

東海大學化學研究所

碩士學位論文

指導教授：林宗吾 博士

提升銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材在表面增強

拉曼散射基材的活性與其應用於分子偵測

Enhancing SERS Activity of the Ag

Nanoparticles/Graphenen Oxide

Nanocomposites and Their Applications for

Molecule Detections

研究生：吳泓毅

中華民國一〇三年十一月

摘要

本研究提出一個簡單的濕式化學法將銀奈米粒子 (AgNPs) 裝飾在事先合成的氧化石墨烯 (GO) 上形成銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材 (AgNPs/GO)。此複合材除了可做為表面增強拉曼散射活性基板，並應用在高靈敏度，具有高選擇性的 DNA 偵測生物感測器之外，亦可以在複合材表面進行電漿驅動化學反應，使得具特定官能基的分子能經由二聚化反應相互結合。

第一部分，使用 AgNPs/GO 做為 SERS 基材，並將目標 DNA 修飾在帶有 4-MBA 做為拉曼探針的 AgNPs，以 DNA 雜合反應自組裝系統來偵測 DNA。由於互補 DNA 彼此會產生雜合反應，能將修飾 DNA 的 AgNPs 自組裝在 AgNPs/GO 上，形成 AgNPs 對增加基板表面上的熱點，能夠有效增強拉曼訊號，增加偵測 DNA 的靈敏度。同時探討 AgNPs 的尺寸對於表面增強拉曼散射 (SERS) 增強效果之影響，證明 AgNPs 尺寸越大能夠產生越好的拉曼增顯效果，利用這個方式 DNA 的偵測極限可以達到 1 pM。除此之外，使用不同分子做為拉曼探針，能夠在同一基板偵測複數的 DNA。

第二部分，我們利用電漿驅動化學反應在 AgNPs/GO 上催化 4-硝基苯硫酚 (4-NTP) 轉變成 *p, p'*-二巯基偶氮苯 (DMAB)。AgNPs/GO 作為 SERS 活性基板不只是能夠有效地催化分子的轉換，同時能夠靈敏地偵測修飾分子的結構變化。與 AgNPs/GO 比較，可以發現 DMAB 官能化 AgNPs/GO 的最大表面電漿共振吸收波長出現紅位移。DMAB 的形成不只減少 GO 表面上相鄰的 AgNPs 之間的距離，同時增加 AgNPs 周圍的介電常數。這些影響導致 DMAB 官能化 AgNPs/GO 的最大表面電漿共振波長紅位移，並且提升 AgNPs 附近的局部電磁場，這意味著 DMAB 官能化 AgNPs/GO 具有更為良好 SERS 活性。本工作成功地證明了當 DMAB 官能化 AgNPs/GO 作為 SERS 基板時，對 R6G 的偵測靈敏度比起先前合成的 AgNPs/GO 提高了 3 個數量級。

第三部分，我們利用電漿驅動化學反應機制，使具 NH_2 官能基分子在

AgNPs/GO 表面發生二聚化反應，根據拉曼訊號變化達到偵測分子的目的。進行二聚化反應的 SERS 基板經過清洗後，仍可以在表面上觀察到 3-氨基吡啶(3-AP) 分子以及 DMAB 特有拉曼訊號，證明 N=N 雙鍵形成，3-AP 分子已固定在 AgNPs/GO 上。而經過硼氫化鈉處理，能夠有效還原 N=N 雙鍵使 SERS 基板恢復到初始狀態，能再次作為 NH₂ 官能基分子偵測平台。除此之外，使用具 NO₂ 官能基的分子進行控制實驗，也證明了該二聚化反應必須是由兩個相同官能基 (NH₂ 或 NO₂) 才可以進行。

本論文之研究使用 AgNPs/GO 作為 SERS 活性基板進行一系列實驗，證實 AgNPs/GO 具有良好的 SERS 活性，同時根據基板不同修飾能夠偵測不同的待測物，並具有高靈敏度和選擇性，有做為良好感測器的應用潛力。

關鍵詞：氧化石墨烯、銀奈米粒子、DNA、*p, p'*-二巰基偶氮苯、電漿驅動化學反應、表面增強拉曼散射、電磁場增強

Abstract

In this study, we propose a simple wet chemical method to modified silver nanoparticles (AgNPs) on the pre-synthesis graphene oxide (GO), formation of the silver nanoparticles/graphene oxide composite (AgNPs/GO). This composite not only can be used as Surface-enhanced Raman spectroscopy active substrates, applied in DNA biosensor of highly sensitivity and selective. On other hand, can also conduct plasmon-driven reaction on the substrate surface, so that the molecule have a specific functional group can bind each other via a dimerization.

The first part, use of AgNPs/GO as SERS substrates and modified the target DNA on the AgNPs with 4-MBA serves as Raman probe, use of self-assembly system of DNA hybridization to detect DNA. The complementary DNA will hybridized each other, AgNPs with DNA modified can self-assembled on the AgNPs/GO. Increased hot spots site with the formation of AgNPs couple on the substrate surface, can effectively enhance the Raman signal and increased the sensitivity of DNA detection. We also discussed the size of AgNPs to impact the effect of SERS enhance. Proved the greater size AgNPs able to produce significant increases Raman effect, the limit of DNA detection can reach 1 pM with this method. In addition, use of different label molecule is possible to detect multiplex DNA on the same substrate.

The second part, we use plasmon-driven chemical reaction catalyzed 4-nitrothiophenol (4-NTP) transformed into *p, p'*-dimercaptoazobenzene (DMAB) on the AgNPs/GO. The AgNPs/GO as SERS active substrates not only able to effectively catalyze the conversion of molecules, and can sensitively detect change in the structure of modified molecules. It is found that maximum surface Plasmon absorption of DMAB functionalized AgNPs/GO is red-shifted compared with that of AgNPs/GO. The formation of DMAB on AgNPs/GO results in the decrease in

distance between adjacent AgNPs on GO surface and the increase in dielectric constant of the medium near the AgNP surface. These effects lead to the red shift of the maximum surface plasmon absorption of DMAB functionalized AgNPs/GO and enhance the local electromagnetic field near AgNPs. Since the aforementioned experiments result, it means DMAB functionalized AgNPs/GO has a more favorable SERS activity. This work successfully proves that when DMAB functionalized AgNPs/GO serves as the SERS substrate, it can increase the detection sensitivity of R6G molecules by 3 orders of magnitude compared with as-synthesized AgNPs/GO.

The third part, we use the plasmon-driven chemical reaction mechanism make the dimerization reaction of the molecule of functional group NH_2 occurs on the AgNPs/GO surface, according to the changes of the Raman signal achieves the purpose of molecular detection. The dimerization reaction SERS substrate after washed, can still be observed the unique Raman signal of 3-aminopyridine (3-AP) molecule and DMAB to proved N=N double bond is formed, 3-AP molecule have been binded on the AgNPs/GO surface. After treatment with sodium borohydride, can effectively reduced the N=N double bond, that the SERS substrate recovered to the initial state can be used as the detection platforms of the molecule of functional group NH_2 again. In addition, through the control experiment that use the molecule of functional groups NO_2 also proved that the dimerization reaction must be composed of two identical functional groups (NH_2 or NO_2) can be conduct.

This thesis is to study the AgNPs/GO as SERS active substrate conduct a series of experiments to proved AgNPs/GO has good SERS activity, while able to detect different analytes depend on the substrate of different modification, and has a high sensitivity and selectivity shows a potential in the application of sensor.

Keywords: graphene oxide, Ag nanoparticle, DNA, *p*, *p'*-dimercaptoazobenzene,

plasmon-driven chemical reactions, surface enhanced Raman scattering,
electromagnetic field enhancement



誌謝

此篇碩士論文能夠完成，必須感謝我的指導教授林宗吾老師在研究上的指導以及教誨，這兩年多來積極與我討論，教導我實驗除了實作同時也要閱讀，培養我邏輯思考的能力以及正確的實驗態度，使我的實驗能朝向正確的方向，這段時間我獲益良多，使碩士學業得以順利完成。

同時感謝口試委員賴英煌老師以及中央大學的蘇清源老師在百忙之中對本研究細心審閱與指導，並提供了諸多寶貴建議，使此篇論文能夠更加完整。

也感謝研究生涯中實驗室的鏘權學長、家瑞學長和佩頤學姊於學業上的幫助與指引。感謝實驗室同儕兆軒兩年來對實驗還有課業上互相勉勵與幫助。感謝實驗室的學弟妹們，貫中、庭悌、文凱、彥誠、小丹、孟珊等人在實驗與雜務上的諸多幫忙。

特別感謝生命科學系的趙偉廷老師，在儀器使用上提供許多便利，使我的研究能夠順利進行。特別感謝物理系的正緯，因為你給予實驗上不同的觀點與想法，以及儀器操作上的幫忙，我才能順利完成研究。

因為有了上述各位的陪伴，使我在研究所生涯更加多彩與順利，必且使我能積極面對挫折與解決問題。在這段期間我從各位的身上所獲得的東西是無價的寶物，我會牢記在心，謝謝。

最後，要感謝我的爸爸、媽媽與妹妹，這兩年多來由於家人們默默的在背後支撐著，在我面對挫折時給予鼓勵而使我沒有斷然放棄，同時給予我足夠經濟支援，讓我能沒有顧慮的專注在學業上，必且提供我這個機會讓我能進行學習與更加充實自己。

目錄

摘要.....	I
Abstract.....	III
誌謝.....	VI
目錄.....	VIII
圖目錄.....	X
表目錄.....	XVI
第 1 章 介紹.....	1
1-1 前言	1
1-2 生物感測器 (biosensor)	1
1-3 拉曼光譜	2
1-3-1 拉曼光譜的歷史與演進.....	2
1-3-2 共振拉曼 (Resonance Raman)	4
1-4 表面電漿共振 (Surface Plasmon Resonance)	6
1-5 表面增強拉曼散射 (Surface Enhanced Raman Scattering)	10
1-5-1 電磁效應 (electromagnetic effect)	11
1-5-2 化學效應 (chemical effect)	13
1-5-3 熱點 (hot spot)	15
1-6 表面增強拉曼散射活性基板	16
1-6-1 金屬膠體 (Metallic colloid)	17
1-6-2 二維平面 SERS 活性基材	21
1-7 金屬奈米粒子/石墨烯複合材 (Metallic Nanoparticles/Graphenen Nanocomposites)	21
第 2 章 實驗與材料鑑定.....	26
2-1 實驗藥品	26

2-2 材料製備	27
2-2-1 氧化石墨烯的合成	27
2-2-2 銀奈米粒子與銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材的合成	27
2-2-3 目標 DNA/銀奈米粒子的製備	27
2-2-4 標定分子的修飾	28
2-2-5 表面增強拉曼散射樣品的製備	28
2-2-6 修飾 4-硝基苯硫酚 (4-NTP) 在銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材表面	29
2-2-7 修飾 4-氨基苯硫酚 (4-ATP) 在銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材表面	30
2-2-8 以 SERS 的偵測實驗	30
2-3 材料觀察與鑑定	30
2-2-1 原子力顯微鏡	30
2-2-2 穿透式電子顯微鏡	31
2-2-3 UV/vis 吸收光譜	32
2-2-4 X 光繞射分析儀	33
2-4 拉曼光譜	34
第 3 章 氧化石墨烯為基底的 SERS 活性平台應用於專一性與複數 DNA 偵測	36
3-1 材料鑑定	36
3-1-1 表面形貌觀察	36
3-1-2 光學鑑定	38
3-1-3 X 光繞射分析	39
3-2 表面增強拉曼散射實驗	40
3-2-1 高靈敏度的 DNA 偵測	40
3-2-2 銀奈米粒子的粒徑尺寸對表面增強拉曼散射的影響	42
3-2-3 專一性與複數 DNA 的偵測	45

3-3 結語	47
第 4 章 在 AgNPs/GO 表面上形成 DMAB 對 SERS 增強的影響.....	49
4-1 材料鑑定	49
4-2 拉曼光譜實驗	49
4-2-1 在 AgNPs/GO 表面上的電漿驅動反應	49
4-2-2 官能化 DMAB 的 AgNPs/GO 作為高靈敏度偵測器	58
4-3 結語	60
第 5 章 在 AgNPs/GO 表面上修飾 4-ATP 對於特定官能基分子的選擇性偵測...	62
5-1 材料鑑定	62
5-2 拉曼光譜實驗	62
5-2-1 偵測具 NH ₂ 官能基分子和偵測平台重複利用性測試	62
5-2-2 特定官能基的選擇性偵測	66
5-3 結語	67
第 6 章 結論與未來工作.....	69
第 7 章 參考文獻.....	71

圖目錄

圖 1-1 生物感測器的構造 ¹ 。.....	2
圖 1-2 拉曼散射現象，光射入物體後散射光頻率差異的示意圖。.....	3
圖 1-3 不同尺寸（9~99 nm）的金奈米粒子的 UV-vis 吸收光譜。.....	7
圖 1-4 (a)鏈霉抗生物素蛋白感測器製備的示意圖。(b)利用吸收光譜的變化感測蛋白質分子。(c)不同濃度下的鏈霉抗生物素蛋白分子，修飾生物素分子的金奈米粒子基板在 550 nm 波長處的光吸收度隨時間的變化。(d)不同濃度下的鏈霉抗生物素蛋白分子，偵測 30 分鐘後的光吸收量變化。.....	9
圖 1-5 位在一表面電漿共振最大吸收為 550 nm 的銀奈米粒子的 CdSe 量子點，其在不同波長激發光源下的螢光強度變化（黑色），與單獨量子點比較圖（藍色）。插圖為對應波長激發光下的螢光影像。.....	10
圖 1-6 金屬奈米球受到外加電磁場作用下激發電漿子振盪產生局部電場放大作用示意圖 ¹⁴ 。.....	11
圖 1-7 為 SERS 電磁場增強機制的簡易示意圖 ¹⁵ 。.....	12
圖 1-8 分子-金屬系統能階圖，顯示拉曼過程涉及(a)分子路徑和(b)、(c)分子-金屬路徑 ¹⁵ 。.....	14
圖 1-9 平行極化（藍色）與正交偏振（紅色）的金奈米粒子間距對光場強度關係圖 ¹⁶ 。.....	15
圖 1-10 金屬奈米粒子間的熱點之相對位置與 SERS 增強因子增加相關性的示意圖 ¹⁷ 。.....	16
圖 1-11 平均粒徑為(a)17 nm、(b)30 nm、(c)40 nm、(d)50 nm、(e)60 nm 和(f)80 nm 的金奈米粒子的 SEM 影像。平均粒徑為(g)17 nm、(h)30 nm、(i)40 nm、(j)50 nm、(k)60 nm 和(l)80 nm 的金奈米粒子的尺寸分布直方圖。圖中實線是高斯分布擬似曲線。.....	18
圖 1-12 (a)0.25 μM 的 4-ATP 和(b)0.044 μM 的 4-NTP 水溶液在 17~80 nm 的金奈	

米粒子的 SERS 光譜。	19
圖 1-13 自組裝金奈米星二聚體偵測汞離子示意圖。	19
圖 1-14 不同的金奈米星二聚體的 TEM 影像，分別為(A)60 nm 的二聚體、(B)異 二聚體和(C)50 nm 的二聚體。(D)不同二聚體系統獲得的 4-ATP 的 SERS 光譜圖。	20
圖 1-15 (A)不同濃度的汞離子所獲得的 SERS 光譜圖。(B)以 4-ATP 特徵峰 (1083 cm^{-1}) 對汞離子濃度的標準曲線。	20
圖 1-16 石墨烯的六角蜂窩狀結構。	21
圖 1-17 石墨結構。	22
圖 1-18 使用 AgNPs/RGO 做為 SERS 平台的不同濃度下 TMPyP 的拉曼光譜圖。	24
圖 1-19 使用 AuNPs/G 作為 SERS 活性平台的 DNA 偵測示意圖。	25
圖 1-20 (a)分別是沒有目標 DNA (黑色)和 1 nM 的非互補 DNA (紅色)和互補 DNA (藍色)存在下獲得的 SERS 光譜。(b)目標 DNA 在 0~100 nM 下的 SERS 光譜。(c)不同拉曼特徵峰的強度對不同 DNA 濃度的標準曲線。(d) 分別是 T1 目標 DNA (A 處)、T2 目標 DNA (B 處) 以及 T1 與 T2 同時 存在下 (C 處) 的 SERS 光譜。圖中星號為石墨烯的 D 和 G 帶。	25
圖 2-1 製備 SERS 活性基板和 DNA 偵測的示意圖。	29
圖 2-2 原子力顯微鏡。	31
圖 2-3 型號 JEOL JSM-7000F 的穿透式電子顯微鏡。	32
圖 2-4 型號 UV-1800 Shimadzu 的 UV/vis 吸收光譜儀。	33
圖 2-5 型號為 PHILIPS X'PERT Pro MPD 的 X 光繞射分析儀。	34
圖 2-6 型號 Horiba iHR550 拉曼光譜儀。	35
圖 3-1 利用改良式漢默法合成的單層氧化石墨烯(GO)的原子力顯微鏡(AFM) 影像。右上角插圖為圖中所指的橫截面高度差示意圖。	37
圖 3-2 (a)為 AgNPs/GO 典型的 TEM 影像。(b)較高倍率下的 AgNPs/GO 的 TEM	

影像。(c)為 AgNPs 的 TEM 影像。AgNPs 的尺寸分佈分別表示在各圖中的插圖。.....	38
圖 3-3 (a)GO 奈米薄片、AgNPs 和 AgNPs/GO 的 UV/Vis 吸收光譜。(b)GO 奈米薄片和 AgNPs/GO 的拉曼光譜。拉曼光譜利用 Si 訊號峰的強度作歸一化。.....	39
圖 3-4 為 AgNPs/GO 的 XRD 圖像。位在 $2\theta=21.7^\circ$ 處的寬峰為玻璃基板的背景訊號。.....	40
圖 3-5 (a)不同濃度(1 nM~1 μ M)的 target DNA 存在下所獲得的 SERS 光譜圖。(b)標定分子 4-MBA 的拉曼特徵峰 (1077 cm^{-1}) 對 DNA 濃度的劑量反應 (dose-response) 分佈。SERS 實驗中使用的雷射強度為 1.5 mW，積分時間為 3 秒。.....	41
圖 3-6 官能化 4-MBA 的 AgNPs 滴在 AgNPs/GO 上的拉曼光譜圖。分別量測清洗前(紅色線),和清洗後(黑色線)。拉曼光譜使用功率 1.5 mW 的 532 nm 雷射，積分時間為 3 秒的條件進行量測。.....	42
圖 3-7 (a)大尺寸的 AgNPs 的 TEM 影像，粒徑分佈如圖中插圖所示。(b)大尺寸的 AgNPs 的 UV/Vis 吸收光譜。.....	43
圖 3-8 修飾不同尺寸 AgNPs 的目標 DNA，在 1 nM 下所獲得的 SERS 光譜圖。黑色線為 15.6 nm，紅色線為 57.5 nm。拉曼實驗中使用的雷射強度為 1.5 mW，積分時間為 3 秒。.....	44
圖 3-9 (a)使用大尺寸 AgNPs 獲得的不同濃度的目標 DNA 存在下的 SERS 光譜圖。(b)目標分子 4-MBA 的拉曼特徵峰強度對濃度的劑量反應 (dose-response) 分佈。SERS 光譜使用雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 3 秒。.....	45
圖 3-10 為 DNA 偵測的專一性實驗。獲得的所量測的光譜分別是沒有綁定 target 目標 DNA 的 AgNPs 存在下(黑色線)、與 Probe 探針 DNA 不互補的 1 nM 的 nonc 非互補 DNA 的 AgNPs (紅色線)和互補的 target 目標 DNA 的 AgNPs 存在下(藍色線)滴在探針 DNA 官能化 AgNPs/GO 表面上。SERS	

光譜使用雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 3 秒。.....	46
圖 3-11 探針 DNA 和目標 DNA 在不同配對所獲得的 SERS 光譜圖，分別做 P1 對 T1 (藍色線)、P1 對 T2 (黑色線)、P2 對 T1 (紅色線) 和 P2 對 T2 (綠色線)。目標 DNA 濃度皆為 1 nM，SERS 光譜使用雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 3 秒。.....	47
圖 4-1 對-硝基苯硫醇 (4-NTP) 在 AgNPs/GO 表面的時間相關性 SERS 光譜。光譜測定範圍分別是(a)1000 到 1700cm ⁻¹ (b)700 到 1050 cm ⁻¹ 。.....	50
圖 4-2 滴塗 (drop-coated) 在 SiO ₂ /Si 基板上的 4-NTP 的拉曼光譜圖。光譜分別測量照光前(紅色線)和照光 5 分鐘(綠色線)。拉曼光譜使用功率 1.5 mW 的 532 nm 雷射，積分時間為 3 秒。.....	51
圖 4-3 滴塗 (drop-coated) 在 GO 表面上的 4-NTP 的拉曼光譜圖。光譜分別測量照光前 (黑色線) 和照光 5 分鐘 (紅色線)。拉曼光譜使用功率 1.5 mW 的 532 nm 雷射，積分時間為 1 秒。.....	52
圖 4-4 官能化 4-NTP 的銀奈米粒子的(a)拉曼光譜和(b) UV/vis 吸收光譜圖。以及官能化 4-NTP 的 AgNPs/GO 的(c)拉曼光譜和(d) UV/vis 吸收光譜圖。.....	53
圖 4-5 官能化 DMAB 的銀奈米粒子的(a)拉曼光譜和(b)UV/vis 吸收光譜圖。拉曼光譜在液相下使用功率 1.5 mW 的 532 nm 雷射，積分時間為 1 秒的條件進行量測。關於官能化 DMAB 的銀奈米粒子，將 1 ml 的銀奈米粒子水溶液和 0.5 ml 的 4-NTP 乙醇溶液 (0.02 M) 相混合後保持 20 分鐘，之後將混合溶液用氙燈照射 5 分鐘，以 15,000 rpm 離心 20 分鐘。收集含有官能化 DMAB 的銀奈米粒子的沉澱固體，然後用乙醇離心清洗去除任何沒有結合的 4-NTP 分子。最後官能化 DMAB 的銀奈米粒子重新分散在水中形成穩定的分散液，將得到的溶液用在拉曼光譜和 UV/vis 吸收光譜實驗。.....	54
圖 4-6 形成 DMAB 的 AgNPs/GO 在 NaBH ₄ 溶液存在下，以 532 nm 雷射照射的	

時間相關性 SERS 光譜圖。光譜量測時使用的雷射功率分別是(a)1 mW 和 (b)1.5 mW。.....	55
圖 4-7 (a)分散在 NaBH ₄ 溶液中的 DMAB 官能化 AgNPs/GO 的 UV/vis 吸收光譜圖。DMAB 官能化 AgNPs/GO 的拉曼光譜分別測量(b)照光 60 秒後，(c) 黑暗中 60 秒後，以及(d)在黑暗中 12 小時。拉曼量測樣品的製備，將 SiO ₂ /Si 基板浸入 UV/vis 吸收光譜實驗的溶液中，將 DMAB 官能化 AgNPs/GO 沉積在基板上。拉曼光譜使用功率為 1.5 mW 的 532 nm 雷射，積分時間為 1 秒的條件進行量測。.....	56
圖 4-8 (a)4-ATP 在 AgNPs/GO 上的時間相關性 SERS 光譜圖。(b)由 4-ATP 轉變成 DMAB 和由 4-NTP 轉變成 DMAB 的 SERS 光譜強度比較圖。.....	57
圖 4-9 (a)不同 SRES 平台偵測 R6G 10 ⁻⁶ M 的 SERS 光譜圖。(b)不同濃度的 R6G 在官能化 DMAB 的 AgNPs/GO 上的 SERS 光譜圖。.....	58
圖 4-10 調查 DMAB 官能化 AgNPs/GO 的 SERS 性能而偵測 10 ⁻⁶ M 的 R6G 乙醇溶液。紅色和黑色的箭頭分別表示 DMAB 和 R6G 的拉曼特徵峰。.....	59
圖 4-11 (a)10 ⁻⁶ M 的 R6G 在 AgNPs/GO 上。(b)10 ⁻⁶ M 和(c)10 ⁻⁷ M 的 R6G 在 4-ATP 官能化 AgNPs/GO 上的 SERS 光譜圖。532 nm 雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 5 秒。.....	60
圖 5-1 分別為 P-ATP 官能化 AgNPs/GO (黑色線) 以及在 3-AP 水溶液下 (紅色線) 所獲得的 SERS 光譜。拉曼光譜使用波長為 532 nm 雷射，雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 1 秒。.....	63
圖 5-2 分別為在 3-AP 存在下經過二聚化反應後的 SERS 偵測基板，經過清洗的 SERS 光譜 (黑色線)，以及在硼氫化鈉存在下的二聚化後 SERS 偵測基板的 SERS 光譜 (紅色線)。拉曼光譜使用波長為 532 nm 雷射，雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 1 秒。.....	64
圖 5-3 比較初始未滴上 3-AP 水溶液的 SERS 基板 (黑色線) 和鍵結 3-AP 後經過硼氫化鈉處理的 SERS 基板 (紅色線) 的拉曼光譜。使用波長為 532 nm	

雷射，雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 1 秒。拉曼光譜經過 Si 訊號歸一化。.....65

