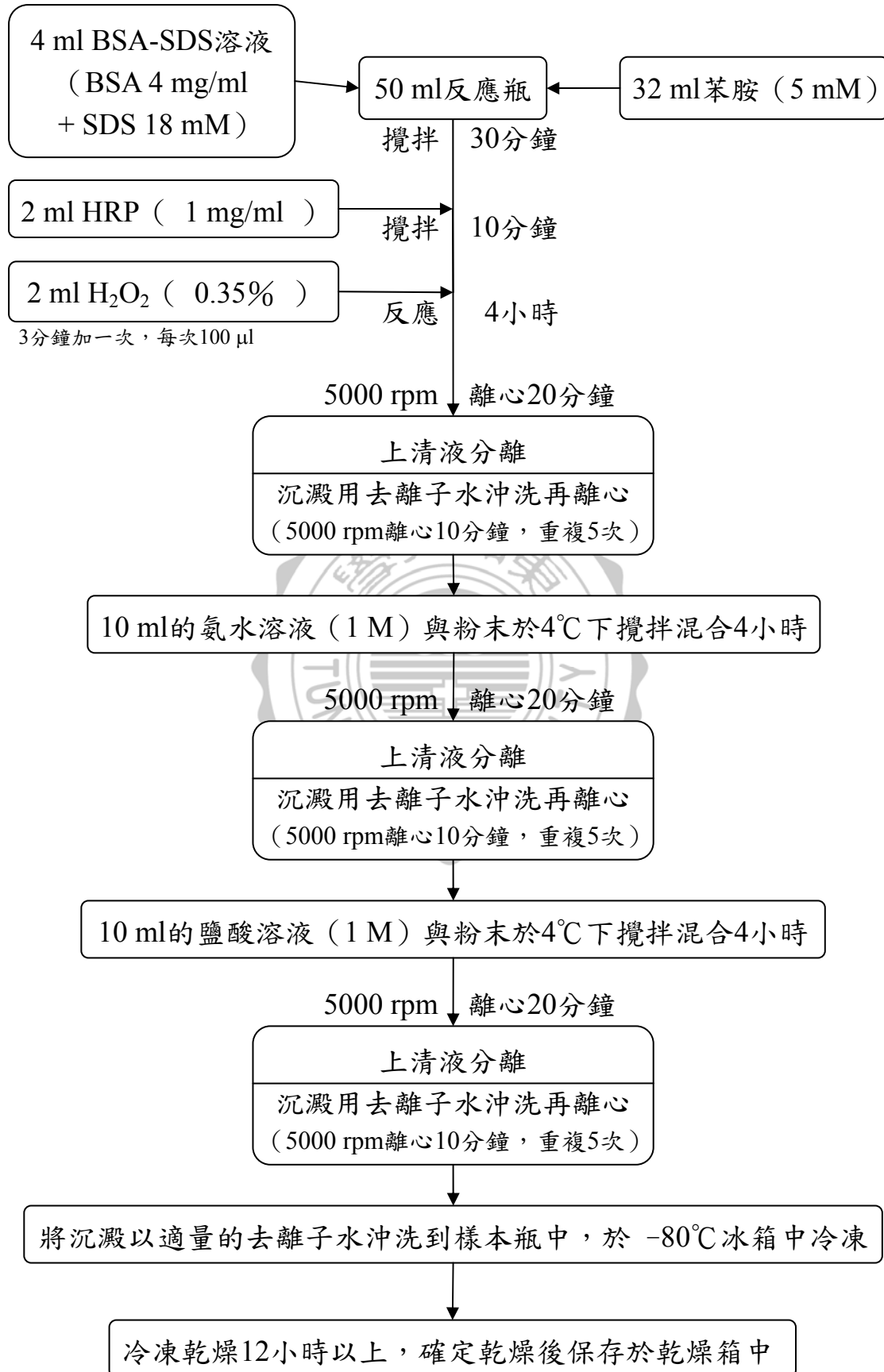
F. 氨水溶液 (去摻雜劑)

取  $28\%$  的氨水溶液  $3.45\ \text{ml}$  以去離子水稀釋至  $50\ \text{ml}$ , 配成  $1\ \text{M}$  的氨水溶液。

G. 鹽酸溶液 (再摻雜劑)

取  $37\%$  的鹽酸溶液  $4.17\ \text{ml}$  以去離子水稀釋至  $50\ \text{ml}$ , 配成  $1\ \text{M}$  的鹽酸溶液。

實驗流程圖：



**實驗步驟：(磁石攪拌，電磁攪拌器(MS-90)轉速為 3)**

1. 於 50 ml 樣本瓶中加入 28.8 ml 的檸檬酸－磷酸鹽緩衝液 (pH 4.0)，再加入 3.2 ml 的苯胺單體溶液 (50 mM) 混合。
2. 將 4 ml 的 4 mg/ml BSA－18 mM SDS 模板溶液加到苯胺單體溶液中，計時 30 分鐘，使模板與苯胺單體充分混合。
3. 時間到之後，再加入 2 ml 的 HRP 酵素溶液 (1 mg/ml)，計時 10 分鐘，使酵素充分混合到反應溶液中。(時間不宜過長以避免 SDS 影響)
4. 每 3 分鐘加入 100  $\mu$ l 的過氧化氫溶液 (0.35%(v/v))，直到總加入量達 2 ml。(共 20 次，需 1 小時)
5. 當過氧化氫溶液添加完後，開始替聚合反應計時，時間為 4 小時。
6. 時間一到，將 50 ml 樣本瓶移至冰浴中讓反應終止。(減緩剩餘可能反應)
7. 將反應溶液轉移到 50 ml 離心管中，用 5000 rpm 離心 20 分鐘。(轉速與時間可增加，提高分離效果)
8. 將溶液和沉澱物分離，添加 4 倍於殘留體積之去離子水沖洗沉澱物，再用 5000 rpm 離心 10 分鐘。(轉速與時間可增加，提高分離效果)
9. 再重複沖洗四次，共五次。(最末次盡可能不殘留任何可取體積)
10. 添加 10 ml 的氨水溶液 (1 M，體積可視粉末量加減) 將粉末沖洗到 50 ml 樣本瓶中，於 4°C 下磁石攪拌 (轉速 3) 4 小時。(時間可增加，可提高去摻雜效果)

11. 將去摻雜氨水溶液轉移到 50 ml 離心管中，用 5000 rpm 離心 20 分鐘。(轉速與時間可增加，提高分離效果)
12. 將溶液和沉澱物分離，添加 4 倍於殘留體積之去離子水沖洗沉澱物，再用 5000 rpm 離心 10 分鐘。(轉速與時間可增加，提高分離效果)
13. 再重複沖洗四次，共五次。(最末次盡可能不殘留任何可取體積)
14. 添加 10 ml 的鹽酸溶液 (1 M，體積可視粉末量加減) 將粉末沖洗到 50 ml 樣本瓶中，於 4°C 下磁石攪拌 (轉速 3) 4 小時。(時間可增加，可提高再摻雜效果)
15. 將摻雜鹽酸溶液轉移到 50 ml 離心管中，用 5000 rpm 離心 20 分鐘。(轉速與時間可增加，提高分離效果)
16. 將溶液和沉澱物分離，添加 4 倍於殘留體積之去離子水沖洗沉澱物，再用 5000 rpm 離心 10 分鐘。(轉速與時間可增加，提高分離效果)
17. 再重複沖洗四次，共五次。(最末次盡可能不殘留任何可取體積)
18. 將沉澱物添加適量的去離子水沖洗到 50 ml 樣本瓶 (已秤重) 中，於 -80°C 冰箱中冷凍至少 30 分鐘。
19. 利用冷凍乾燥機乾燥，約 12 小時。(時間可增加，提高乾燥程度)
20. 乾燥後取出秤重，之後保存於乾燥箱中。

## 2-4 分析方法

### 2-4.1 紫外光可見光光譜儀 (Ultraviolet-visible spectrophotometer)

#### 一、關於辣根過氧化酶活性影響條件分析

本研究中使用ABTS/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP分析系統<sup>[39]</sup>來分析辣根過氧化酶活性，這是利用ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) 可以作為提供辣根過氧化酶與過氧化氫催化作用的供氫物質，同時又能在過程中形成藍綠色且半衰期長的ABTS自由基物質，此自由基物質在波長 410 nm 左右有吸收值，因此可藉由此波長與固定的反應時間，判斷酵素的活性。

#### 1. 溶液 pH 值之影響

配備由 pH 3~8 的檸檬酸—磷酸鹽緩衝液，各取用 300 µl 的緩衝液，添加 150 µl ABTS 溶劑混合，最後加入 10 µl HRP 酵素開始計時，扣除後兩項體積，於反應前以去離子水平衡體積，最終體積在 2 ml，反應時間 15 分鐘，測其 410 nm 波長下的吸收值。

#### 2. 其他反應環境物質之影響

步驟如同前者，緩衝液則用前者最佳 pH 值的檸檬酸—磷酸鹽緩衝液，取用相同的緩衝液體積，再依序添加 ABTS 與 HRP 酵素開始計時，反應時間 15 分鐘，測其 410 nm 波長下的吸收值。



## 二、聚苯胺分析

根據文獻<sup>[4,5,40]</sup>可知，不同型態的聚苯胺都有其特定的紫外光可見光吸收光譜，像是完全還原態聚苯胺在波長330 nm附近有吸收峰，是分子鏈上苯環 $\pi-\pi^*$ 電子躍遷所造成，因此其他氧化態也都有此吸收峰；完全氧化態聚苯胺在330 nm與500 nm附近有吸收峰；鹼式中間氧化態聚苯胺在330 nm與640 nm附近有吸收峰，後者乃是分子鏈上醌環（quinoid ring）的激子（exciton）吸收所引起，當聚苯胺氧化程度增加時，此吸收峰會出現偏移，往更低的波長靠近，接近完全氧化態的波長；有質子酸摻雜的鹽式中間氧化態聚苯胺，鹼式的640 nm吸收峰會偏移至較高的波長，摻雜的每種質子酸所能造成吸收峰偏移程度也不同，不過一般此吸收峰都在700 nm~900 nm之間（本研究在750 nm左右）。此750 nm吸收峰乃是鹼式中間氧化態聚苯胺經過質子摻雜後，聚苯胺主鏈上的電子形成非定域化（delocalization）情形，並且使共振現象較佳，以致降低電子躍遷所需的能量。鹽式中間氧化態聚苯胺額外有在420 nm附近有另一個吸收峰，此吸收峰則源自於自由基陽離子，因此可由這些初步判斷聚合而成的物質為何型態。

### 方式一：

在 2 ml 塑膠比色槽內，加入 900  $\mu$ l 去離子水，取 100  $\mu$ l 反應溶液（即包含所有反應物質的溶液）加入均勻混合後，測聚合物

的紫外光可見光光譜。

#### 方式二：

在 2 ml 塑膠比色槽內，加入 1 ml 聚合物的粉末溶液（將聚合物 3 mg，溶於 50%(v/v)的 NMP 中），測聚合物的紫外光可見光光譜。

### 2-4.2 霍氏轉換紅外線光譜儀（Fourier transform infrared spectrometer，FT-IR）

每個物質其分子內部存在著許多振動，不同的官能基與結構有不同的頻率，當紅外光照射到振動的分子位置時，如果振動的頻率與紅外光頻率相同，此紅外光就會被吸收而獲得吸收峰，隨著調整變換的紅外光頻率，可以獲得許多不同的吸收峰，由此能判斷待測物所擁有的分子結構。下表 2.3 是聚苯胺上主要的幾個吸收峰。

本研究中，稱取 10 mg 聚合物與 100 mg KBr 混合，用瑪瑙研鉢磨細後壓錠，前往清華大學貴重儀器中心借用霍氏轉換紅外線光譜儀，測聚合物 IR 光譜，掃描範圍由 450~4000  $\text{cm}^{-1}$  解聚合物之分子結構。

表 2.3 聚苯胺主要官能基與結構之吸收峰<sup>[40]</sup>

| Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Assignment |
|--------------------------------|------------|
|--------------------------------|------------|

|        |  |
|--------|--|
| 3376   | NH str.  |
| 3310   | H-bonded NH str.                                       |
| 1589   | str. of N=Q=N  |
| 1496   | str. of N-B-N  |
| 1378   | C-N str. in QB <sub>t</sub> Q                          |
| 1306   | C-N str. in QB <sub>c</sub> Q, QBB, BBQ                |
| 1238   | C-N str. in BBB  |
| 1165   | a mode of N=Q=N  |
| (1131) | a mode of Q=NH <sup>+</sup> -B or B-NH <sup>+</sup> -B |
| 830    | C-H op on 1, 4-ring                                    |

---

Assignment : sym. = symmetric, str. = stretching,  
op. = out-of-plane bending, Q = quinoid unit, B = benzoid unit,  
B<sub>t</sub> = *trans*-benzoid unit, B<sub>c</sub> = *cis*-benzoid unit

---

### 2-4.3 熱重分析儀 (Thermogravimetric analyzer, TGA)

秤取約 10 mg 聚合物，放上熱重分析儀，在 10°C/min. 的升溫速率下，測量聚合物在室溫到 800°C 間的熱重損失，由聚合物重量損失情形可判斷其穩定性與模版含量。

### 2-4.4 場發式掃描電子顯微鏡 (Field emission-scanning electron microscope, FE-SEM)

取適量聚合物以碳膠帶固定，分兩次濺鍍白金每次 30 秒以增加顯像效果，藉此觀察聚合物粉末的外觀、表面與顆粒大小。

### 2-4.5 循環伏安法 (Cyclic voltammetry, CV)

本研究中使用碳糊電極來進行此方法，預備碳糊工作電極是將 0.16 g 石墨碳粉 (graphite powder) 和 0.04 g 聚合物粉末混合，用瑪瑙研鉢研磨混合均勻後，再加入石蠟油 (paraffin oil) 使之充分混合，再將粉末填充入事先製作好的電極管模具中，壓實後完成，再配合白金絲輔助電極與 Ag/AgCl 3 M NaCl 參考電極，放置如下圖 11，設定好電位範圍進行掃描，掃描速率 50 V/s，藉聚合物氧化還原峰的變化可概略知道聚合物之導電性。

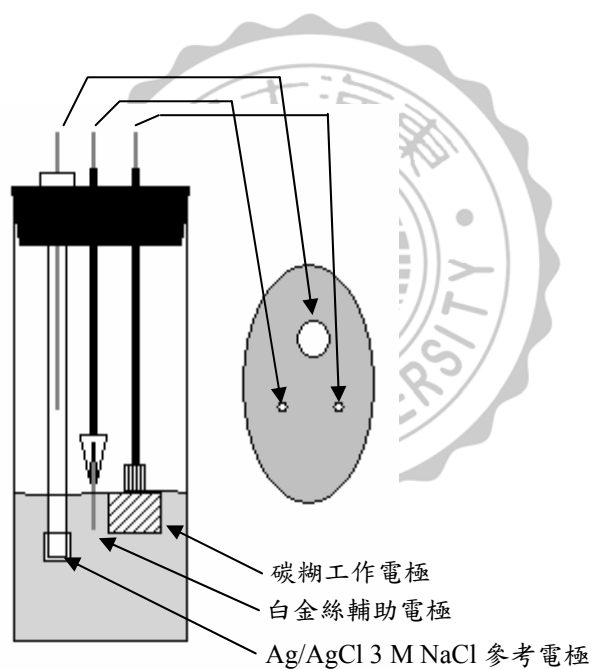


圖 11 循環伏安法碳糊電極放置示意圖

### 第三章 實驗結果與討論

## 3-1 紫外光可見光光譜儀分析

### 3-1.1 關於辣根過氧化酶活性影響條件分析

酵素是一種具有特殊活性中心的蛋白質，此活性中心能與某些種類的物質之分子（或結構）進行結合，然後酵素與這些物質會形成中間反應物，再將此分子（或結構）轉化成產物，此催化反應的能力稱為酵素的活性。一般常見會影響酵素活性的環境因素，有溫度、pH 值、氧化或還原劑、界面活性劑與有機溶劑等，因此本研究中針對相關因素的進行酵素活性分析，變因包括 pH 值、氧化劑與界面活性劑，並藉這些分析挑選出最佳的反應條件。以 HRP 與 ABTS 反應 15 分鐘時的吸收值，計算其殘留活性（Residual activity），定義如下(1-8)式。

$$\text{Residual activity(\%)} = \frac{\text{待測條件下的吸收值}}{\text{標準條件吸收值}} \times 100\% \quad (1-8)$$

其中，標準條件吸收值乃為每次以 ABTS 分析時，使用相同的 HRP 濃度，在 pH 4.0 且沒有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、SDS 與 BSA 情況下測得的吸收值。

待測條件下的吸收值則為使用與標準條件相同的 HRP 濃度，改變一個變因時，如 pH 值、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度、SDS 濃度或 BSA 濃度等，所測得的吸收值。

#### 一、溶液 pH 值之影響

為了維持酵素能在最佳活性下進行催化反應，一般都用緩衝溶液

控制環境的 pH 值，而酵素在不同 pH 環境下會有不同的活性表現，因此本實驗首先探討檸檬酸－磷酸鹽緩衝液最適用酵素活性之 pH 值。使用的 HRP 濃度為 0.0175 unit/ml。

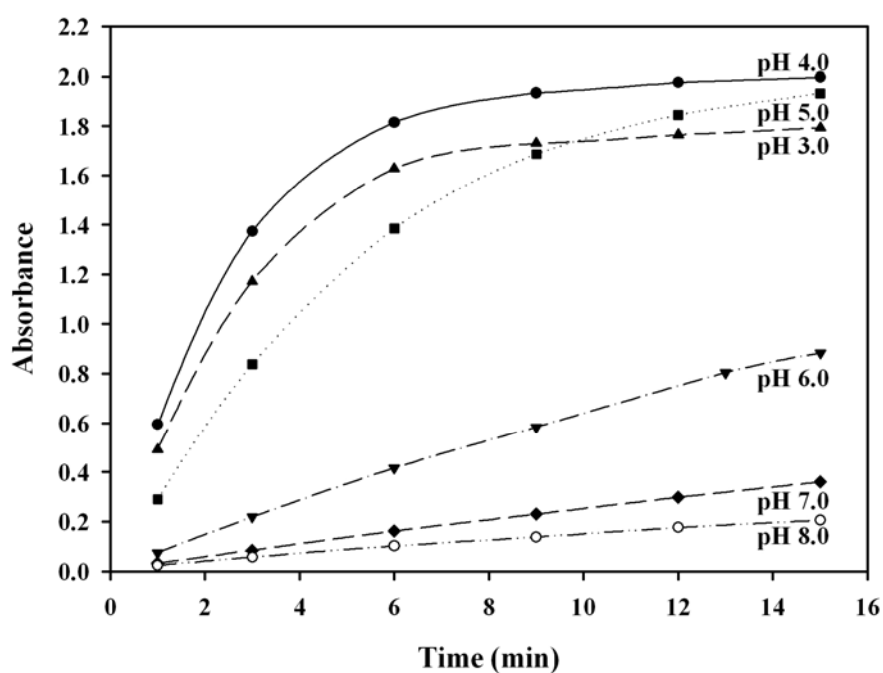


圖 12 pH 值對 HRP-ABTS 活性分析之影響，

pH 分別為 3.0(▲), 4.0(●), 5.0(■), 6.0(▼), 7.0(◆), 8.0(○)

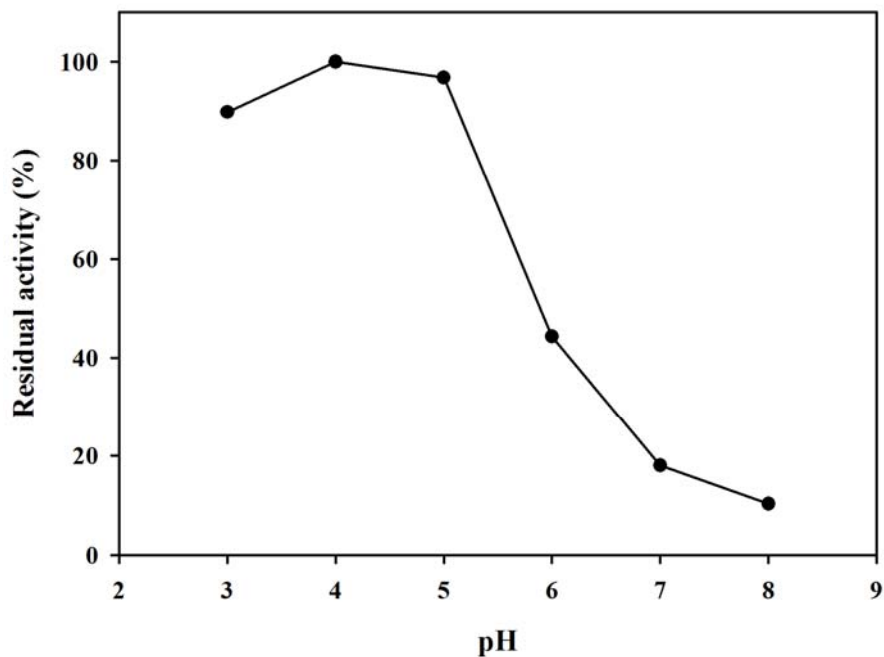


圖 13 pH 值對 HRP 酵素活性之影響

由圖 12 可見，當 pH 值在 6.0 以上的環境裡活性分析之吸收值與時間呈線性關係，且 HRP 的活性明顯較差；pH 5.0 的吸收值曲線在反應六分鐘後較平緩，而其活性較 pH 6.0 以上的佳，但與 pH 3.0 和 pH 4.0 相比則較差；在 pH 3.0 與 pH 4.0 時則反應能快速的達到平衡（即吸收值提升趨於平緩），但是 pH 4.0 的起始點較 pH 3.0 的高，且變化也比 pH 3.0 更大些。圖 13 的數據與計算是取自圖 12 中第 15 分鐘時的吸收值，可以看出 HRP 的活性在 pH 3.0~5.0 之間遠比更高 pH 值的佳，與圖 12 相對應後可確定最佳活性 pH 值接近 pH 4.0。

文獻<sup>[35]</sup>中亦提到一般 HRP 的最佳活性 pH 值在 3.0 (HRP 源之山葵)

與 4.0 (HRP源之西洋山葵)，另有文獻<sup>[4,41]</sup>顯示HRP有最佳聚合效果之pH值在 4.0 到 4.5 之間。因此，在本研究中苯胺單體使用pH 4.0 的檸檬酸－磷酸鹽緩衝液配製，雖然最終的混合溶液pH值有微幅上升（大約pH 4.2），仍未超過最佳活性的pH值範圍，因此可以確定反應使用的pH值不會造成太大影響，故HRP在反應時是落在合適的活性範圍內。

## 二、氧化劑－過氧化氫濃度之影響

氧化劑會引起酵素結構的改變，而造成酵素失去活性，由於聚合反應添加的過氧化氫濃度的初始為 100 mM，當溶液平衡時最終濃度約在 5 mM左右，為了避免過氧化氫的使用而引起對HRP活性的影響，故需要探討其合適的使用濃度。因此，利用ABTS分析方法探討過氧化氫濃度對HRP活性的影響。使用的HRP濃度為  $5 \times 10^{-6}$  mg/ml。