圖 5-4 分別為重複試用的 SERS 基板（黑色線）和滴上 ABA 水溶液的 SERS 基板（紅色線）的拉曼光譜。使用波長為 532 nm 雷射，雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 1 秒。.....66

圖 5-5 分別為 SERS 基板用作偵測 3-AP（黑色線）和 NB（紅色線）的 SERS 光譜圖。拉曼光譜使用波長為 532 nm 雷射，雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 1 秒。.....67



表目錄

表 2-1 本研究中所使用藥品列表。.....	26
表 2-2 本研究中所使用的寡核苷酸(Oligonucleotides)序列.....	26



第 1 章 介紹

1-1 前言

生物感測器 (biosensor) 主要是結合具有辨識功能的生物分子元件，經過設計而可以固定在表面的生物分子來當作感應構造的一部分，利用生物分子間的交互作用特性與選擇性，以達到和分析物間產生高特異性與高靈敏度的反應，後端再藉由換能器 (transducer) 將生物分子間快速作用的反應狀態轉換成光訊號或是電訊號，據以進行定性或定量之濃度或成份分析。一個良好的感測器性能，包括檢測極限、檢測範圍、響應時間、干擾物阻隔、多次重覆使用、保存期限等，上述特性都是感測器設計需要考量的重要因素。

目前對於多數的生物感測器設計方向，大多是在固液相介面上，一方面藉由半導體、陶瓷、塑膠基材製作成感測電極並且固定探針生物分子，另一方面則在其上藉由流體將樣本分子輸送至反應位置以進行辨識之交互作用，以多數感測之生物分子皆在數十至數百奈米大小的尺度前提下，如何能在此一固液相介面上進行高靈敏與專一性的偵測，是所有生物感測器技術共同面臨的第一個挑戰。目前在各種可能的檢測技術中，光學檢測技術 (如螢光顯微術、超解析光學顯微術) 配合奈微米結構的近場 (表面漸逝波) 與遠場 (干涉與散射等) 特性，以達到高靈敏度高解析度甚至單分子動態即時檢測技術之發展，不僅在文獻中有快速發展的趨勢，甚至已有產品問世來用於DNA、蛋白質等的研究使用。假使能夠直接觀察到生物分子作用引發的改變，那將會是最直接的偵測方式，而目前認為最可行的方法則是表面電漿共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 或者是表面增強拉曼光譜 (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS)。

1-2 生物感測器 (biosensor)

生物感測器最獨特的地方就是來自生物體的元件與其所具備的高特異性、高靈敏度或高選擇性，與即時輸出 (real-time output) 等特性，而且真實地結合元

件當作感測器或探針構造的一部分，由於生物感測器的特性，因此目前廣泛地應用在醫藥及動物藥品，生物科技，食品與農業，環境監測等領域。生物感測器具備兩個部分，分別是由固定化的生物敏感材料作識別元件(包括酶、抗體、抗原、微生物、細胞、組織、核酸等生物活性物質)，以及適當的換能器(如氧電極、光敏管、場效應電晶體、壓電晶體等等)，將信號經過裝置放大達成偵測目的的一套系統工具¹。

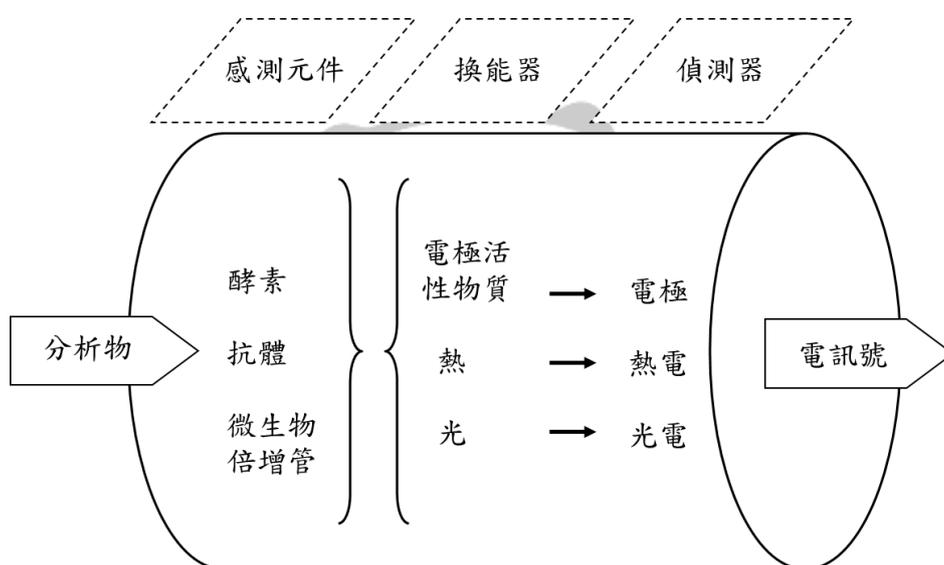


圖 1-1 生物感測器的構造¹。

1-3 拉曼光譜

1-3-1 拉曼光譜的歷史與演進

印度的物理學家拉曼 (C. V. Raman) 在 1928 年的實驗中觀察到拉曼散射 (Raman Scattering) 的現象²。他發現當光射到物體時，入射光受到物體分子散射時，部分的散射光的頻率會與原先的入射光有些許的不同。而散射光頻率的改變與分子的化學結構很大的關聯。如圖 1-2 所示，在光射入物體時的散射現象分為三種：(1) 彈性散射，散射光頻率與入射光 ν_0 相同，又被稱作瑞利散射 (Rayleigh

scattering); (2) 低頻率的非彈性散射，其散射光频率 $\nu_0 - \nu_m$ 低於入射光 ν_0 ，稱為史托克散射 (Stokes Scattering); (3) 高頻率的非彈性散射，其散射光频率 $\nu_0 + \nu_m$ 高於入射光 ν_0 ，稱為反史托克散射 (Anti-Stokes Scattering)。拉曼散射是一種非彈性散射，可以用來研究材料晶格或是分子的震動模式，分析分子結構與官能基或是化學鍵的位置，由於這個發現，拉曼於 1930 年獲得諾貝爾物理學獎。

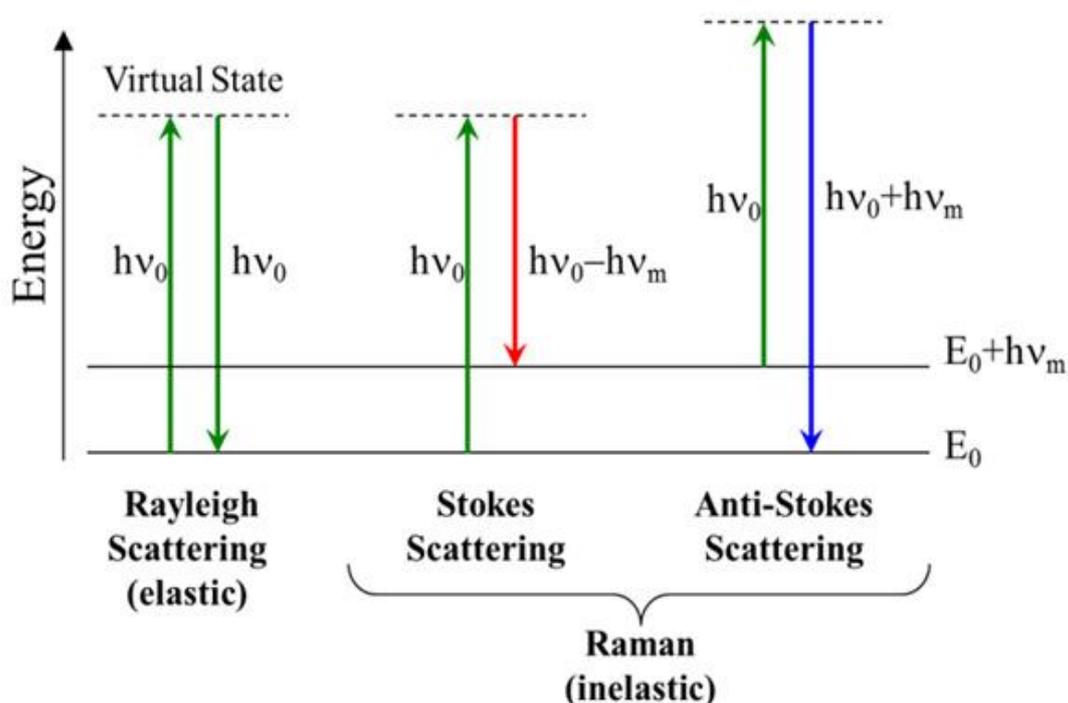


圖 1-2 拉曼散射現象，光射入物體後散射光频率差異的示意圖。

拉曼光譜 (Raman Spectroscopy) 的技術與紅外線吸收光譜 (Infrared Spectroscopy) 相互補，且具有許多優點，例如樣品製備簡單、不需要添加額外的反應試劑、能夠即時監控、沒有限制樣品狀態等，而且拉曼光譜的訊號擁有較狹窄的光譜半高寬，能夠使訊號的辨識度相對提高，並且最重要的是拉曼光譜不會收到水的訊號干擾，能夠作為良好的定性與定量分析技術。最早的拉曼效應系統的開創性理論，在 1930 至 1934 年間，由捷克斯洛伐克的物理學家 George Placzek 所開發，他先使用汞弧光燈做為主要光源，並使用攝影檢測，然後用分

光光度法檢測。然而，拉曼光譜並沒有如預期的廣受使用。受到散射截面積小的影響（公式 1-1），當待測物受到光照後，產生的拉曼散射非常微弱，導致初期的拉曼光譜訊號強度不足，同時常受到待測物本身光致螢光的訊號干擾，使訊號判斷困難。過去，拉曼光譜使用光電倍增管作為偵測器，但是比起商用的 IR 吸收光譜儀來說，偵測所花費的時間要長很多。在缺乏可以偵測微弱訊號的偵測器下，拉曼光譜的使用受到極大的限制。直到 1960 年代，隨著高功率單色雷射的發明，提供拉曼光譜高強度的單頻光源，才使拉曼光譜開始受到重視，成為研究分子結構的重要工具。在 1980 年代之後，帶阻濾波器（notch filter）、傅立葉轉換光譜儀以及電荷耦合元件（Charge-couple Device）開發與電腦運算技術增強，拉曼光譜被廣泛地應用在生物醫療以及化學分析的領域上³。

$$I_R = I_0 \sigma_j D d_z \quad (1-1)$$

I_R 為拉曼強度

I_0 為雷射強度

D 為單位體積的分子的散射光強度

d_z 為雷射通過樣品的距離

σ_j 為散射截面

1-3-2 共振拉曼（Resonance Raman）

共振拉曼（Resonance Raman）光譜是振動拉曼光譜的一種，使用的入射光雷射的頻率接近待測物分子或晶格的電子躍遷。頻率一致（或共振）可以使拉曼光譜訊號顯著地提升，有助於小樣品研究。如果電子激發發生在分子的一部分的局部發色團（chromophore），那振動躍遷增強主要是涉及發色團的原子運動。對於較大的分子，這個選擇性有助於確定所觀察到的振動⁴。

因為不同的化學物種顯示出不同的 $\Delta\nu$ ，所以拉曼光譜可以用於辨識化學化合物。這是因為振動躍遷與原子量和鍵結強度有關（較重的原子對應較低的振動頻率，而越強的鍵結對應於越高的振動頻率）。因此，從已知的拉曼光譜數據庫，可以清楚地辨識許多已知的化合物。振動模式的數目與分子中的原子數目成比例，這代表大分子的拉曼光譜會非常複雜。例如，蛋白質通常含有成千上萬個原子，因此將有數千種的振動模式。如果這些振動模式具有相似的能量 ($\Delta\nu$)，則光譜將會是難以置信的混亂和複雜。

不是所有的振動躍遷都具有拉曼活性，有一些振動模式不會出現在拉曼光譜中。這是因為拉曼光譜具有光譜選擇規則。不同於紅外線吸收光譜是觀察具有偶極矩變化的振動模式，拉曼光譜是觀察極化率 (Polarizability) 變化的振動模式。這是 IR 和拉曼光譜辨識振動模式上的區別。在拉曼光譜中，入射光子導致分子中鍵周圍的電子分佈瞬時變形，隨後經由輻射放射使鍵返回到正常狀態。這導致鍵瞬時極化，並誘導偶極消失。在具有對稱中心的分子中，偶極的變化是由於對稱中心喪失，而極化變化必須保持對稱中心存在。因此，在中心對稱分子，非對稱伸縮和彎曲將 IR 活性而拉曼不活性，而對稱伸縮和彎曲將拉曼活性而 IR 不活性。所以在中心對稱分子中，IR 和拉曼光譜是互補的。對於沒有對稱中心的分子，每個振動模式可以是 IR 活性，拉曼活性，兩者都是或兩者都不是。只是對稱伸展和彎曲通常是拉曼活性。

在共振拉曼光譜中，調整入射雷射的能量，使它和分子或晶體的電子躍遷相一致。當雷射的頻率被調整接近電子躍遷（共振），其振動模式特定電子躍遷會表現出顯著提高拉曼散射光的強度。這通常是遠超過所有其他躍遷的拉曼訊號。例如，與 $\pi-\pi^*$ 躍遷共振將會增強 π 鍵的伸縮模式，而其它模式則不受到影響。拉曼光譜的這方面，對於內嵌發色團的大生物分子特別有用。在發色團中，金屬錯合物的電荷轉移 (charge-transfer) 躍遷通常提高金屬 - 配位體的伸縮模式，以及一些與單獨的配位體有關聯的模式。因此，例如血紅蛋白的生物分子，調整雷射靠近鐵中心的電荷轉移電子躍遷，使拉曼光譜僅僅顯示出與四吡咯 - 鐵基團

(tetrapyrrole-iron group) 有關的拉伸和彎曲模式。由此，在具有成千上萬振動模式的分子，共振拉曼光譜可以使我們僅觀察相對較少的振動模式。這降低了光譜的複雜性，可以更輕鬆地辨識一個未知的蛋白質。除此之外，如果蛋白質具有一個以上的發色團，如果它們電荷轉移的能量不同，不同的發色團則可以單獨研究。除了確定化合物，共振拉曼光譜在某些情況下還可以提供發色團的結構鑑定。

共振拉曼光譜比傳統的拉曼光譜最主要優點是能夠顯著增加訊號的強度(增強因子為 10^6)。這使得在共振拉曼光譜中樣品的濃度可以低至 10^{-8} M。此外，如前述提到的，共振拉曼光譜通常只顯示出很少的訊號峰，通過選定特定的電子躍遷。共振拉曼光譜主要缺點是增加了螢光產生的風險和由於增加入射雷射能量使樣品產生光降解。這兩個因素雖然可以通過使用紅外線雷射而不是可見光雷射來避免，但就無法調整至特定的振動頻率進行共振拉曼光譜，除非研究目標的電子躍遷能量較低。

1-4 表面電漿共振 (Surface Plasmon Resonance)

當電磁波通過金屬奈米粒子時，奈米粒子上的電子會受交流電場的驅動而產生振盪，並在奈米粒子表面產生表面電漿 (Surface Plasmon)⁵。當此電磁波波長接近此金屬奈米粒子的表面電漿共振波長 λ_{SP} 時，會因局部表面電漿共振現象而有相當大的光吸收。由於粒徑小於 20 nm 的金奈米粒子的表面電漿共振吸收約波長 520 nm 左右，因此其膠體溶液因吸收綠光而呈現鮮紅色。此一現象在 1857 年被 Faraday 解釋⁶，並在 1908 年由 Mie 利用馬克士威方程式 (Maxwell's equation) 獲得其理論計算的結果⁷。圖 1-3 顯示不同直徑的金奈米粒子的紫外線-可見光 (UV-vis) 吸收光譜，顯示其光學特性亦與粒子的大小有關。

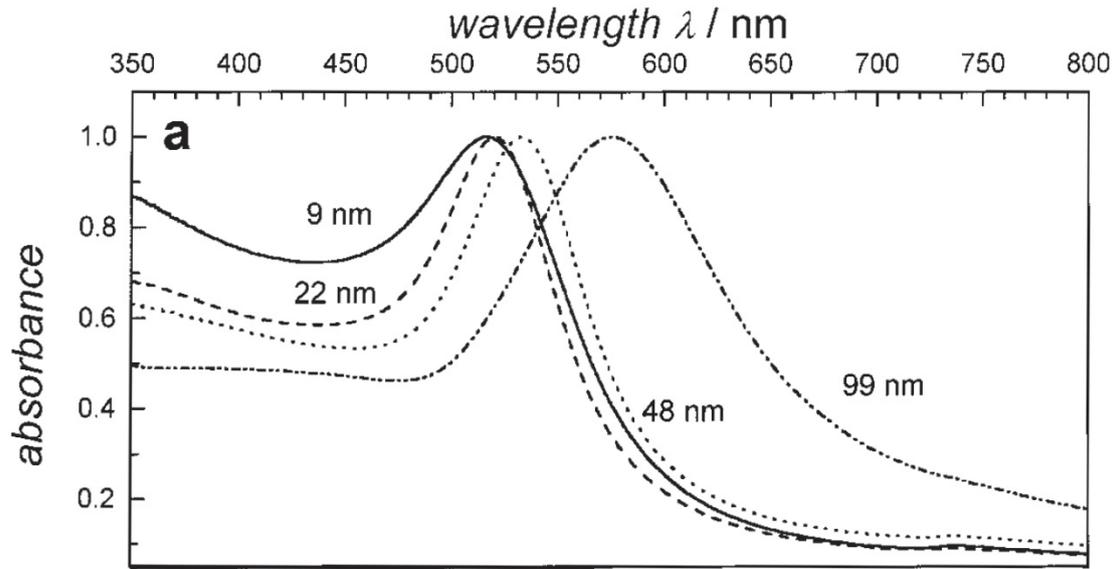


圖 1-3 不同尺寸 (9 ~ 99 nm) 的金奈米粒子的 UV-vis 吸收光譜。

對單一球形金屬奈米粒子而言，其電偶極矩 μ 與外加電場 E 的關係可寫成

$$\mu = \alpha \epsilon_m E \quad (1-2)$$

其中， $\alpha = \epsilon_0 V (1 + \kappa) \left(\frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + \kappa \epsilon_m} \right)$ 為 Clausius-Mossotti 耦極極化率， ϵ_0 為真空介電常數， V 為奈米粒子的體積， $\epsilon = \epsilon_r + i\epsilon_i$ 為金屬塊材與光頻率相關的介電常數， ϵ_m 為粒子周圍物質的介電常數， κ 為與粒子形狀有關的幾何因子⁸。對於球形奈米粒子而言 $\kappa = 2$ ，由公式 1-2 可知，當 $\epsilon + \kappa \epsilon_m = 0$ 的條件下外加電場造成的耦極極化率最大。假設介電函數 ϵ 的虛數部分極小或可忽略，則表面電漿共振產生發生

於 $\epsilon_r|_{SP\ max} = -\kappa \epsilon_m$ 時。由 Drude 自由電子模型，可得金屬介電函數 $\epsilon_r = \epsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2}$ 。

其中 $\omega_p = \sqrt{\frac{Ne^2}{\epsilon_0 m_e}}$ 為金屬塊材的電漿頻率， N 為金屬中的電子密度， m_e 為電子質量。

由此，可推得單一金屬奈米粒子的表面電漿共振條件為

$$\epsilon_r|_{SP\ max} = \epsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} = -\kappa \epsilon_m \quad (1-3)$$

亦即

$$\omega_{SP} = \frac{\omega_P}{\sqrt{\varepsilon_\infty + \kappa\varepsilon_m}} = \sqrt{\frac{Ne^2}{\varepsilon_0 m_e (\varepsilon_\infty + \kappa\varepsilon_m)}} \quad (1-4)$$

或

$$\lambda_{SP} = 2\pi c \sqrt{\frac{\varepsilon_0 m_e (\varepsilon_\infty + \kappa\varepsilon_m)}{Ne^2}} \quad (1-5)$$

由公式 1-5 可知，金屬奈米粒子的表面電漿共振波長 λ_{SP} 除了與粒子的幾何因子 κ 有關之外，亦與其周圍物質的介電常數 ε_m 有關。此一特性目前廣泛被用於生化感測的應用研究上。常用的方式為在金奈米顆粒表面修飾上特定的感測分子，當待測分子遇到感測分子時，便附著於感測分子上，並造成金奈米粒子周圍的有效介電常數 ε_m 改變。除了使 λ_{SP} 產生一些偏移之外，亦使粒子的光吸收率增加。因此，可由其吸收光譜的變化檢測生化分子。

Ashutosh Chilkoti⁹ 等人利用生物素-鏈霉抗生物素蛋白 (Biotin-Streptavidin) 親合系統為例，設計鏈霉抗生物素蛋白偵測方法。如圖 1-4 所示，他們將金奈米粒子吸附在具有修飾 APTMS 分子的玻璃基板上，再將金奈米粒子表面修飾 MPS 分子，使生物素分子能夠透過 -COOH 和 -NH₂ 官能基的連結而修飾在金奈米粒子表面。由於鏈霉抗生物素蛋白與生物素具有極高的親和力，當鏈霉抗生物素蛋白靠近金奈米粒子就會被固定在其表面上，同時使金奈米粒子的介電常數和光吸收度改變，再經由吸收光譜與分光光度計來偵測鏈霉抗生物素蛋白。其結果顯示此一方法可偵測出濃度為 1 $\mu\text{g/ml}$ 的鏈霉抗生物素蛋白分子。

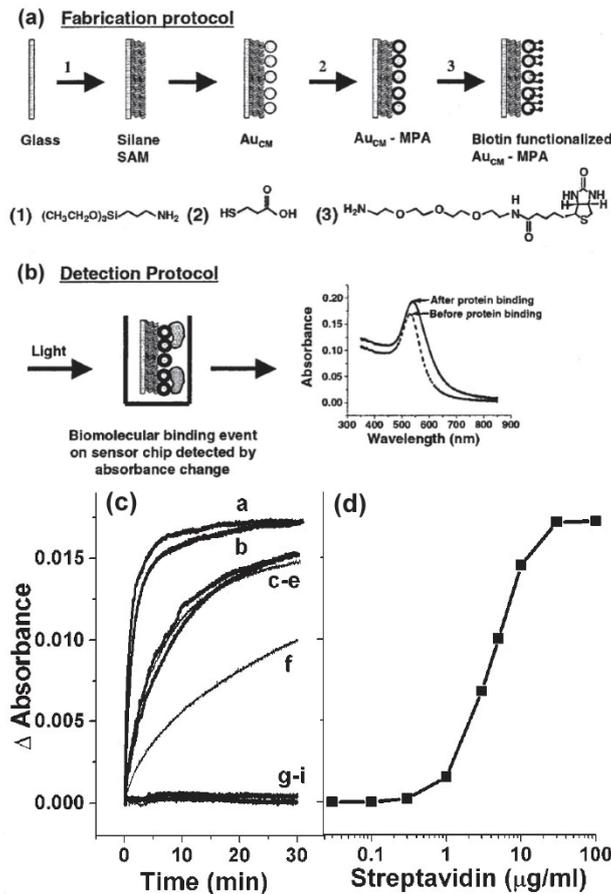


圖 1-4 (a)鏈霉抗生物素蛋白感測器製備的示意圖。(b)利用吸收光譜的變化感測蛋白質分子。(c)不同濃度下的鏈霉抗生物素蛋白分子，修飾生物素分子的金奈米粒子基板在 550 nm 波長處的光吸收度隨時間的變化。(d)不同濃度下的鏈霉抗生物素蛋白分子，偵測 30 分鐘後的光吸收量變化。

除此之外，金屬奈米粒子的表面電漿共振產生的電磁場放大也可以用來增強其表面附近的分子或量子點的螢光（Photoluminescence, PL）。Yeechi Chen¹⁰ 等人將 CdSe 量子點靠近一表面電漿共振最大吸收為 550 nm 的銀奈米粒子，並照射不同波長的激發光觀察 CdSe 量子點的螢光強度變化。發現 CdSe 量子點在受到波長約為 550 nm 的激發光照射下，其螢光有最大幅度的增強，結果如圖 1-5 所示。這是由於在表面電漿共振下，金屬奈米粒子表面的放大電場會使附近的分子或是量子點產生更多的電子電洞對，而在複合後產生更多的螢光。

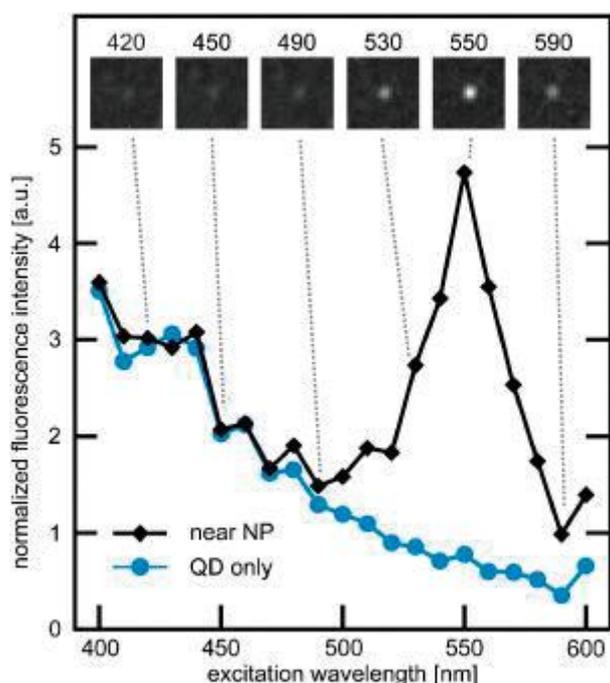


圖 1-5 位在一表面電漿共振最大吸收為 550 nm 的銀奈米粒子的 CdSe 量子點，其在不同波長激發光源下的螢光強度變化(黑色)，與單獨量子點比較圖(藍色)。插圖為對應波長激發光下的螢光影像。

1-5 表面增強拉曼散射 (Surface Enhanced Raman Scattering)

在 1973 年，英國南安普敦大學 Fleischmann¹¹ 等人在經過粗糙化的銀電極表面吸附吡啶 (pyridine)，觀察到吡啶的拉曼訊號出現很強的增強現象。自此開啟了表面增強拉曼散射 (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS) 的研究歷程。1977 年，兩個團隊分別注意到，散射物質的濃度並無法用來解釋所觀察到的拉曼訊號增強現象，他們嘗試用理論解釋 SERS 現象。Jeanmaire 和 Van Duyne¹² 在研究中發現等量的帶測物在粗糙化的銀電極表面上的訊號會比一般在溶液中訊號增強約 $10^5 \sim 10^6$ 倍，他們以電磁效應 (electromagnetic effect) 機制來說明這個現象。Albrecht 和 Creighton¹³ 提出一種電荷轉移 (charge-transfer) 效應，說明拉曼訊號增強的原因是來自於待測物本身與貴金屬奈米結構表面作用而導致散射

效率增加。橡樹嶺國家實驗室的 Rufus Ritchie 更預測表面電漿子 (surface plasmon) 的存在。

表面增強拉曼散射確切的作用機制仍然是個爭論的問題，目前有兩種主要的理論，彼此的機制有很大的不同。電磁理論假設訊號的增顯是由於表面電漿子 (surface plasmon) 所誘導；而化學理論則提出電荷轉移錯合物的形成所導致。化學理論僅適用於物質在表面形成化學鍵的情況，所以它不能解釋所有的情況下所觀察到的訊號增強，而電磁理論仍適用樣品是物理吸附在表面的情況。

1-5-1 電磁效應 (electromagnetic effect)

在前述提到，當一電磁波照射在尺寸小於其波長的金屬奈米粒子時，會使奈米粒子的表面電漿子產生一個同調性的振動，即為表面電漿共振 (surface Plasmon resonance, SPR)，而此效應會使表面電子產生一個短暫極化的現象，而在金屬奈米粒子表面形成一個強大的局部電場 (local field)，如圖 1-6。

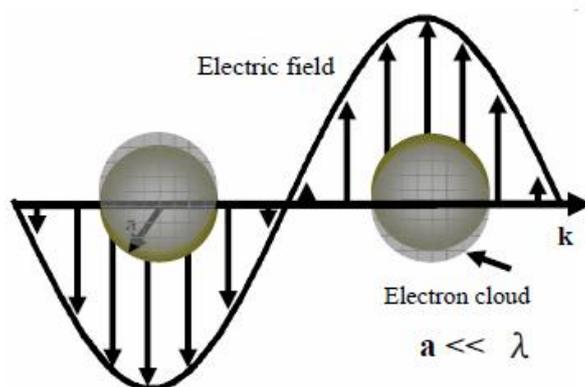


圖 1-6 金屬奈米球受到外加電磁場作用下激發電漿子振盪產生局部電場放大作用示意圖¹⁴。

受到此局部電場影響，吸附在金屬奈米粒子表面上的樣品分子會產生誘導偶極，使拉曼訊號增強。而與化學效應相比，電磁效應是屬於長範圍影響，分子和

金屬奈米粒子不需要直接的接觸就會產生增強效果。

假設有一金屬奈米球的直徑 $2r$ 遠小於入射光的波長 λ (Rayleigh limit)，其介電常數 $\epsilon = \epsilon_r + i\epsilon_i$ ，周圍介質的介電常數為 ϵ_m ，而距離球體 d 的分子感受到的電場為強度為 $E_M = E_0 + E_{sp}$ ， E_0 為入射光電場 (laser field)， E_{sp} 為金屬誘導偶極電場，形成的電場強度與距離的三次方成反比 (圖 1-7)。

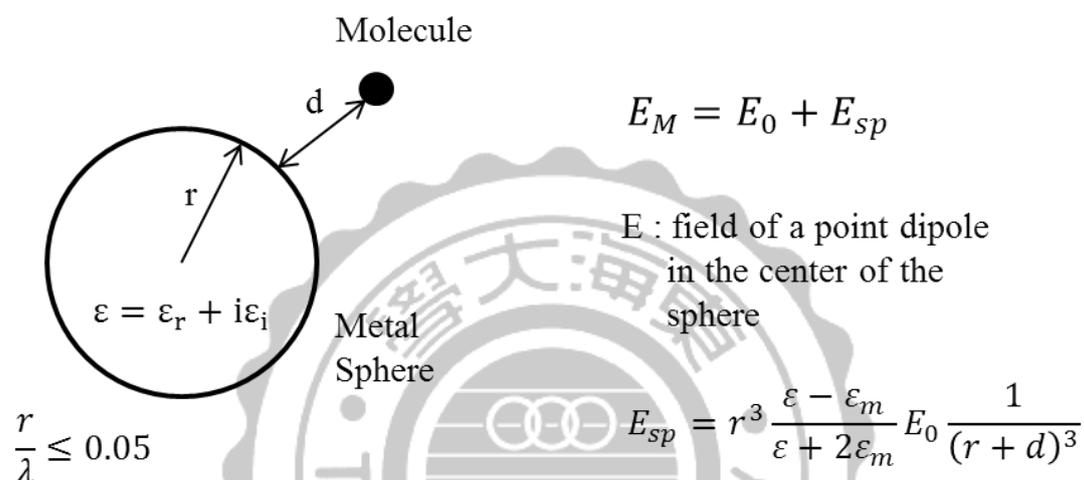


圖 1-7 為 SERS 電磁場增強機制的簡易示意圖¹⁵。

而電場的增強因子 $A(\nu)$ 則是 E_M 和 E_0 的比值，表示為

$$A(\nu) = \frac{E_M(\nu)}{E_0(\nu)} \approx \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \left(\frac{r}{r+d} \right)^3 \quad (1-6)$$

假設介電函數 ϵ 的虛數部分極小或可忽略，當 $\epsilon = -2\epsilon_m$ ($\epsilon + \kappa\epsilon_m = 0$) 的條件下會有最大的增強因子 $A(\nu)$ ，以此表示雷射場 (laser field) 與表面電漿 (surface plasmon) 的共振。

在之前提到，拉曼散射光強度和激發光強度、分子數目、分子的拉曼散射截面有關，當受到電磁增強時，可將公式 1-1 改寫成

$$I^{\text{SERS}} = N' \sigma_{\text{ads}}^{\text{R}} |A(\nu_{\text{L}})|^2 |A(\nu_{\text{S}})|^2 I(\nu_{\text{L}}) \quad (1-7)$$

其中 I^{SERS} 為 SERS 訊號強度， N' 為分子數目， $\sigma_{\text{ads}}^{\text{R}}$ 為 SERS 截面， $A(\nu_{\text{L}})$ 為激發光電場增強因子， $A(\nu_{\text{S}})$ 為散射光電場增強因子， $I(\nu_{\text{L}})$ 為激發光強度。

將公式 1-6 與公式 1-7 整理，SERS 訊號強度可改寫為

$$I^{\text{SERS}} \propto |A(\nu_{\text{L}})|^2 |A(\nu_{\text{S}})|^2 \approx \left| \frac{\varepsilon(\nu_{\text{L}}) - \varepsilon_{\text{m}}}{\varepsilon(\nu_{\text{L}}) + 2\varepsilon_{\text{m}}} \right|^2 \left| \frac{\varepsilon(\nu_{\text{S}}) - \varepsilon_{\text{m}}}{\varepsilon(\nu_{\text{S}}) + 2\varepsilon_{\text{m}}} \right|^2 \left(\frac{r}{r+d} \right)^{12} \quad (1-8)$$

則綜合上述，當分子與金屬奈米粒子表面產生物理吸附，而激發光電場與金屬奈米粒子產生表面電漿共振，造成激發場增強，同時產生強大的局部電場，受到這個效應影響，分子的拉曼散射光也會和金屬表面電漿共振，使得散射光電場增強，產生拉曼訊號增強效果。電磁效應中，分子雖然無須與奈米粒子接觸，但是由公式可發現，SERS 訊號強度會隨著距離的增強而大幅減少，拉曼訊號強度與距離的十二次方成反比。

1-5-2 化學效應 (chemical effect)

由於電磁效應為物理吸附產生，一般來說並不會選擇性增強分子的拉曼訊號，但是實驗發現，在相同的量測環境下，有些分子會出現不同的拉曼增顯效果，電磁效應並無法對這種增強幅度作出解釋，表示說表面增強拉曼散射存在別種機制，即為化學效應。

化學效應是由吸附的樣品分子與金屬奈米粒子之間的化學作用產生，大致分為兩種，一種是分子與金屬奈米粒子之間產生化學吸附時候，會產生分子軌域的耦合現象而形成分子與金屬的錯合物，導致拉曼散射截面增加，使拉曼訊號增強。另外一種是電荷轉移 (charge-transfer) 效應，如圖 1-8 所示，當光激發分子上的電子時，會形成電子電洞對，而電子會轉移到吸附分子上的高能階軌域 (LUMO)

中，但是當存在分子-金屬系統時，部分電子會先轉移至金屬的費米能階，再移動至分子的 LUMO。由於增加的電子躍遷路徑，當激發態電子回至基態後，便提供額外的散射光，使拉曼訊號增強。化學效應需要分子與金屬直接接觸，不管是由化學吸附鍵結還是電荷轉移效應，化學效應對於拉曼訊號增顯約為 100 至 1000 倍。

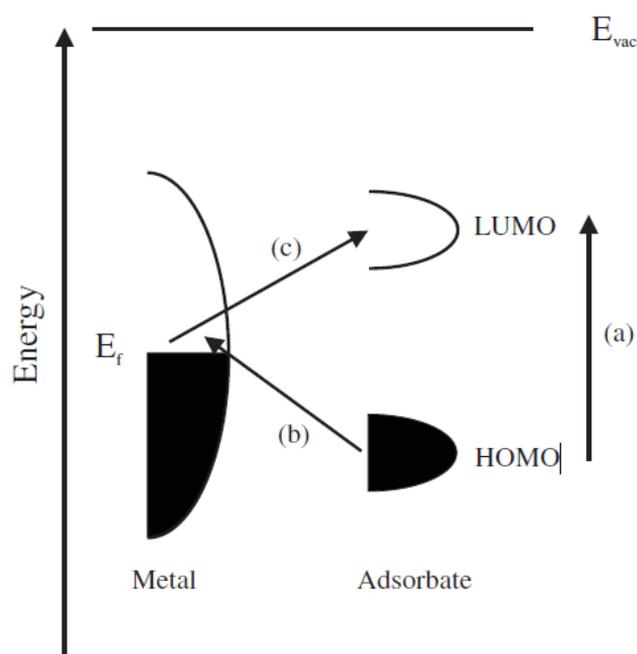


圖 1-8 分子-金屬系統能階圖，顯示拉曼過程涉及(a)分子路徑和(b)、(c)分子-金屬路徑¹⁵。

絕大多數的 SERS 系統中，電磁效應和化學效應是共存的，只是它們對增強的貢獻程度會隨系統不同而占有不同的比例，具體的情況相當複雜，由於金屬表面特性，分子種類，分子結構，分子與金屬之間的結合狀況等等都會影響拉曼的增強效應。

1-5-3 熱點 (hot spot)

前面提到金屬奈米粒子由於與入射光產生的表面電漿共振會使表面的局部電場出現明顯放大現象。此外，當發生表面電漿共振的金屬奈米粒子彼此距離緊密時，會在粒子間隙之中產生額外的耦合振盪模式，這種耦合的電漿共振的振盪模式，就是所謂的熱點 (hot spot)。在熱點中，會產生不同以往極大的電場增強效果。

電場增強的效果與電磁波電場方向有關，當電場方向正交於粒子對軸向，其增強效果較弱，若是電場方向平行於粒子對軸向，則會產生極大的增強效果。如圖 1-9 所示為金奈米粒子電場耦合作用示意圖，耦合電場的強度隨距離縮短而增加。另外，當粒子對間距超過 75 nm，電場增強的耦合作用幾乎不存在，因為當距離夠遠，粒子對系統可視為兩個單粒子系統。此電場增強效應可產生更好的拉曼增顯，應用在表面增強拉曼散射中可以得到更高的增強因子，圖 1-10 為 SERS 的增強因子與熱點的位置關係圖，如何增加 SERS 基板表面的熱點數目，也是現在 SERS 研究的重要課題。

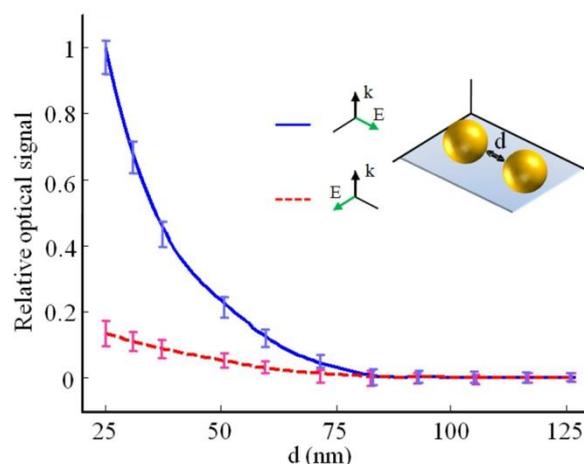


圖 1-9 平行極化 (藍色) 與正交偏振 (紅色) 的金奈米粒子間距對光場強度關係圖¹⁶。

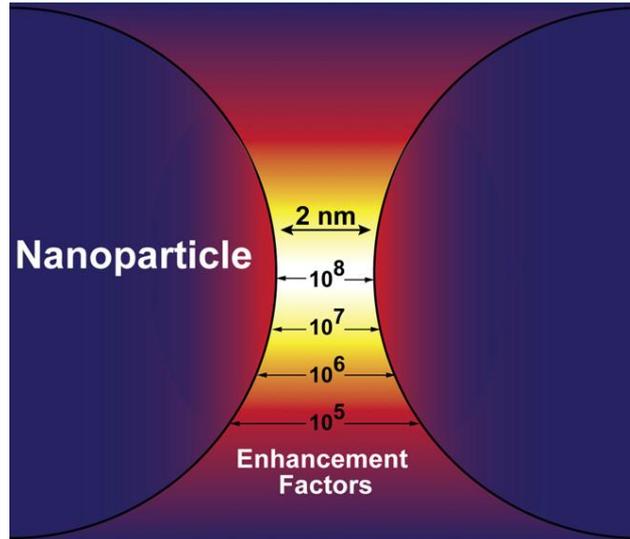


圖 1-10 金屬奈米粒子間的熱點之相對位置與 SERS 增強因子增加相關性的示意圖¹⁷。

1-6 表面增強拉曼散射活性基板

表面電漿共振很大程度上取決於金屬的組成、尺寸、幾何形狀、介電環境和奈米粒子顆粒與顆粒之間的距離。而表面增強拉曼散射會受到吸附分子在基材表面的吸附行為，基材的奈米結構，表面特性所影響。根據上述機制，分子的振動模式增強與 SERS 基材有關，同一種分子在不同的 SERS 活性基板上可能獲得不同的拉曼光譜圖。所以如何針對不同偵測物設計適用的 SERS 活性基板是非常重要的。

在過去三十年來，常用於 SERS 研究的金屬例如金、銀、銅等，尤其是金和銀，這是由於其 d-d 軌域電子轉換的能階產生的 LSPR 顯示在可見光範圍內¹⁸。同時由於金具有惰性、生物相容性、以及固定在生物分子的硫金鍵結等特性，常用於生物分析應用¹⁹。除此之外，SERS 中散射發生的條件是電漿共振必須垂直於該表面；若是平行於表面上則不會發生散射。為了滿足這一條件，在表面增強拉曼散射實驗通常使用粗糙金屬表面或是金屬奈米粒子，因為這些表面能提供局部電漿共振的區域。這代表 SERS 研究不只是奈米科學，同時還包括了表面化學

等研究。

如何製備良好的 SERS 活性基板是近年來科學家研究的重點，其必須具備容易製備、方便使用、高度增強、以及良好再現性。SERS 活性基板從最早的金屬膠體如膠體金、膠體銀；以及目前廣泛使用的二維平面 SERS 基板，如金屬島膜（metallic island thin film）、金屬奈米粒子石墨烯複合材（metallic nanoparticle/graphene）。

1-6-1 金屬膠體（Metallic colloid）

金屬膠體（Metallic colloid）是最早開始作為 SERS 活性基板使用的材料，其製備方式有許多，例如化學還原法、光誘導法、電解法等。金屬膠體具有製備容易，價格低廉等優點，但是其缺點為奈米粒子之間容易產生聚集團簇，粒徑大小以及分散度難以控制，使得製備的基板再現性較差。目前最常使用的方式為化學還原法，主要是利用硼氫化鈉^{20,21}或是檸檬酸鈉^{22,23,24}等還原劑，將金離子或銀離子還原製備成奈米粒子、奈米棒²⁵、奈米星²⁶。

Seongmin Hong²⁷ 等人使用檸檬酸鈉和羥胺還原不同尺寸的金奈米粒子（圖 1-11），用以偵測 4-硝基苯硫酚（4-NTP）和 4-氨基苯硫酚（4-ATP）分子。結果如圖 1-12 所示，由於越大的金奈米粒子擁有越強的 SPR，產生的 SERS 增顯越大，所獲得的 SERS 訊號越強。在固定金奈米粒子數量下，粒徑平均為 80 nm 有最大增強因子，對 4-ATP 增強因子為 9×10^5 ，對 4-NTP 增強因子為 4.5×10^5 ，顯示出良好的拉曼活性。

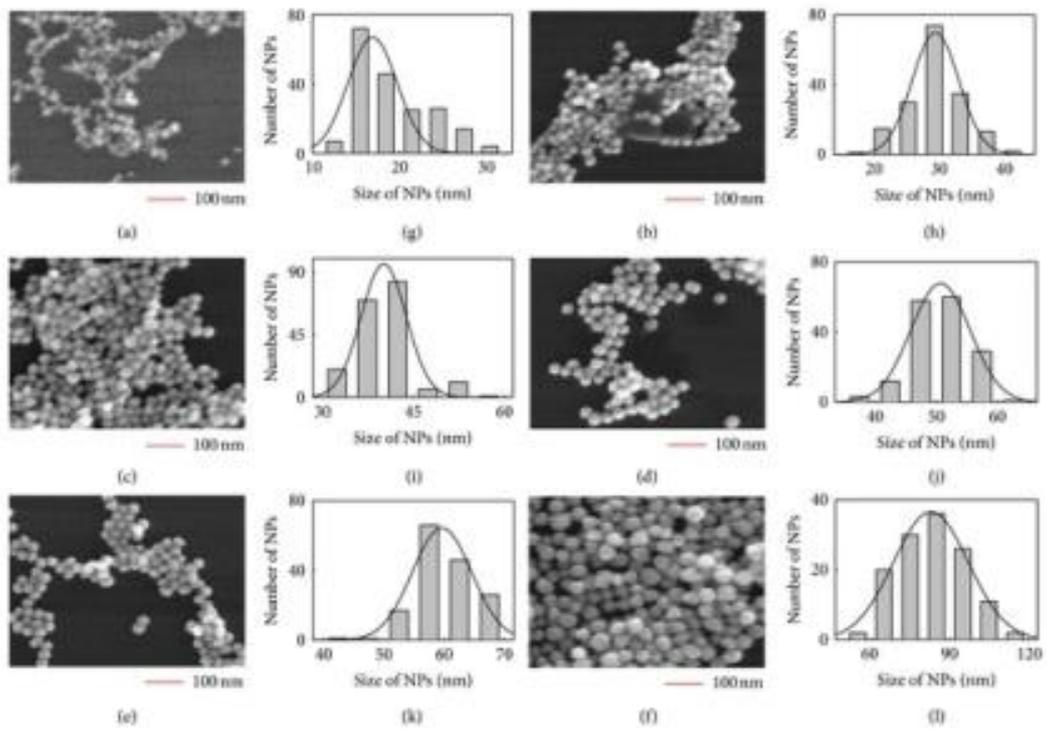


圖 1-11 平均粒徑為(a)17 nm、(b)30 nm、(c)40 nm、(d)50 nm、(e)60 nm 和(f)80 nm 的金奈米粒子的 SEM 影像。平均粒徑為(g)17 nm、(h)30 nm、(i)40 nm、(j)50 nm、(k)60 nm 和(l)80 nm 的金奈米粒子的尺寸分布直方圖。圖中實線是高斯分布擬似曲線。

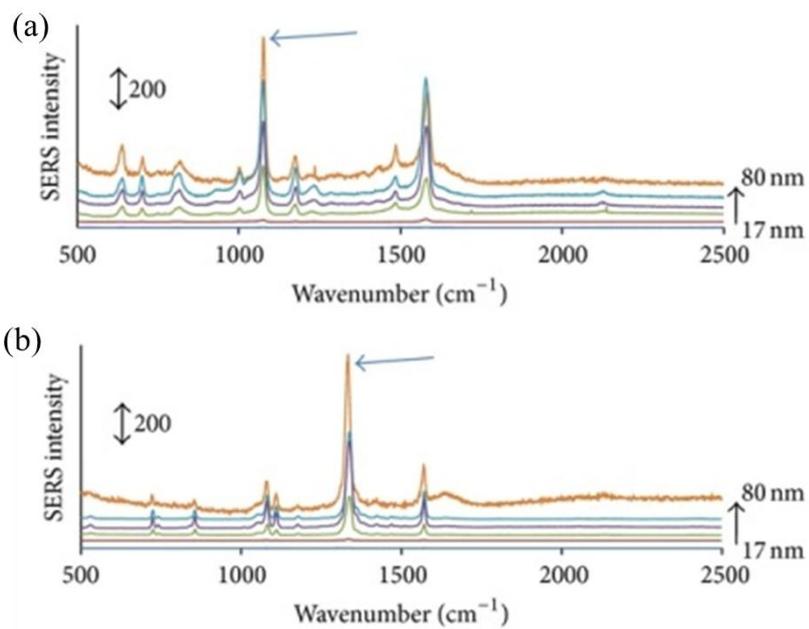


圖 1-12 (a)0.25 μM 的 4-ATP 和(b)0.044 μM 的 4-NTP 水溶液在 17~80 nm 的金奈米粒子的 SERS 光譜。

Wei Ma²⁶ 等人利用胸腺嘧啶-汞-胸腺嘧啶系統 (thymine-Hg-thymine) 設計偵測偵汞離子的雙金奈米星方法(圖 1-13)。由於胸腺嘧啶和汞具有高度親合力，當汞離子靠近修飾具有胸腺嘧啶鹼基的 DNA 的金奈米星時，會形成胸腺嘧啶-汞-胸腺嘧啶將兩顆奈米星拉在一起，同時根據觀察 4-氨基苯硫酚 (4-ATP) 標定分子的拉曼訊號來偵測汞離子。如圖 1-14 所示，由於不同尺寸的奈米星產生 SPR 強度不同，越大的奈米星獲得的拉曼訊號越強。當汞離子存在時，修飾具有胸腺嘧啶鹼基的 DNA 的金奈米星會自組裝形成二聚體，由於形成二聚體會產生顯著地 SERS 贈顯，觀察到的拉曼訊號比單顆奈米星要來得強，則能夠確實偵測汞離子。此研究中，60 nm 的二聚體系統對汞離子的偵測極限可達到 0.8 nM (圖 1-15)。