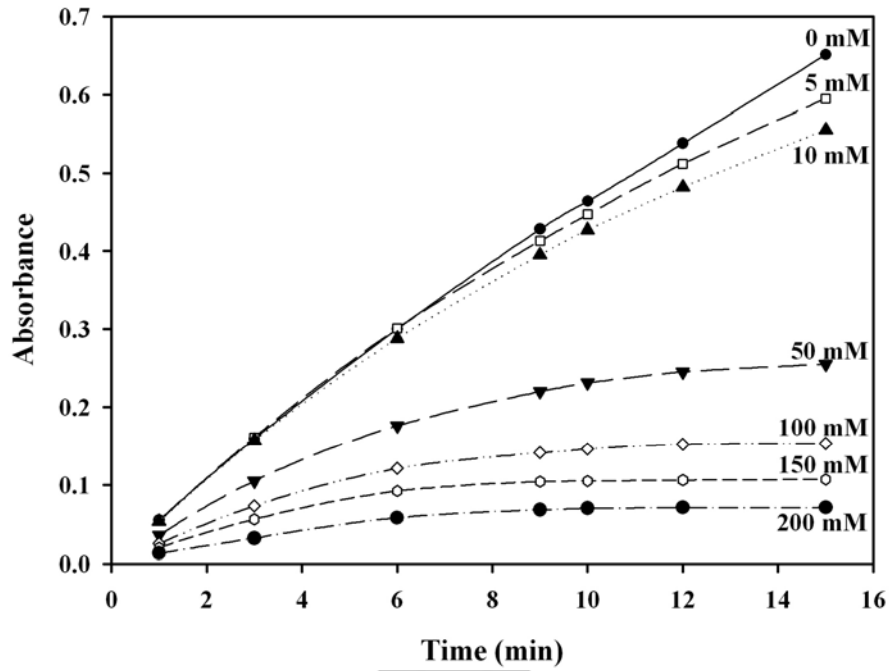


圖 14 過氧化氫濃度對 HRP-ABTS 活性分析之影響，  
 過氧化氫濃度分別為 0 mM (—●—), 5 mM (-□-), 10 mM (···▲···),  
 50 mM (-▼-), 100 mM (-◇-), 150 mM (-○-), 200 mM (-●-)

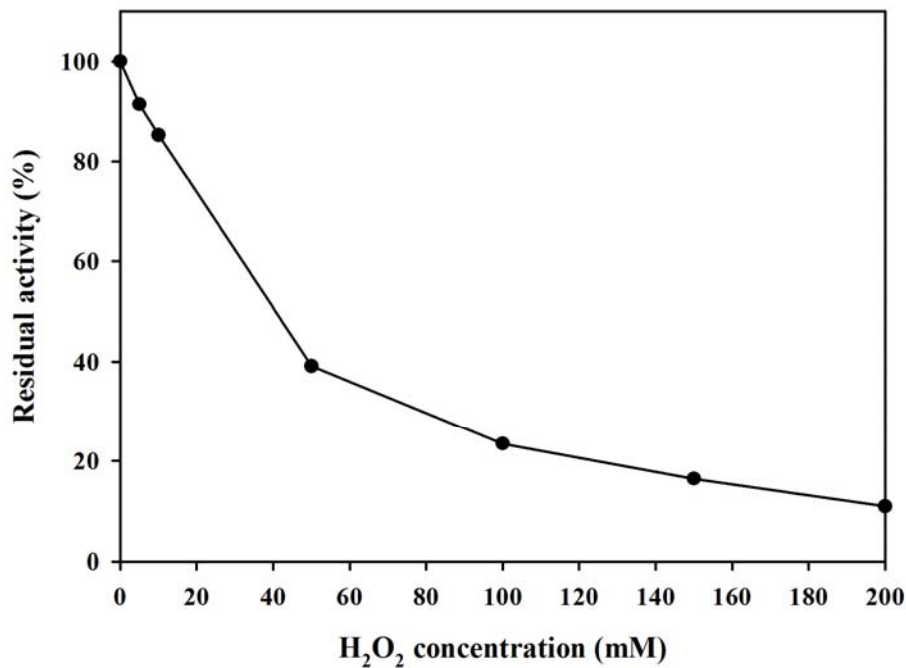


圖 15 過氧化氫濃度對 HRP 酵素活性之影響

從圖 14 裡可以明顯的看到，當過氧化氫濃度高於 50 mM 後，活性明顯偏低，而過氧化氫濃度在 10 mM 以下，在一定時間裡，過氧化氫濃度對 HRP 活性的影響並非十分明顯。圖 15 的數據與計算是取自圖 14 中第 15 分鐘時的吸收值，由此可見，提高過氧化氫的濃度導致 HRP 的活性有顯著的下降。由趨勢猜測過氧化氫濃度在 20 mM 時，HRP 的活性下降了大約 30%，可見過氧化氫的使用濃度要落在一定的範圍內，才能保持 HRP 較高的催化活性。

文獻<sup>[4]</sup>中所使用之過氧化氫濃度為 0.03% (約 8.8 mM)，本研究使用的濃度為 5 mM，由圖 15 可知，此濃度將維持 92% 的 HRP 活性。由實驗結果與文獻比較後，可以確定反應時所使用的過氧化氫濃度是適量的。

### 三、界面活性劑—SDS 對於 HRP 活性之影響

本研究過程中，先期試驗於模版 BSA 裡添加 SDS 的效果時，添加了相當高濃度的 SDS，隨後經過幾次嘗試與探討後，注意到其對 HRP 也造成影響。由實驗結果可見，SDS 於模版聚合過程中具有重要功能，可提高變性 BSA 於反應溶液之 pH 值下的負電性，但是 SDS 亦會形成另兩個功用，一是具有類似摻雜的功能，添加 SDS 可聚合出綠色的導電性聚苯胺，二是 SDS 除了可造成 BSA 變性外，亦可能

造成 HRP 變性。

這是由於 HRP 酵素也是一種蛋白質，當 SDS 與 HRP 接觸後，SDS 會吸附到 HRP 的結構上，此過程會造成 HRP 的摺疊結構被破壞，然而酵素的活性是建立在所擁有的特殊的摺疊結構。由於 SDS 於研究中主要作用為維持 BSA 的變性與改變其帶電性，而過量的 SDS 會破壞 HRP 的活性，因此，選擇適當 SDS 濃度就很重要。

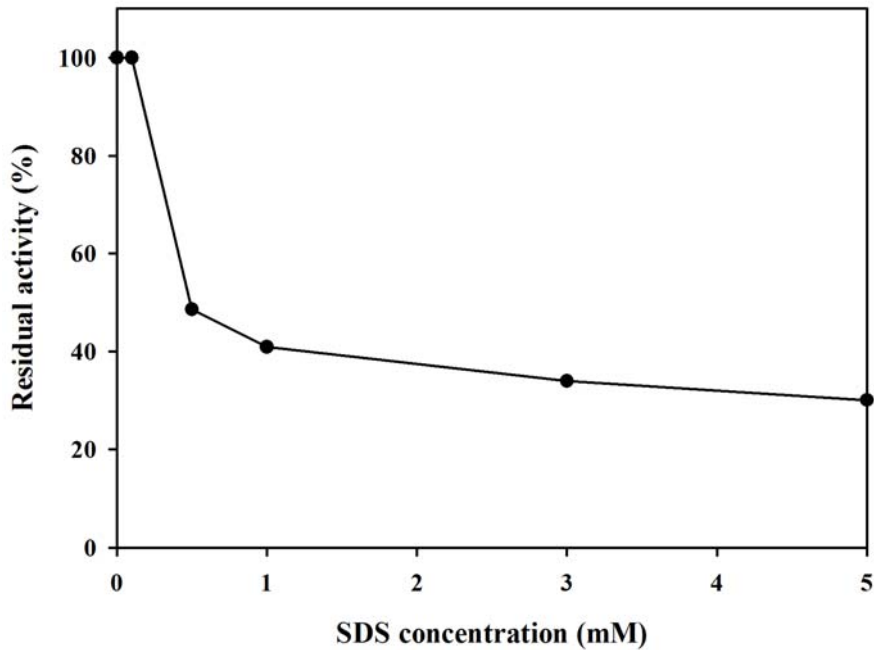


圖 16 SDS 濃度對 HRP ( $5 \times 10^{-4}$  mg/ml) 酵素活性之影響，

SDS 濃度為 0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mM

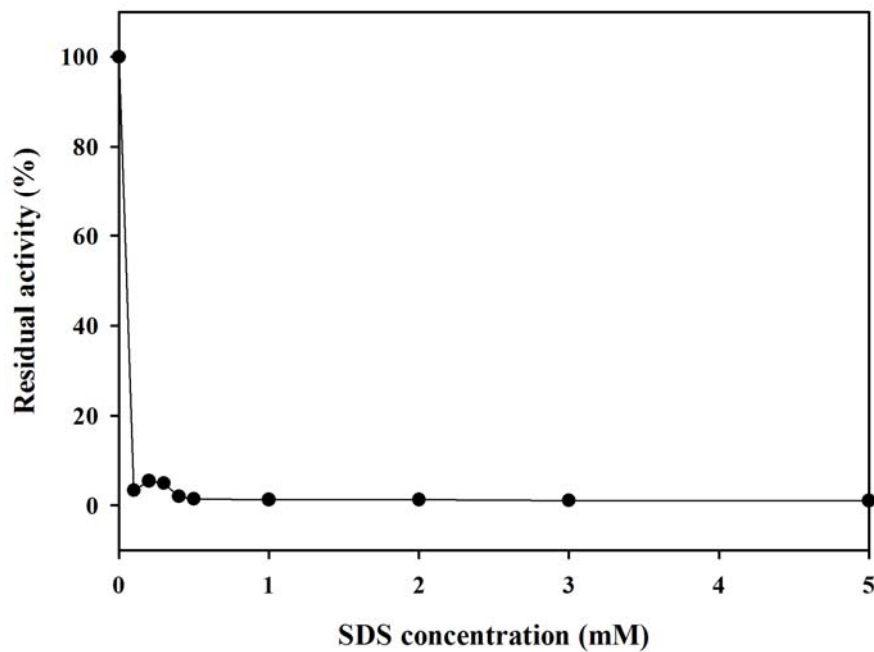


圖 17 SDS濃度對HRP ( $10^{-5}$  mg/ml) 酵素活性之影響，

SDS濃度為 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mM

圖 16 顯示，濃度在 0.5 mM 以下的 SDS，使得 HRP 濃度為  $5 \times 10^{-4}$  mg/ml 的活性損失約 50%，而濃度為 0.1 mM 的 SDS 則對 HRP 的活性無明顯影響。而當 HRP 的濃度降為  $10^{-5}$  mg/ml 時，濃度為 0.1 mM 的 SDS 則幾乎使 HRP 完全失活。因此提高 HRP 的濃度會使 SDS 的影響減少，而 HRP 的濃度過低時，SDS 的影響就會很明顯。

由於本研究之實驗中 SDS 是先將與熱變性的 BSA 進行混合，形成合適之模板，BSA 與 SDS 的先行結合，可能會緩解 SDS 對 HRP 的影響，但無論如何，先要探討 BSA 與 SDS 混合後，其對於 HRP 活性可能造成的影響。

#### 四、BSA—SDS 對於 HRP 活性之影響

在本研究中之初期，SDS 的添加量是根據 BSA 的使用量來決定的。若選用 SDS 的濃度為 1.0 mM，其影響如圖 16 所示，進行聚合反應時，如果 BSA 的濃度為 0.2 mg/ml，則無法合成出預期的具有導電性之聚苯胺產物，可見於此條件下兩者無法形成完美的配合，導致 SDS 無法確實鍵結上全部的 BSA 分子，使全部的 BSA 分子帶負電性。

如前文所言，於本研究中 SDS 主要目的在改變 BSA 帶電性，但是卻發現到 SDS 會非常明顯地影響 HRP 的活性。而 SDS 於本實驗的設計是先將與 BSA 混合，因此考慮 SDS 對 HRP 活性分析時，不能僅考慮 SDS 對 HRP 活性的影響，而需要將 SDS 與 BSA 兩者合併進行分析並探討兩者混合後對 HRP 的影響。

為挑選合適反應之 SDS 濃度，在 SDS 濃度介於 1.0~2.0 mM 之間再選三個條件進行聚合，卻都獲得相當好的效果，此部份相關的探討與分析後面會再仔細提到，於是將挑選的 SDS 濃度與不同濃度的 BSA 混合，再分析 HRP 活性，並比較 SDS 與 BSA—SDS 對於 HRP 活性的影響。

(下面圖中，使用的 HRP 濃度皆為  $10^{-5}$  mg/ml)

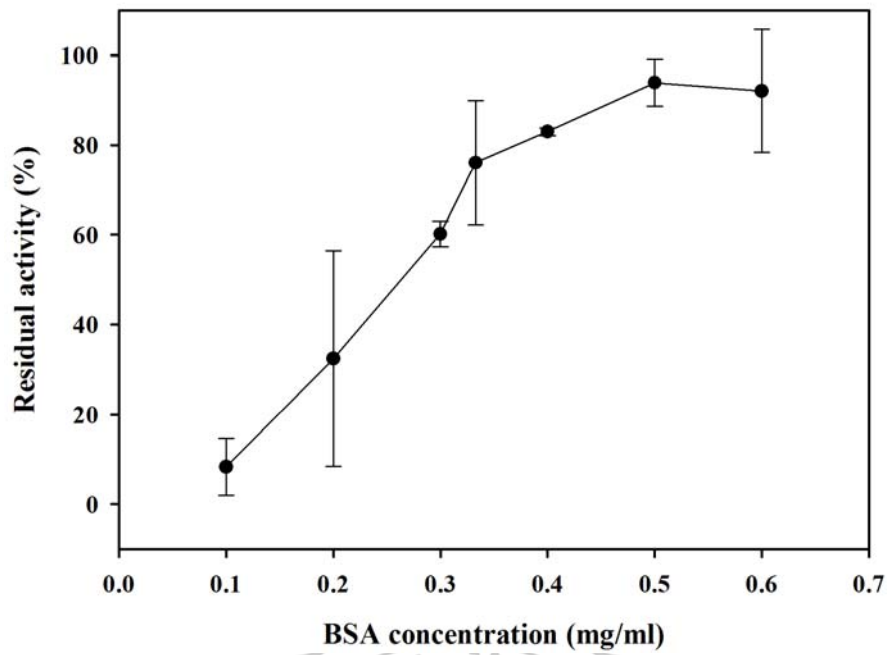


圖 18 在 SDS 濃度為 1.5 mM 時，BSA 濃度對 HRP 酵素活性之影響，

BSA 濃度為 0.1, 0.2, 0.3, 0.33, 0.4, 0.5, 0.6 mg/ml

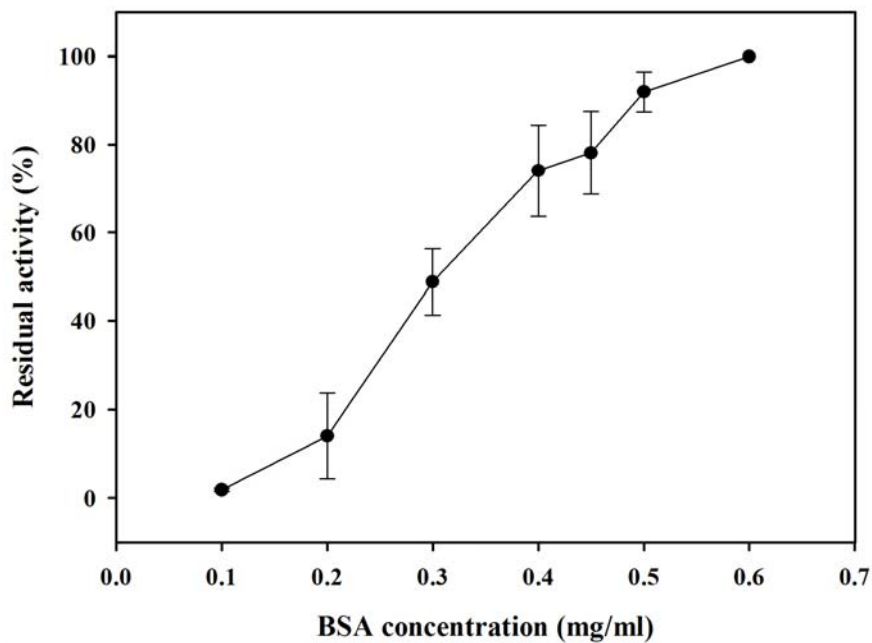


圖 19 在 SDS 濃度為 1.8 mM 時，BSA 濃度對 HRP 酵素活性之影響，

BSA 濃度為 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6 mg/ml

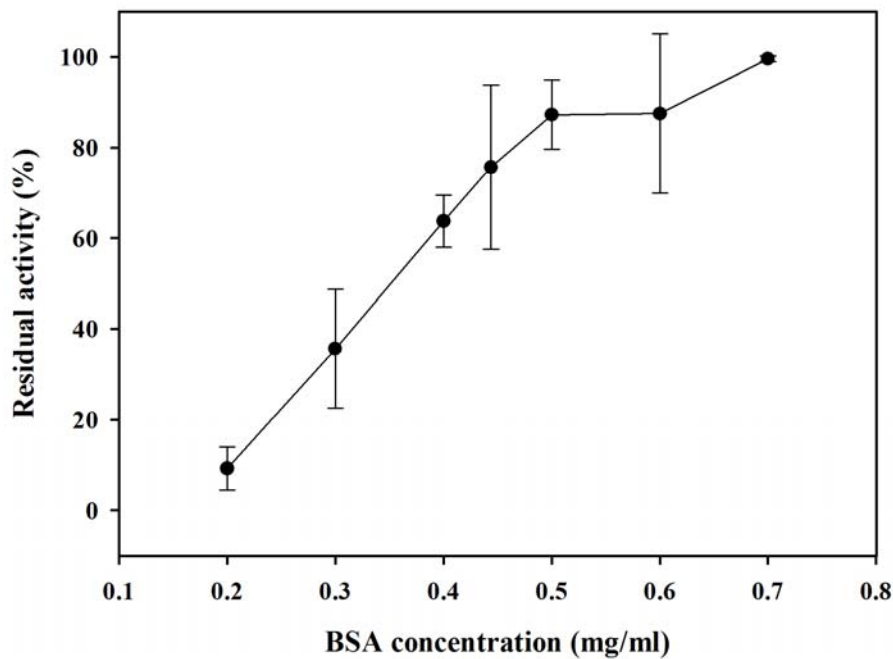


圖 20 在 SDS 濃度為 2.0 mM 時，BSA 濃度對 HRP 酵素活性之影響，

BSA 濃度為 0.2, 0.3, 0.4, 0.44, 0.5, 0.6, 0.7 mg/ml

圖 18 裡，BSA 的濃度在 0.2 mg/ml 時波動最大而 0.33 與 0.6 mg/ml 次之，而其他濃度下只有小波動；圖 19 裡，除了相對高濃度的兩個條件沒有明顯波動外，其他幾個的 HRP 之活性波動的情形很固定，因每次的分析都能落在固定的範圍內；圖 20 裡，BSA 的濃度在 0.44 與 0.6 mg/ml 的波動較大而 0.3 mg/ml 次之。這可能由於 SDS 與 BSA 間之非共價的鍵結結合，導致在混合 HRP 的操作過程可能造成的誤差，使 SDS 很可能因為攪拌而脫離 BSA，再與 HRP 相結合，影響到 HRP 的活性。

雖然幾次的 BSA 與 SDS 的混合溶液於酵素活性分析裡，可以清楚看出許多部份的數據之最高與最低兩者間差距是很大的，然而就平均值來看可以概略確定其趨勢，由圖 18 到圖 20 接顯示出，HRP 的活性會隨著 BSA 的濃度增加而提高，因此雖然不能由此判斷出最佳的 BSA 混合 SDS 的比例，但能確定 BSA 與 SDS 結合後可有效避免 HRP 受到影響。

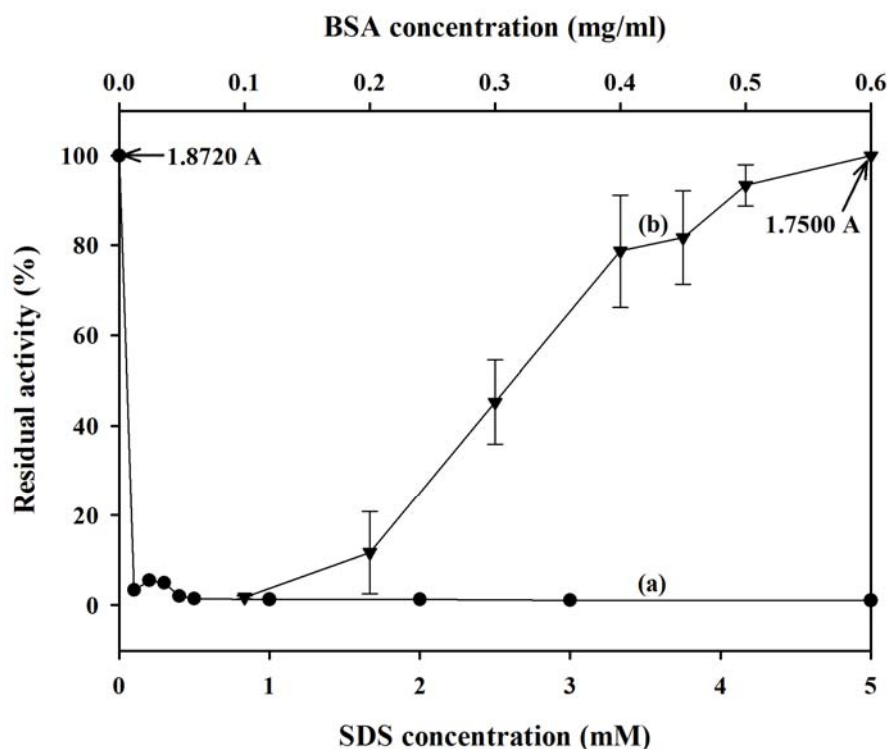


圖 21 不同 BSA 濃度混合 1.8 mM SDS 與 SDS 對於 HRP 活性之影響比較圖，(a) 不同 SDS 濃度對 HRP 酵素活性之影響；(b) 不同 BSA 濃度混合 1.8 mM SDS 時對 HRP 酵素活性之影響（SDS 濃度的挑選是來自目前的最佳反應條件）



圖 21 裡，可以發現當添加的 BSA 濃度逐漸增高時，HRP 活性也能逐漸回升，雖無法達到不影響的效果，但是當 SDS 與適量的 BSA 能有效結合時，就很難再與 HRP 結合，故 HRP 的活性表現變佳。因此在聚合反應中，選擇不影響 HRP 活性的 SDS 濃度配合適量的 BSA 濃度，以獲得良好的 HRP 活性。至於最佳的濃度組合，後面會有實驗結果與討論。

### 3-1.2 聚苯胺分析

文獻<sup>[4,5,40]</sup>中說明不同型態的聚苯胺都有其特定的紫外光可見光吸收峰，只要吸收光譜上具有該型態全部的吸收峰，就可藉由此來判定聚苯胺的氧化還原型態，下表 3.1 中列出各型態的吸收峰波長。

表 3.1 不同聚苯胺型態之吸收波長<sup>[17]</sup>

| 聚苯胺型態   | 吸收波長                 |
|---------|----------------------|
| 完全還原型態  | 330 nm               |
| 完全氧化態   | 330 nm、500 nm        |
| 醯式中間氧化態 | 330 nm、640 nm        |
| 鹽式中間氧化態 | 330 nm、420 nm、750 nm |

## 一、無模板的聚苯胺分析

最初於反應瓶中加入 1.8 ml 的苯胺單體溶液 (5 mM, 以 pH 4.3 磷酸鹽緩衝液配備), 接著添加 0.1 ml 的 HRP (5 mg/ml), 再加入 0.1 ml 的過氧化氫 (初始濃度為 100 mM, 每 6 分鐘加 10  $\mu$ l), 反應 2 小時, 嘗試單純使用酵素進行聚合, 取 100  $\mu$ l 溶液測吸收光譜, 並將產物混合鹽酸、氫氧化鈉和氨水, 以了解混合後之變化, 與能否獲得有用產物。