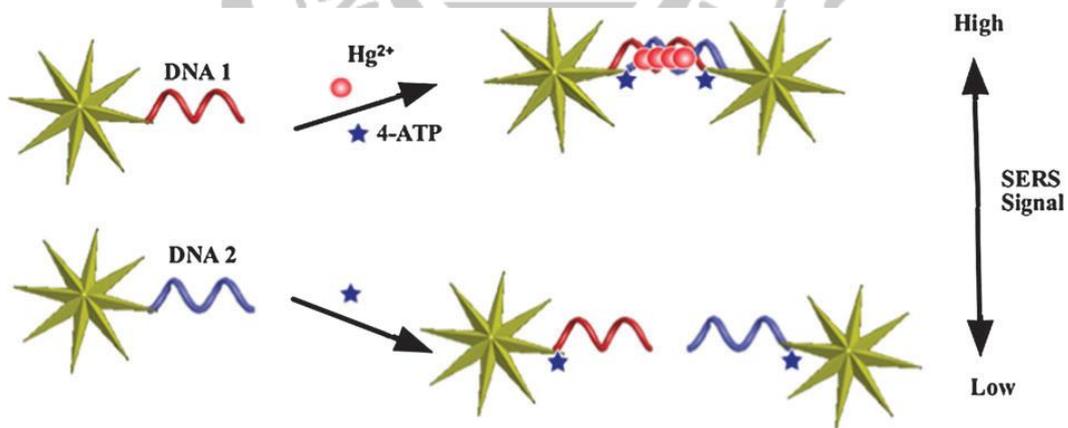


圖 1-13 自組裝金奈米星二聚體偵測汞離子示意圖。

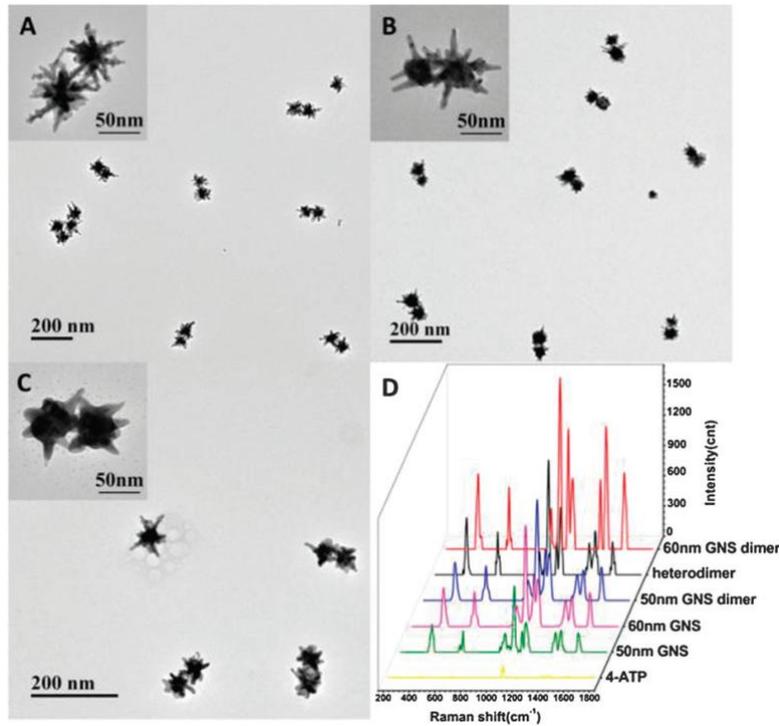


圖 1-14 不同的金奈米星二聚體的 TEM 影像，分別為(A)60 nm 的二聚體、(B)異二聚體 (heterodimer，不同尺寸的奈米星組裝的二聚體) 和(C)50 nm 的二聚體。(D)不同二聚體系統獲得的 4-ATP 的 SERS 光譜圖。

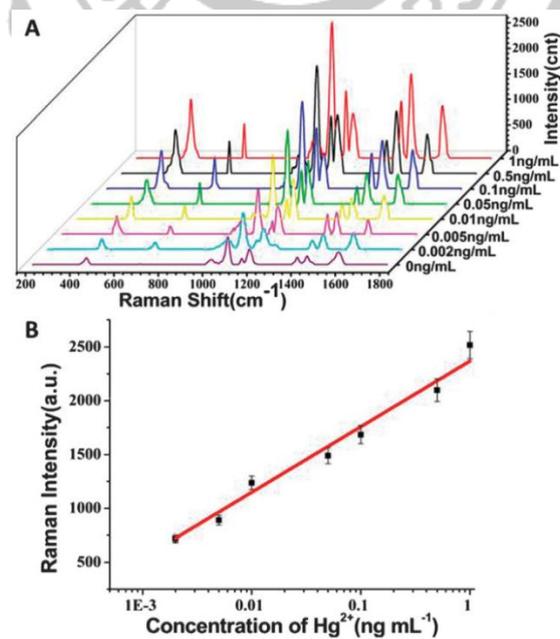


圖 1-15 (A)不同濃度的汞離子所獲得的 SERS 光譜圖。(B)以 4-ATP 特徵峰 (1083 cm^{-1}) 對汞離子濃度的標準曲線。

1-6-2 二維平面 SERS 活性基材

金屬島膜 (metallic island thin film) 也是廣為應用在 SERS 的活性基材。其製備方式有蒸鍍法²⁸、電沉積法²⁹ 和外擴散離子交換法³⁰ 等,但是相對金屬膠體,這種基板製備成本較為昂貴,同時製作方法也較為繁瑣。金屬膜做為 SERS 基板具有製備再現性佳的優點,同時對於待測物也有良好的增顯效果。

1-7 金屬奈米粒子/石墨烯複合材 (Metallic Nanoparticles/Graphenen Nanocomposites)

石墨烯的結構概念很早就被建立,其被認為是石墨的單體,石墨是碳的同素異構物之一,單層的石墨是碳原子以 sp^2 混成模式相互鍵結,形成蜂窩狀六角結構 (圖 1-16),向二維方向延伸,而層與層之間再以凡德瓦力方式堆疊,其堆疊是以 ABAB 方式層與層錯開,形成三維的石墨塊材 (圖 1-17)。石墨由於柔軟和光滑性質,普遍用於書寫工具或是添加在潤滑劑。

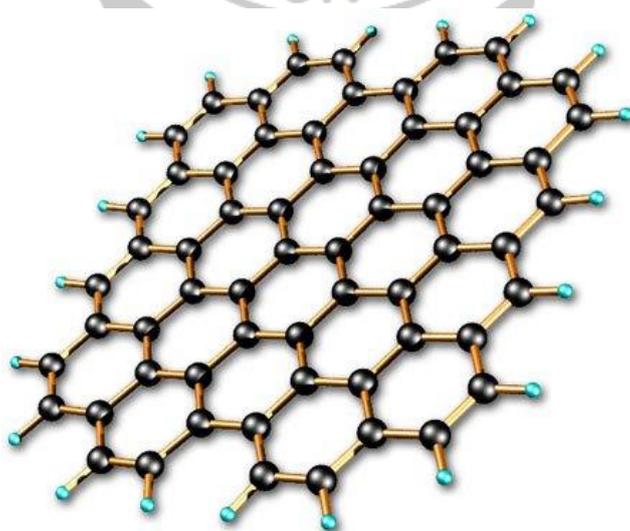


圖 1-16 石墨烯的六角蜂窩狀結構。

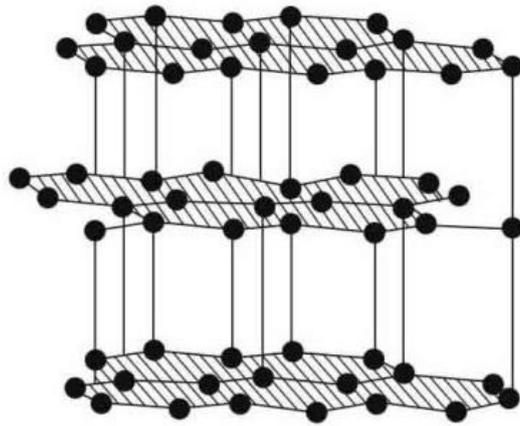


圖 1-17 石墨結構。

長久以來，科學家們好奇石墨其單體是否能夠單獨存在，得到其厚度只有一個原子厚的石墨片。然而以熱力學的觀點來看，這只是無稽之談，在非絕對零度時，由於單原子層的二維結構，受到原子之間上下的熱擾動影響，會使得原子之間重新鍵結形成更加穩定的三維結構。在經過多次實驗，發現薄膜的厚度低於數十個原子層時，薄膜將會變得不穩定，這使得單原子層結構不穩定的論點更加穩固，則二維原子層平面被視為是三維結構的一部份，並無法單獨存在。石墨烯則是被用來描述一些由碳原子層組成的物質，例如巴克球或是碳奈米管被認為是石墨烯捲曲所構成的。

但是在 2004 年，英國曼徹斯特大學的 Geim 和 Novoselov 打破的了這個過去的思考侷限。兩人利用相當簡單的方式成功獲得單原子層厚的石墨烯³¹。他們利用膠帶反覆黏貼石墨塊材，石墨塊材經過不斷重複的黏貼過程會逐漸變薄，最後即可得到單原子層厚的石墨烯，這種方式稱作機械剝離法（mechanical exfoliation）。將石墨烯轉移至具有氧化矽層的矽基板上，石墨烯表面反射光與穿透石墨烯在矽基板表面反射光會產生干涉現象，經過光學顯微鏡觀察，能夠簡單分辨石墨烯的層數。

石墨烯因為它本身獨特的電子、光學、熱學和機械性質以及在奈米電子學、

光子學和奈米機械系統領域的潛在應用而引起了廣泛的注意。同時石墨烯能夠有效地提高吸附的有機分子的拉曼訊號，使它能作為一種表面增強拉曼散射 (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS) 基板³²。這是由於石墨烯與吸附分子之間的電荷轉移導致拉曼訊號增強。石墨烯已經被證實能夠吸附或是複合各種有機分子。其能夠吸附並集中目標分子的能力，對於表面增強拉曼散射偵測是相當有用的特性，能藉由石墨烯與目標分子的相互作用調控表面增強拉曼散射增強的幅度。在這種情況下，會被石墨烯吸附的分子會集中在石墨烯基板表面，經過檢測過程得到表面增強拉曼光譜。石墨烯的碳原子經由 sp^2 混成相互連接成網狀結構，使石墨烯可以經由 π - π 堆積與芳香族的分子相互作用^{33,34}。此外，氧化石墨烯表面的含氧官能基團能夠與某些特定的原子和分子物種相互作用³⁵。石墨烯與特定分子相互作用的能力，促使石墨烯複合材料能夠針對特定的分子物種設計離子偵測³⁶、電子轉移³⁷ 或是針對分子濃度的光催化降解平台³⁸。

可是，石墨烯本身具有幾個缺點不利於作為高效的 SERS 基板用於生物分子的偵測。首先，一般化學合成的氧化石墨烯 (Graphene Oxide) 奈米薄片通常只具有小尺寸，同時表面有許多的結構缺陷³⁹。其次，石墨烯本身對於 SERS 增強效果有限，並不適合作為高靈敏度的 SERS 基板。再者，生物分子很難直接固定在石墨烯表面，由於缺乏便利和可靠的表面化學。根據過去的研究結果^{23,24,40}，金屬奈米粒子可以很容易的還原在碳奈米材料表面上，而金屬奈米粒子如金或銀，不僅可以作為巰基化 DNA 探針的錨點，同時其表面電漿共振能提供額外的 SERS 訊號增強。目前金屬奈米粒子/石墨烯複合材已經應用於有機分子偵測⁴⁰ 或是生物感測，DNA 偵測⁴¹。

Sean Murphy⁴⁰ 等人利用硼氫化鈉作為還原劑製備銀奈米粒子/還原氧化石墨烯複合材 (AgNPs/RGO)，作為偵測吡啉衍生物 TMPyP 的 SERS 活性平台。TMPyP 擁有在 516 nm 處的最大吸收帶，實驗中拉曼所用雷射波長為 514 nm，與 TMPyP 電子躍遷是共振的，能使實驗產生共振拉曼與表面增強拉曼散射 (SERS) 結合成表面增強共振拉曼散射 (Surface Enhanced Resonance Raman Scattering,

SERRS)。而 TMPyP 具有龐大的芳香環結構，並同時具備正電荷，能經由 π - π 堆疊和靜電相互作用與 RGO 的結合。良好的結合使 TMPyP 與 RGO 之間產生電荷轉移，加上 SERRS 產生相當明顯拉曼訊號增顯效果。如圖 1-18 所示，其可以偵測到約 140 nM 的 TMPyP，表示 AgNPs/RGO 具有良好的 SERS 活性。

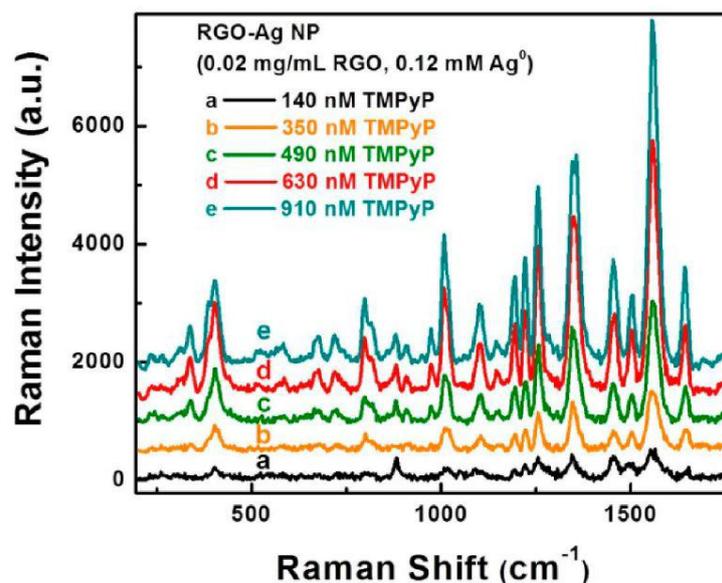


圖 1-18 使用 AgNPs/RGO 做為 SERS 平台的不同濃度下 TMPyP 的拉曼光譜圖。

Shijiang He⁴¹ 等人將金奈米粒子結合 CVD 法合成的大面積石墨烯薄膜製備成金奈米粒子石墨烯複合基板 (AuNPs/G) 作為偵測 DNA 的 SERS 活性平台。利用互補的 DNA 序列的雜合特性，設計具有專一性和選擇性的 DNA 偵測方法 (圖 1-19，路徑 b)，如圖 1-20 所示，其 DNA 偵測極限到達 10 pM，同時使用不同互補 DNA 序列和不同的標定染料分子能夠做到複數 DNA 偵測使用同一個 SERS 活性平台 (圖 1-19，路徑 c)。AuNPs/G 對於偵測 DNA 的高靈敏度和高選擇性表示其具備生物分析的高度應用潛力。

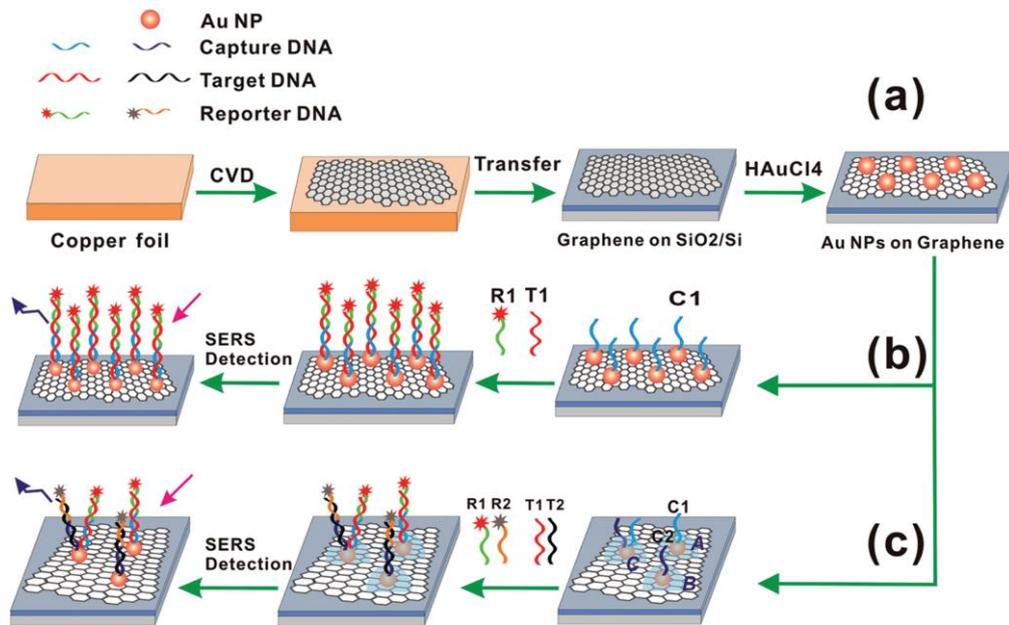


圖 1-19 使用 AuNPs/G 作為 SERSD 活性平台的 DNA 偵測示意圖。

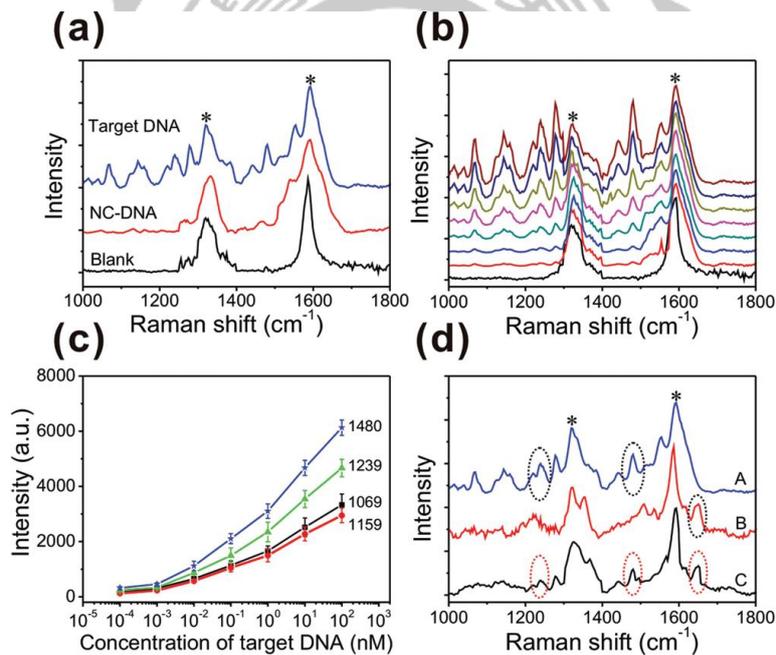


圖 1-20 (a)分別是沒有目標 DNA (黑色) 和 1 nM 的非互補 DNA (紅色) 和互補 DNA (藍色) 存在下獲得的 SERS 光譜。(b)目標 DNA 在 0~100 nM 下的 SERS 光譜。(c)不同拉曼特徵峰的強度對不同 DNA 濃度的標準曲線。(d)分別是 T1 目標 DNA (A 處)、T2 目標 DNA (B 處) 以及 T1 與 T2 同時存在下 (C 處) 的 SERS 光譜。圖中星號為石墨烯的 D 和 G 帶。

第 2 章 實驗與材料鑑定

2-1 實驗藥品

表 2-1 本研究中所使用藥品列表。

名稱	純度	廠商
硫酸 (Sulfuric acid)	99 %	Sigma-Aldrich
鹽酸 (Hydrochloric acid)	37 %	Sigma-Aldrich
高錳酸鉀 (Potassium permanganate)	99 %	SHOWA
雙氧水 (Hydrogen peroxide)	30 %	Sigma-Aldrich
硝酸銀 (Silver nitrate)	99 %	SHOWA
檸檬酸鈉 (Sodium citrate)	99 %	SHOWA
4-巰基苯甲酸 (4-Mercaptobenzoic acid, 4-MBA)	99 %	Sigma-Aldrich
4-氨基苯硫酚 (4-Aminothiophenol, 4-ATP)	97 %	Sigma-Aldrich
4-硝基苯硫酚 (4-Nitrothiophenol, 4-NTP)	80 %	Sigma-Aldrich
硼氫化鈉 (Sodium borohydride)	≥98 %	Sigma-Aldrich
3-氨基吡啶 (3-Aminopyridine, 3-AP)	99 %	Sigma-Aldrich
氨基丁酸 (γ -Aminobutyric acid, ABA)	99 %	Sigma-Aldrich

表 2-2 本研究中所使用的寡核苷酸(Oligonucleotides)序列

名稱	序列 (5'→3')
P1 (Probe DNA No.1)	ACATAGCACATTTCGAGGTAG-SH
P2 (Probe DNA No.2)	TGCATTACGGAATCTTACTC-SH
T1 (Target DNA No.1)	CTACCTCGAATGTGCTATGT-SH
T2 (Target DNA No.2)	GAGTAAGATTCCGTAATGCA-SH
Non Complementary DNA	TACATCTTGCGACATCGCAG-SH

2-2 材料製備

2-2-1 氧化石墨烯的合成

本研究使用改良式的漢默法 (modified Hummer's method) 來製備大面積的單層氧化石墨烯 (Graphene Oxide) 奈米薄片⁴²。首先取 2 g 的天然石墨與 12 ml 的硫酸相混合保持在 80°C，進行 4.5 個小時的初步氧化，冷卻後震盪 4 至 6 個小時。以 500 ml 的去離子水稀釋後過濾並以 60°C 烘乾。將氧化後的石墨置於 120 ml 的硫酸當中，加入 15 g 的高錳酸鉀攪拌 2 小時。接著緩慢地加入 250 ml 的去離子水，並且再次攪拌 2 小時。隨後再加入 700 ml 的去離子水，並同時加入 30 % 的雙氧水 20 ml。靜置隔夜後，收集上層液過濾並以去離子水:鹽酸=1:10 的溶液清洗去除多餘的金屬離子，再以大量的去離子水清洗去除多餘的酸，將 GO 固體分散於去離子水中，得到穩定的 GO 分散溶液。

2-2-2 銀奈米粒子與銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材的合成

合成銀奈米粒子 (AgNPs) 和銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材 (AgNPs/GO)。首先取 10 μ l 的硝酸銀溶液 (1.5 M) 加入至 15 ml 的 GO 去離子水分散液 (0.067 mg/ml)，將混合溶液加熱至 100 °C，之後加入 177 μ l 的檸檬酸鈉 (0.085 M)，維持條件反應 10 分鐘。將混合溶液冷卻至室溫，以 5000 rpm 離心 20 分鐘，分別收集以 AgNPs 為主的上清液與以 AgNPs/GO 為主的沉澱物。將前述的上清液以 8000 rpm 離心 20 分鐘去除額外的 GO 奈米薄片，重複此過程三次，即得到 AgNPs 膠體溶液。將前述的沉澱物以去離子水離心 (5000 rpm) 清洗，去除自由的 AgNPs，並用去離子水重新分散，得到穩定的 AgNPs/GO 分散溶液。

2-2-3 目標 DNA/銀奈米粒子的製備

將購置回來的目標 DNA 序列以去離子水配置成溶液，取目標 DNA 母液 (100

μM) 10 μl 加入至 1 ml 的 AgNPs 分散液中，配置成 1 μM 的目標 DNA/AgNPs 溶液。分別取出 1 μM 的目標 DNA 溶液 1 μl 、10 μl 和 100 μl ，各加入至 1 ml 的 AgNPs 分散液中，分別配置成 1 nM、10 nM 和 100 nM 的目標 DNA/AgNPs 溶液。將 1 μM 的目標 DNA 溶液稀釋成 1 nM，分別取 1 nM 的目標 DNA 溶液 1 μl 、10 μl 和 100 μl ，各加入至 1 ml 的 AgNPs 分散液中，分別配置成 1 pM、10 pM 和 100 pM 的目標 DNA/AgNPs 溶液。非互補 DNA 處理步驟同上。

2-2-4 標定分子的修飾

將各個濃度的目標 DNA/AgNPs 溶液加入 0.5ml 的 0.1M 的 4-MBA (或者 4-NTP) 乙醇溶液，將混合液靜置 20 分鐘，以 15000rpm 轉速離心 20 分鐘，去除上清液後以去離水回配至 1.5 ml，以相同條件離心，去除上清液後以去離子水回配至 0.5 ml，得到修飾 4-MBA (或者 4-NTP) 的目標 DNA/AgNPs 分散溶液。非互補 DNA 處理步驟同上。

2-2-5 表面增強拉曼散射樣品的製備

將購置回來的 Probe-DNA 序列以去離子水配置成溶液，取 Probe-DNA 母液 (100 μM) 10 μl 滴在 AgNPs/GO/Si 基板上，靜置 2 小時，之後以去離子水和乙醇清洗，再將 10 μl 4-MBA /目標 DNA/AgNPs 溶液滴上 AgNPs/GO/Si 基板，靜置 2 小時，以去離子水和乙醇徹底清洗 (使用去離子水和乙醇沖洗 1 分鐘，並浸泡在去離子水中攪拌 1 小時)，以氮氣吹乾，以供往後拉曼光譜實驗使用。

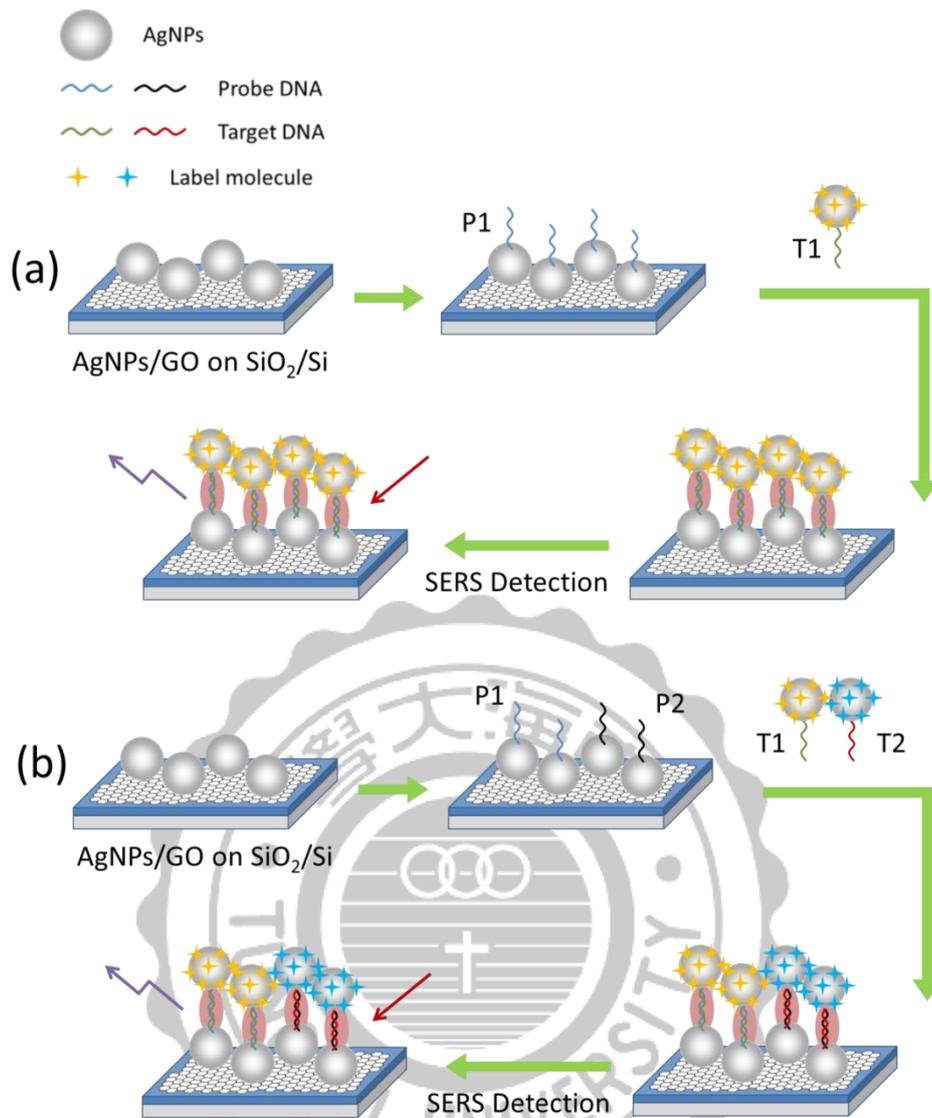


圖 2-1 製備 SERS 活性基板和 DNA 偵測的示意圖。

2-2-6 修飾 4-硝基苯硫酚 (4-NTP) 在銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材表面

將 1 ml 的 AgNPs/GO 分散水溶液和 0.5 ml 的 4-NTP 乙醇溶液 (0.02 M) 混合靜置 20 分鐘。之後以 15,000 rpm 離心 20 分鐘去除上清液，將含有 4-NTP 官能化的 AgNPs/GO 的固體沉澱物以乙醇清洗去除任何未結合的 4-NTP。最後，將沉澱物重新分散在去離子水中形成穩定的分散溶液。銀奈米粒子修飾 4-NTP 的方式仿照上述步驟。

2-2-7 修飾 4-氨基苯硫酚 (4-ATP) 在銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材表面

將浸塗上 AgNPs/GO 的 SiO₂/Si 基板浸泡在 1×10^{-7} M 的 4-ATP 乙醇溶液中 20 分鐘，將基板以乙醇和去離子水清洗，以氮氣吹乾，即獲得官能化 4-ATP 的 AgNPs/GO。

2-2-8 以 SERS 的偵測實驗

將待測物溶液滴在預先處理好的 SERS 基板，以拉曼光譜進行量測。根據實驗需求，可分別做乾與濕的樣品。

2-3 材料觀察與鑑定

將合成好的氧化石墨烯或是銀奈米粒子/氧化石墨烯複合做以下觀察與鑑定，以確認合成的材料正確。分別是原子力顯微鏡 (AFM)、高解析穿透式電子顯微鏡 (HRTEM)、UV/vis 吸收光譜、以及 X 光繞射分析儀 (XRD)。

2-2-1 原子力顯微鏡

將所合成的石墨烯使用 Nanosurf Easyscan 原子力顯微鏡 (Atomic force microscopy, AFM) 進行掃描。原子力顯微鏡是在奈米尺度操作材料，以及其成像和測量最重要的工具。其原理是利用末端具有奈米尺度探針的微觀懸臂，這個懸臂通常只有數十至數百微米大，當探針接觸到樣品表面附近的地方時，由於懸臂彈性係數和原子間的作用力相當，因此探針尖端的原子與樣品表面原子的作用力便會使懸臂在垂直力方向移動，作用力來源包括探針和表面的凡得瓦力 (Van der Waals force) 與探針和表面的外層電子之間的庫倫排斥力。所以樣品的表面高低起伏造成懸臂作上下偏移。偏移會由射在微懸臂上的雷射光束反射至高靈敏

度的位置偵測器而被測量到，將測量到的高低數據處理繪製掃描區域的原子力圖像。

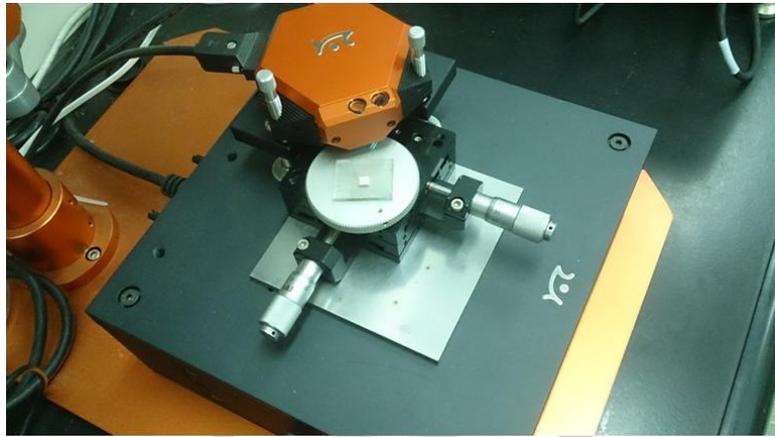


圖 2-2 原子力顯微鏡。

2-2-2 穿透式電子顯微鏡

將合成的銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材使用 JEOL JEM-2100F 的穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM) 做微觀結構觀察。TEM 的工作原理是把加速和聚集後的電子束投射到非常薄的樣品上，當電子與樣品中的原子碰撞時會改變行進方向，從而產生立體角散射。電子束散射角的大小與樣品的密度、厚度有關，因此會形成明暗不同的影像，將影像經過放大、聚焦後成像顯示出來。由於電子的德布羅意波長非常短，穿透式電子顯微鏡的解析度比一般的光學顯微鏡高的很多，可以達到 0.1~0.2nm，放大倍數為幾萬~百萬倍。因此，使用穿透式電子顯微鏡可以用於觀察樣品的精細結構，甚至可以用於觀察僅僅一列原子的結構，比光學顯微鏡所能夠觀察到的最小的結構小數萬倍。TEM 在物理學和生物學相關的許多科學領域都是重要的分析方法，如生物組織、奈米材料、以及晶體元件等等。



圖 2-3 型號 JEOL JEM-2100F 的穿透式電子顯微鏡。

2-2-3 UV/vis 吸收光譜

本研究使用型號 UV-1800 Shimadzu 的 UV/vis 吸收光譜儀對預先合成的銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材進行材料鑑定與吸收光譜實驗。

光透過某一物質時，某些波長的光被該物質吸收，主要是由於部分光子能量符合物質的電子躍遷能量所造成光吸收現象。在偵測到的透射光的連續光譜中有一段或幾段波長的光減弱或消失，這種光譜稱為吸收光譜。不同物質的吸收光譜不同，這取決於物質的分子、原子結構，因此可用吸收光譜可以做定性分析來鑑別物質和推測樣品的結構；同時吸收光譜的強弱和物質的濃度有關，符合比爾定律（公式 2-1），這個性質可用來做定量分析。

$$A = \epsilon bc \quad (2-1)$$

A 為吸收度

ϵ 為莫耳吸收係數(molar absorptivity) ，單位 $M^{-1}cm^{-1}$

b 為光通過路徑長，單位 cm

c 為溶液濃度，單位 M



圖 2-4 型號 UV-1800 Shimadzu 的 UV/vis 吸收光譜儀。

2-2-4 X 光繞射分析儀

本研究使用之儀器型號為 PHILIPS X'PERT Pro MPD，將預先合成的銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材進行 X 光繞射分析 (X-Ray Diffraction, XRD)。

當 X-ray 被一晶體內的規則環境散射，散射的光線間即產生干涉 (建設性或破壞性都有)，因為散射中心之間的距離與輻射波長長短相近，即為繞射。經由 X 光繞射光譜，可以鑑定結晶性物質。由光譜上之各繞射角，就可以根據布拉格定律 (Bragg's Law, 公式 2-2)，算出結晶中所有組面的垂直距離。再者，結晶上各面原子密度不同，則各面繞射時的強度也就不同，因此由一粉末繞射光譜中，各光譜線的強弱和位置，就可以鑑定某一結晶物質的存在。若樣品是很多種結晶性物質的混合物，各成分的繞射光譜均可觀察的到。光譜線的強度，大致與各成分的含量成正比。因此，X-射線粉末繞射光譜也可以作各結晶成分的定量分析，不過精確度不高。

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

(2-2)

n ：繞射階數

λ ：繞射 X 光之波長

d ：晶體面間距

θ ：入射 X 光與晶面之夾角



圖 2-5 型號為 PHILIPS X'PERT Pro MPD 的 X 光繞射分析儀。

2-4 拉曼光譜

本研究使用共聚焦拉曼光譜系統 (Horiba Jobin Yvon iHR550)，光柵為 600 gr/mm，搭配 532 nm 的雷射作為激發光源，以及使用 50 x 的接物鏡聚焦。拉曼光譜實驗中，雷射功率與光譜的積分時間隨實驗需求改變條件。



圖 2-6 型號 Horiba iHR550 拉曼光譜儀。



第 3 章 氧化石墨烯為基底的 SERS 活性平台應 用於專一性與複數 DNA 偵測

靈敏和複數 DNA 偵測對於分子生物學的許多領域和臨床醫學是非常重要的，因為它可以提供有用的訊息作為確定疾病的診斷依據。在目前許多 DNA 偵測方法中，最主流使用的是螢光法。然而，螢光訊號的偵測常受限於不同螢光團的光譜重疊，這使得螢光法通常只能同時偵測最多三個標定物，並且通常需要使用不同的激發波長。表面增強拉曼散射是一種對於複數 DNA 偵測可靠的替代方法，因為它通過分辨特定的分子振動光譜，可以容易地區別螢光標定物的混合物。因此，表面增強拉曼光譜已經被用於同時偵測複數的 DNA 標定物。只是，均勻和有效的 SERS 基板的製備仍然具有挑戰性，由於其複雜的製作過程、高成本，並且對於生物分析的相容性較差。根據過去的研究結果，金屬奈米粒子可以很容易的還原在碳奈米材料表面上，銀奈米粒子不僅可以作為巰基化 DNA 探針的錨點，同時提供額外的 SERS 訊號增強。本研究在這裡提出一種方便和高活性的 AgNPs/GO 基板，利用修飾銀奈米粒子的互補 DNA 在銀奈米粒子/氧化石墨烯表面進行雜合反應，套入 SERS 的“熱點”系統，作為螢光法的替代方案，來進行 DNA 偵測

3-1 材料鑑定

3-1-1 表面形貌觀察

圖 3-1 為先前所製備的氧化石墨烯 (GO) 奈米薄片利用浸塗 (dip-coating) 方法附在 SiO₂/Si 基板上，經過原子力顯微鏡 (AFM) 掃描後所獲得的影像。可以觀察到改良式漢默法 (modified Hummer's method) 所合成的 GO 奈米薄片具有平坦的表面，而由插圖可以得知其 GO 奈米粒片的厚度約為 1 nm，代表這個 GO 奈米薄片為單層的⁴³。除此之外，GO 奈米粒片的橫向寬度範圍約在 1 至數

10 μm ，由上述結果得知獲得大面積的單層 GO 奈米薄片。

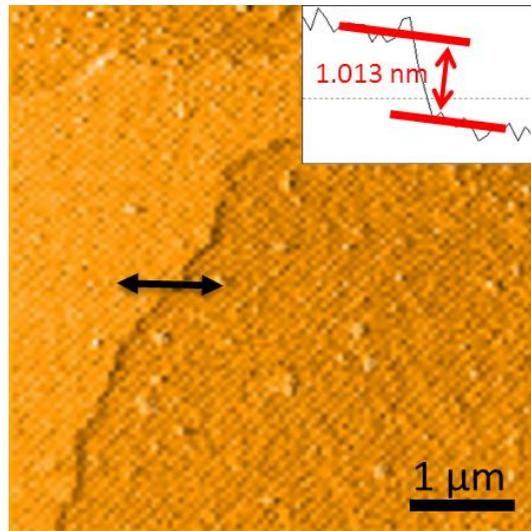


圖 3-1 利用改良式漢默法合成的單層氧化石墨烯(GO)的原子力顯微鏡(AFM)影像。右上角插圖為圖中所指的橫截面高度差示意圖。

通過使用穿透式電子顯微鏡 (TEM) 可以觀察先前所合成的銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材 (AgNPs/GO) 的局部細微結構與微觀表面形貌，觀察的結果如圖 3-2 所示。其中圖 3-2(a)和圖 3-2(b)分別是在不同放大倍率下所得到的 AgNPs/GO 的 TEM 影像，其圖 3-2(a)中黑色的骨架為銅網上具有破孔的碳膜，利用這個可以更清楚地分辨材料之間的差異。由圖 3-2(a)可以看到，銀奈米粒子 (AgNPs) 密集且平均的分佈在 GO 奈米薄片的表面上，由於 AgNPs 出現在碳膜簍空的部分，所以能進一步確定影像中的 AgNPs 是附著在作為基板的 GO 奈米薄片的表面。材料的 AgNPs 粒徑大小分佈如圖 3-2(b)插圖所示，經過計算得知 AgNPs 的平均粒徑約為 15.1 nm。至於先前所合成的 AgNPs 膠體的 TEM 影像如圖 3-2(c)所示，與 AgNPs/GO 的 TEM 影像不同的是，AgNPs 僅僅出現在黑色的碳膜骨架上，並沒有出現在其簍空的部份，可以進一步確認材料為純的 AgNPs 膠體，沒有 GO 奈米薄片的存在。AgNPs 粒徑大小分佈如圖 3-2(c)插圖所示，其平均粒徑經過計算得知約為 15.6 nm，與 AgNPs/GO 中的 AgNPs 粒徑尺寸相異不

大。

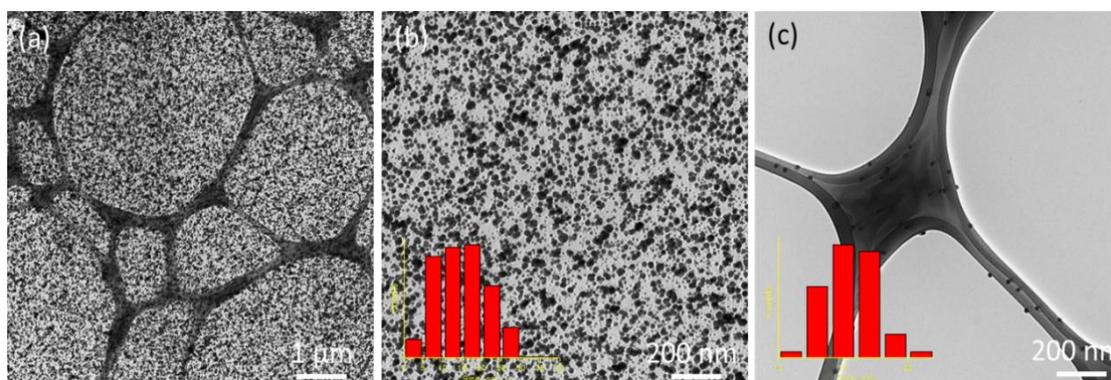


圖 3-2 (a)為 AgNPs/GO 典型的 TEM 影像。(b)較高倍率下的 AgNPs/GO 的 TEM 影像。(c)為 AgNPs 的 TEM 影像。AgNPs 的尺寸分佈分別表示在各圖中的插圖。

3-1-2 光學鑑定

另外將樣品做光學鑑定，分別是 UV/Vis 吸收光譜和拉曼光譜，以確認材料合成前後的差異。圖 3-3(a)中所示，GO 位於 228 nm 有一支最大吸收峰，其來自碳的 π 電漿子⁴⁴。與 GO 的吸收光譜相比，AgNPs/GO 約在 400 nm 處多出一支吸收峰，和純的 AgNPs 膠體的吸收光譜對比得知，這是由於 AgNPs 的表面電漿共振 (SPR) 所產生的吸收波峰⁴⁵。在這裡值得注意的是，AgNPs/GO 吸收光譜中較短波長的吸收峰 (228 nm) 維持不變，這代表了在反應中加入的檸檬酸鈉主要是還原了銀離子而非 GO。而圖 3-3(b)分別為 GO 和 AgNPs/GO 的拉曼光譜。由圖可以得知，雖然 GO 和 AgNPs/GO 兩者的拉曼光譜皆顯示 D 帶 1344 cm^{-1} 和 G 帶 1608 cm^{-1} 的 GO 特徵峰，但是可以清楚地看到 AgNPs/GO 的拉曼訊號強度比起 GO 有顯著地增強，經過計算 GO 的拉曼訊號強度放大了約 2.6 倍，這是由於附著在 GO 表面上的 AgNPs 本身局部表面電漿共振 (LSPR) 所產生的局部電場 (local electric field) 所導致 GO 的拉曼散射光增強的結果^{46,47}。此外，將兩者的 D 帶和 G 帶之間的強度比 I_D/I_G 做計算，其 GO 的強度比 I_D/I_G 為 0.91，與反應後的 AgNPs/GO 的強度比 I_D/I_G 為 0.95 相比較可以發現，反應前後兩者是幾乎

保持不變的，這能進一步證明在反應中所加入的檸檬酸鈉對於 GO 的影響是微乎其微的。

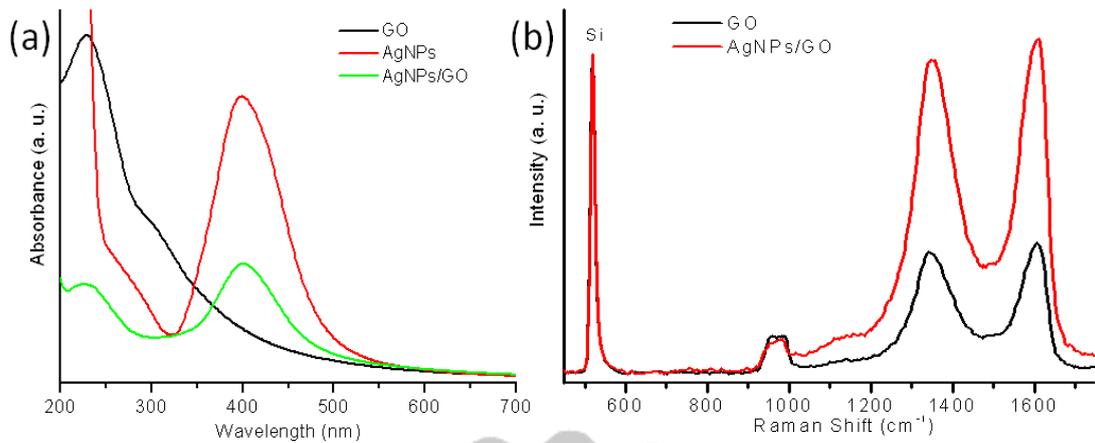


圖 3-3 (a)GO 奈米薄片、AgNPs 和 AgNPs/GO 的 UV/Vis 吸收光譜。(b)GO 奈米薄片和 AgNPs/GO 的拉曼光譜。拉曼光譜利用 Si 訊號峰的強度作歸一化。

3-1-3 X 光繞射分析

為了進一步鑑定 AgNPs/GO 的組成與結構，使用 X 光繞射 (XRD) 進行材料分析。如圖 3-4 所示，可以觀察到的繞射峰對照 JCPDS card No. 4-783 皆屬於銀的 fcc 堆疊。除此之外，值得注意的是位在 $2\theta=10.9^\circ$ 處的 GO 繞射峰並沒有出現在 AgNPs/GO 的 XRD 光譜中。這可能是因為當銀奈米粒子附著在 GO 表面上會有礙於 GO 奈米薄片的有序堆疊產生。根據以上種種的證據顯示，可以得出 AgNPs/GO 被成功合成的結論。

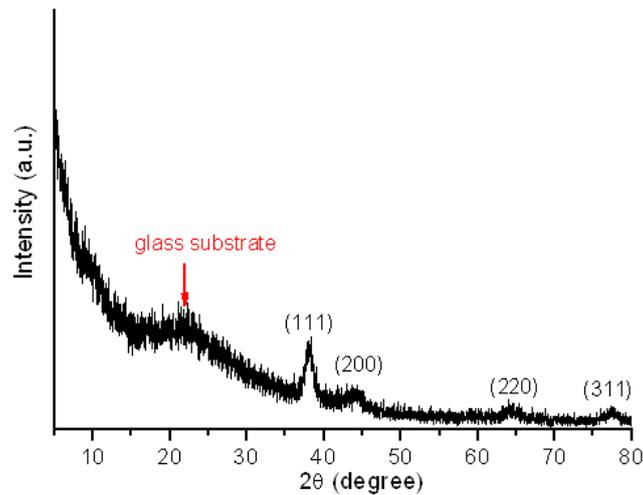


圖 3-4 為 AgNPs/GO 的 XRD 圖像。位在 $2\theta=21.7^\circ$ 處的寬峰為玻璃基板的背景訊號。

3-2 表面增強拉曼散射實驗

3-2-1 高靈敏度的 DNA 偵測

通過測量 4-巰基苯甲酸 (4-MBA) 標定的目標 DNA 的 SERS 訊號⁴⁸，DNA 定量偵測結果如圖 3-5(a)所示。可以看到 SERS 訊號強度隨著目標 DNA 的濃度減少而下降，在這個實驗中，當目標 DNA 的濃度減少至 1 nM，仍可以觀察到明顯的 4-MBA 的 SERS 訊號，說明 AgNPs/GO 作為 SERS 活性平台對於 DNA 偵測具有極高的靈敏度。這個優異的結果可以歸究於，當目標 DNA 存在 AgNPs/GO 表面時，會與表面上所修飾的探針 DNA 相互雜合，由於兩者 DNA 末端皆連接銀奈米粒子，當雜合發生後，此時會形成雙奈米粒子系統，兩個銀奈米粒子之間由於彼此的局部電磁場相互交疊，使得粒子間的局部電磁場強度大為增加，這之間的位置稱為表面拉曼散射之熱點(hot spot)。由於目標 DNA 末端連接的 AgNPs 上吸附了許多 4-MBA 標定分子，而部份的 4-MBA 可能會位於熱點中，使得 SERS 訊號更為提升。同時圖 3-5(b)為 4-MBA 的 SERS 特徵峰 (1077 cm^{-1}) 對目標 DNA 濃度所作的劑量反應 (dose-response) 分佈，其線性迴歸的 R^2 值為 0.9991，說明

這個偵測實驗能作為可靠的定量偵測分析。

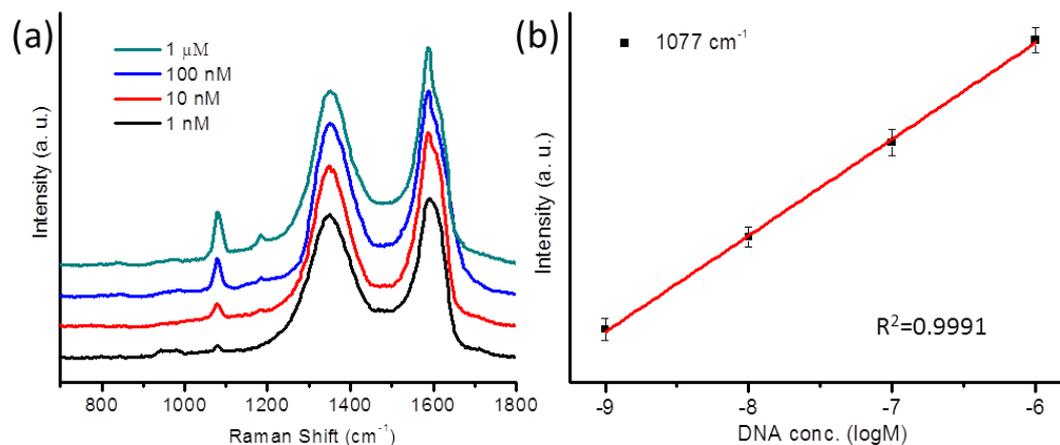


圖 3-5 (a)不同濃度(1 nM~1 μM)的 target DNA 存在下所獲得的 SERS 光譜圖。(b)標定分子 4-MBA 的拉曼特徵峰 (1077 cm^{-1}) 對 DNA 濃度的劑量反應 (dose-response) 分佈。SERS 實驗中使用的雷射強度為 1.5 mW，積分時間為 3 秒。