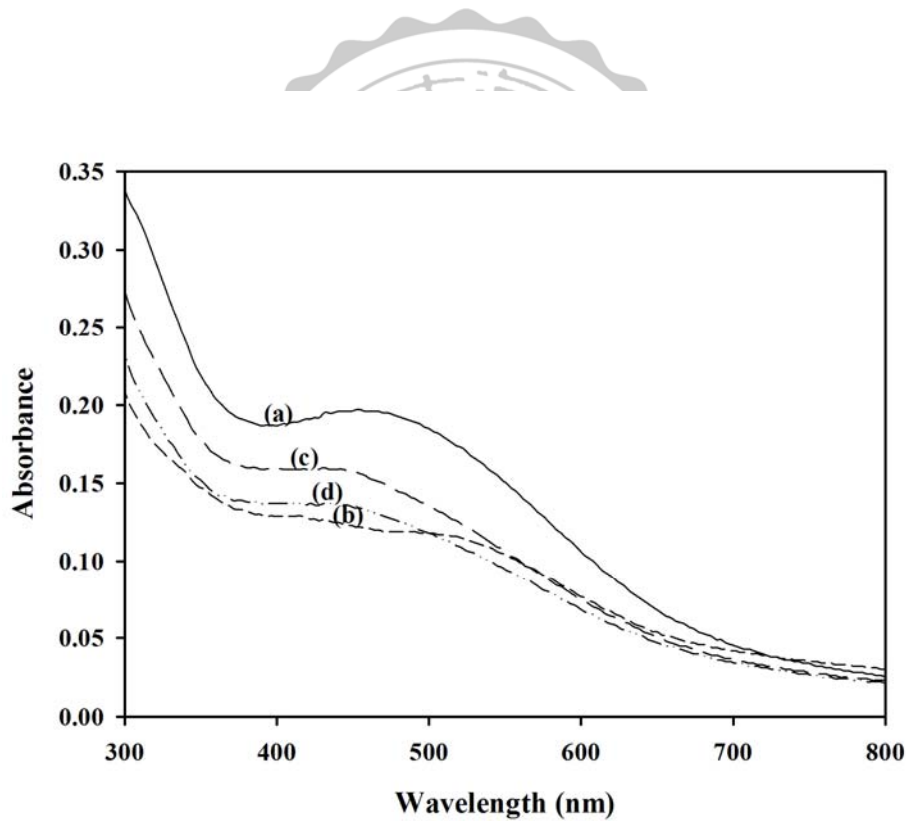


圖 22 比較無模板聚合後使用酸鹼處理的差別之吸收光譜圖, (a) 聚苯胺; (b) 鹽酸處理的聚苯胺; (c) 氫氧化鈉處理的聚苯胺; (d) 氨水處理的聚苯胺

由圖 22 中可見，在不添加模板聚合時，無法產生鹽式中間氧化態聚苯胺，因為不具有鹽式中間氧化態於 700 nm~900 nm 處的特徵吸收峰。而在此反應條件下，不管加入酸或鹼也都單單使在 460 nm 左右的波峰偏移與下降一點點，沒有能轉換聚苯胺產物的型態。

由文獻<sup>[41]</sup>可知，這樣的聚合產物應該是寡聚合物或多分枝聚合物，此情形可藉由添加模板增加鏈長並減少分枝聚合，還有添加摻雜物來改善。

## 二、單純以 BSA 當模板的聚苯胺分析

模板的應用可使苯胺有規律的排列，較有機會得到長鏈的聚苯胺，挑選加熱變性的 BSA 為模板 0.1 ml，將之混合到 0.8 ml 不同 pH 值的苯胺單體溶液（最終濃度為 5 mM，以檸檬酸—磷酸鹽緩衝液配備）中，再添加 0.05 ml 的 HRP (1 mg/ml) 與 0.05 ml 的過氧化氫 (100 mM) 進行聚合反應，測量在不同 pH 環境下聚合，聚合成的產物之差異或變化。

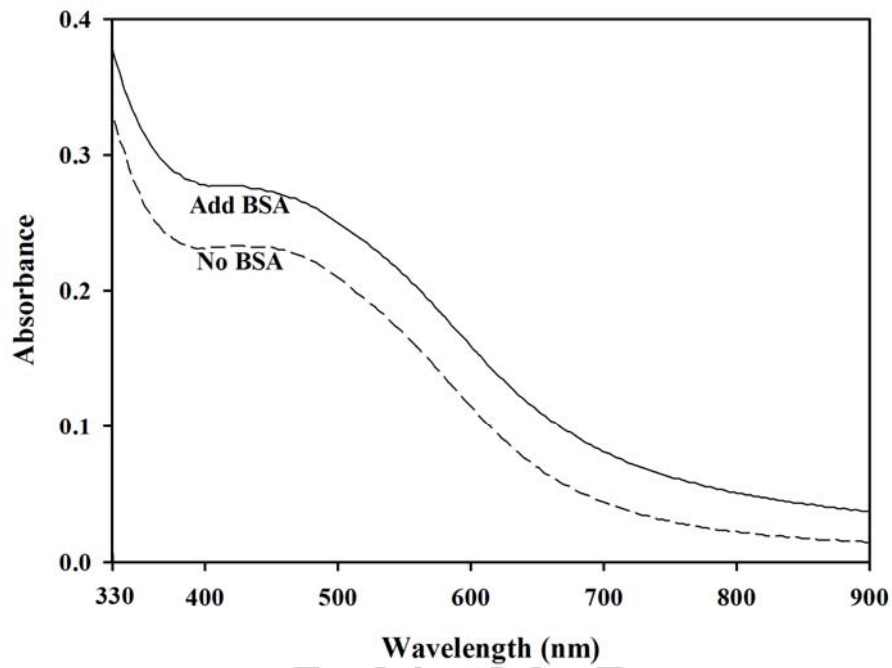


圖 23 添加 0.2 mg/ml BSA 對聚合產物之吸收光譜圖的影響(使用 pH 4.3 的磷酸鹽緩衝液)

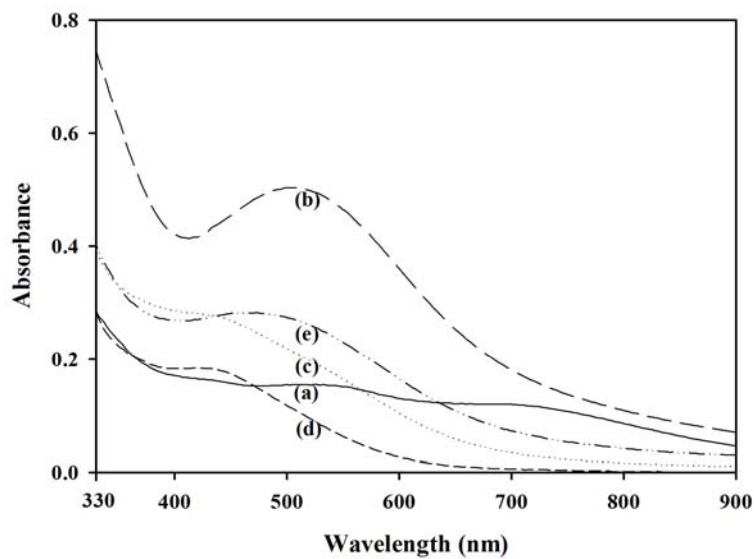


圖 24 以不同的 pH 值配合 0.2 mg/ml BSA 聚合之吸收光譜圖，(a)到 (d)是用檸檬酸-磷酸鹽緩衝液配備，pH 值依序為 3.0, 4.3, 6.0, 8.0；(e)則是用 pH 4.3 磷酸鹽緩衝液配備

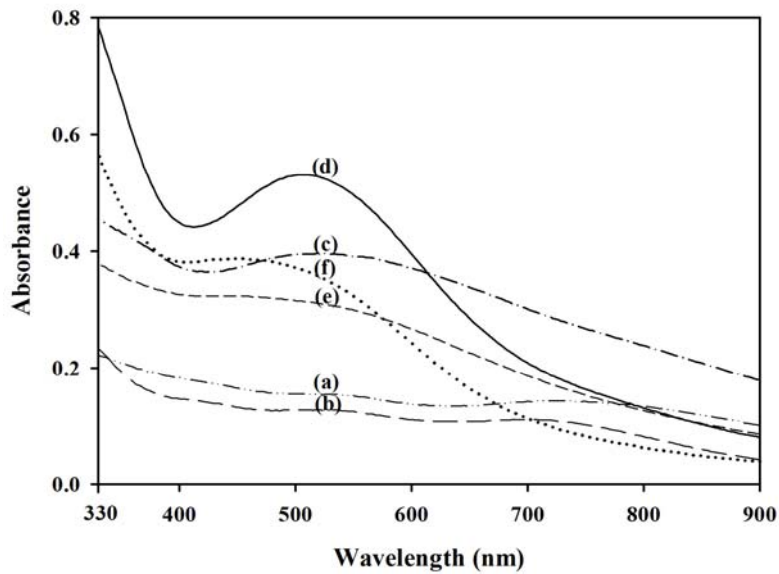


圖 25 以不同的 pH 值添加 0.2 mg/ml BSA 與否聚合之吸收光譜圖，  
 無添加 BSA 的 pH 值為(a) 3.0；(c) 4.0；(e) 5.0，  
 有添加 BSA 的 pH 值為(b) 3.0；(d) 4.0；(f) 5.0

由圖 23 來看，由相同稀釋方式的產物溶液之吸收峰的變化，可以確定加入模板是有提高聚合的效果，但對於氧化態的變化則未有任何成效。由圖 24 與圖 25 來看，能明顯注意到在 pH 4.0 與 4.3 時吸收值遠較其他 pH 值高，可見此 pH 條件下酵素較能獲得應用，然而從兩圖中都可些微注意到在 pH 3.0 時應該有 4 個吸收峰，其中波長 330 nm 和 500 nm 左右這兩個吸收峰，與未加模板之產物的吸收峰相同，而 400 nm 和 700 nm 左右則應該是與溶液 pH 值有關，低 pH 值使得聚合反應同時產生幾個氧化態，又低 pH 值使 HRP 活性低，所以反應的效果也最差。

由於弱酸與弱鹼的環境，皆非能提供 HRP 最佳活性的環境，因此大幅削弱酵素聚合的能力，只能產出少量產物與自由基。因此判斷聚合過程中，BSA 也許能提高聚合程度，但是 BSA 的等電點在 4.7 左右，在 pH 4.0 的反應環境下使 BSA 所帶電性以正電為主，而苯胺的 pKa 值為 4.63 也可保持催化形成的苯胺維持自由基陽離子狀態，故在帶正電的 BSA 排斥苯胺的自由基陽離子，使聚合時苯胺間碰撞機會增加，聚合程度也隨之提高，但是無法獲得鹽式中間氧化態聚苯胺。

### 三、嘗試變性 BSA 混合 SDS 為模板之聚合分析

文獻<sup>[22]</sup>中提到聚苯胺聚合時模板需要帶負電荷，而反應溶液 pH 值為 4.0，低於 BSA 的等電點 4.7，所以 BSA 帶電性以正電為主，故添加能改變 BSA 帶電性質的界面活性劑—SDS，將兩者混合後加到不同 pH 值的單體溶液中，再進行聚合反應，測量在不同 pH 環境下聚合，聚合成的產物吸收峰之差異。

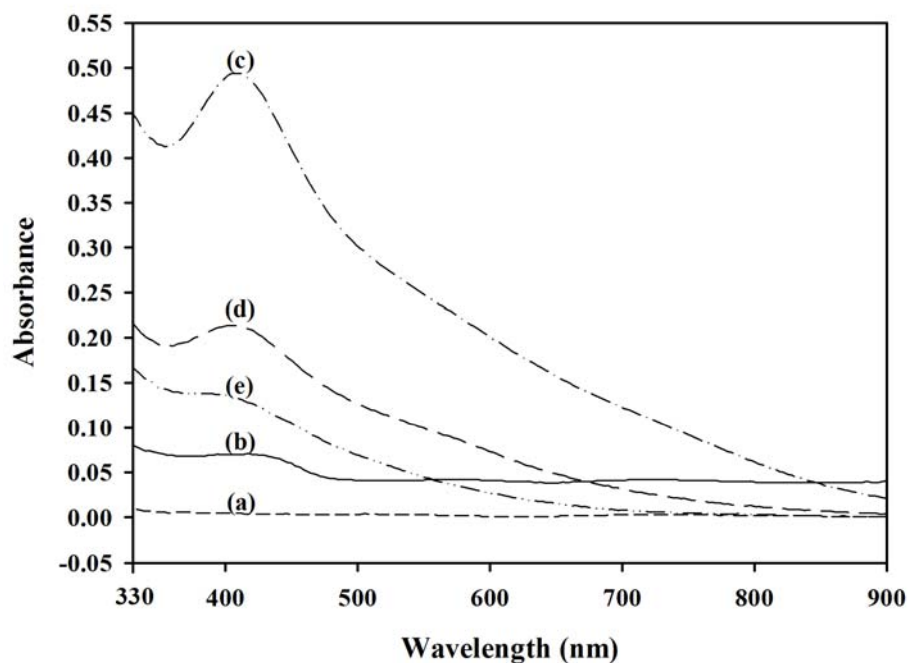


圖 26 以不同的 pH 值添加 0.2 mg/ml BSA 與 5 mM SDS 聚合之吸收光譜圖，(a) pH 3.0；(b) pH 4.0；(c) pH 5.0；(d) pH 6.0；(e) pH 8.0

由圖 26 可見，添加此比例的模板時，pH 值 5.0 能視為分界線，當 pH 增加時吸收峰會降低，而低於 5.0 時，卻能使苯胺同時聚出幾個氧化態。由反應過程觀察可發現，聚合是在 pH 5.0 以上的幾個 pH 值其產物皆為溶解狀態，而 pH 4.0 的產物則尚可看的到綠色沉澱，pH 3.0 的產物則無任何可見變化。SDS 在預設作用乃在改變 BSA 帶電性，但是由結果來看，在添加此比例的模板下，SDS 不僅影響聚合物結構與生成量，亦同時影響到酵素的活性與反應機構，因此需要考慮調節兩者間的關係與使用比例。

#### 四、調整 SDS 濃度與 BSA 混合之聚合反應

由 SDS 對於 HRP 活性之分析結果可見，SDS 濃度高於 0.5 mM 時 HRP 活性明顯較差，因此嘗試調整幾個 SDS 濃度聚合並分析其變化。

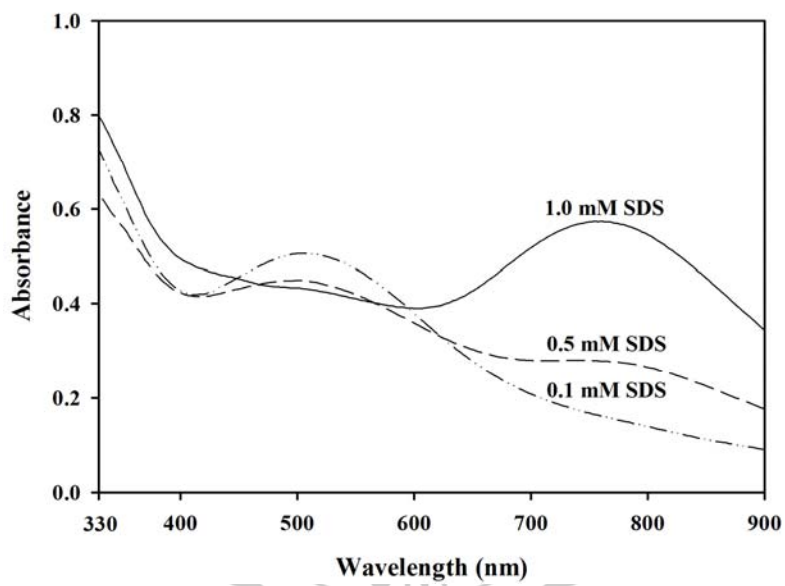


圖 27 不同 SDS 濃度混合 0.2 mg/ml BSA 聚合反應之吸收光譜圖



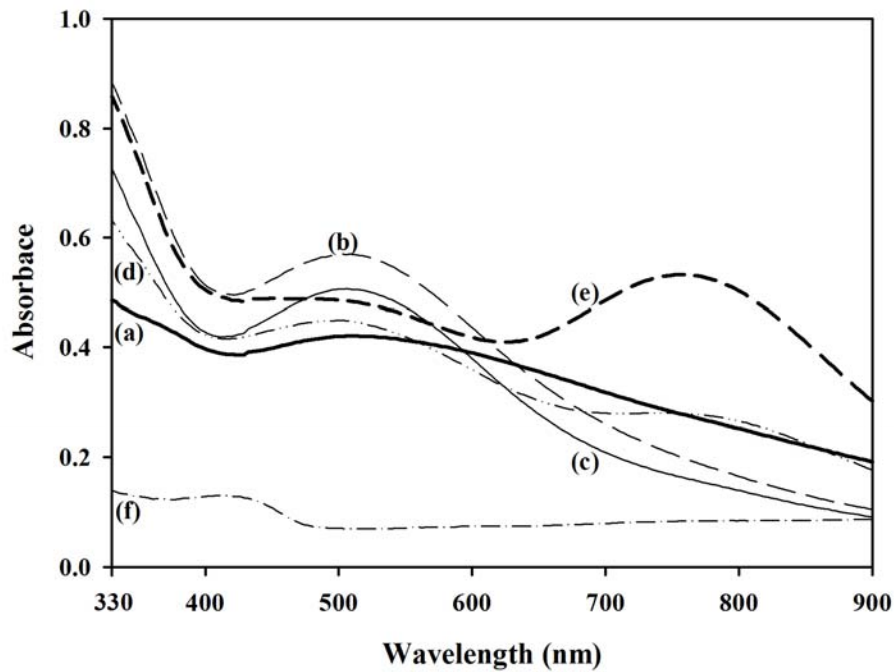


圖 28 比較有否混合 BSA 與添加不同 SDS 濃度聚合反應之吸收光譜圖，(a)為聚合時無添加 BSA 與 SDS，其他聚合則是以 0.2 mg/ml BSA 與 SDS 混合，而 SDS 的濃度從(b)到(f)依序為 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mM

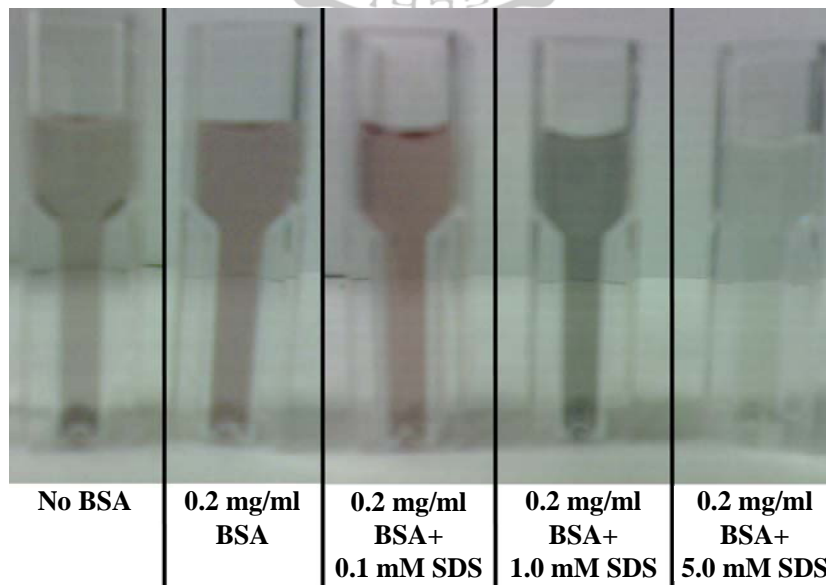


圖 29 幾種模版聚合顏色圖

由圖 27 到圖 29 可見吸收峰與顏色的明顯變化，所以 SDS 在以 BSA 為模板的聚合時是有效用的，但使用的 SDS 濃度有待嘗試。圖 27 與圖 28 中，可以了解到 BSA 與 SDS 間應該會有最佳配合的濃度，如果 BSA 比例較高則 SDS 無法提供足夠的影響，使聚合的氧化態沒法大幅度變化，但是若 SDS 比例較高則 BSA 無法充分的吸引 SDS，導致 HRP 因為 SDS 覆蓋也變性，變成為模板的一部分同時也降低聚合程度；圖 29 中發現較高的 SDS 濃度（5 mM）可聚出淡綠色產物，水溶性高，但是產量低；過低的 SDS 濃度（0.1 mM）則無效果。

比較文獻<sup>[22]</sup>與實驗結果後，可見於反應中混和的模板濃度為 BSA 0.2 mg/ml 與 SDS 1.0 mM 時，能夠具有負價模板的功能，因能獲得深綠色產物，有可能為具導電性之鹽式中間氧化態聚苯胺。所以當 BSA 與 SDS 兩者濃度在一定比例時，可以形成最佳的負價模板，因此針對此假設來進行下面的分析與探討。

## 五、不同的 BSA 與 SDS 濃度進行聚合

由先前實驗知道，BSA 混合 SDS 可影響聚合反應，兩者間應該會有最佳配合的濃度。為找尋最佳比例關係做了下列實驗。

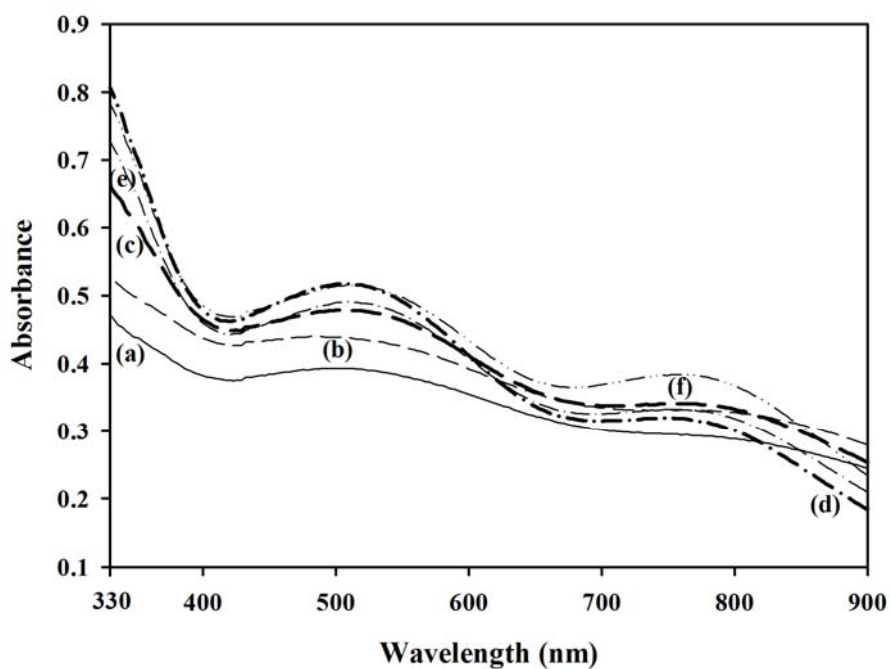


圖 30 比較混合 BSA 與添加 0.5 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖，  
BSA 的濃度從(a)到(f)依序為 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 mg/ml

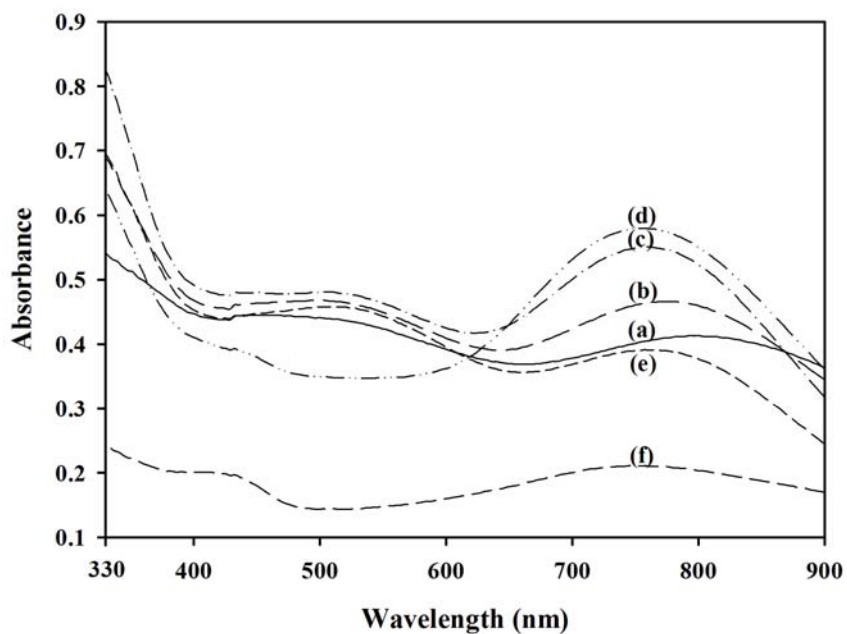


圖 31 比較混合 BSA 與添加 0.8 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖，  
BSA 的濃度從(a)到(f)依序為 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 mg/ml