為了確認拉曼光譜所量測到的 4-MBA 訊號是由於互補 DNA 序列在 SERS 活性基板上發生雜合所產生的，分別量測官能化 4-MBA 的 AgNPs/GO 清洗前後的拉曼光譜。實驗方法為將 4-MBA 官能化在 AgNPs 上後，滴塗在 AgNPs/GO 表面上，進行拉曼光譜量測。量測後，以去離子水沖洗 AgNPs/GO 的 SiO₂/Si 基板數次，並將基板浸泡在去離子水中 1 小時，進行拉曼光譜量測。由圖 3-6 所示，清洗前的拉曼光譜如同目標 DNA 存在 AgNPs/GO 表面上，可以清楚地觀察到 4-MBA 的拉曼特徵峰 (1074 和 1588 cm^{-1})，經過清洗後發現，4-MBA 的拉曼特徵峰從拉曼光譜圖中消失，這個結果表示官能化 4-MBA 的 AgNPs 從 AgNPs/GO 的表面上移除。由上述實驗證明，DNA 偵測實驗中在 SERS 光譜圖 (圖 3-5) 觀察到 4-MBA 標定分子的拉曼特徵峰是由於互補的 DNA 序列產生的雜合現象，能夠確保官能化 4-MBA 的 AgNPs 在經過清洗後仍然固定在 AgNPs/GO 表面上，達到偵測 DNA 的目的。

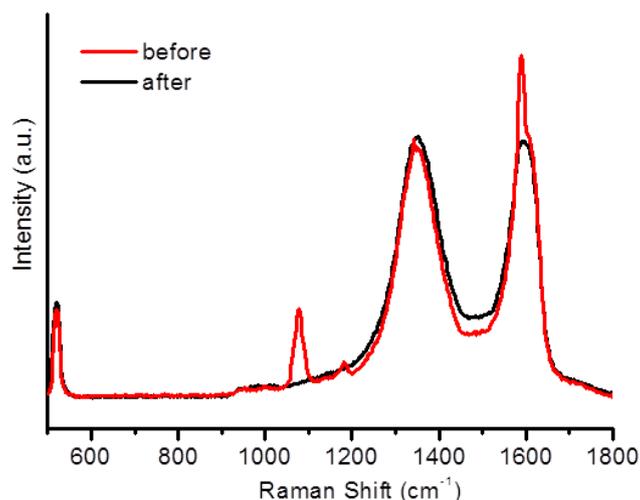


圖 3-6 官能化 4-MBA 的 AgNPs 滴在 AgNPs/GO 上的拉曼光譜圖。分別量測清洗前（紅色線），和清洗後（黑色線）。拉曼光譜使用功率 1.5 mW 的 532 nm 雷射，積分時間為 3 秒的條件進行量測。

3-2-2 銀奈米粒子的粒徑尺寸對表面增強拉曼散射的影響

已知金屬奈米粒子尺寸的改變會影響表面電漿共振的振動頻率而產生不同的吸收波長，同時粒徑越大的金屬奈米粒子表面周圍產生的局部電場也會越強⁴⁹。為了進一步使 DNA 偵測極限提高，同時調查 AgNPs 的粒徑尺寸對 SERS 訊號增顯的影響，使用不同條件所合成大尺寸的 AgNPs 作為目標 DNA 的末端修飾。如同實驗 2-1-2 中，使用相同步驟以及藥品用量，不同的是單獨使用硝酸銀(1.5 M) 溶液，並加入檸檬酸鈉 (0.085 M) 來合成銀奈米粒子，過程從原本直接加入改變為間隔 5 秒逐漸滴入。所合成的大尺寸 AgNPs 膠體的 TEM 影像如圖 3-7(a) 所示，與上述圖 3-2(c) 相同，影像中 AgNPs 僅僅出現在黑色碳膜的骨架上，表示所合成的材料中並無 GO 奈米薄片存在。其 AgNPs 粒徑分佈如插圖所示，經過計算平均粒徑約為 57.5 nm。圖 3-7(b) 為大尺寸 AgNPs 的 UV/Vis 吸收光譜，可以觀察到其表面電漿共振所產生的最大吸收峰位於 446 nm，與圖 3-3(a) 的吸收光譜相比，大尺寸的 AgNPs 產生了一個明顯的紅位移，這個現象符合文獻中所描述

金屬奈米粒子的表面電漿共振的吸收波長會隨粒徑尺寸增加而變長。

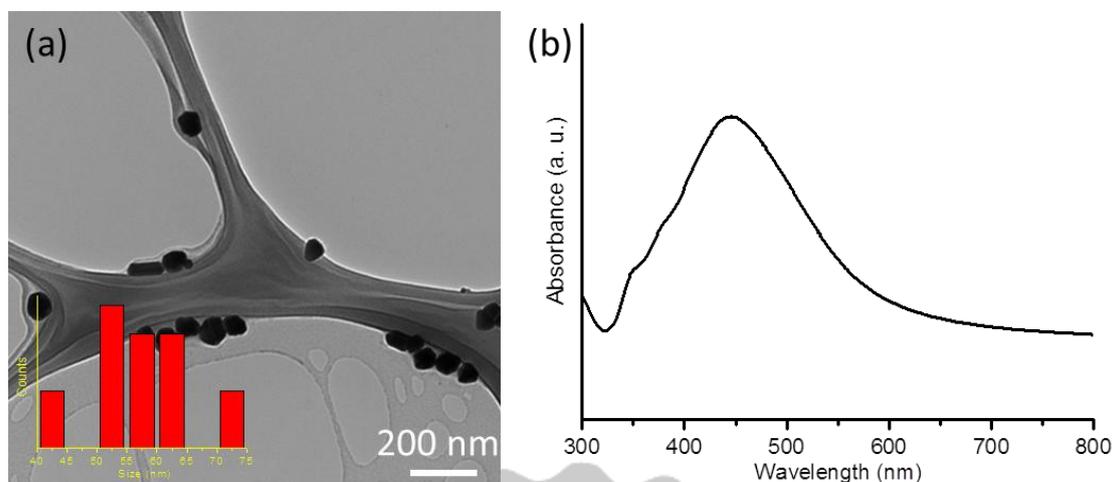


圖 3-7 (a)大尺寸的 AgNPs 的 TEM 影像，粒徑分佈如圖中插圖所示。(b)大尺寸的 AgNPs 的 UV/Vis 吸收光譜。

圖 3-8 比較不同尺寸的 AgNPs 作為目標 DNA 末端修飾對於 1 nM 的目標 DNA 存在下 SERS 訊號強度的影響。由圖可以得知，當使用平均粒徑約為 57.5 nm 的 AgNPs 作為修飾時，所獲得的作為目標 DNA 標定的 4-MBA 的 SERS 訊號強度比使用平均粒徑約為 15.6 nm 的 AgNPs 作為末端修飾時的 SERS 訊號強度來得要強，經過積分計算訊號峰強度高了 4 倍。這說明了當 AgNPs 的粒徑增加時，其粒子周圍經由表面電漿共振產生的局部電場對於吸附在粒子表面的 4-MBA 標定分子的 SERS 訊號會產生更好的增顯效果。另一方面，由於 AgNPs 粒徑增加改變表面電漿共振的吸收波長，其紅位移至 446 nm 而更加靠近 SERS 實驗中所使用的 532 nm 的雷射波長，可以使得 SERS 訊號有所提升。由於上述正面的結果，加上偵測系統中互補的 DNA 相互雜合後所形成的熱點效應，使得所獲得的 SERS 訊號更為明顯。

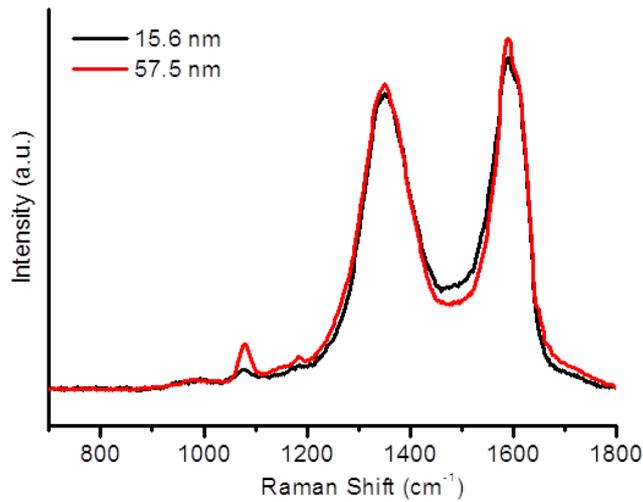


圖 3-8 修飾不同尺寸 AgNPs 的目標 DNA，在 1 nM 下所獲得的 SERS 光譜圖。黑色線為 15.6 nm，紅色線為 57.5 nm。拉曼實驗中使用的雷射強度為 1.5 mW，積分時間為 3 秒。

將官能化 4-MBA 標定分子的 AgNPs 更換成 57.5 nm 後，DNA 定量偵測結果如 **圖 3-9(a)** 所示。在這裡同樣可以看到 SERS 訊號強度隨著目標 DNA 的濃度減少而下降。但是與上述實驗不同的是，當目標 DNA 的濃度減少至 1 pM 時，仍然可以觀察到明顯的 4-MBA 的 SERS 訊號，這個結果證明 AgNPs 粒徑大小對於整體 SERS 偵測實驗具有顯著地影響，當 AgNPs 粒徑變大的同時電磁場增顯效果增加，則能使 SERS 訊號更加提升，而偵測到更低的目標 DNA 濃度。另外 **圖 3-9(b)** 為 4-MBA 的 SERS 特徵峰對目標 DNA 濃度所作的劑量反應 (dose-response) 分佈，其線性區域橫跨 10^{-7} 至 10^{-12} M，而 R^2 值為 0.9990，同樣說明這個偵測實驗能作為可靠的定量偵測分析。

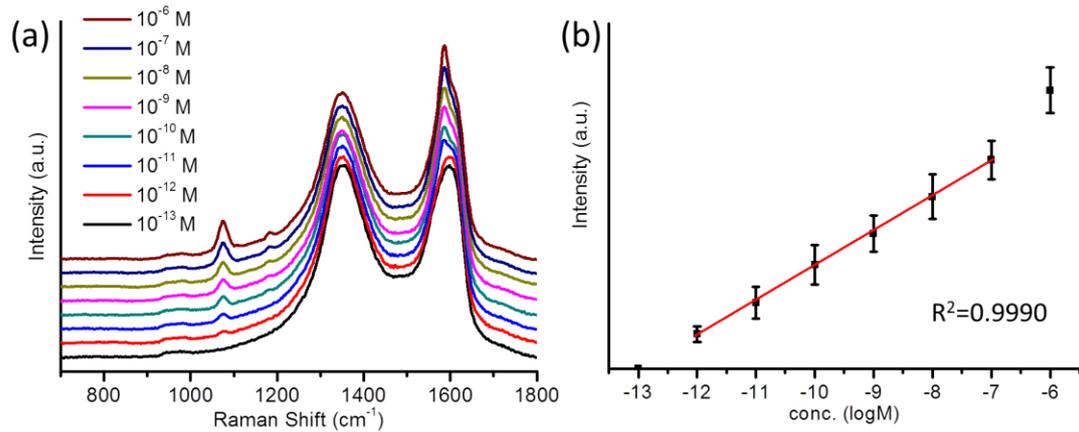


圖 3-9 (a)使用大尺寸 AgNPs 獲得的不同濃度的目標 DNA 存在下的 SERS 光譜圖。(b)目標分子 4-MBA 的拉曼特徵峰強度對濃度的劑量反應(dose-response)分佈。SERS 光譜使用雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 3 秒。

3-2-3 專一性與複數 DNA 的偵測

如圖 3-10 所示，當與探針 DNA 完全互補的目標 DNA 存在下，由於兩者能完全相互雜合，則可以清楚地觀察到一 4-MBA 標定分子的 SERS 訊號，與不存在目標 DNA 的空白組和與探針 DNA 不互補的非互補 DNA 組相互對照具有明顯不同。表示這個利用 DNA 序列互補雜合特性的 DNA 感測器具有高度的專一性。在這裡說明了由於非互補 DNA 與探針 DNA 不互補，使得非互補 DNA 無法有效地經由與探針 DNA 發生雜合吸附在 AgNPs/GO 表面上，使得 4-MBA 標定分子幾乎不存在 SERS 平台，表現出的偵測結果同空白組而沒有明顯的 SERS 訊號。

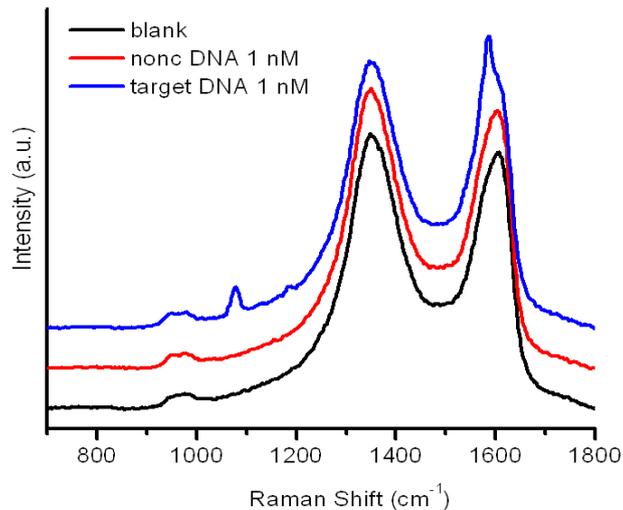


圖 3-10 為 DNA 偵測的專一性實驗。獲得的所量測的光譜分別是沒有綁定 target 目標 DNA 的 AgNPs 存在下 (黑色線)、與 Probe 探針 DNA 不互補的 1 nM 的 nonc 非互補 DNA 的 AgNPs (紅色線) 和互補的 target 目標 DNA 的 AgNPs 存在下 (藍色線) 滴在探針 DNA 官能化 AgNPs/GO 表面上。SERS 光譜使用雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 3 秒。

為了驗證這個 DNA 感測器能做為選擇性複數 DNA 偵測的平台，則在 AgNPs/GO 表面上修飾不同的探針 DNA (P1 和 P2)，用來偵測不同的目標 DNA (T1 和 T2，10 nM)。如圖 3-11 所示，由於 DNA 序列的專一性，P1 (P2) 只會和互補的 T1 (T2) 相互雜合而在偵測平台上產生該標定分子的 SERS 訊號，如藍色線為 P1 與 T1 相互雜合下獲得的 SERS 光譜，在 1074 cm^{-1} 和 1588 cm^{-1} 表現出 4-MBA (T1 的標定分子) 的拉曼特徵峰；而綠色線為 P2 與 T2 相互雜合下所獲得的 SERS 光譜，可以看到 1000 cm^{-1} 、 1024 cm^{-1} 和 1071 cm^{-1} 為苯硫酚 (T2 的標定分子) 的拉曼特徵峰。若是非互補的情況 (P1 對 T2 或 P2 對 T1)，由於探針 DNA 與目標 DNA 彼此無法形成雜合，則無法觀察到明顯的 SERS 訊號 (黑色線和紅色線)。這個實驗表明，當使用不同的互補 DNA 序列，並且在目標 DNA 上修飾不同的標定分子，則可以偵測複數的目標 DNA，同時，利用 DNA 序列彼

此互補才能產生雜合的專一特異性，使 DNA 偵測具有高度的選擇性。

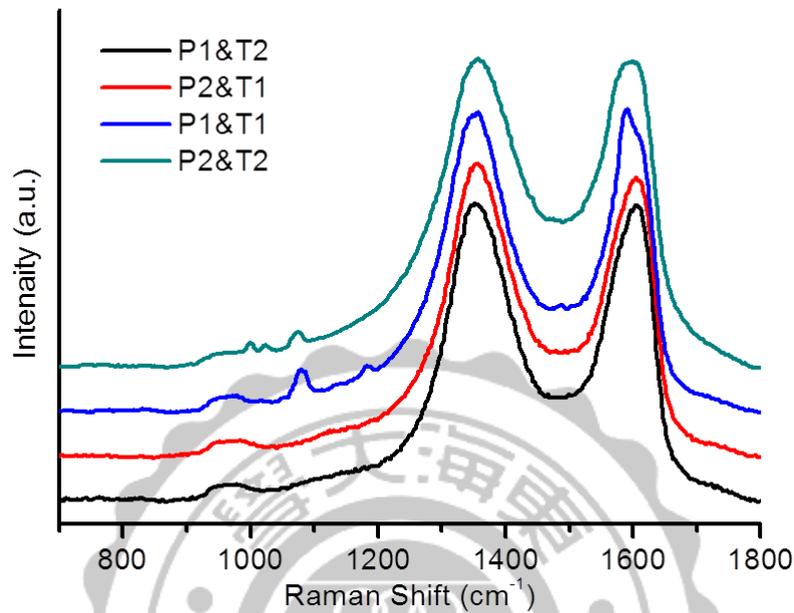


圖 3-11 探針 DNA 和目標 DNA 在不同配對所獲得的 SERS 光譜圖，分別做 P1 對 T1 (藍色線)、P1 對 T2 (黑色線)、P2 對 T1 (紅色線) 和 P2 對 T2 (綠色線)。目標 DNA 濃度皆為 10 nM，SERS 光譜使用雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 3 秒。

3-3 結語

本研究提出了一個簡單的濕式方法將 AgNPs 裝飾在 GO 奈米薄片表面合成 AgNPs/GO。此 AgNPs/GO 能作為具有專一性與靈敏地高效率 SERS 活性平台用於複數 DNA 的偵測。使用石墨烯作為基板具有合成方便且廉價的優點，同時在其表面裝飾 AgNPs 能夠很容易的將標定過的 DNA 序列組裝到基板上，經過 AgNPs 的電場增強，SERS 訊號強度在 AgNPs/GO 表面可以產生顯著地增強。除此之外，利用互補 DNA 序列彼此會產生雜合的特性，設計能夠在平台上產生雙

奈米粒子系統藉此形成熱點來使 SERS 訊號更加提升，以便偵測出更低的 DNA 濃度，偵測極限可以達到 1 pM。並且根據改變所使用的探針 DNA 和標定分子，則能夠在相同的 SERS 平台上偵測複數的目標 DNA。因此，AgNPs/GO 作為 SERS 平台將能夠成為強而有力的 DNA 偵測工具。



第 4 章 在 AgNPs/GO 表面上形成 DMAB 對 SERS 增強的影響

在上個章節中說明銀奈米粒子和銀奈米粒子之間彼此靠近時所形成 SERS 的“熱點”能夠有效地增強 SERS 的活性，使偵測物的偵測極限提升。而近年來，電漿驅動化學反應創造了嶄新的途徑來控制金屬基板上的催化反應而受到極大的關注。在電漿子驅動化學中，4-氨基苯硫酚（4-ATP）是被研究最多的分子，其在金屬基板的表面上經過雷射的照射下會轉變成 *p, p'*-二巰基偶氮苯 (DMAB)⁵¹。除了 4-ATP，4-硝基苯硫酚 (4-NTP) 也被證實通過局部表面電漿子的協助下，轉變成 DMAB。在這項研究中，使用銀奈米粒子與氧化石墨烯的奈米複合材 (AgNPs/GO) 作為電漿驅動化學反應的催化和分析平台，並在單一 AgNPs/GO 奈米片上進行連續轉換 (4-NTP→DMAB→4-ATP→DMAB)。同時設想形成 DMAB 的 AgNPs/GO 能夠拉近 GO 表面上銀奈米粒子彼此的距離來增加“熱點”數目，並預期看到 SERS 活性的提升，以典型的有機分子作檢測。

4-1 材料鑑定

詳細請參閱 3-1 材料鑑定。

4-2 拉曼光譜實驗

4-2-1 在 AgNPs/GO 表面上的電漿驅動反應

圖 4-1 顯示為曝光在功率 1 mW 的 532 nm 雷射下，所作的對-硝基苯硫醇 (4-NTP) 在 AgNPs/GO 表面的時間相關性 SERS 光譜。由圖 4-2 可以得知 4-NTP 的拉曼特徵峰位在 1336cm^{-1} ，它對應 NO_2 官能基的對稱伸縮模式⁵²。在圖 4-1(a) 中，無法觀察到 4-NTP 的 $\nu(\text{NO}_2)$ 訊號峰，而與此不同的是，能夠在光譜中清楚地看到位在 1389cm^{-1} 和 1437cm^{-1} 訊號峰，兩者來自 $\nu(\text{N}=\text{N})$ ，這表明大部

分 4-NTP 皆被轉化成 *p,p'*-二巰基偶氮苯 (DMAB)。除此之外，位在 1142cm^{-1} 以及相對強度較弱的訊號峰 1190cm^{-1} 分別可以代表 β (CH) 和 C-N 對稱伸縮的混合運動和 C-H 在平面的彎曲^{50, 53}。在上述拉曼光譜中觀察到的特徵峰與反式 DMAB 的模擬 SERS 光譜訊號分佈一致^{53, 54}。有鑑於 DMAB 以反式構象存在，它的形成可能是涉及到兩個 4-NTP 分子在 GO 奈米薄片上的兩個相鄰的銀奈米粒子通過表面電漿共振的幫助下作用形成一個 DMAB。

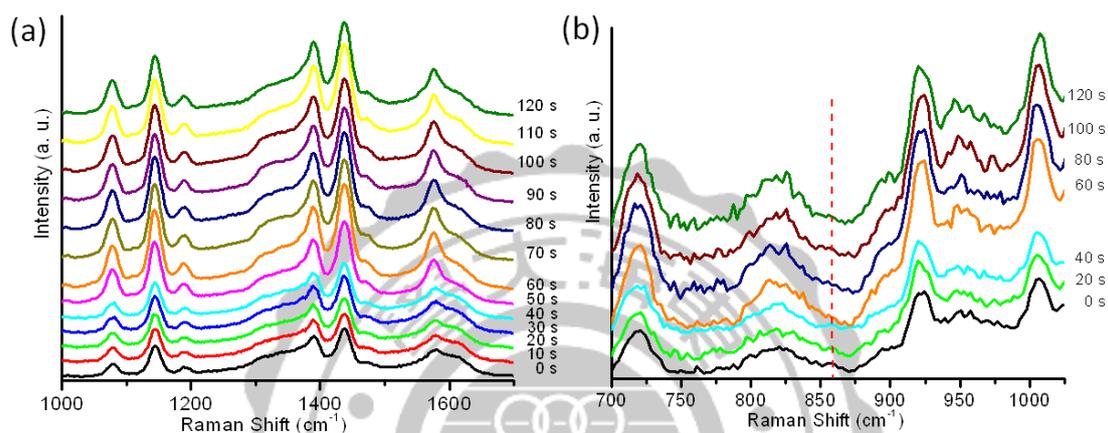


圖 4-1 對-硝基苯硫醇 (4-NTP) 在 AgNPs/GO 表面的時間相關性 SERS 光譜。光譜測定範圍分別是(a)1000 到 1700cm^{-1} (b)700 到 1050cm^{-1} 。

從其他的控制實驗 (如圖 4-2 和圖 4-3 所示) 可以發現，無論是 4-NTP 本身或者是在空白的 GO 奈米薄片表面都不能轉變成 DMAB，這代表了銀奈米粒子的存在對於 4-NTP 的二聚反應是不可或缺的。另外需要注意的是，DMAB 的 ν (N=N) 訊號峰在雷射照射下 60 秒後強度明顯增加，而在此之後，即使雷射持續照射，DMAB 的 SERS 強度沒有顯示明顯的變化，表示 4-NTP 的二聚反應已完成。為了進一步證實在 AgNPs/GO 上的 4-NTP 分子二聚反應在雷射照射 60 秒後完成，記錄了其低波數區域的 SERS 光譜。如圖 4-1(b)所示，位在 854cm^{-1} 的拉曼訊號峰，是來自 NO_2 官能基的對稱變形⁵⁵，其可以在 SERS 實驗的一開始觀察到。在約 60 秒，位在 854cm^{-1} 的訊號峰消失，表示 4-NTP 轉化 DMAB 二聚反應完成。

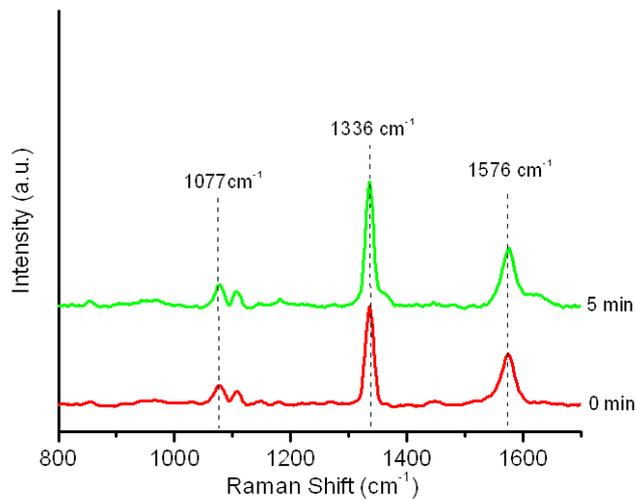


圖 4-2 滴塗 (drop-coated) 在 SiO_2/Si 基板上的 4-NTP 的拉曼光譜圖。光譜分別測量照光前 (紅色線) 和照光 5 分鐘 (綠色線)。拉曼光譜使用功率 1.5 mW 的 532 nm 雷射，積分時間為 3 秒。

而在圖 4-1(b) 中如同先前理論計算，在 700 到 1000 cm^{-1} 區域顯示四種 DMAB 的共振模式，可以看到這些拉曼訊號峰較微弱。值得注意的是，可以清楚地觀察到在 AgNPs/GO 表面上的 DMAB 的低波數拉曼訊號。這一結果表示，在 GO 奈米薄片上密集分佈的銀奈米粒子提供了強大的局部電磁場 (local electromagnetic field) 增強，因而使得 AgNPs/GO 成為一個有效的 SERS 偵測平台，可以用來監測吸附反應物的結構變化。

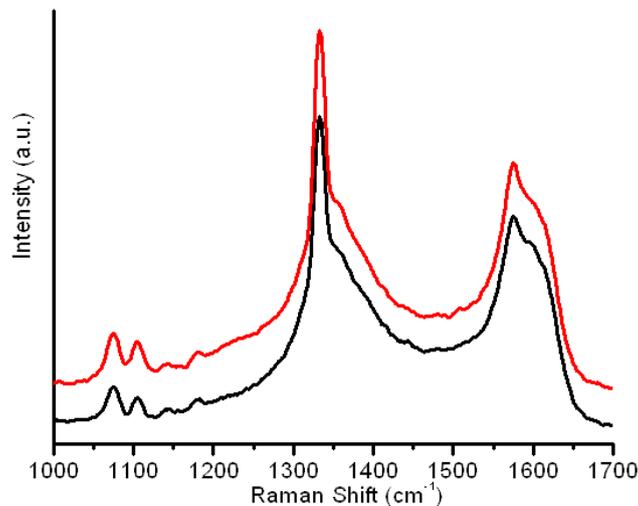


圖 4-3 滴塗 (drop-coated) 在 GO 表面上的 4-NTP 的拉曼光譜圖。光譜分別測量照光前 (黑色線) 和照光 5 分鐘 (紅色線)。拉曼光譜使用功率 1.5 mW 的 532 nm 雷射，積分時間為 1 秒。

為了調查 DMAB 形成在 AgNPs/GO 上對於 SERS 強度的影響，分別記錄液相下不同 SERS 活性之基板的拉曼光譜和 UV-vis 吸收光譜，實驗方法為將它們官能化 4-NTP 分子後，再經氙燈照射 5 分鐘。在圖 4-4(a) 中，官能化 4-NTP 分子的銀奈米粒子的拉曼光譜顯示 4-NTP 本身的特徵峰，這表示光照下不能觸發在銀奈米粒子上 4-NTP 轉化成 DMAB。另外，圖 4-4(b) 顯示官能化 4-NTP 的銀奈米粒子的吸收光譜和銀奈米粒子的吸收光譜相同，經過照光後仍維持不變。相比之下，在 AgNPs/GO 上的 4-NTP 分子可以成功轉變成 DMAB，由圖 4-4(c) 顯示，在經過照光後可以清楚地看到 DMAB 的拉曼光譜。圖 4-4(d) 顯示官能化 4-NTP 分子的 AgNPs/GO 的最大表面電漿吸收峰比起先前合成的 AgNPs/GO 出現紅位移至 408 nm。經過照光 5 分鐘之後，官能化 4-NTP 的 AgNPs/GO 的最大表面電漿吸收峰可以進一步紅位移至 416 nm。值得注意的是，在拉曼和 UV/vis 吸收光譜實驗中並沒有其他的 4-NTP 來源，其結果是 4-NTP 轉變成 DMAB 必須發生在兩個或者更加緊密靠近的銀奈米粒子之間。以圖 4-4 中的兩個吸收光譜的最大表面電漿吸收峰的吸收強度為基礎可以判斷，銀奈米粒子膠體的濃度是高於

在 GO 奈米薄片上的銀奈米粒子濃度。然而，DMAB 的形成卻只發生在官能化 4-NTP 的 AgNPs/GO。這一結果表示，在 GO 表面上的銀奈米粒子整體密度相當的高，以致於可以輕易地將 4-NTP 轉化成 DMAB。同時也證明了 AgNPs/GO 的 TEM 影像 (圖 3-2(a)和圖 3-2(b))，GO 具有高比表面積和豐富的官能基團可以作為一個理想的銀奈米粒子集中器。

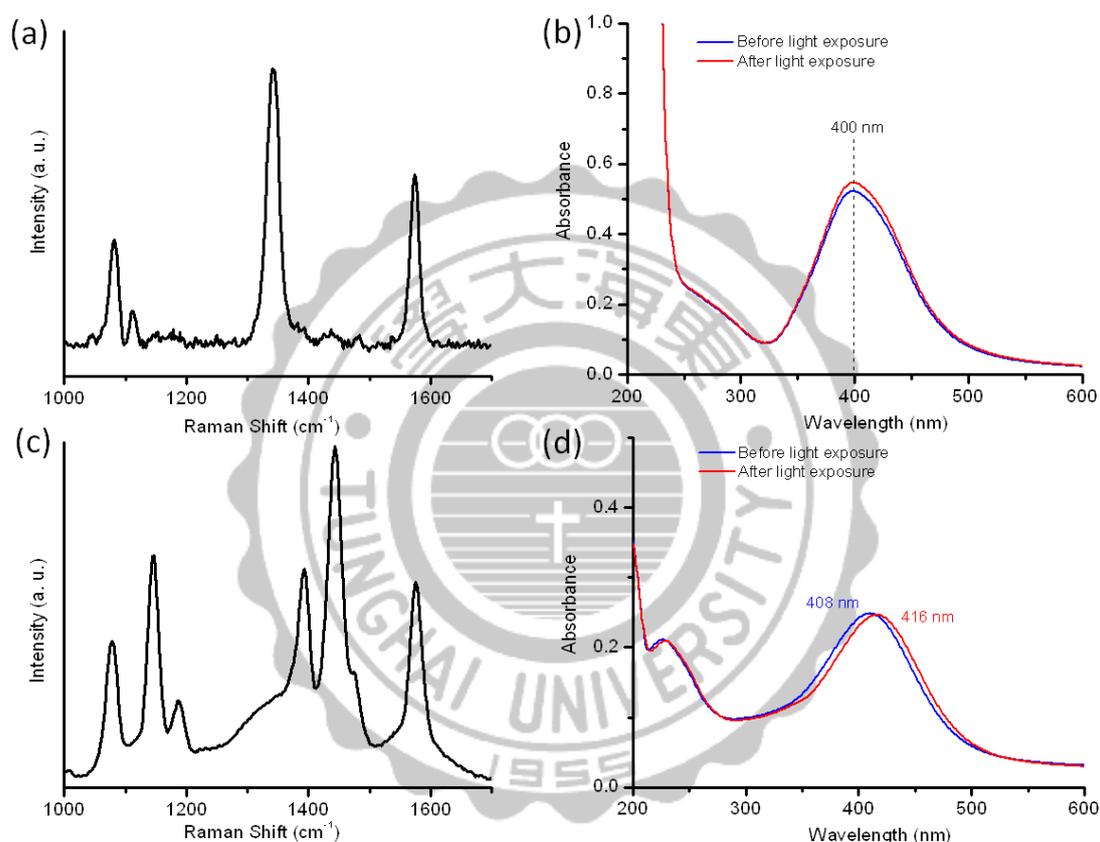


圖 4-4 官能化 4-NTP 的銀奈米粒子的(a)拉曼光譜和(b) UV/vis 吸收光譜圖。以及官能化 4-NTP 的 AgNPs/GO 的(c)拉曼光譜和(d) UV/vis 吸收光譜圖。

已知銀奈米粒子的表面電漿共振波長取決於它們的大小和形狀、周圍介質的介電常數，以及銀奈米粒子之間的距離⁴⁹。對於官能化 DMAB 的 AgNPs/GO 來說，表面電漿共振吸收紅位移的起因可以只歸究在銀奈米粒子之間的距離或是周圍介質的介電常數的改變。很明顯的，在 GO 奈米薄片表面上相鄰的銀奈米粒子上的 4-NTP 分子二聚化反應導致銀奈米粒子之間的距離縮短。這會造成銀奈米

粒子的表面電漿共振波長紅位移，以及局部電磁場的增強^{56,57}。為了釐清銀奈米粒子的表面電漿共振波長對於周圍介質的介電常數改變的影響，測量官能化 DMAB 的銀奈米粒子的 UV/vis 吸收光譜。如圖 4-4(b)所示，官能化 4-NTP 的銀奈米粒子並沒有改變銀奈米粒子的表面電漿共振波長，而由圖 4-5 得知，官能化 DMAB 的銀奈米粒子的表面電漿共振波長會紅位移至 411 nm。先前研究指出，在金屬表面附近的介質的介電常數改變，不僅會導致表面電漿共振波長的紅位移，而且還會使局部電磁場增強^{58,59}。因此，在 AgNPs/GO 上形成 DMAB 使得銀奈米粒子之間的距離縮短，以及銀奈米粒子表面附近介質的介電常數增加。這些影響應該同時加強 GO 奈米薄片表面上的銀奈米粒子附近的局部電磁場。並且顯著地提升 4-NTP 的二聚化反應和 DMAB 的 SERS 量測⁶⁰。

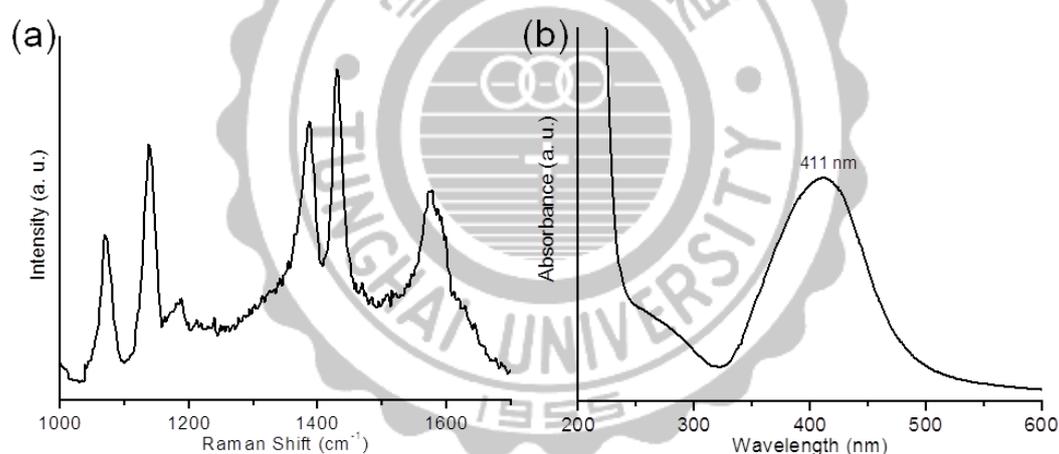


圖 4-5 官能化 DMAB 的銀奈米粒子的(a)拉曼光譜和(b)UV/vis 吸收光譜圖。拉曼光譜在液相下使用功率 1.5 mW 的 532 nm 雷射，積分時間為 1 秒的條件進行量測。關於官能化 DMAB 的銀奈米粒子，將 1 ml 的銀奈米粒子水溶液和 0.5 ml 的 4-NTP 乙醇溶液 (0.02 M) 相混合後保持 20 分鐘，之後將混合溶液用氬燈照射 5 分鐘，以 15,000 rpm 離心 20 分鐘。收集含有官能化 DMAB 的銀奈米粒子的沉澱固體，然後用乙醇離心清洗去除任何沒有結合的 4-NTP 分子。最後官能化 DMAB 的銀奈米粒子重新分散在水中形成穩定的分散液，將得到的溶液用在拉曼光譜和 UV/vis 吸收光譜實驗。

圖 4-6 顯示形成 DMAB 的 AgNPs/GO 的隨時間變化的 SERS 光譜圖，在 NaBH₄ 溶液 (0.1 M) 存在下持續曝露在 532 nm 的雷射下。當雷射照射的時間增加，DMAB 的拉曼特徵峰強度逐漸減弱，並且最終位在 1142 cm⁻¹ 的 β (CH) 以及 1389 和 1437 cm⁻¹ 的 ν (N=N) 訊號消失。此外，在 1078 和 1574 cm⁻¹ 的訊號峰分別移動到 1080 和 1592 cm⁻¹。這兩個轉變的訊號峰可以認定是對-氨基苯硫酚(4-ATP)的拉曼特徵峰⁶¹。其結果在還原劑存在下 DMAB 成功轉換成 4-ATP⁶²。同時還發現在 AgNPs/GO 上的 DMAB 還原速率明顯和雷射功率有關。如圖 4-6(b) 所示，當雷射功率為 1.5 mW 時，DMAB 還原反應可以在 30 秒內完成。在較高功率的雷射照射下，DMAB 還原完成所需反應時間較短，可以歸因於較強的電磁場和局部表面電漿共振在 GO 奈米薄片上 AgNPs 附近產生⁶³。DMAB 還原成 4-ATP 導致相鄰銀奈米粒子通過 N=N 雙鍵的連結不再存在，並且因此使相鄰銀奈米粒子之間間隙恢復到初始狀態。

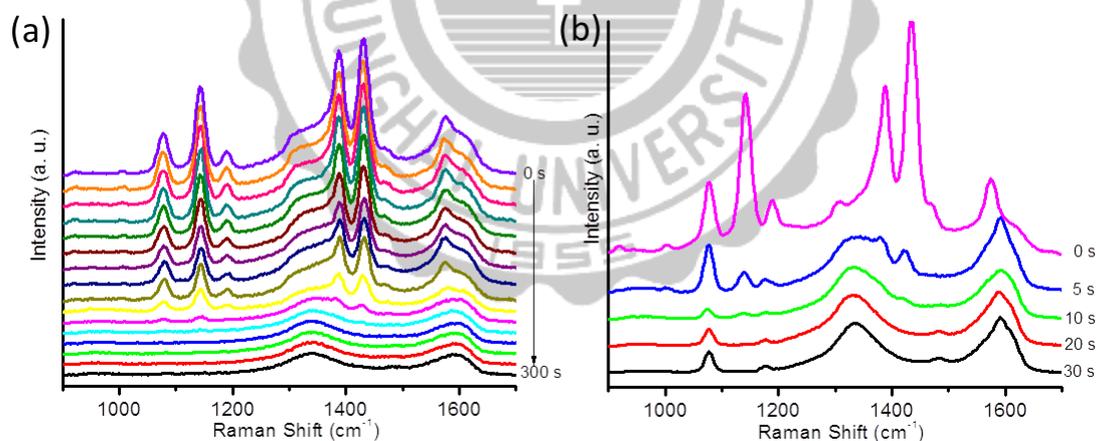


圖 4-6 形成 DMAB 的 AgNPs/GO 在 NaBH₄ 溶液存在下，以 532 nm 雷射照射的時間相關性 SERS 光譜圖。光譜量測時使用的雷射功率分別是(a)1 mW 和(b)1.5 mW。

根據圖 4-7，在 NaBH₄ 溶液下的官能化 DMAB 的 AgNPs/GO 的 UV/vis 吸收光譜圖能夠支持上述說法。如圖 4-7(b)，經過 60 秒的照光後，在 AgNPs/GO 上

DMAB 還原成 4-ATP 完成。照光後的溶液的 UV/vis 吸收光譜顯示，與官能化 DMAB 的 AgNPs/GO 的吸收光譜 (圖 4-4(d)) 相比較，形成 4-ATP 的 AgNPs/GO 的最大表面電漿共振吸收藍位移至 401 nm。這是因為還原反應恢復了 GO 奈米薄片上相鄰的銀奈米粒子之間的距離。如圖 4-7(c)和圖 4-7(d)所示，可以注意到即使是限制照光，當 NaBH_4 存在下，AgNPs/GO 上的 DMAB 仍會緩慢地轉化成 4-ATP。相較之下，經過連續照光可以加速在 NaBH_4 溶液中 AgNPs/GO 上的 DMAB 還原速率 (圖 4-7)。DMAB 還原速率明顯地差異可以說明通過照光使電磁場增強能有效地提高在 AgNPs/GO 上 DMAB 轉化成 4-ATP 的速率。藉由光照，由表面電漿共振產生的熱電子能在質子源下驅動 DMAB 還原⁵⁰。

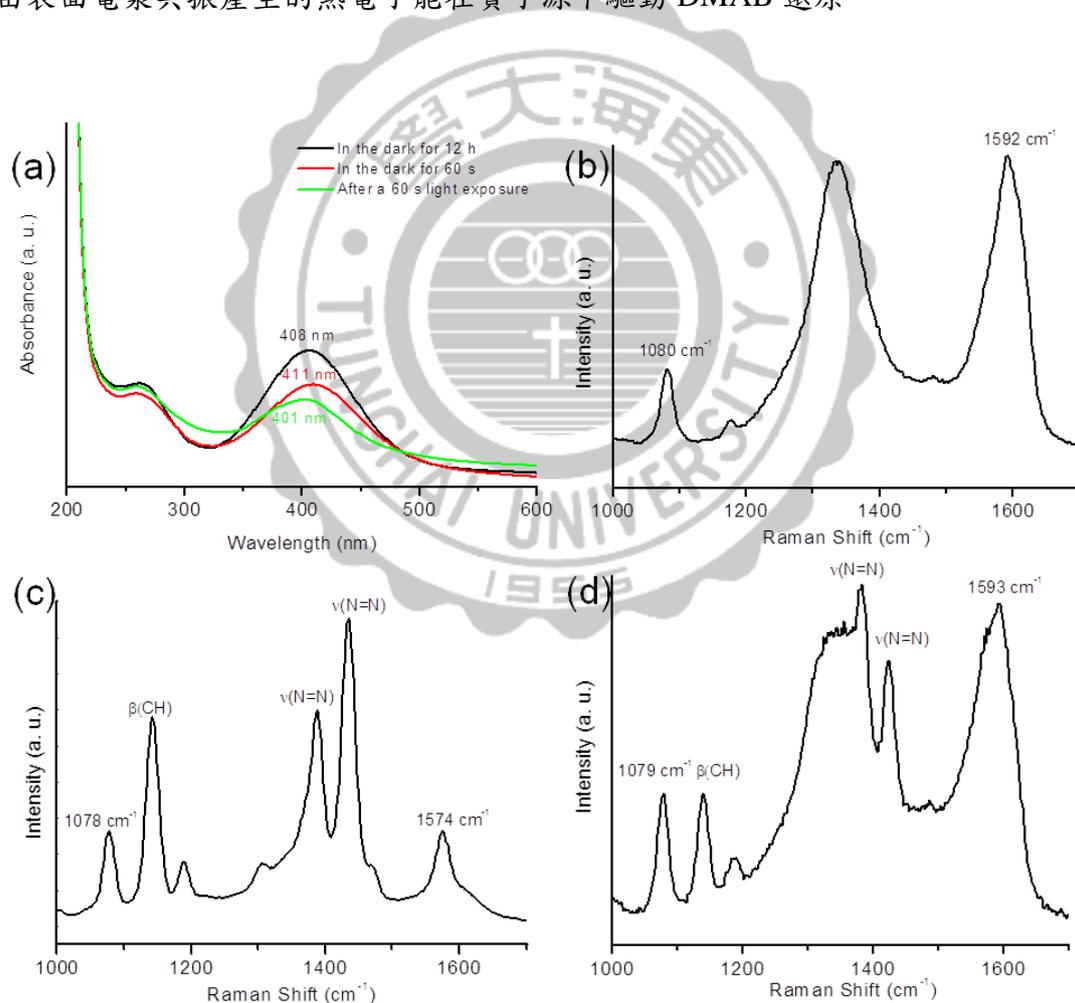


圖 4-7 (a)分散在 NaBH_4 溶液中的 DMAB 官能化 AgNPs/GO 的 UV/vis 吸收光譜圖。DMAB 官能化 AgNPs/GO 的拉曼光譜分別測量(b)照光 60 秒後，(c)黑暗中 60 秒後，以及(d)在黑暗中 12 小時。拉曼量測樣品的製備，將 SiO_2/Si 基板浸

入 UV/vis 吸收光譜實驗的溶液中，將 DMAB 官能化 AgNPs/GO 沉積在基板上。拉曼光譜使用功率為 1.5 mW 的 532 nm 雷射，積分時間為 1 秒的條件進行量測。

最近的研究顯示，在 AgNPs 上 DMAB 和 4-ATP 之間的轉變是可逆反應^{50,64}。文中，我們試圖展示 4-ATP 和 DMAB 之間完整的氧化還原循環在單一 AgNPs/GO 表面。圖 4-8(a) 為 4-ATP 的時間相關性 SERS 光譜圖，使用功率 1 mW 的 532 nm 雷射連續照射。隨著雷射照射時間增加，在 1388 和 1437 cm^{-1} 處的兩峰由於 $\nu(\text{N}=\text{N})$ 開始出現以及強度逐漸增強。訊號強度在 60 秒達到最大。如圖 4-8(b) 所示，同樣在雷射下照射 60 秒，由 4-ATP 轉變成 DMAB 的 SERS 光譜強度與由 4-NTP 轉變成 DMAB 的 SERS 光譜強度相差不大。因為這些電漿驅動化學反應是使用相同的 AgNPs/GO 基板進行，由上述結果表示，4-NTP 分子進行的二聚化反應的數量應該與 4-ATP 分子進行二聚化反應的數量接近。因此，可以斷定在前述中 DMAB 轉化成 4-ATP 的反應應該是接近完全。除此之外，4-NTP 轉變成 DMAB 的反應與 4-ATP 轉變成 DMAB 的反應速率幾乎相同，在雷射照射 60 秒後訊號強度達到最大。

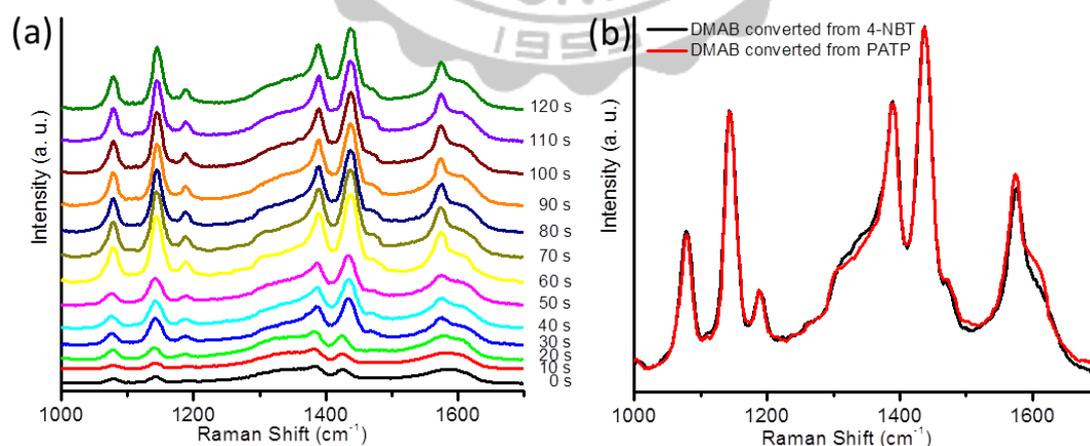


圖 4-8 (a)4-ATP 在 AgNPs/GO 上的時間相關性 SERS 光譜圖。(b)由 4-ATP 轉變成 DMAB 和由 4-NTP 轉變成 DMAB 的 SERS 光譜強度比較圖。

4-2-2 官能化 DMAB 的 AgNPs/GO 作為高靈敏度偵測器

根據上述的 UV/vis 吸收光譜的實驗表明，表面形成 DMAB 的 AgNPs/GO 可誘導 AgNPs 附近的局部電磁場增強，這似乎顯示官能化 DMAB 的 AgNPs/GO 比起先前合成的 AgNPs/GO 能作為更為靈敏的 SERS 平台。使用官能化 DMAB 的 AgNPs/GO 去偵測一個常使用在 SERS 技術的典型有機分析物羅丹明 6G(R6G) 來調查這個平台的偵測能力。將 R6G 的乙醇溶液(10^{-6} M)滴在 SERS 活性基板，乾燥後記錄拉曼光譜。如圖 4-9(a)所示，在 GO 中沒有觀察到明顯的 R6G 拉曼特徵峰；相比之下，在 AgNPs/GO 上所量測的 R6G 拉曼光譜顯示很強的 R6G 拉曼訊號和很高的訊號雜訊比。其 771 cm^{-1} 處的訊號來自氧雜蒽 (xanthene) 框架上朝平面外的氫原子，而在 611 cm^{-1} 處的訊號來自氧雜蒽環的彎曲^{65,66}。先前的研究表明，R6G 分子吸附在石墨烯表面上產生的 SERS 增強可以歸究兩個因素，分別是在石墨烯表面上發生螢光淬滅 (fluorescent quenching) 和化學增強³²。當然，眾所皆知的是，化學增強和電磁增強相比下是較微弱的⁶⁷。對於 AgNPs/GO 基板，石墨烯的螢光淬滅和銀奈米粒子的電磁增強的結合，導致 R6G 優異的 SERS 訊號。值得注意的是，和 GO 以及 AgNPs/GO 相比，DMAB 官能化 AgNPs/GO 顯示出更好的 SERS 增強 (圖 4-9(a)，圖 4-10)。