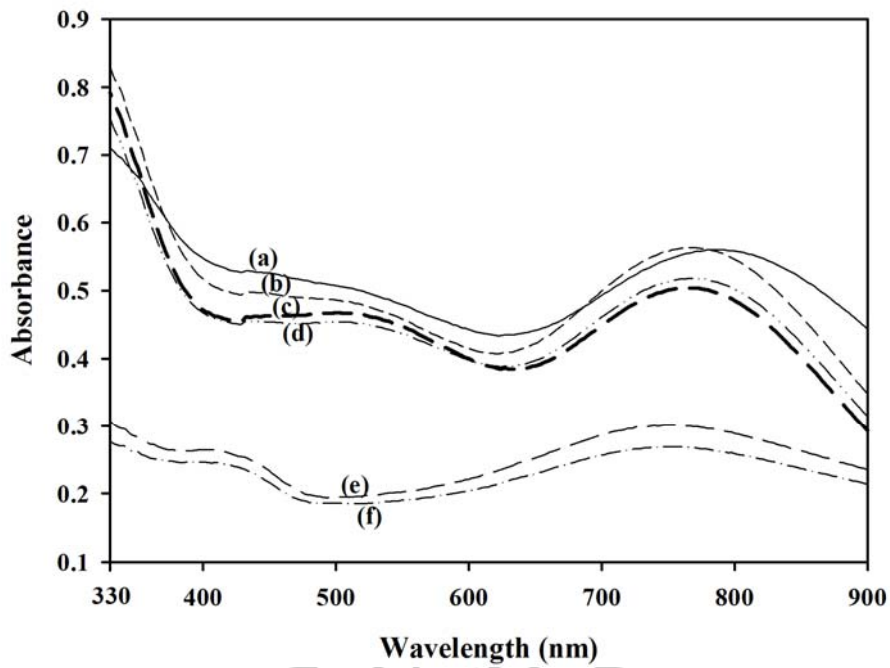


圖 32 比較混合 BSA 與添加 1.0 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖，  
BSA 的濃度從(a)到(f)依序為 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 mg/ml

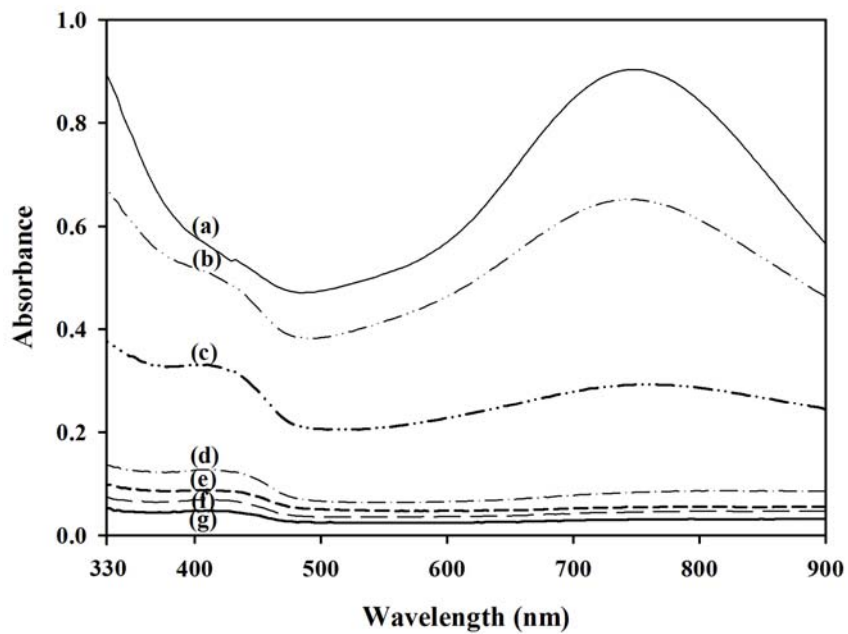


圖 33 比較混合 BSA 與添加 2.0 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖，  
BSA 的濃度從(a)到(g)依序為 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 mg/ml

由圖 30 裡產物以 500 nm 吸收峰（完全氧化態）為主，並包含一部分 750 nm 吸收峰（鹽式中間氧化態），顯示此數個條件下 BSA 與 SDS 間的混合效果不佳；圖 31 裡產物則在兩氧化態間變化，並有部分混合具有實際效果，突出 750 nm 吸收峰，可以猜測為鹽式中間氧化態聚苯胺；圖 32 裡產物以 750 nm 吸收峰為主，並包含一部分 500 nm 吸收峰，此數個條件下 BSA 與 SDS 間的混合效果一般，並未有特別良好的效果；圖 33 裡 750 nm 吸收峰的高度則明顯隨著 BSA 濃度變化，明顯的其中一個組合條件具有最佳效果，而當 SDS 濃度與 BSA 濃度相比差距逐漸變大時，如(c)和(d)，可注意到 420 nm 吸收峰逐漸提高到比 750 nm 的高些，猜測若直接使用較低濃度的 SDS 混合單體進行聚合，也可獲得相同結果。

## 六、用 SDS 聚合之情形

由之前實驗可知，SDS 於聚合反應中相當具有作用，能成功改變 BSA 帶電性。而根據觀察，單獨使用 SDS 聚合時，亦能微量產生聚苯胺（淡綠色）。

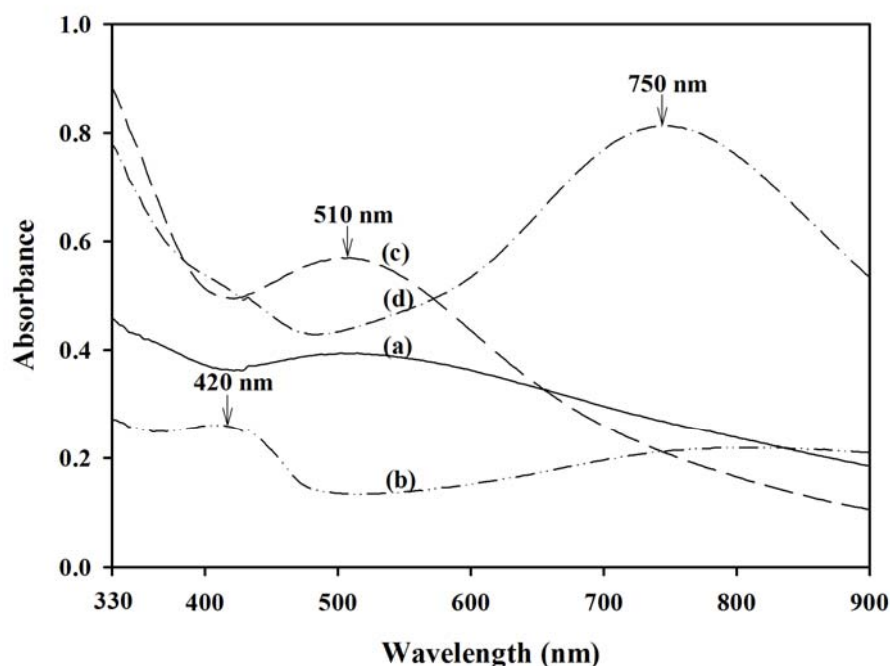


圖 34 比較四種情況聚合之吸收光譜圖，(a) 無 BSA 或 SDS 聚合；(b) 以 2.0 mM SDS 聚合；(c) 以 0.2 mg/ml BSA 聚合；(d) 以 0.3 mg/ml BSA-2.0 mM SDS 聚合

圖 34 可見於聚合反應時，只添加 BSA 能增加苯胺自由基陽離子分子的碰撞機會，間接提高苯胺的聚合程度，但是對於聚苯胺的氧化態則沒有實際的影響；只添加 SDS 會影響 HRP 的活性，部份 HRP 會因為 SDS 影響而變性成為模板，因此能產生少量的鹽式中間氧化態聚苯胺，而部分的苯胺轉為自由基陽離子後，沒能進行聚合而保留下來，因此可以看到較高 420 nm 吸收峰與較低的 800 nm 吸收峰；當 BSA 與 SDS 兩者混合來加入時，在適當的混合濃度下，即可獲得較

佳的聚合效果(非常突顯的 750 nm 吸收峰),與圖 34 的(a)到(c)相比, (d)在相同流程下吸收譜線的高度較高,可見聚合程度亦有顯著的提高。

### 七、提高不同濃度 BSA 與 SDS 進行聚合

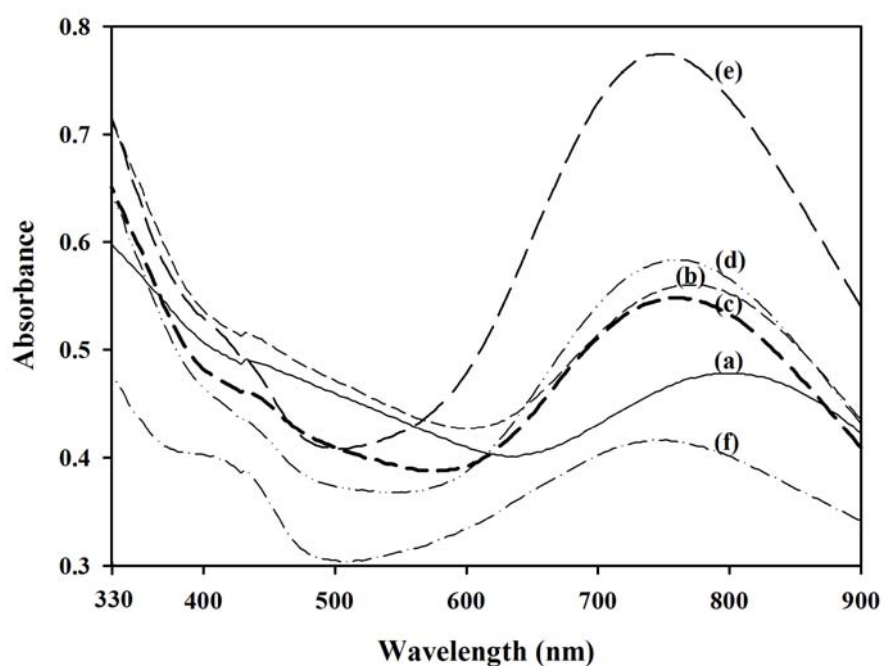


圖 35 比較混合 BSA 與添加 1.5 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖,

BSA 的濃度從(a)到(f)依序為 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 mg/ml

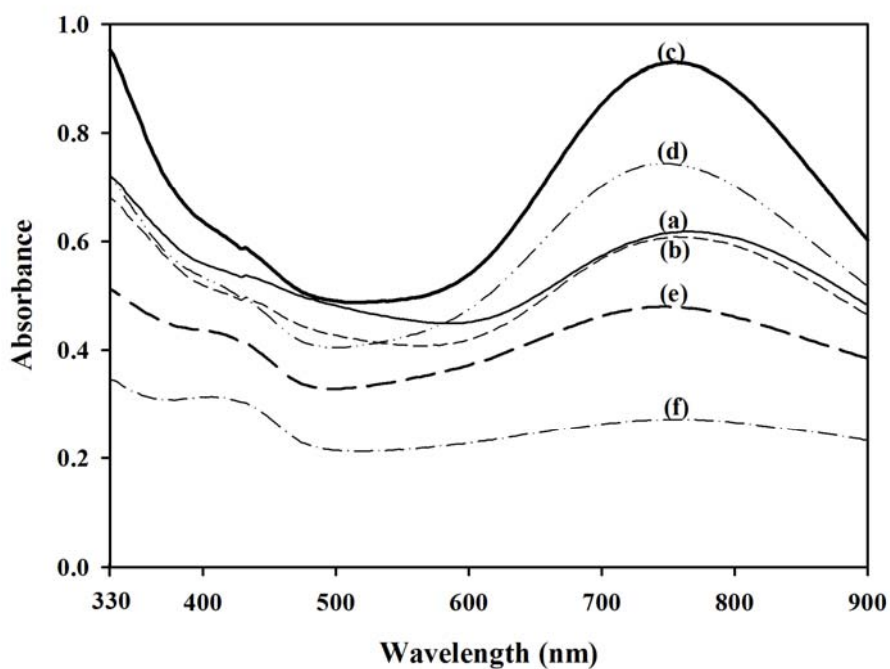


圖 36 比較混合 BSA 與添加 1.8 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖，

BSA 的濃度從(a)到(f)依序為 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 mg/ml

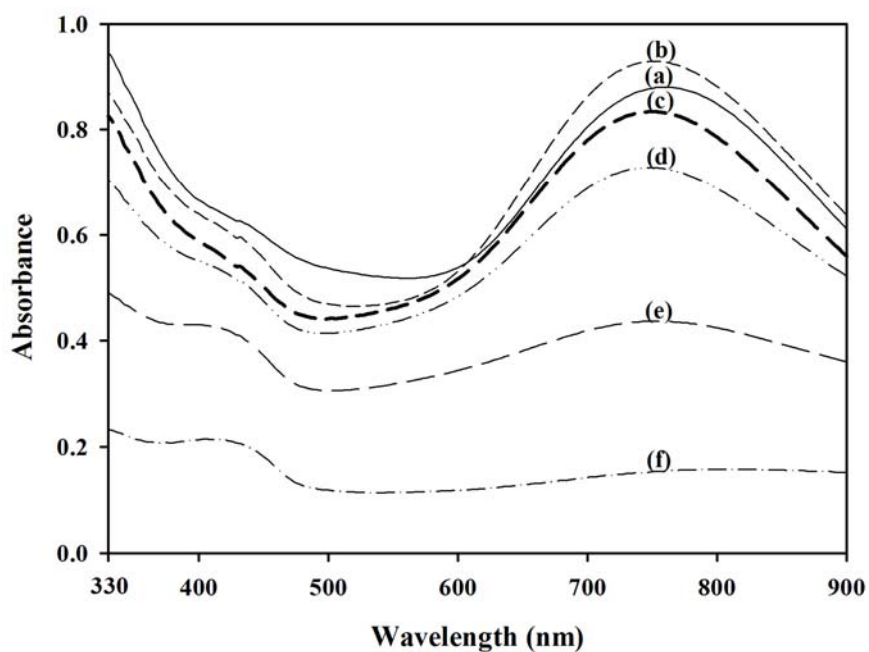


圖 37 比較混合 BSA 與添加 2.0 mM SDS 聚合反應之吸收光譜圖，

BSA 的濃度從(a)到(f)依序為 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 mg/ml



於圖 35 到圖 37 裡，可以發現雖然提高 BSA 濃度，但是若沒能提供比例適量的 SDS 與苯胺濃度，對於反應亦無任何助益，如同使用 1.8 mM 之 SDS 進行聚合時，將 BSA 提高超過 0.4 mg/ml 後，反而使 750 nm 吸收峰大幅下降。由實驗數據來看，決定選擇 BSA 0.4 mg/ml-SDS 1.8 mM 作為模板使用，因其在 750 nm 波長下具有最大吸收值。

#### 八、確立使用模板時最低 HRP 濃度與過氧化氫濃度

由於酵素具高價位，為減少成本，最終確認在含有模板情況下，了解可使用的 HRP 與過氧化氫最低濃度。

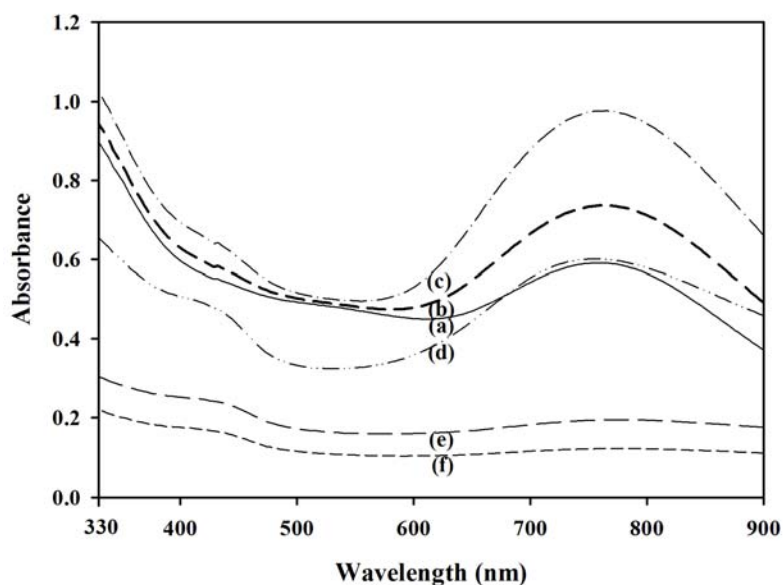


圖 38 比較使用不同濃度之 HRP，於 0.4 mg/ml BSA 與 1.8 mM SDS 條件下聚合之吸收光譜圖，HRP 的濃度從(a)到(f)依序為 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005 mg/ml

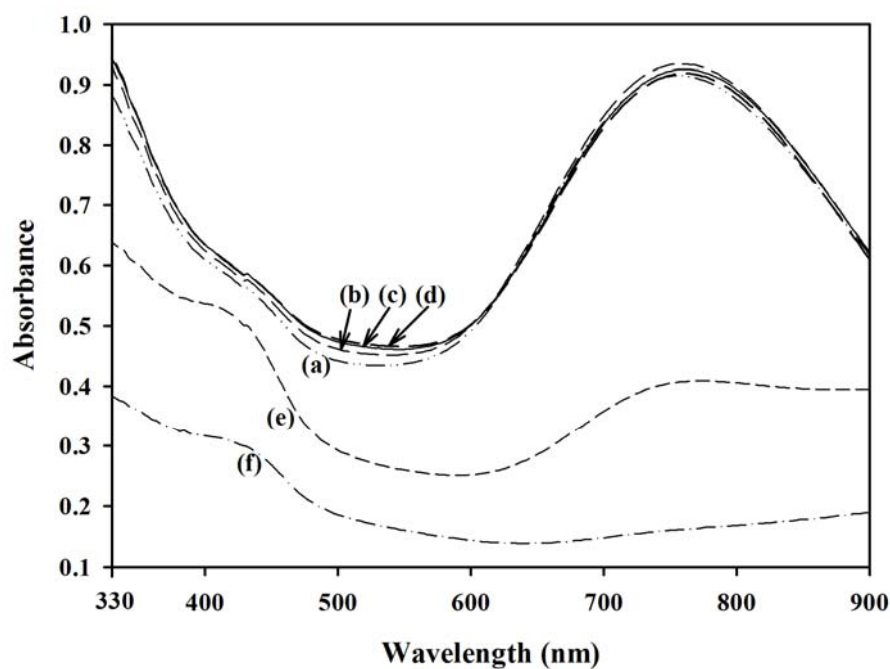


圖 39 比較使用不同濃度之過氧化氫，於 0.4 mg/ml BSA與 1.8 mM SDS條件下聚合之吸收光譜圖， $\text{H}_2\text{O}_2$ 的濃度從(a)到(f)依序為 12, 8, 5, 4, 2, 1 mM

圖 38 與圖 39 可見，HRP 表現最佳的是 0.05 mg/ml，而過氧化氫最佳的濃度是 4 mM（苯胺與過氧化氫比例 1：1，都 4 mM），不過由於使用 5 mM 過氧化氫跟使用 4 mM 的兩者結果幾乎一樣，但是 5 mM 配製較方便，所以不改動濃度也不會有影響，綜合兩實驗的結果，可以確定目前使用的 HRP 與過氧化氫濃度，大致上已是可使用的最低濃度，應該跟篩選模板濃度時，用來進行聚合分析使用的 HRP 與過氧化氫濃度相同有關。

## 九、不同情況下聚苯胺產物的分析

考慮到反應溶液中含有大量其他物質，因此溶解聚苯胺粉末進行分析是必須的，以 50%(v/v) NMP 雖無法完全溶解聚苯胺，但是粉末的懸浮狀態與少量粉末的溶解依然能提供分析使用。下面比較稀釋的反應溶液與微溶懸浮的粉末溶液兩者間吸收光譜的差異。

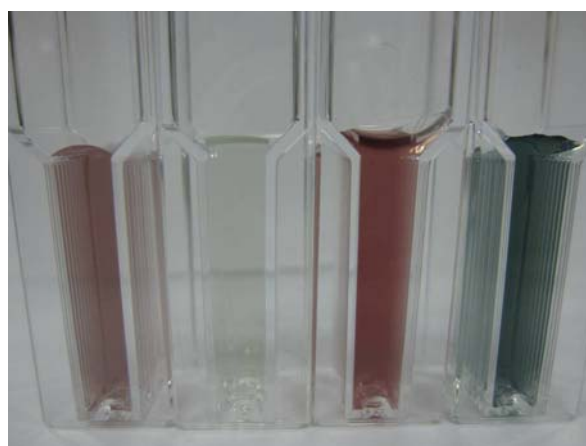


圖 40 反應溶液稀釋 10 倍顏色圖，由左到右條件依序為沒有模板、以 1.8 mM SDS 為模板、以 0.4 mg/ml BSA 為模板與以 0.4 mg/ml BSA-1.8 mM SDS 為模板

圖 40 中，可以清楚的看到模板對於聚苯胺的影響，由顏色深淺判斷，添加 BSA 比起沒添加模板增加了聚合的程度；而添加 SDS 則降低了 HRP 催化效果，但能產生少量鹽式中間氧化態聚苯胺，使溶液顏色呈淡綠色；至於同時添加 BSA 與 SDS 的情況，既產生鹽式中間氧化態聚苯胺亦能維持一定的聚合程度。

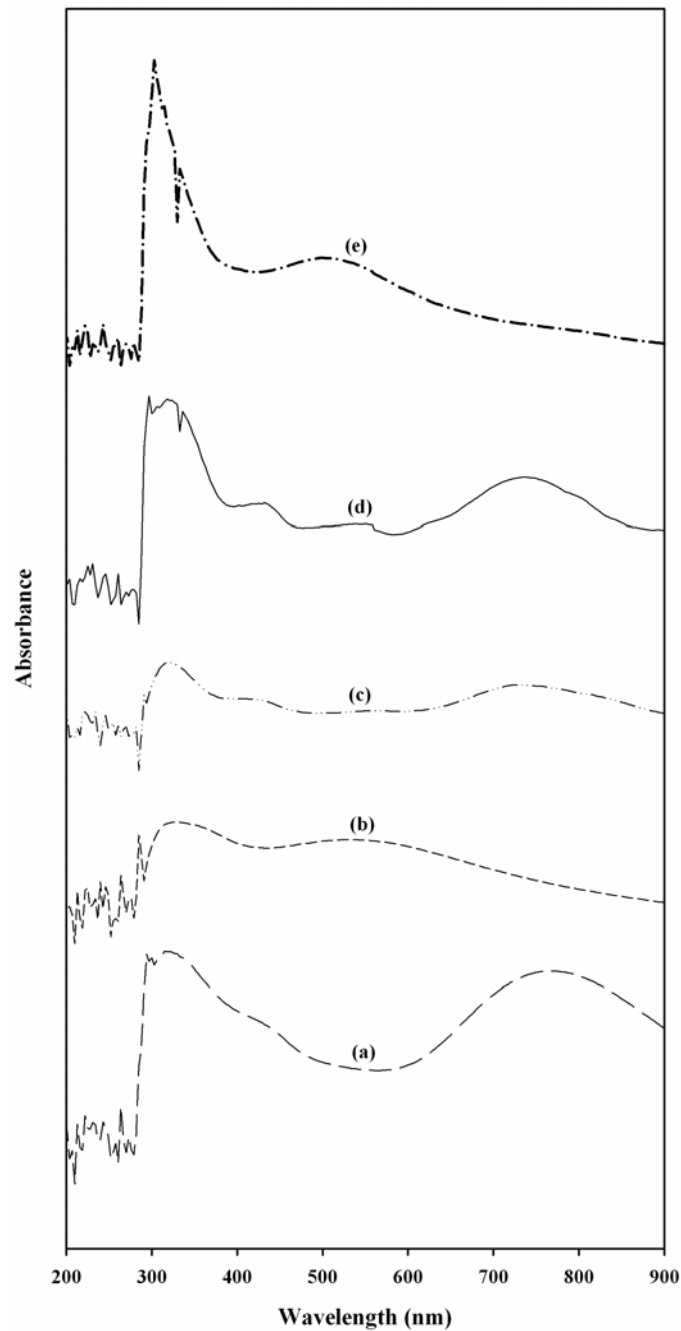


圖 41 比較不同情況下(反應液與粉末溶液)聚苯胺之吸收光譜圖(石英比色槽)，稀釋 10 倍的未經酸鹼處理之反應溶液為(a) 添加模板聚合；(b) 未添加模板聚合，50%(v/v) NMP 的聚苯胺粉末溶液，有添加模板聚合的為(c) 未經酸鹼處理；(d) 經酸鹼處理，未添加模板聚合的為(e) 未經酸鹼處理

由圖 41 裡，可以看到以兩種方式所得的分析光譜，相同條件之光譜的吸收峰位置是相同的，由於吸收峰的高度與溶液顏色深淺（或是聚苯胺濃度高低）有直接關係，在不考慮吸收峰高度的情狀下，憑藉反應溶液的分析即可用來判斷聚合物的型態。

### 3-2 霍氏轉換紅外線光譜儀分析

每個物質其分子內部存在著許多振動，不同的官能基與結構有不同的頻率，當紅外光照射到振動的分子位置時，如果振動的頻率與紅外光頻率相同，此紅外光就會被吸收而獲得吸收峰，隨著調整變換的紅外光頻率，可以獲得許多不同的吸收峰，由此能判斷待測物所擁有的分子結構，比較各吸收峰波長後，約略可判斷聚苯胺產物的型態。（主要的吸收峰波長參考第二章中第 25 頁表 2.3）

#### 一、未添加模板之實驗

最初於反應瓶中加入 10 ml 苯胺（5 mM，以 pH 4.3 的磷酸鹽緩衝液配備），再添加 0.5 ml HRP（5 mg/ml）與 1.5 ml 過氧化氫（10 mM），反應 2 小時，離心分離，加去離子水清洗，再分離，加水沖散，倒入樣本瓶冷凍，冷凍乾燥。（樣品：KBr = 1 : 50）

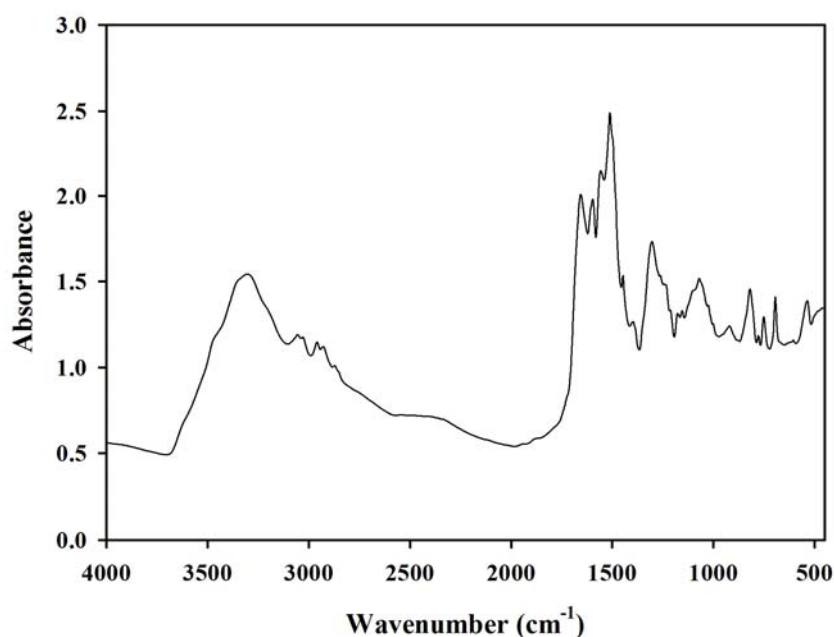


圖 42 以 pH 4.3 的磷酸鹽緩衝液配備，未添加模板聚合之 FTIR 圖

由圖 42 可知，未添加模板的聚合物雖然擁有幾個聚苯胺的主要官能基，不過比例上以  $1496\text{ cm}^{-1}$  的 N-B-N 為主。圖中可見有很多其他雜訊干擾，主要是因為用去離子水清洗時，產物會懸浮與溶解於水中，高速離心亦無法沉澱，為減少消耗而減少清洗次數，導致大量的苯胺單體、緩衝液與酵素不能完全去除所致，因此無法判定此聚合物為何種型態。

## 二、模板添加之影響

為了解添加模板與否對聚合物的影響，於反應瓶中加入 8 ml 苯胺單體溶液 (5 mM，以 pH 4.0 的檸檬酸-磷酸鹽緩衝液配備)，再依序

加入 1 ml 模板溶液、0.5 ml 的 HRP (1 mg/ml) 與 0.5 ml 的過氧化氫 (100 mM, 3 分鐘加一次, 每次 25  $\mu$ l), 反應 4 小時, A 組—沒添加模板(以去離子水平衡體積); B 組模板—添加 0.4 mg/ml BSA-1.8 mM SDS。(樣品: KBr = 1 : 10)

A 組 :

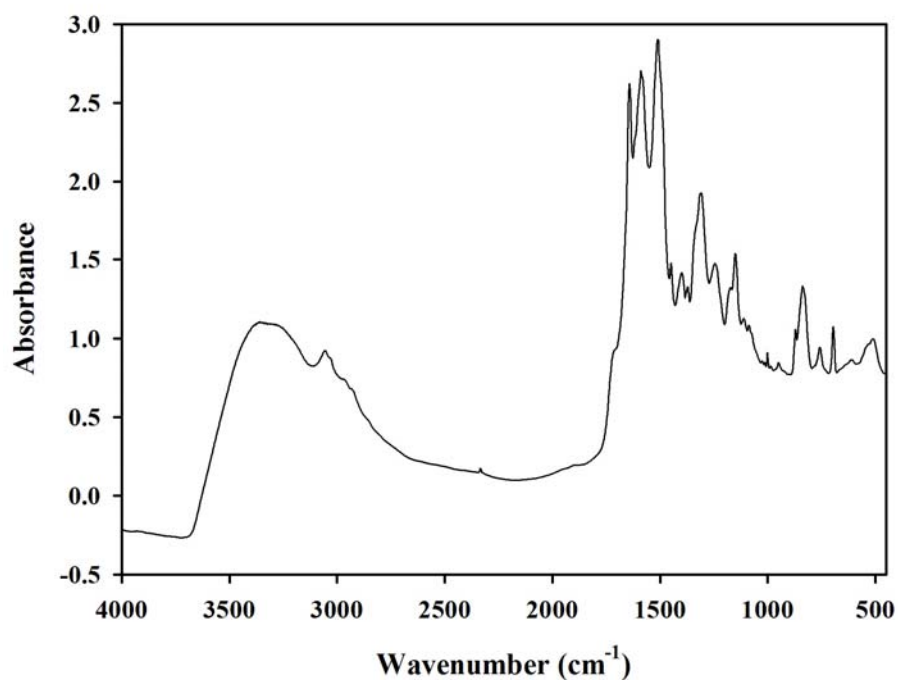


圖 43 以 pH 4.0 的檸檬酸—磷酸鹽緩衝液配備, 未添加模板聚合之 FTIR 圖

B 組：

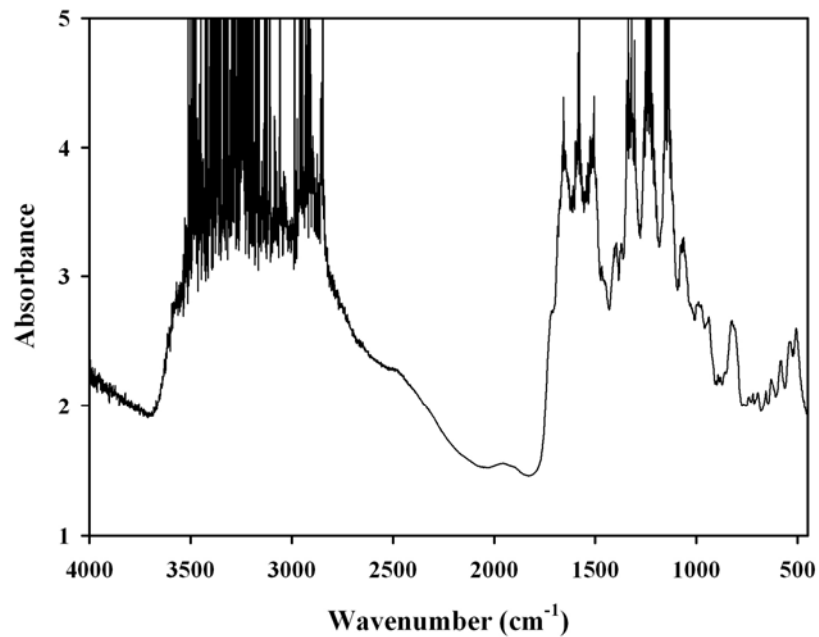


圖 44 以 pH 4.0 的檸檬酸－磷酸鹽緩衝液配備，添加模板聚合之 FTIR

圖 43 中，A 組聚合物幾個基本官能基都有，以  $1589\text{ cm}^{-1}$  的 N=Q=N 與  $1496\text{ cm}^{-1}$  的 N-B-N 為主，還有一個比較高的在  $1650\text{ cm}^{-1}$  左右，應該是酵素蛋白質結構上的醯胺鍵（amide group）<sup>[42]</sup>，圖 44 中 B 組聚合物由於壓錠片過厚且顏色過深，導致數據 overflow，不過仍可見到幾個官能基的吸收峰，但無法用來判斷分析。反應濃度與體積的調整、緩衝液的變更與清洗次數增加，這三項改變對於聚合效果有明顯的影響，可以發現主要官能基的吸收峰比圖 42 更突顯，但可能被包覆在聚苯胺內的酵素依然有很大的訊號。



### 三、不同種類模板添加之影響

為了解使用不同模板對聚合物的影響，於反應瓶中加入 8 ml 的苯胺單體溶液 (5 mM，以 pH 4.0 的檸檬酸-磷酸鹽緩衝液配備)，再依序加入 1 ml 模板溶液、0.5 ml 的 HRP (1 mg/ml) 與 0.5 ml 的過氧化氫 (100 mM，3 分鐘加一次，每次 25  $\mu$ l)，反應 4 小時，第一組—沒添加模板 (以去離子水平衡體積)；第二組模板—僅添加 1.8 mM SDS；第三組模板—僅添加 0.4 mg/ml BSA；第四組模板—添加 0.4 mg/ml BSA-1.8 mM SDS。(樣品：KBr = 1 : 10)

第一組：

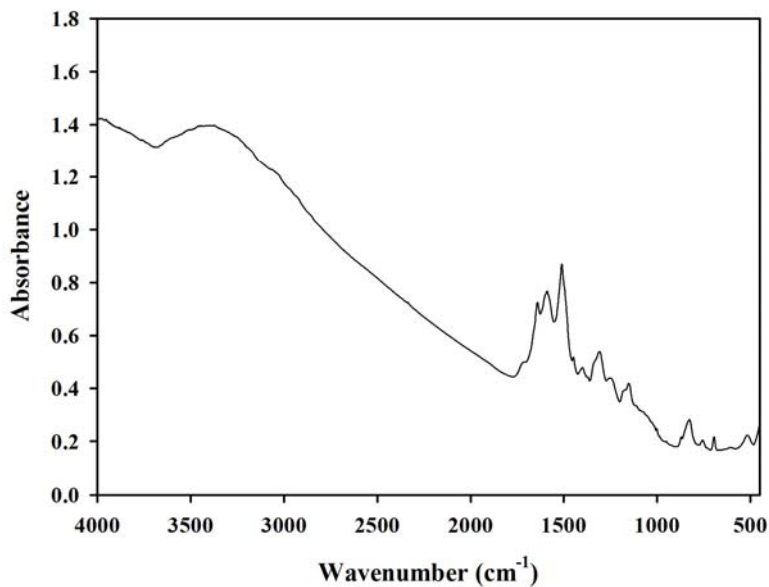


圖 45 未添加模板聚合之 FTIR 圖

第二組：

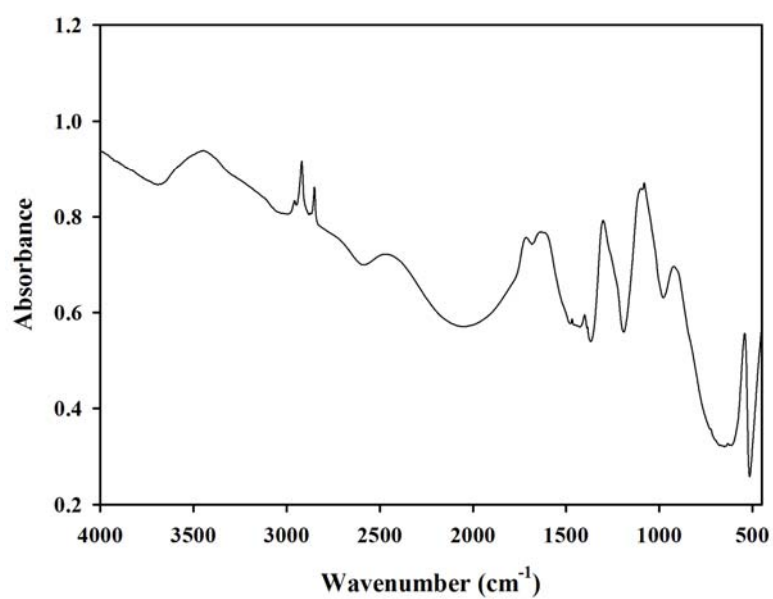


圖 46 添加 1.8 mM SDS 聚合之 FTIR 圖

第三組：

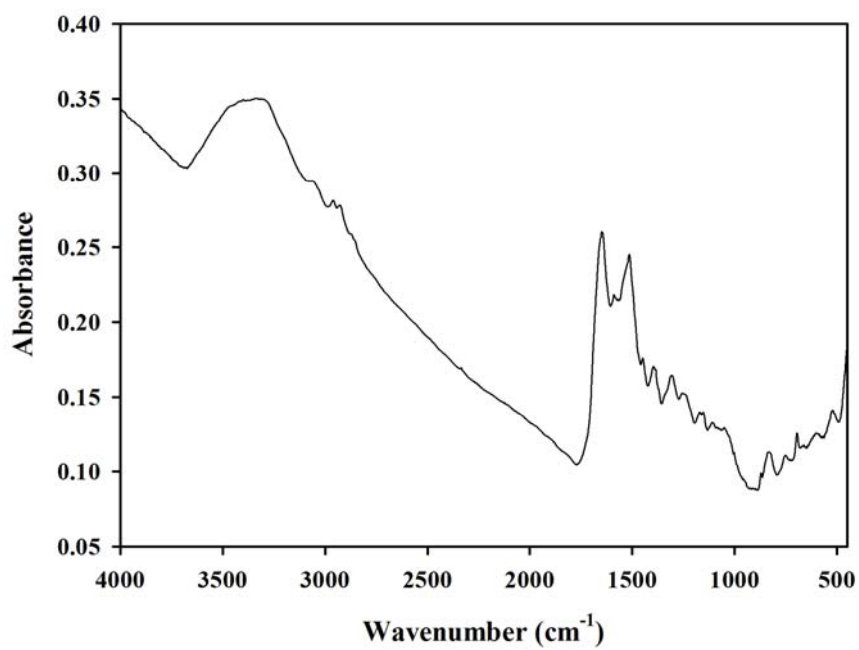


圖 47 添加 0.4 mg/ml BSA 聚合之 FTIR 圖

第四組：

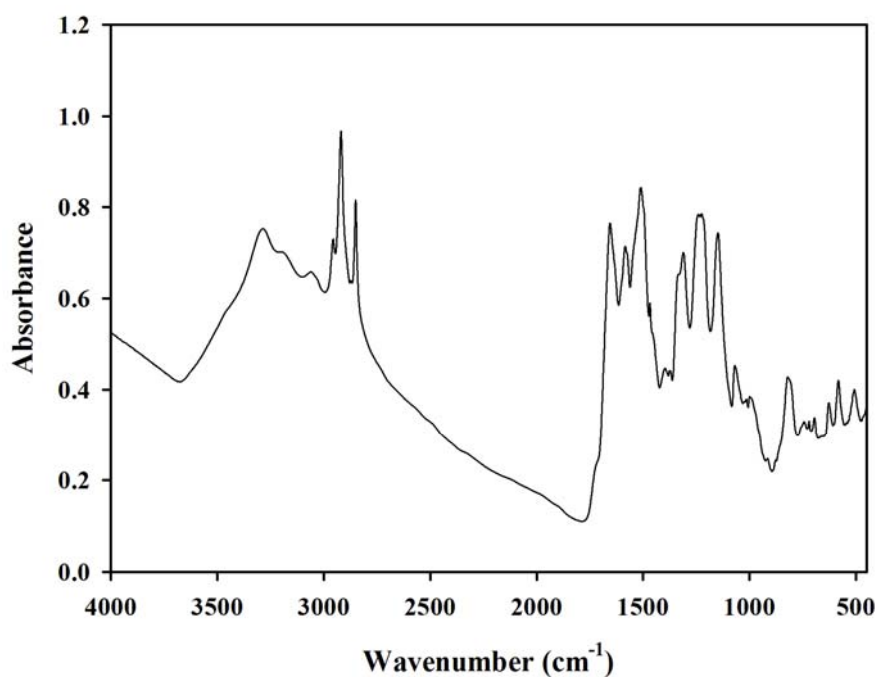


圖 48 添加 0.4 mg/ml BSA-1.8 mM SDS 聚合之 FTIR 圖

圖 45 到圖 48 裡，除第二組外，都有幾個主要官能基的表現，其中  $1650\text{ cm}^{-1}$  這個吸收峰在混合了 BSA 後有明顯的增高，可見 BSA 在產物中佔有相當高的比例，經過計算可能沉澱的物質後，也確定添加的 BSA 佔有相當大的份量。圖 45 與前面幾次圖形有很大不同，可能跟壓錠的厚度與研磨均勻度有關係；第二組的產物為淡綠色，但是圖 46 中卻沒有明顯跟聚苯胺有關之吸收峰，可能是回收時將反應溶液直接乾燥，導致聚苯胺的訊號被其他物質的訊號蓋過有關；圖 47 中吸收峰  $1650\text{ cm}^{-1}$  相當突出，可見 BSA 應該是被聚苯胺包覆住跟著被

乾燥出來；圖 48 裡，可看到聚苯胺的幾個主要官能基吸收峰，如  $\text{N}=\text{Q}=\text{N}$  ( $1589\text{ cm}^{-1}$ ) 與  $\text{N}-\text{B}-\text{N}$  ( $1496\text{ cm}^{-1}$ )、 $\text{C}-\text{N}$  ( $1306\text{ cm}^{-1}$  與  $1238\text{ cm}^{-1}$ ) 和  $\text{C}-\text{H}$  ( $827\text{ cm}^{-1}$ ) 等，雖然經過多次清洗後明顯降低其他物質的訊號，但 BSA 被包覆導致醯胺鍵 (amide group,  $1650\text{ cm}^{-1}$ )<sup>[42]</sup> 這個官能基吸收峰不降反升，而純粹以去離子水沖洗並無法直接去除它，這點可能對導電度影響甚大，因此，考慮如何適量去除 BSA 就變的很重要。

#### 四、用鹽酸處理模板聚合的聚苯胺之影響

為去除 BSA 以提升導電度，用鹽酸處理乾燥後的聚苯胺進行摻雜。於反應瓶中加入 8 ml 的苯胺單體溶液 (5 mM，以 pH 4.0 的檸檬酸-磷酸鹽緩衝液配備)，再依序加入 1 ml 的 BSA (4 mg/ml) - SDS (18 mM)、0.5 ml 的 HRP (1 mg/ml) 與 0.5 ml 的過氧化氫 (100 mM，3 分鐘加一次，每次 25  $\mu\text{l}$ )，反應 4 小時，(A) 不額外進行酸處理，(B) 將粉末磨細，加 1 M 的 HCl 搖晃浸泡 30 分鐘，離心分離，清洗五次後，加去離子水沖散，倒入已秤重之樣本瓶冷凍，冷凍乾燥。(樣品：KBr = 1 : 10)

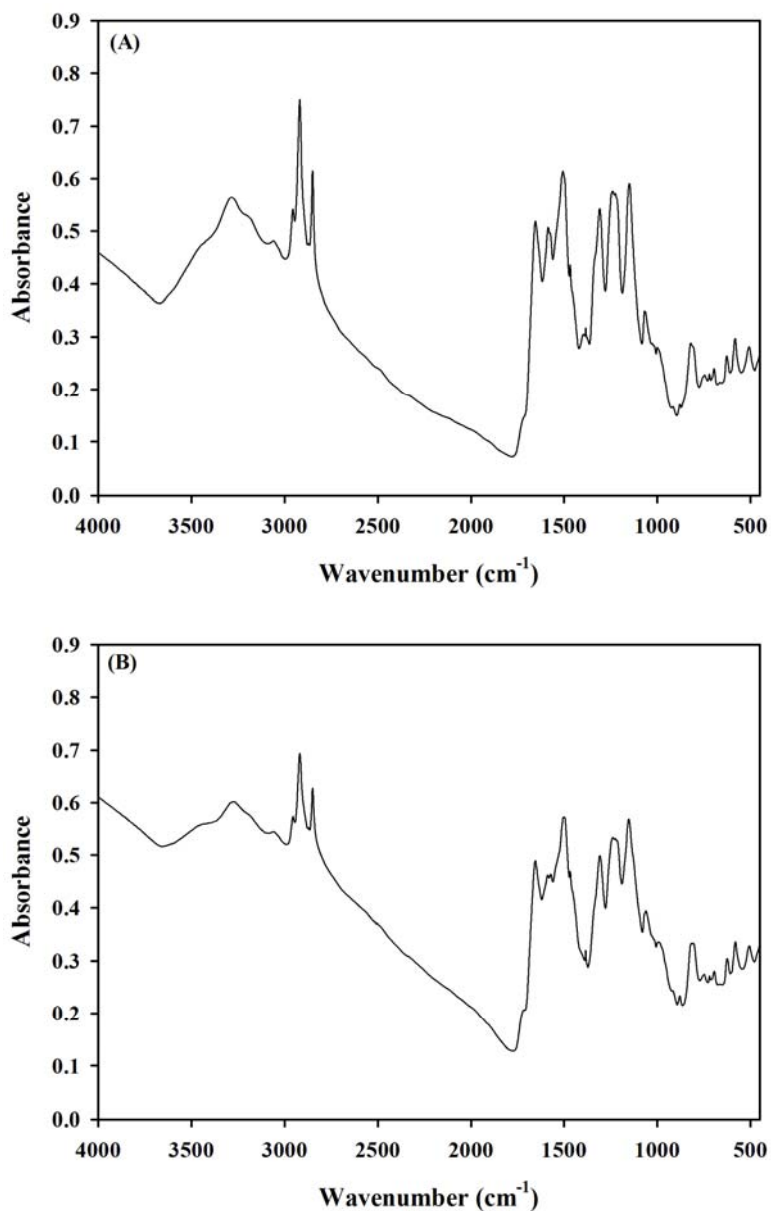


圖 49 添加模板聚合乾燥後鹽酸處理之 FTIR 圖，

(A) 未處理；(B) 處理

圖 49 裡可見，經過鹽酸處理過後，吸收峰都明顯降低，乃是粉末研磨過後，處理過程洗掉部分裸露之寡聚物與BSA，但是卻不是直接影響被包覆的BSA，所以去除的效果有限，考慮到化學法中，聚合

後會用大量 1 M HCl 清洗，然後以  $\text{NH}_4\text{OH}$  去摻雜，再用 1 M HCl 進行再摻雜，以此提升聚苯胺導電度，過程乃是在乾燥之前，因此未避免乾燥過程聚苯胺的聚集影響摻雜，於是需要在反應後直接進行去摻雜與再摻雜。

### 五、用氨水與鹽酸處理模板聚合的聚苯胺之影響

為去除 BSA 以提升導電度，用氨水與鹽酸對聚苯胺進行去摻雜與再摻雜。實驗步驟是以第二章完整流程製造。(樣品： $\text{KBr} = 1:10$ )

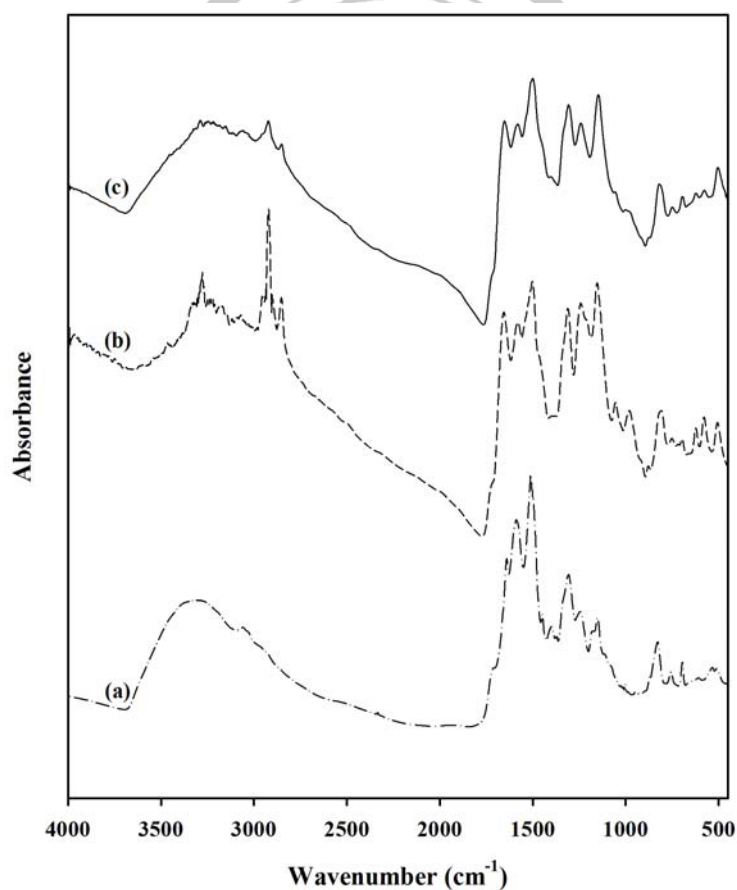


圖 50 添加模板聚合再以氨水與鹽酸處理之 FTIR 圖，

(a) 無模板未處理；(b) 有模板未處理；(c) 有模板有處理

由圖 50 中可見，經過兩個溶液處理過後，蛋白質（BSA與HRP）上的醯胺鍵（amide group， $1650\text{ cm}^{-1}$ ）擁有的比例降低，而左半邊與蛋白質相關的吸收峰（ $3000\text{ cm}^{-1}$ 到  $3500\text{ cm}^{-1}$ ）也大幅度消耗降低，因此反應後對聚苯胺進行氨水去摻雜與鹽酸再摻雜，這過程對於模板的去除是有效果的，而在圖 50 (c)裡，可以看出並未完全消除模板，若是調節處理的方式與流程，應該能夠去除更多的模板與酵素。

### 3-3 熱重分析儀分析

經由熱重分析可以了解，模板的使用對於聚苯胺的結構穩定性，以及用氨水與鹽酸處理的聚苯胺有何變化。

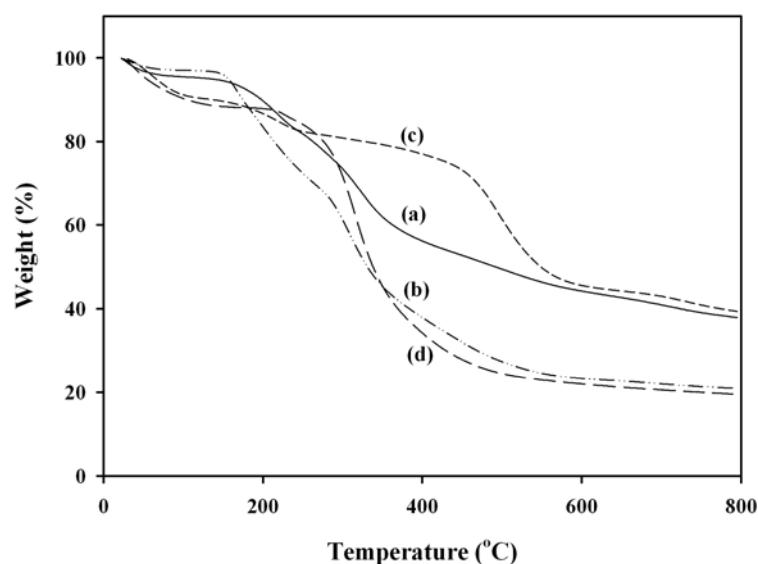


圖 51 添加模板與否聚合之 TGA 圖，(a) 有模板酸鹼處理過之聚苯胺；(b) 有模板無酸鹼處理過之聚苯胺；(c) 化學法無模板酸鹼處理過之聚苯胺；(d) 單純 BSA

圖 51 中各曲線皆可見在 100°C 前將殘留水蒸發，圖 51(a) 中聚苯胺有幾個重量損失，第一個是在 120°C 到 250°C 間重量損失 12.85%，應是少量沒洗去的苯胺單體、寡聚物與其它物質，然後在 250°C 到 420°C 間重量損失 27.67%，應該則是聚苯胺在聚合過程中被包覆在內的 BSA、SDS 與 HRP，這些燃燒裂解掉所減少的重量，而在 420°C 到 800°C 間重量損失 16.78%，此則為聚苯胺主要的重量損失與聚苯胺更進一步分解。圖 51(b) 重量損失的溫度變化與圖 51(a) 相似，差別在第一個在 100°C 到 260°C 間損失 27.24%，然後在 260°C 到 420°C 間損失 34.70%，而在 420°C 到 800°C 間重量損失 14.18%。

圖 51(c) 中化學法聚苯胺的重量損失，第一個在 130°C 到 280°C 間損失 9.73%，是少量沒洗去的苯胺單體、寡聚物與其它物質，然後在 420°C 到 650°C 間損失 31.56%，這部份應為聚苯胺主要的重量損失，最後在 650°C 到 800°C 間重量損失 4.87%，則是聚苯胺更進一步分解。圖 51(d) 則是純粹 BSA 的重量損失，僅在 200°C 到 400°C 間有損失。

將圖 51(a) 與 (c) 比較後，可以明顯看到以 BSA 作為模板的熱穩定性較差，這與 BSA 的耐熱性質有直接關係。把圖 51(b) 與 (c) 在 200°C 到 400°C 間的重量損失相減後，估計聚合後模板含量大約為 29.04%，而將圖 51(a)、(b) 與 (d) 比較後，可以了解聚合後模板在經過酸鹼處理過後含量僅大約減少 7.03%，因此在酸鹼處理進行的摻雜與去摻雜過



程，此過程會消除大部份裸露在外的模板並保留約 20%左右的模板，但是殘留的模板被包覆在聚苯胺內部，可能導致後續應用的困難。

### 3-4 場發式掃描電子顯微鏡分析

為了知道所聚合的聚苯胺粉末，其外觀是球型或是鏈狀，以及顆粒大小或長度，改變聚合的條件與方法來確定。

#### 一、變更酵素濃度，未添加模板

單體以 pH 4.3 磷酸鹽緩衝液配備，改變添加的酵素濃度，比較不同濃度情況下，聚合而成的聚苯胺粉末在表現上的差別，濃度由低到高如下圖 47 到圖 54。

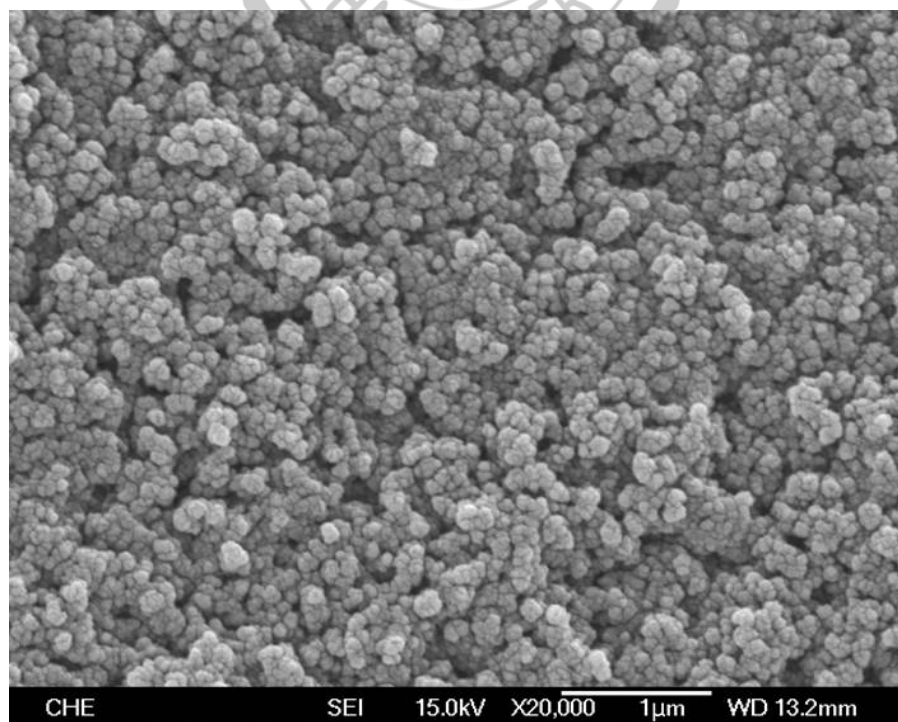


圖 52 未添加模板以 HRP 濃度為 0.05 mg/ml 聚合之 SEM 圖

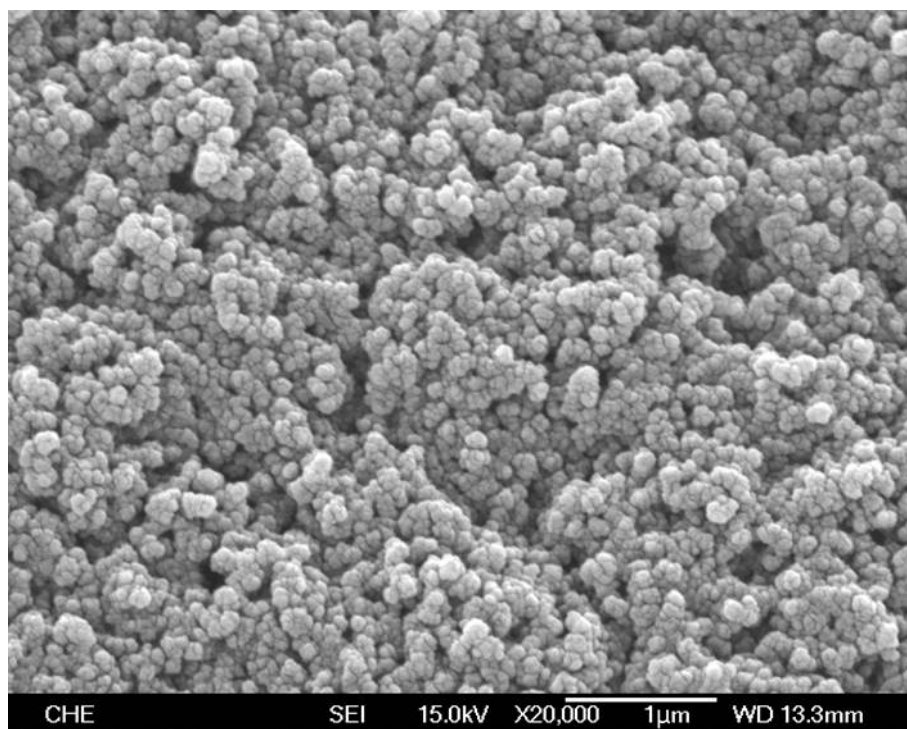


圖 53 未添加模板以 HRP 濃度為 0.1 mg/ml 聚合之 SEM 圖

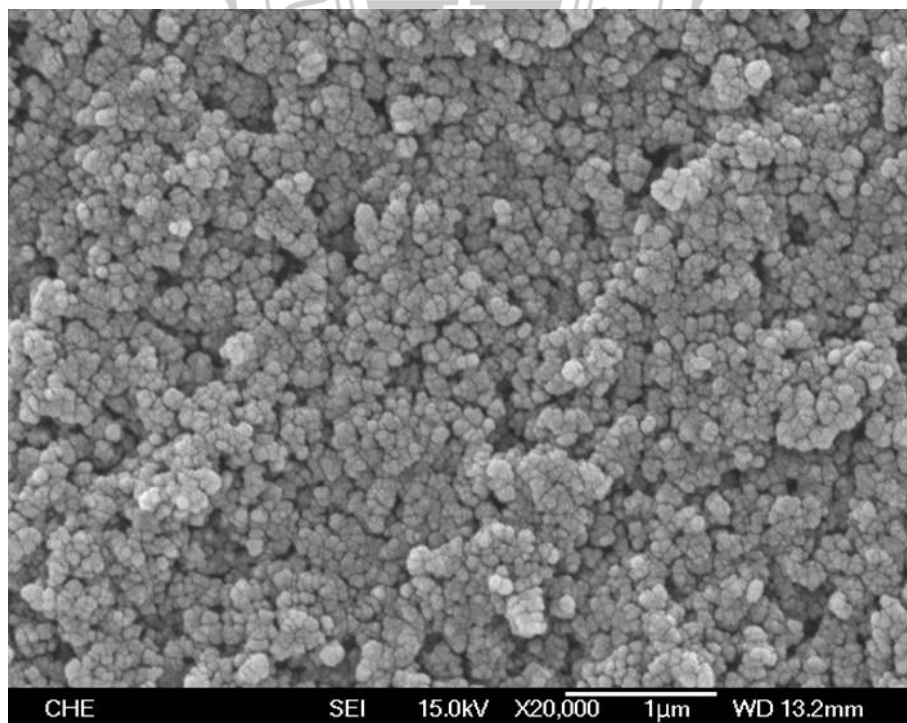


圖 54 未添加模板以 HRP 濃度為 0.2 mg/ml 聚合之 SEM 圖

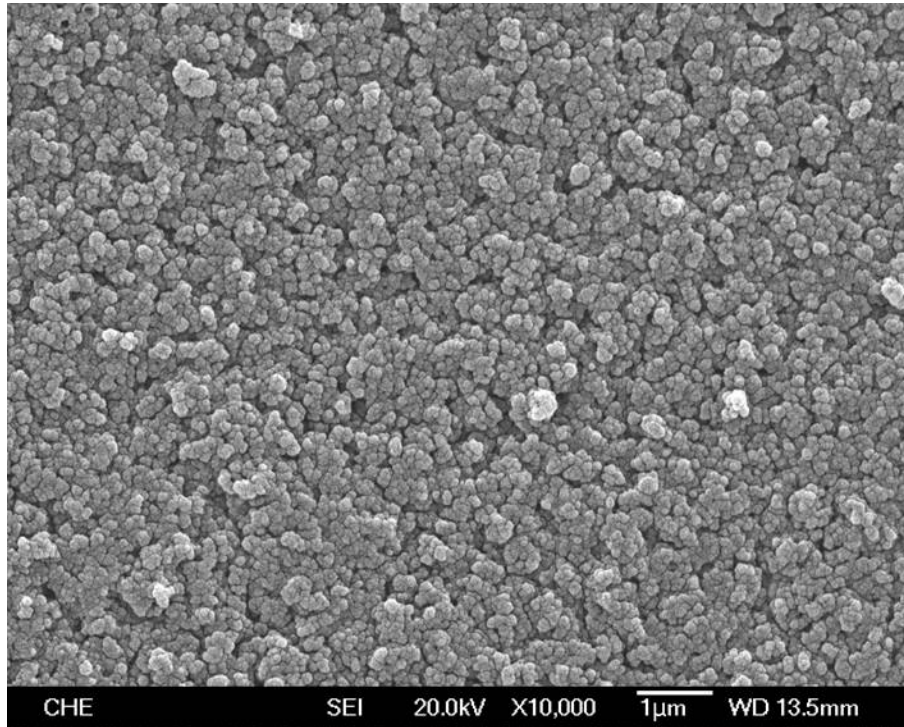


圖 55 未添加模板以 HRP 濃度為 0.3 mg/ml 聚合之 SEM 圖

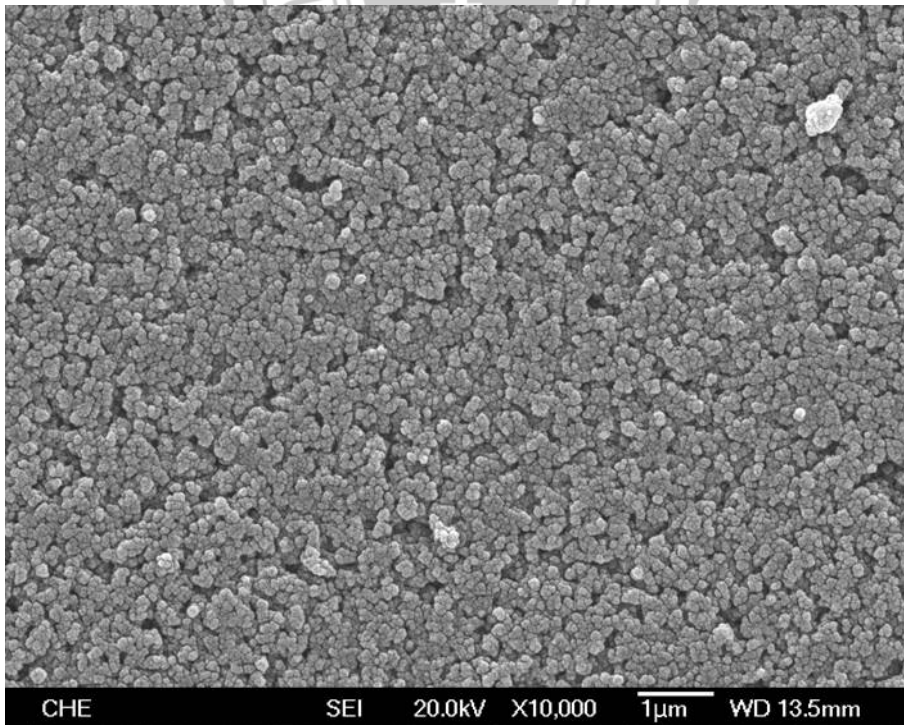


圖 56 未添加模板以 HRP 濃度為 0.4 mg/ml 聚合之 SEM 圖

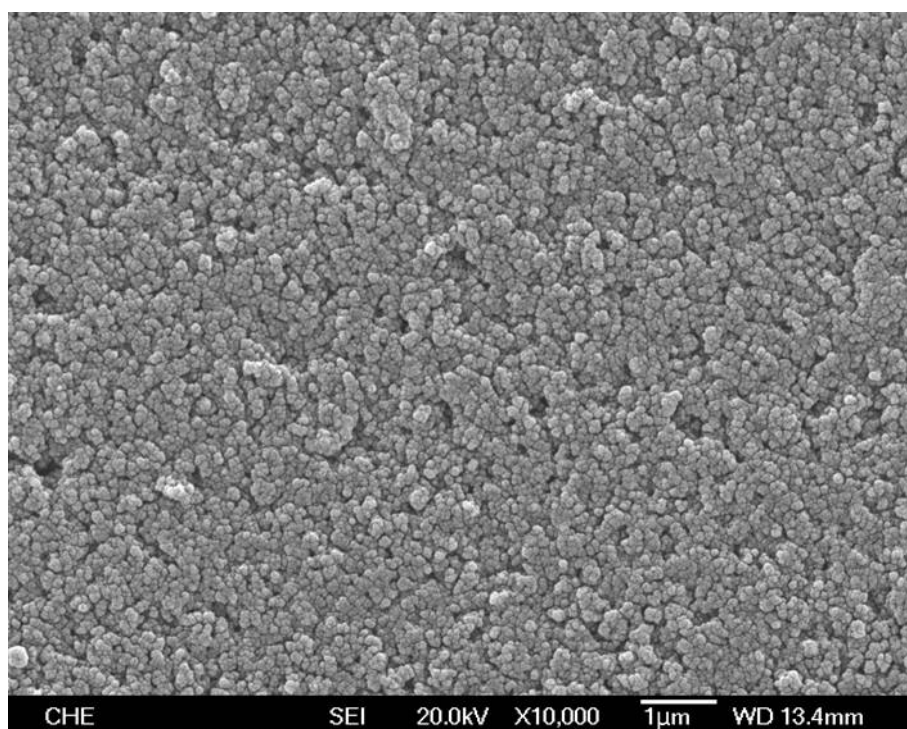


圖 57 未添加模板以 HRP 濃度為 0.5 mg/ml 聚合之 SEM 圖

圖 52 到圖 57 裡，可以確認以酵素聚合而得的聚苯胺皆以球狀為主，顆粒的大小與酵素的濃度變化沒有明顯相關，由於聚苯胺的顆粒都聚集堆疊在一起，估計一個顆粒的半徑在 0.05  $\mu\text{m}$  到 0.3  $\mu\text{m}$  間。

表 3.2 未添加模板變更酵素濃度聚合之產物重差別

|                    |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| HRP 濃度 (mg/ml)     | 0.05 | 0.1  | 0.2  | 0.25 | 0.3  | 0.35 | 0.4  | 0.5  |
| 聚合物重 (mg)          | -    | 1.6  | 2.2  | 3.1  | 3.2  | 3.5  | 3.5  | 4.0  |
| 產率 (%)             | -    | 34.8 | 47.8 | 67.4 | 69.6 | 76.1 | 76.1 | 87.0 |
| ◎加入的苯胺單體總重約 4.6 mg |      |      |      |      |      |      |      |      |

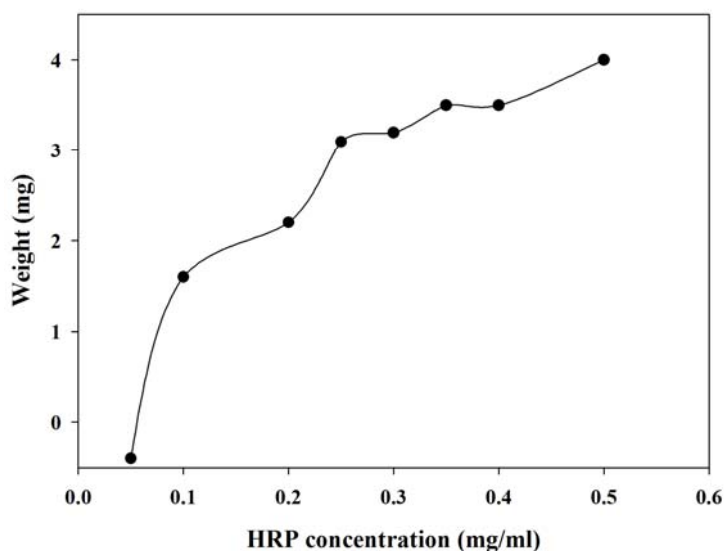


圖 58 未添加模板變更酵素濃度聚合之產物重差別

由表 3.2 與圖 58 中，可以確定將清洗過的聚合物溶液加熱乾燥後，將總重與空瓶重相減，雖有些小誤差但能從中看出隨著酵素使用量增加，能夠使苯胺獲得更完全的聚合。而預定的反應時間結束後將之離心，仍能發現上清液靜置時，依然會有粉末產生並沉澱，故反應時間應該還可以延長。由於加熱乾燥後，導致聚合物緊密的平貼在管壁難以取用。

使用酒精和丙酮於 45°C 水浴中去溶解產物，發現酒精對於 HRP 用量高的溶解度較差，丙酮則高些，跟粉末乾燥後高密實度有關，從圖 52 到圖 57 裡看到一個粉末的 SEM 圖，可見聚苯胺粉末其實是很多顆粒堆疊在一起的，其間的連結力強，溶劑不容易破壞其聯繫，因此對溶解度造成影響。

未添加模板時，固定酵素濃度 (0.21 mg/ml) 而變更苯胺濃度的聚合過程中，當苯胺濃度高濃度越高，沉澱所需的時間越長，可能是因為尚在進行反應，亦或是因為聚合物輕懸浮於溶液中而難沉澱。

由圖 59 中，可以觀察到聚苯胺的沉澱量不完全隨著苯胺的濃度提升，可能因素有兩個，一是跟使用的 HRP 之濃度所具有的最大催化能力有關，二是苯胺於聚合過程對於 HRP 之活性與濃度的影響有關，由反應機制來看應該以前一項因素為主，而且 HRP 的活性也會隨著反應時間增長而下降，後一項因素則是由反應結束後，測量溶液的上清液中，HRP 的活性有明顯下降與消失之情形，因此猜測 HRP 於反應過程中會受到聚苯胺的包覆而沉澱，進而失去催化功用。

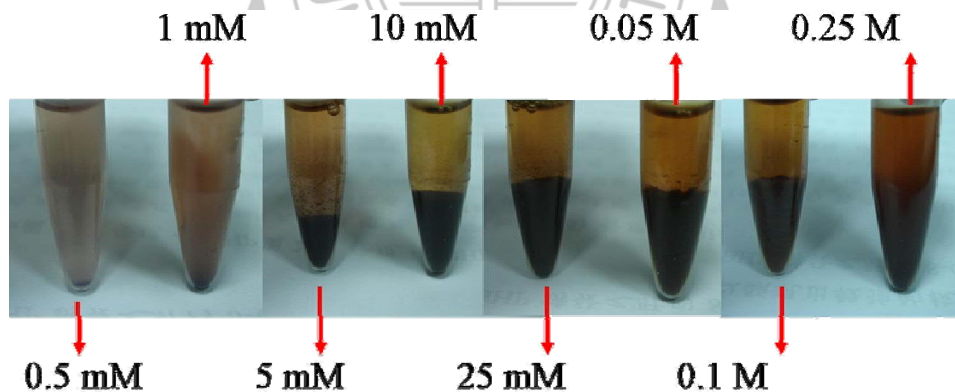


圖 59 未添加模板以不同苯胺濃度聚合沉澱圖

## 二、改變酵素添加方式，未添加模板

單體以 pH 4.3 磷酸鹽緩衝液配備，改變酵素添加方式，若干分鐘添加一次 HRP 酵素，對聚合的長度與形狀的影響，如下圖 60 到 63。

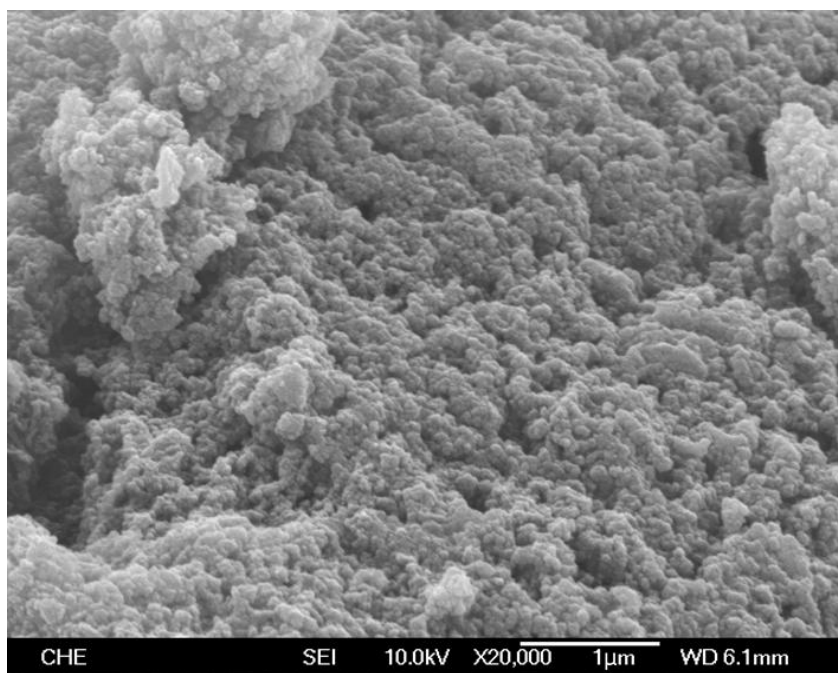


圖 60 酵素每次添加 10  $\mu\text{l}$  直到 250  $\mu\text{l}$ ，反應總體積 6 ml，未添加模板聚合之 SEM 圖 (pH 4.3 磷酸鹽緩衝液)

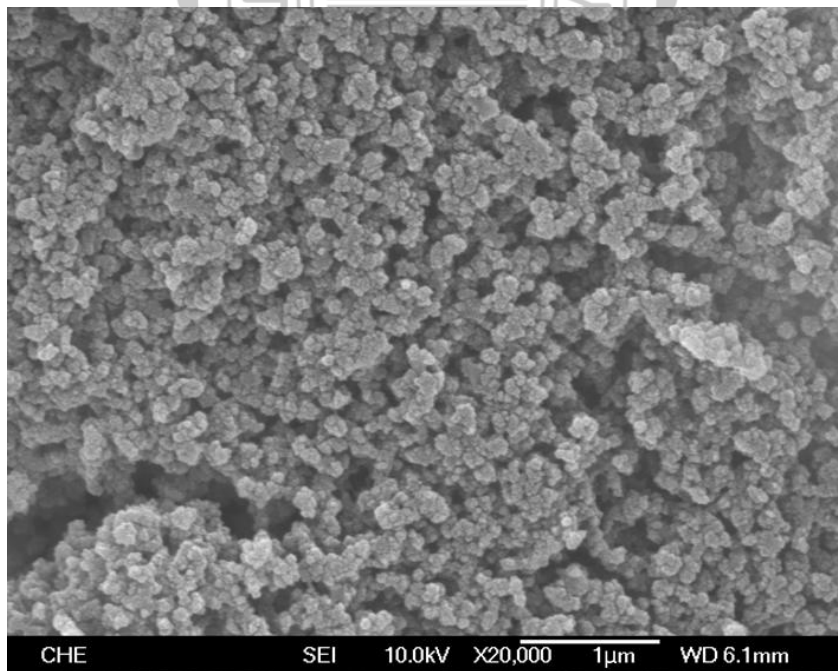


圖 61 酵素每次添加 50  $\mu\text{l}$  直到 250  $\mu\text{l}$ ，反應總體積 6 ml，未添加模板聚合之 SEM 圖 (pH 4.3 磷酸鹽緩衝液)

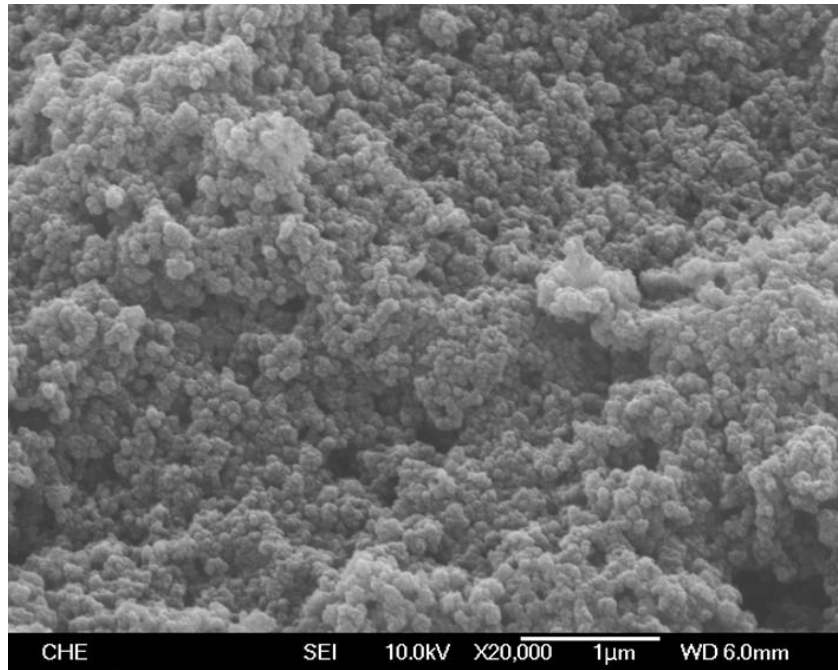


圖 62 酵素每次添加 125  $\mu\text{l}$  直到 250  $\mu\text{l}$ ，反應總體積 6 ml，未添加模板聚合之 SEM 圖（pH 4.3 磷酸鹽緩衝液）

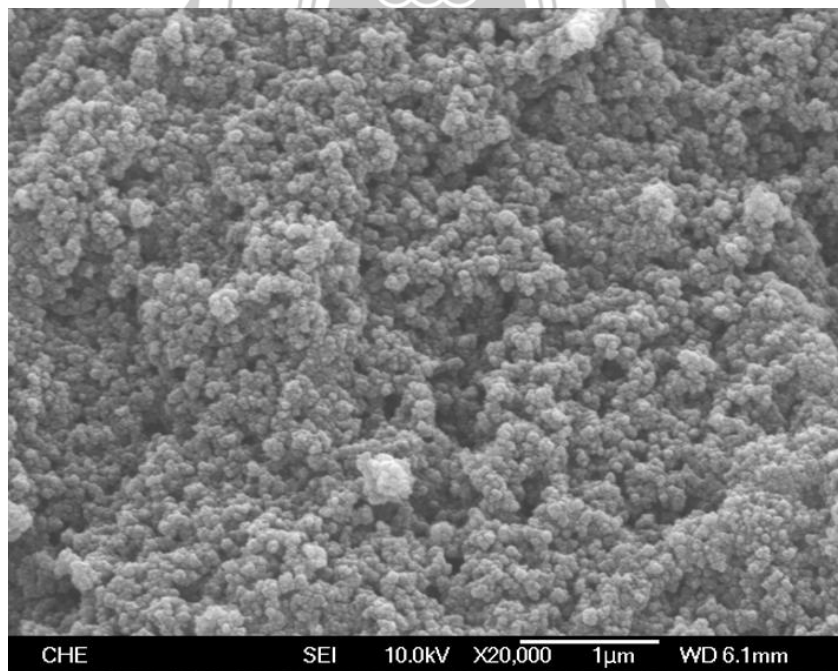


圖 63 酵素直接添加 250  $\mu\text{l}$ ，反應總體積 6 ml，未添加模板聚合之 SEM 圖（pH 4.3 磷酸鹽緩衝液）



改用冷凍乾燥法收集粉末後，聚合物能以粉末狀態收集，由圖 60 到 63 的影像顯示出，乾燥收集的顆粒仍然是聚集的，雖然無法以數據化，只能大略由圖上看到，酵素若分越多次添加，其粒徑也會稍微增加但不明顯。聚集行為乃是由於聚苯胺的分子包含的大量的胺基與亞胺基，導致分子內形成氫鍵鍵結。

在聚苯胺的收集清洗過程中，聚苯胺顆粒會彼此吸引，當達到一定重量後沉澱，因此聚集行為在清洗過程就更明顯了。雖然聚合物顆粒是聚集在一起成粉末的，但是粉末還是很輕，輕微的風亦能將之吹走，而且很容易吸附於手套上，因此粉末的收集不方便，也很難獲得實際重量（秤不到重量）。

### 三、添加模板的差別

單體以 pH 4.0 檸檬酸－磷酸鹽緩衝液配備，比較添加不同的模板，對於聚合的長度與形狀的影響。

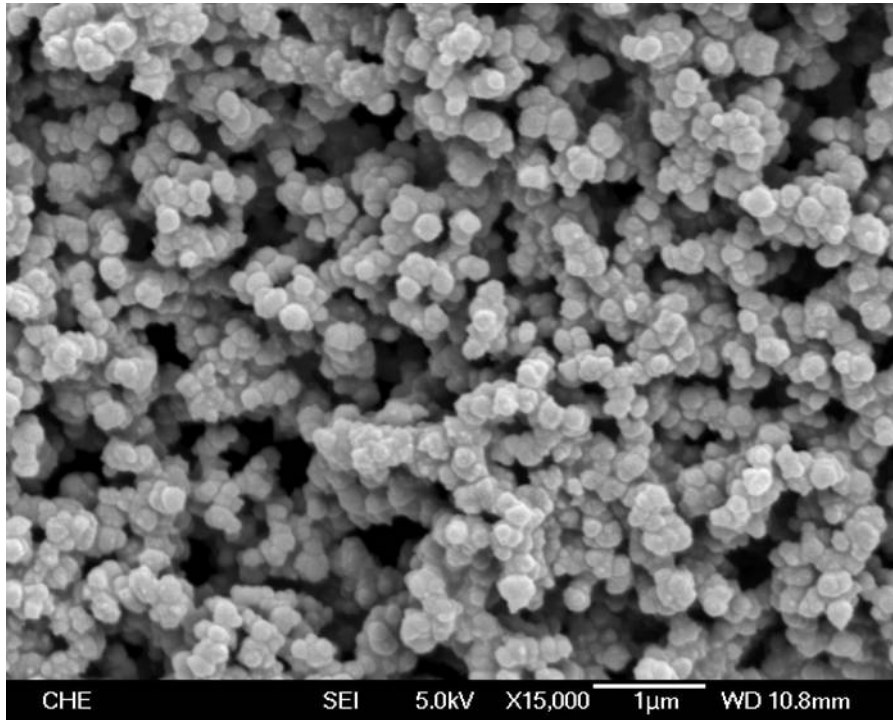


圖 64 未添加模板聚合之 SEM 圖 (pH 4.0 檸檬酸-磷酸鹽緩衝液)

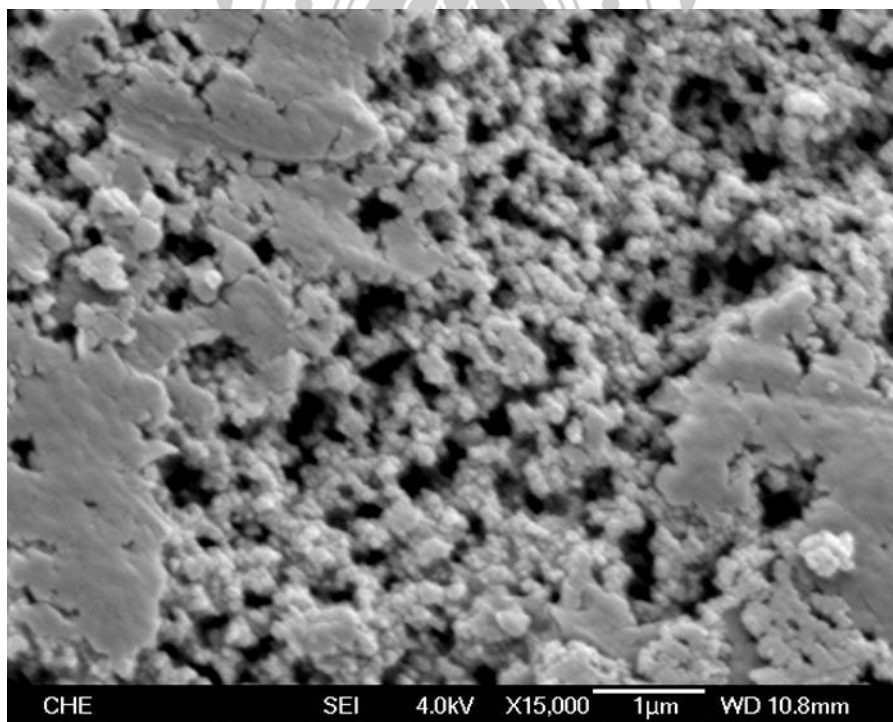


圖 65 添加模板 0.2 mg/ml BSA 聚合之 SEM 圖 (pH 4.0 檸檬酸-磷酸鹽緩衝液)

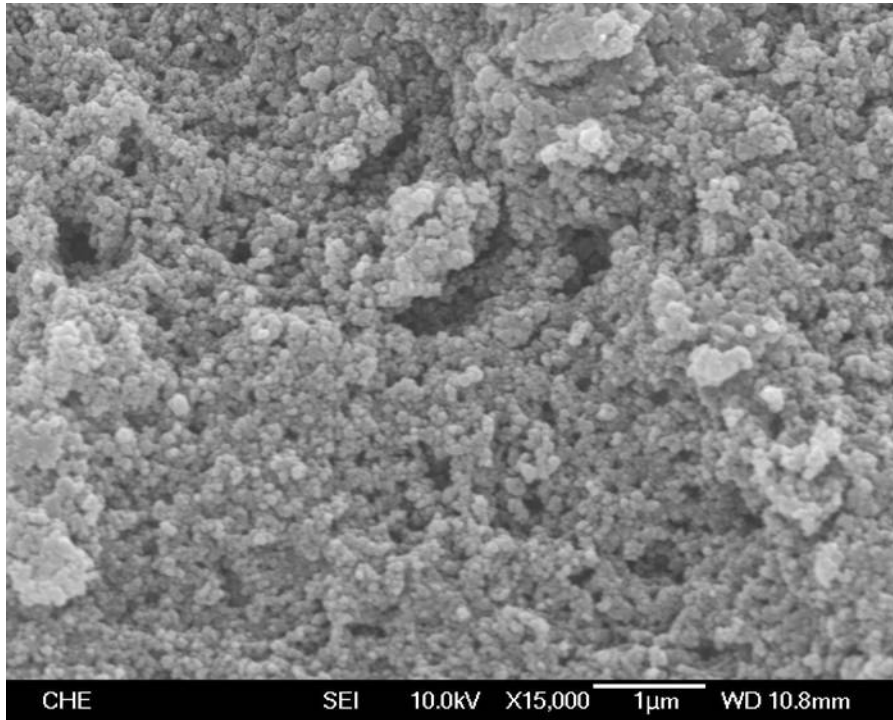


圖 66 添加模板 0.2 mg/ml BSA-1 mM SDS 聚合之 SEM 圖 (pH 4.0 檸檬酸-磷酸鹽緩衝液)

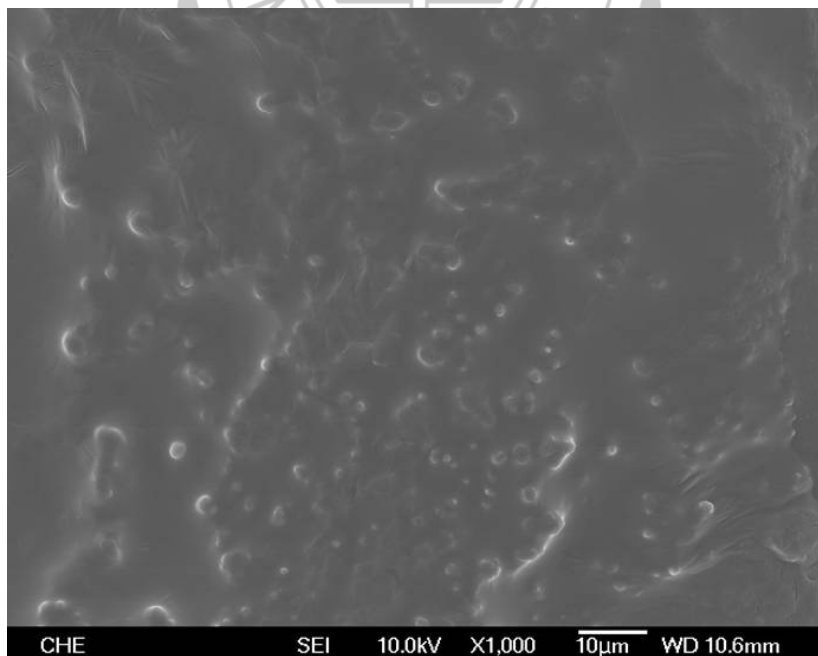


圖 67 添加模板 0.2 mg/ml BSA-5 mM SDS 聚合之 SEM 圖 (pH 4.0 檸檬酸-磷酸鹽緩衝液)

由圖 64 裡，可以看到聚苯胺（褐色）約有  $0.3\ \mu\text{m}$  的清晰顆粒；而圖 65 裡，使用帶正電荷為主的 BSA，聚合而成的聚苯胺（褐色）顆粒半徑縮小到約  $0.1\ \mu\text{m}$ ；圖 66 裡，模板由 BSA 混合 SDS 變成帶負電荷，而聚苯胺（墨綠色）的顆粒半徑就更小；圖 67 的反應條件裡，高濃度的 SDS 影響到 HRP 的功能，因此聚合成看起來完全溶解的聚苯胺（淡綠色）。比較四圖後，可見 BSA 的添加使聚苯胺的顆粒有明顯的變小，而 SDS 的使用則使顆粒再更小些，所以模板的使用對於聚苯胺的顆粒大小有明顯的相關性。

#### 四、固定於電極表面

為尋找測量導電度方式，將以苯胺單體  $4\ \text{mM}$ ，配合模板 BSA  $0.4\ \text{mg/ml}$  與 SDS  $1.8\ \text{mM}$ ，用 HRP  $0.05\ \text{mg/ml}$  與過氧化氫  $5\ \text{mM}$  催化反應，聚合而成的聚苯胺粉末（圖 68），以不同方式固定在白金電極上。

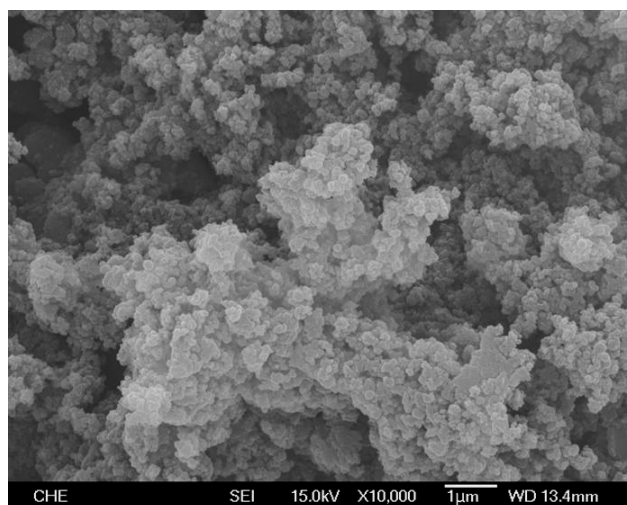


圖 68 添加模板聚合 4 小時之 SEM 圖

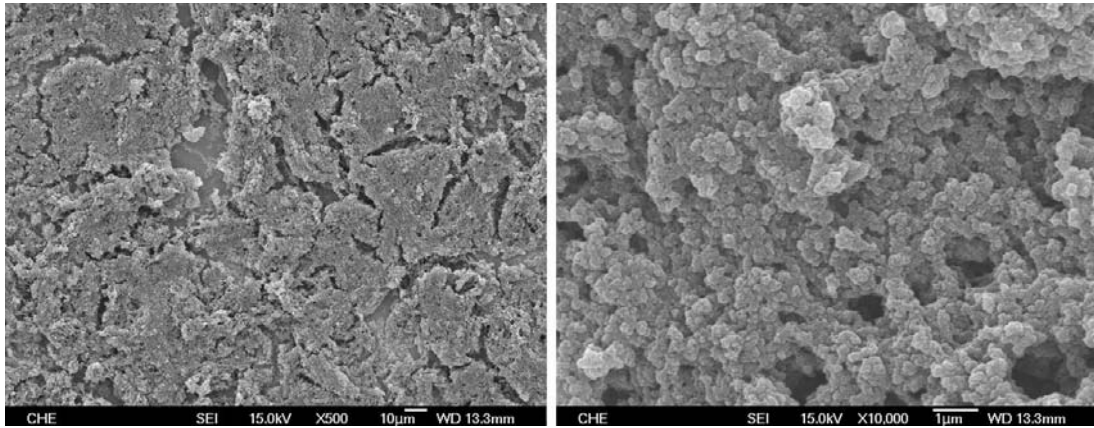


圖 69 將聚苯胺溶液直接滴上白金電極乾燥後之 SEM 圖

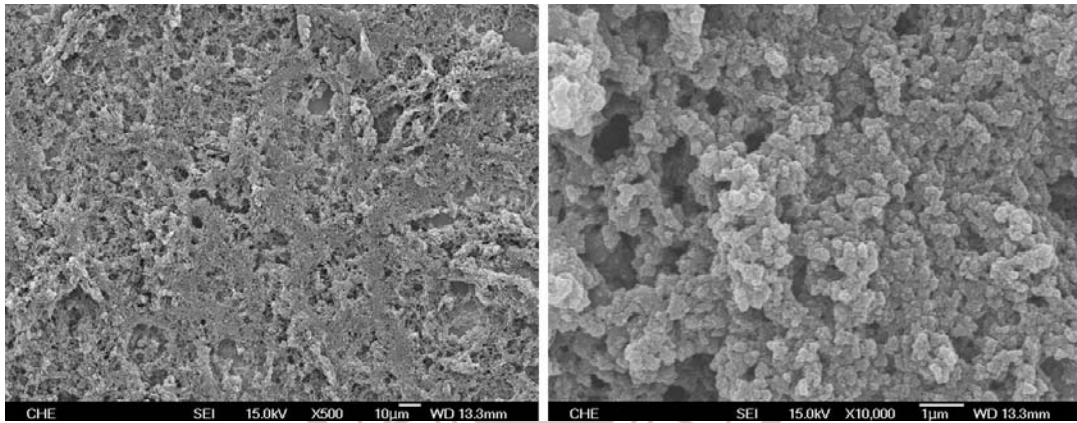


圖 70 將聚苯胺混合戊二醛的溶液滴上白金電極乾燥後之 SEM 圖

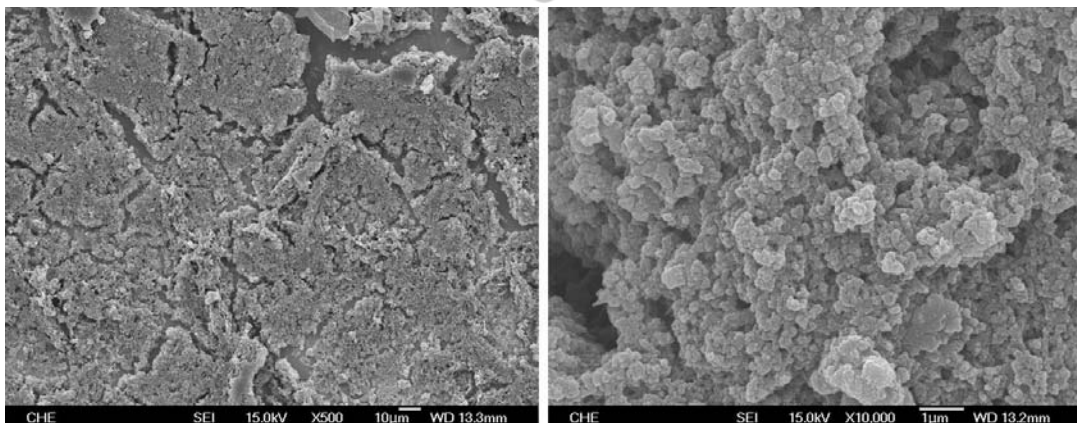


圖 71 將聚苯胺溶液滴上白金電極乾燥，再滴上戊二醛乾燥後之 SEM 圖

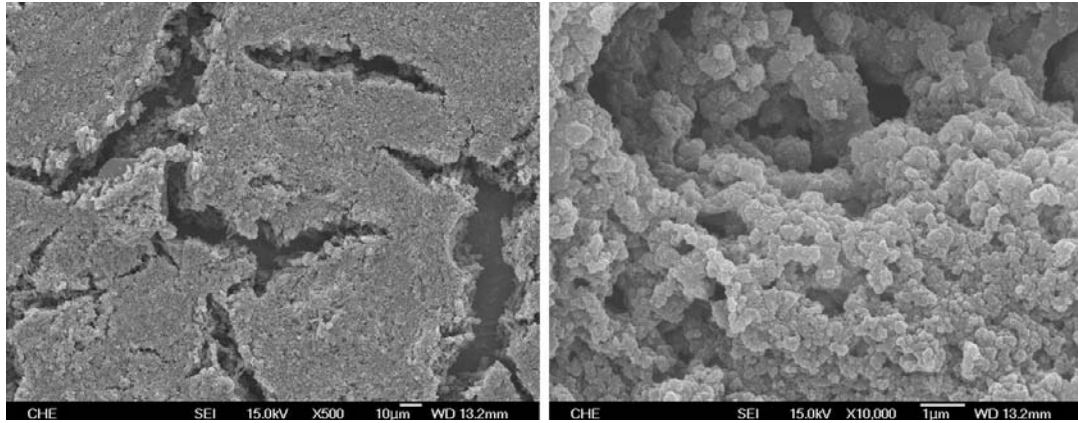


圖 72 將聚苯胺溶液直接滴上白金電極乾燥，再以相同體積之聚苯胺  
溶液滴上白金電極乾燥後之 SEM 圖

圖 69 到圖 72 的右圖與圖 68 相比，沒有能從其中看出有何不同。圖 69 到圖 72 的左圖裡，可以發現將聚苯胺溶液直接固定的方式，都會有很大很多的龜裂，以致於利用循環伏安法進行感測時，獲得的氧化還原峰都是來自於底下的白金電極，圖 70 的方式雖然沒有明顯的龜裂，但是聚苯胺並非完全的覆蓋在白金表面上，所以無法在感測時看到聚苯胺的表現，圖 72 則顯示即使分兩次加入聚苯胺溶液，聚苯胺大部分也只會在前一次的表面上固定，因此沒有幫助增加覆蓋面的功能。總的來說，最大的問題在於聚苯胺並非覆蓋，而是純粹停留在白金表面，因此若要做平面電極，需要將聚苯胺粉末完全溶解，這樣在乾燥的同時應該就能使聚苯胺成膜。

### 3-5 循環伏安法分析

#### 一、在赤血鹽溶液中

由於使用嘗試使用平面電極方式並不成功，因此使用填充式的碳糊電極來進行循環伏安法感測，而預備的碳糊電極中，石墨粉：聚苯胺為 9：1（10%）和 4：1（20%），並了解使用氨水與鹽酸處理的影響，下圖 73 為處理過的粉末，圖 74 為未處理過的粉末。

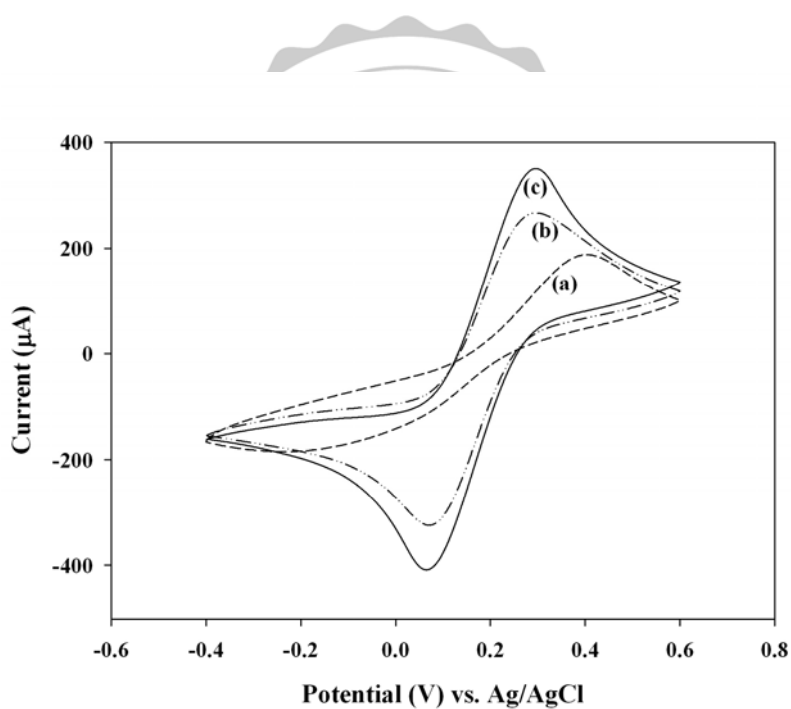


圖 73 比較碳糊電極感測 10 mM  $K_3Fe(CN)_6$  之 CV 圖，

(a) 純碳糊電極；(b) 石墨粉：摻雜的聚苯胺=9：1；

(c) 石墨粉：摻雜的聚苯胺=4：1

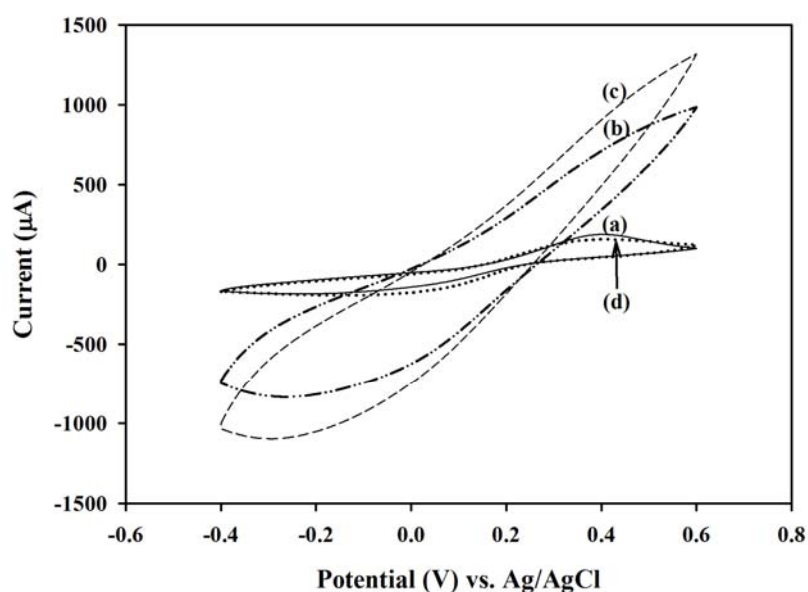


圖 74 比較碳糊電極感測 10 mM  $K_3Fe(CN)_6$  之 CV 圖，(a) 純碳糊電極；(b) 石墨粉：未摻雜的聚苯胺=9：1；(c) 石墨粉：未摻雜的聚苯胺=4：1；(d) 碳糊與BSA混合電極

比較圖 73 與圖 74 後，可以發現經過酸鹼處理的聚苯胺，當其在電極中所佔的比例較高時，氧化還原的情形也更明顯，而未經過酸鹼處理的聚苯胺，在循環伏安法表現上則較類似蓄電的作用。可以判斷經過酸鹼處理後，本研究中的模板物質 BSA 與 SDS 兩者，在經過氨水與鹽酸的處理過程中，很明顯的有被消除的情形，而導電的效果應該會隨著去除的程度提高而增加。



## 二、在鹽酸溶液中

使用填充式的碳糊電極來進行循環伏安法感測，為看到聚苯胺在電化學上的氧化還原波峰，預備碳糊電極裡石墨粉：經酸鹼處理過之聚苯胺為 1：1，並了解使用氨水與鹽酸處理的影響。

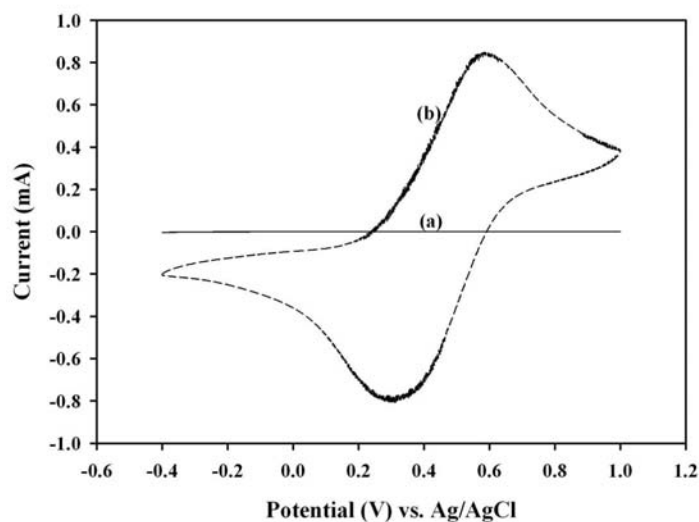


圖 75 比較碳糊電極感測 1 M HCl 之 CV 圖，

(a) 純碳糊電極；(b) 石墨粉：摻雜的聚苯胺粉末 = 1：1

由圖 75 裡可見，聚苯胺電極與純碳糊電極相比電流值有顯著的提高，且圖中可以看到一對明顯的氧化還原波峰。由於電極中可接觸溶液進行摻雜與去摻雜的聚苯胺數量，與所填充可進行氧化與還原的聚苯胺數量相比，後者所能產生的電流值遠大於前者，因此無法突顯摻雜與去摻雜的波峰，而圖中之波峰則為聚苯胺的氧化與還原波峰。圖中亦可見氧化還原波峰的波形相當對稱，故此聚苯胺電極應有良好的可逆性。

## 第四章 結論與建議

本研究乃是以辣根過氧化酶 (HRP) 與過氧化氫配合經過十二烷基磺酸鈉 (SDS) 與加熱變性過的牛血清蛋白 (BSA)，利用變性帶負電荷的牛血清蛋白 (BSA) 吸引被辣根過氧化酶 (HRP) 催化為帶正電荷的苯胺自由基陽離子分子，進行縮合聚合反應形成具導電性的鹽式中間氧化態聚苯胺高分子，再藉由氨水與鹽酸的相繼處理來去除模板並提升導電度。

所製備的聚苯胺，需要先以 pH 4.0 檸檬酸-磷酸鹽緩衝液配製苯胺單體，單體濃度為 4 mM，當模板濃度為 BSA 0.4 mg/ml 混合 SDS 1.8 mM 的條件下，使用 HRP 酵素 0.05 mg/ml 於過氧化氫 5 mM 下催化，在紫外光可見光光譜儀分析下，其波長在 750 nm 左右有最大吸收峰，可見獲得相當良好的鹽式中間氧化態聚苯胺，而模板在經過 1 M 的氨水與鹽酸的相繼處理後，也能由 FTIR 與 TGA 中看到模板的部分去除，而能夠提升導電的功能。

牛血清蛋白與聚苯胺的聚合物在 SEM 觀察下，可以清晰的看到顆粒狀聚苯胺聚集堆疊的情形，這是分子鏈因為氫鍵造成分子捲曲連結，但是這樣也將牛血清蛋白包覆於聚苯胺的內部，導致導電度在含有模板時並不佳，雖然經過氨水與鹽酸的處理後，可以破壞一部分的模板，但是依然有一小部份卻因為收集的過程中，聚苯胺聚集在一

起，而磁石攪拌不足以把它們驅散開來，因此沒有接觸到酸鹼而沒有去除。未來也許可以藉由超音波進行散開，或者再使用蛋白質分解酶進一步分解，再以酸鹼處理應該就能大量去除模板。

研究過程中有嘗試過壓錠與製膜，但壓錠效果不彰；製薄膜（將未經酸鹼處理之聚苯胺粉末溶於NMP溶液中，再混合到PVA膠狀溶液中，於玻璃面上乾燥）以四點探針測量時，中央的面電阻率為  $20 \text{ M}\Omega$ （估算導電率約為  $5 \times 10^{-5} \text{ S/cm}$ ）上下，而邊緣的面電阻率則在  $30 \text{ M}\Omega$  到  $100 \text{ M}\Omega$  間變動。因此應用時，可以考慮使用NMP或其他可行溶劑溶解，經製膜後，聚苯胺分子間連結程度提升，因而能增加導電的效果。



## 參考文獻

- [1] 王博生, “聚丙烯腈系/奈米複合高分子電解質之合成、物性與其在聚苯胺/鋰二次電池應用之研究”, 清華大學論文, 2001。
- [2] 林裕棠, “梳狀聚苯乙烯磺酸與聚苯胺複合材料之合成與分析”, 中央大學論文, 2003。
- [3] Eichen Y., Braun E., Sivan U., and Ben-Yoseph G., “Self-assembly of nanoelectronic components and circuits using biological templates,” *Acta Polym.*, **49**, 663-670 (1998).
- [4] Nickels P., Dittmer W. U., Beyer S., Kotthaus J. P., and Simmel F. C., “Polyaniline nanowire synthesis templated by DNA,” *Nanotechnology*, **15**, 1524-1529 (2004).
- [5] Cruz-Silva R., Romero-García J., Angulo-Sánchez J. L., Ledezma-Pérez A., Arias-Marín E., Moggio I., and Flores-Loyola E., “Template-free enzymatic synthesis of electrically conducting polyaniline using soybean peroxidase,” *European Polymer Journal*, **41**, 1129-1135 (2005).
- [6] Nagarajan R., Liu W., Kumar J., Tripathy S. K., Bruno F. F., and Samuelson L. A., “Manipulating DNA Conformation Using Intertwined Conducting Polymer Chains,” *Macromolecules*, **34**, 3921-3927 (2001).
- [7] Uemura S., Shimakawa T., Kusabuka K., Nakahira T., and Kobayashi N., “Template photopolymerization of dimeric aniline by photocatalytic reaction with  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  in the presence of DNA,” *J. Mater. Chem.*, **11**, 267-268 (2001).
- [8] Kobayashi N., Uemura S., Kusabuka K., Nakahira T., and Takahashi H., “An organic red-emitting diode with a water-soluble DNA–polyaniline complex containing  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ,” *J. Mater. Chem.*, **11**, 1766-1768 (2001).

- [9] Ma Y. F., Zhang J. M., Zhang G. J., and He H. X., “Polyaniline Nanowires on Si Surfaces Fabricated with DNA Templates,” *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 7097-7101 (2004).
- [10] Cao Y., Smith P., and Heeger A. J., “Counter-ion induced processibility of conducting polyaniline and of conducting polyblends of polyaniline in bulk polymers,” *Synth. Met.*, **48**, 91-97 (1992).
- [11] Bicak N. and Karagoz B., “Polymerization of Aniline by Copper-Catalyzed Air Oxidation,” *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **44**, 6025-6031 (2006).
- [12] Genies E. M., Boyle A., Lapkowski M., and Tsintavis C., “Polyaniline: A historical survey,” *Synth. Met.*, **36**, 139-182 (1990).
- [13] MacDiarmid A. G., Chiang J. C., Halpern M., Huang W. S., Mu S. L., Somasiri N. L. D., Wu W., and Yaniger S. I., ““Polyaniline”: Interconversion of Metallic and Insulating Forms,” *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **121**, 173-180 (1985).
- [14] Kobayashi T., Yoneyama H., and Tamura H., “Electrochemical reactions concerned with electrochromism of polyaniline film-coated electrodes,” *J. Electroanal. Chem.*, **177**, 281-291 (1984).
- [15] Petr A., Neudeck A., and Dunsch L., “On the magnetic susceptibility of polyaniline – an alternative approach,” *Chem. Phys. Lett.*, **401**, 130-134 (2005).
- [16] H. Letheby M. B. M. A. Ph. D., “XXIX.—On the production of a blue substance by the electrolysis of sulphate of aniline,” *J. Chem. Soc.*, **15**, 161-163 (1862).
- [17] 楊岳峰，“在孔道均一的模板內合成聚苯胺奈米管”，中央大學論文，2003。
- [18] Oyama N., Tatsuma T., Sato T., and Sotamura T., “Dimercaptan–polyaniline composite electrodes for lithium batteries with high energy density,” *Nature*, **373**, 598-600 (1995).
- [19] Yang Y. and Heeger A. J., “A new architecture for polymer transistors,” *Nature*, **372**, 344-346 (1994).

- [20] Shinohara H., Chiba T., and Aizawa M., “Enzyme microsensor for glucose with an electrochemically synthesized enzyme-polyaniline film,” *Sens. Actuators*, **13**, 79-86 (1988).
- [21] Gustafsson G., Cao Y., Treacy G. M., Klavetter F., Colaneri N., and Heeger A. J., “Flexible light-emitting diodes made from soluble conducting polymers,” *Nature*, **357**, 477-479 (1992).
- [22] Roy S., Fortier J. M., Nagarajan R., Tripathy S., Kumar J., Samuelson L. A., and Bruno F. F., “Biomimetic Synthesis of a Water Soluble Conducting Molecular Complex of Polyaniline and Lignosulfonate,” *Biomacromolecules*, **3**, 937-941 (2002).
- [23] Geng Y. H., Sun Z. C., Li J., Jing X. B., Wang X. H., and Wang F. S., “Water soluble polyaniline and its blend films prepared by aqueous solution casting,” *Polymer*, **40**, 5723-5727 (1999).
- [24] Ram M. K., Maccioni E., and Nicolini C., “The electrochromic response of polyaniline and its copolymeric systems,” *Thin Solid Films*, **303**, 27-33 (1997).
- [25] Akkara J. A., Senecal K. J., and Kaplan D. L., “Synthesis and characterization of polymers produced by horseradish peroxidase in dioxane,” *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **29**, 1561-1574 (1991).
- [26] 吳俊鈺，“聚苯胺及其衍生物的氧化及分子量研究”，東華大學論文，2002。
- [27] 林世仁，“導電性聚摻合物之研究”，高雄應用科技大學論文，2004。
- [28] 葉秀敏，“聚苯胺酵素修飾電及對麩酸鹽(L-glutamate)之偵測”，中山大學論文，2000。
- [29] Chien-Chung Chen and Yesong Gu, “Enhancing the sensitivity and stability of HRP/PANI/Pt electrode by implanted bovine serum albumin,” *Biosensors and Bioelectronics*, **23**, 765–770 (2008).
- [30] Gospodinova N., Terlemezyan L., “Conducting polymers prepared by oxidative polymerization: polyaniline,” *Prog. Polym. Sci.*, **23**, 1443-1484 (1998).

- [31] 賴君杰，“掃描式電化學顯微鏡結合流動注入系統對生化分子之偵測與分析”，中山大學論文，2003。
- [32] 洪偉杰，張朝暉和蘆國營，“辣根過氧化物酶的結構與作用機制”，生命的化學，第**25**卷，第01期，2005。
- [33] Yang B. Y., Gray J. S. S., and Montgomery R., “The glycans of horseradish peroxidase,” *Carbohydr. Res.*, **287**, 203-212 (1996).
- [34] 賴奕成，“固定化HRP於工業廢水處理之應用”，中興大學論文，2001。
- [35] 許珮甄，“綠竹筍(*Bambusa oldhamii*)外殼過氧化酶之研究”，靜宜大學論文，2003。
- [36] 魏曉芳和劉會洲，“熱變性對蛋白質結構及泡沫行為的影響”，化工冶金，第04期，2000。
- [37] 林愛華、孫小梅和李步海，“表面活性劑對蛋白質變性作用的研究”，中南民族大學學報(自然科學版)，第**21**卷，第01期，2002。
- [38] 趙承琛，“界面活性劑探原”，科學月刊，第**四**卷，第48期，1973。
- [39] Arnao M. B., Cano A., Hernández-Ruiz J., García-Cánovas F., and Acosta M., “Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods,” *Anal. Biochem.*, **236**, 255-261 (1996).
- [40] 徐靜眉，“水溶性 N-取代丙烯酸聚苯胺之結構與物性研究”，中原大學論文，2001。
- [41] Liu W., Kumar J., Tripathy S., Senecal K. J., and Samuelson L., “Enzymatically Synthesized Conducting Polyaniline,” *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 71-78 (1999).
- [42] Wang F., Yang Z., Zhou Y., Weng S., Zhang L., and Wu J., “Influence of metal ions on phosphatidylcholine–bovine serum albumin model membrane, an FTIR study,” *J. Mol. Struct.*, **794**, 1-11 (2006).

## 簡 歷

姓 名：阮治瑋

籍 貫：台灣高雄

出生年月日：71年11月8日

學 歷：私立東海大學化學工程學系

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