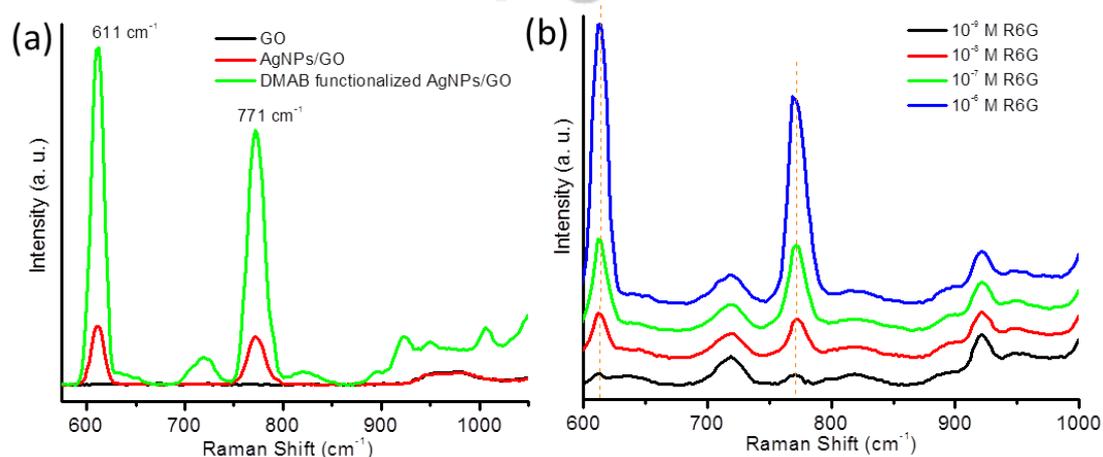


圖 4-9 (a)不同 SRES 平台偵測 R6G 10^{-6} M 的 SERS 光譜圖。(b)不同濃度的 R6G 在官能化 DMAB 的 AgNPs/GO 上的 SERS 光譜圖。

在圖 4-10 中，即使是在 10^{-6} M 濃度下仍可以清楚地觀察到 R6G 所有的拉曼特徵峰，並且能與 DMAB 的拉曼特徵峰輕易地做區別。在 DMAB 官能化 AgNPs/GO 上 R6G 的峰值強度 (611 cm^{-1}) 經過積分計算，約比 AgNPs/GO 要高出 7 倍。吸附在 DMAB 官能化 AgNPs/GO 上 R6G 的 SERS 訊號明顯增強可能因為經由在 AgNPs/GO 表面形成 DMAB 使 AgNPs 彼此之間的距離拉近導致局部電磁場增強所造成。此外，另一個造成 SERS 增強的貢獻，可能是因為 DMAB 官能化 AgNPs/GO 的表面電漿共振波長與實驗中使用的 532 nm 雷射有更好的疊加所導致。在 AgNPs/GO 表面上形成 DMAB 使表面電漿共振波長更加靠近雷射激發波長，因而導致局部電磁場增強^{60,68}。如圖 4-9(b)所示，在 DMAB 官能化 AgNPs/GO 表面上，即使 R6G 的濃度只有 1 nM 仍可以清楚地觀察到一些 R6G 的 SERS 訊號。這一結果顯示，DMAB 官能化 AgNPs/GO 可以做為高靈敏度的偵測平台。

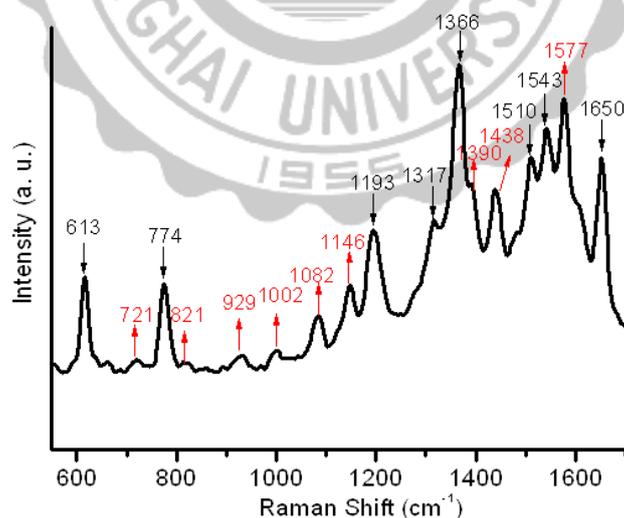


圖 4-10 調查 DMAB 官能化 AgNPs/GO 的 SERS 性能而偵測 10^{-6} M 的 R6G 乙醇溶液。紅色和黑色的箭頭分別表示 DMAB 和 R6G 的拉曼特徵峰。

為了證實在 AgNPs/GO 表面形成 DMAB 對於 R6G 分子的拉曼訊號增強是不

可或缺的，我們進行獨立的實驗，在 AgNPs/GO 表面官能化 4-ATP 分子作為 SERS 基板。由圖 4-11 可知，當在 4-ATP 官能化 AgNPs/GO 上的 R6G 濃度為 10^{-7} M 時，只能觀察到 4-ATP 分子的拉曼特徵峰。此外，在 4-ATP 官能化 AgNPs/GO 上所觀察到拉曼特徵峰的 R6G 最低濃度為 10^{-6} M。由 4-ATP 官能化 AgNPs/GO 的吸收光譜可以證明(圖 4-7(a))，當 AgNPs/GO 表面的 DMAB 轉變成 4-ATP，AgNPs 之間距離的改變和周圍介電常數的增加將會消失。同時，在 GO 表面的 AgNPs 的最大表面電漿共振波長會遠離 SERS 實驗使用的雷射激發波長。因此，4-ATP 官能化 AgNPs/GO 顯示比 DMAB 官能化 AgNPs/GO 要差的偵測極限。這結果進一步證明，在 AgNPs/GO 表面形成 DMAB 對於 R6G 分子的拉曼訊號增顯是有正面幫助的。

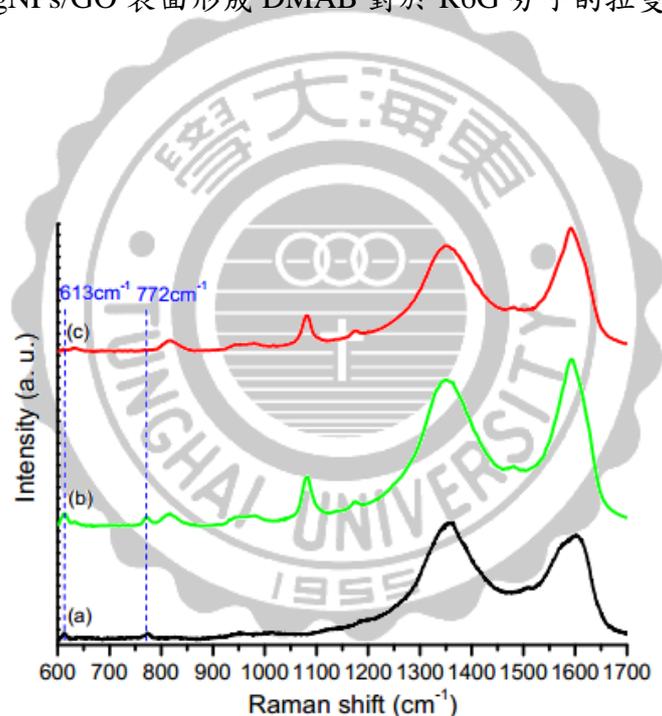


圖 4-11 (a) 10^{-6} M 的 R6G 在 AgNPs/GO 上。(b) 10^{-6} M 和(c) 10^{-7} M 的 R6G 在 4-ATP 官能化 AgNPs/GO 上的 SERS 光譜圖。532 nm 雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 5 秒。

4-3 結語

本研究中我們在單一的 AgNPs/GO 奈米薄片上進行了連續的轉換

(4-NTP→DMAB→4-ATP→DMAB) 來證明 AgNPs/GO 奈米薄片不只是能夠有效地催化分子的轉換，同時通過 GO 奈米薄片上的 AgNPs 的 SPR 能夠靈敏地偵測吸附分子的結構變化。在充分的 SERS 實驗所得出的結論是，GO 可以作為理想的 AgNPs 集中器，使密集的 AgNPs 吸附在 GO 表面，並且允許 4-NTP 在表面上迅速進行反應轉變成 DMAB。除此之外，在 AgNPs/GO 表面上形成 DMAB 經過 UV/vis 吸收光譜確認後發現 AgNPs 附近的局部電磁場有增強的現象。與 AgNPs/GO 比較，可以發現 DMAB 官能化 AgNPs/GO 的最大表面電漿共振吸收波長出現紅位移。DMAB 的形成不只減少 GO 表面上相鄰的 AgNPs 之間的距離，同時增加 AgNPs 周圍的介電常數。這些影響導致 DMAB 官能化 AgNPs/GO 的最大表面電漿共振波長紅位移，並且提升 AgNPs 附近的局部電磁場。另一方面，硼氫化鈉的加入雖然在黑暗中可能導致微量 DMAB 的還原，但是 DMAB 的還原速率仍是可經由照光並且和取決雷射功率來顯著地提升。當 DMAB 轉變成 4-ATP 時，最大表面電漿共振吸收出現藍位移，這說明 GO 表面上的 AgNPs 之間的距離恢復到初始狀態。經過 4-ATP 的時間動態 SERS 實驗，完整進行了 4-ATP 和 DMAB 之間的氧化還原循環，可以知道 4-ATP 轉變成 DMAB 的速率與 4-NTP 轉變成 DMAB 的速率相差無幾。最後，我們成功地證明了 AgNPs/GO 的 SERS 活性可以經過在表面上形成 DMAB 能夠顯著地增加。當 DMAB 官能化 AgNPs/GO 作為 SERS 基板時，R6G 的偵測靈敏度比起先前合成的 AgNPs/GO 提高了 3 個數量級。如此優異的 SERS 性能說明，DMAB 官能化 AgNPs/GO 展現了作為生物感測器的良好應用潛力。

第 5 章 在 AgNPs/GO 表面上修飾 4-ATP 對於特 定官能基分子的選擇性偵測

在上一章節中，成功的進行電漿驅動催化反應將 4-硝基苯硫酚 (4-NTP) 或 4-氨基苯硫酚 (4-ATP) 轉變成 p, p'-二巰基偶氮苯 (DMAB)，並在硼氫化鈉存在下，將 DMAB 還原成 4-ATP。從實驗結果可以得出結論，形成 N=N 的二聚化反應必須由相同官能基 (NO₂ 或 NH₂) 才能進行，同時經提供質子源可以將 N=N 還原成 NH₂。利用這一前提設計針對 NH₂ 官能基具有選擇性的偵測平台，在預先合成的 AgNPs/GO 上修飾 4-ATP，藉由 NH₂ 的二聚化反應，偵測具有 NH₂ 官能基的分子。

5-1 材料鑑定

詳細請參閱 3-1 材料鑑定。

5-2 拉曼光譜實驗

5-2-1 偵測具 NH₂ 官能基分子和偵測平台重複利用性測試

本章節研究中，首先選用 3-氨基吡啶 (3-aminopyridine, 3-AP) 作為待測分子。將 3-AP 水溶液 (0.001 M) 滴在修飾 4-氨基苯硫酚 (4-ATP) 的銀奈米粒子/氧化石墨烯 (AgNPs/GO) 的基板表面，其結果如圖 5-1 所示。在滴上 3-AP 水溶液之前，低濃度 4-ATP (1×10^{-7} M) 修飾下，拉曼光譜僅顯示在 1350 cm⁻¹ 和 1600 cm⁻¹ 處的典型 GO 的 D 帶和 G 帶，這表示在 AgNPs/GO 表面低濃度的 4-ATP 數量稀少，彼此之間距離較遠，而無法順利轉變成 DMAB；就算有轉變成 DMAB，在 AgNPs/GO 表面可能數量也是相當稀少，以致於無法在拉曼光譜中觀察到。

SERS 基板滴上 3-AP 水溶液後，在 3-AP 分子存在下經過雷射照射，獲得跟初始修飾過基板完全不同的 SERS 光譜圖。其在 848 cm⁻¹ 處出現訊號，與 3-AP

位在 842 cm^{-1} 的 C-NH_2 的 $\nu(\text{CN})$ 振動模式特徵峰接近⁶⁹，可能是由於鍵結導致的化學位移，其訊號出現能確認 3-AP 存在。除此之外，可以觀察到在 1386 cm^{-1} 和 1431 cm^{-1} 為 N=N 的特徵拉曼訊號，表明 NH_2 之間經過雷射照射下產生二聚化反應，同時也能在光譜中觀察到其他 DMAB 的特徵峰 (1074 cm^{-1} 、 1144 cm^{-1} 、 1189 cm^{-1} 和 1577 cm^{-1})，則表示 3-AP 成功與基板表面上的 4-ATP 反應形成 N=N 鍵結固定在 AgNPs/GO 表面上。

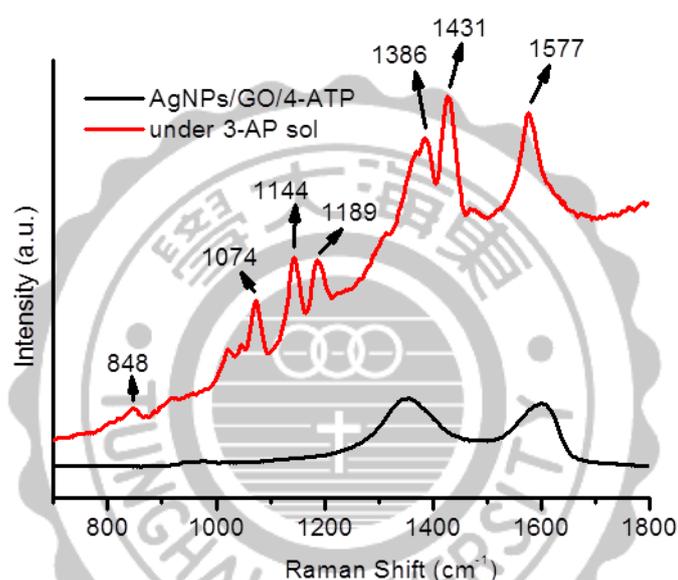


圖 5-1 分別為 P-ATP 官能化 AgNPs/GO(黑色線)以及在 3-AP 水溶液(0.001 M)下(紅色線)所獲得的 SERS 光譜。拉曼光譜使用波長為 532 nm 雷射，雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 1 秒。

上個章節的研究結果指出，DMAB 在的硼氫化鈉的環境下，提供充足的質子源經過光照後，其 N=N 雙鍵會斷開還原成 NH_2 。設想已鍵結 3-AP 的 SERS 基板能以相同的方式恢復為初始狀態，得到能再次使用的偵測基板。將二聚化後的 SERS 基板以去離子清洗，去除表面額外未鍵結的 3-AP 分子，滴上硼氫化鈉水溶液做拉曼光譜，結果如圖 5-2 所示。清洗過的 SERS 基板的拉曼光譜中能觀察到 850 cm^{-1} 處有微弱的訊號，其推斷是 3-AP 分子的 C-NH_2 的 $\nu(\text{CN})$ 振動模式，

以及 1300 cm^{-1} 和 1489 cm^{-1} 處拉曼訊號分別屬於 C-NH_2 的 $\nu(\text{CN})$ 和苯環上的 $\nu(\text{CC})$ 、 $\nu(\text{CN})$ 的振動模式⁶⁹，表明 3-AP 存在。另外，在拉曼光譜中同樣能觀察到 1389 cm^{-1} 和 1434 cm^{-1} 處的 N=N 雙鍵特徵峰，顯示二聚化反應確實產生，3-AP 分子順利固定在 SERS 基板上，同時經過清洗仍留下。

在硼氫化鈉的存在下所獲得的拉曼光譜可以發現到原先具有的拉曼訊號皆消失，只能觀察到 1350 cm^{-1} 和 1600 cm^{-1} 處的 GO 的帶 D 和 G 帶訊號。這一結果表示，3-AP 鍵結的 SERS 基板在硼氫化鈉的環境下，經過雷射照射後，DMAB 的 N=N 雙鍵會斷開還原成 NH_2 ，由於 SERS 基板恢復成初始狀態(官能化 4-ATP)，其變化則反映在拉曼光譜中。與一開始修飾低濃度的 4-ATP 的 AgNPs/GO 的拉曼光譜相同，並沒有觀察到 DMAB 的拉曼訊號，表示 AgNPs/GO 表面的 4-ATP 數量稀少，彼此無法二聚化形成 DMAB (另外是由於硼氫化鈉的存在)。

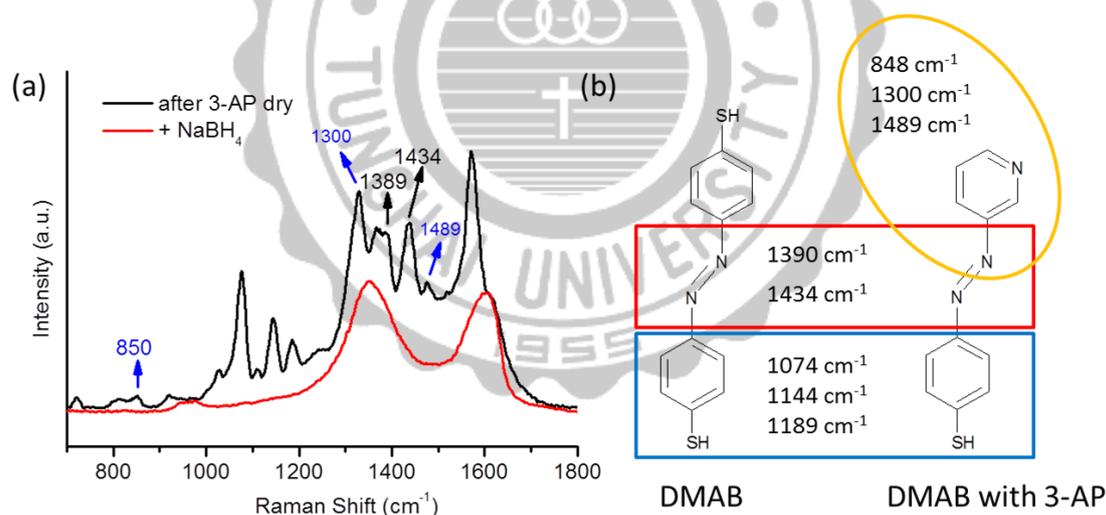


圖 5-2 (a)分別為在 3-AP 存在下經過二聚化反應後的 SERS 偵測基板，經過清洗的 SERS 光譜 (黑色線)，以及在硼氫化鈉存在下的二聚化後 SERS 偵測基板的 SERS 光譜 (紅色線)。(b)不同 DMAB 的結構式與拉曼訊號的振動模式貢獻區塊。拉曼光譜使用波長為 532 nm 雷射，雷射功率為 1.5 mW ，積分時間為 1 s 。

將經過硼氫化鈉處理的 SERS 基板以去離子水清洗，用氮氣吹乾後，進行拉

曼光譜和初始的 SERS 基板做比較。由圖 5-3 可以得知，由於兩者在 AgNPs/GO 上所修飾的 4-ATP 濃度相當低 (1×10^{-7} M)，以致於 4-ATP 彼此不會在表面上進行二聚化轉變成 DMAB，而不會觀察到 DMAB 的拉曼訊號。AgNPs/GO 的 D 帶和 G 帶強度相比下相差不大， I_D/I_G 比值分別為 1.089 和 1.091，這個結果顯示在經過 3-AP 與基板表面的 4-ATP 二聚化反應後，以硼氫化鈉處理打斷 N=N 雙鍵恢復初始 SERS 基板狀態，此過程對於 AgNPs/GO 的影響是微乎其微的，代表這個方式回收 SERS 基板再利用是可行的。

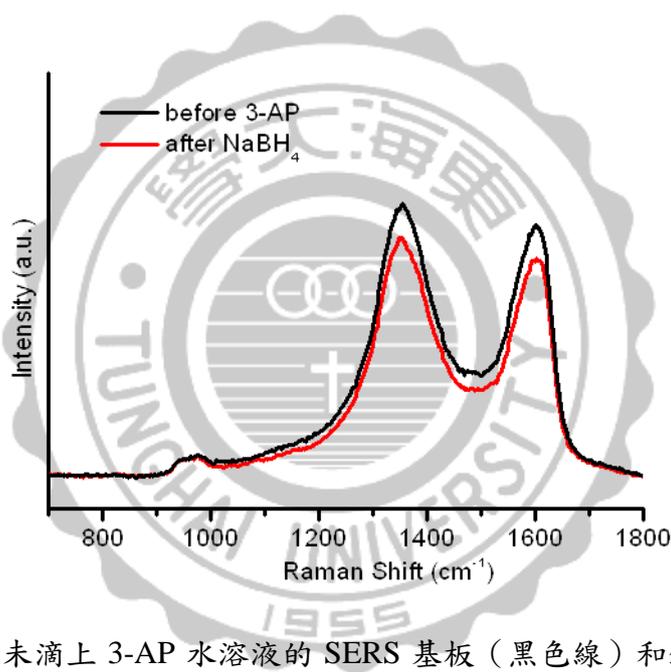


圖 5-3 比較初始未滴上 3-AP 水溶液的 SERS 基板 (黑色線) 和鍵結 3-AP 後經過硼氫化鈉處理的 SERS 基板 (紅色線) 的拉曼光譜。使用波長為 532 nm 雷射，雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 1 秒。拉曼光譜經過 Si 訊號歸一化。

為了確認經過硼氫化鈉處理的 SERS 基板是否能夠重複使用，在這裡選用另一個氨基丁酸 (γ -Aminobutyric acid, ABA) 作為待測物分子。將經過回收處理清洗後的 SERS 基板以氮氣吹乾，將 ABA 水溶液 (0.001 M) 滴在 SERS 基板上，進行拉曼光譜。結果如圖 5-4 所示，在 ABA 分子存在下，經過雷射照射，可以觀察到 1386 cm^{-1} 和 1431 cm^{-1} 處 N=N 雙鍵訊號的出現，確認 ABA 分子與基板表

面的 4-ATP 的 NH_2 官能基發生二聚化反應。除此之外，像是 1074 cm^{-1} 、 1140 cm^{-1} 和 1189 cm^{-1} 等 DMAB 的特徵訊號皆能在光譜中觀察到，由此可知，經過硼氫化鈉處理的 SERS 基板能夠再次作為偵測含 NH_2 官能基分子的偵測平台，AgNPs/GO 具有良好的再利用性。

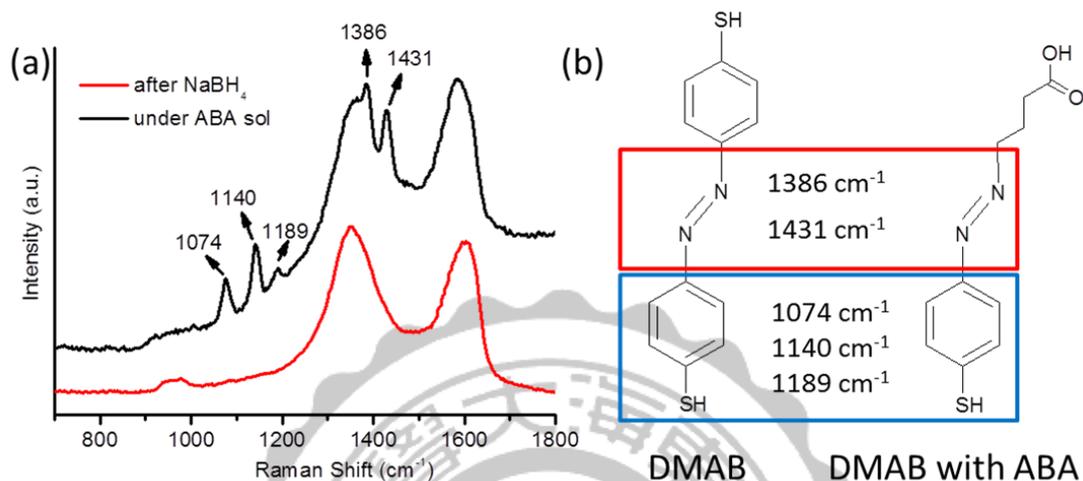


圖 5-4 (a)分別為重複試用的 SERS 基板(黑色線)和滴上 ABA 水溶液(0.001 M)的 SERS 基板(紅色線)的拉曼光譜。(b)不同 DMAB 的結構式與拉曼訊號的振動模式貢獻區塊。拉曼光譜使用波長為 532 nm 雷射，雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 1 秒。

5-2-2 特定官能基的選擇性偵測

上一小節中，我們成功的進行偵測與回收循環（偵測 3-AP→還原處理→偵測 ABA）在同一個 SERS 基板上，證明經過 4-ATP 官能化的 AgNPs/GO 可作為偵測帶 NH_2 官能基的分子，同時具有再利用性的 SERS 活性基板。為了再次確認 4-ATP 官能化的 AgNPs/GO 是否真的能夠選擇含有 NH_2 官能基的分子作偵測，這裡使用具 NO_2 官能基的硝基苯（Nitrobenzene, NB）做為控制實驗的待測物分子，與 3-AP 相比較。

實驗結果如圖 5-5 所示，以 3-AP 作為待測物分子所獲的拉曼光譜中，能觀察到 542 cm^{-1} 處 3-AP 的特徵峰，同時也能清楚地觀察到 DMAB 的特徵峰（ 1074

cm^{-1} 、 1142 cm^{-1} 、 1189 cm^{-1} 、 1389 cm^{-1} 、 1434 cm^{-1} 和 1575 cm^{-1})。同上述實驗，4-ATP 官能化的 AgNPs/GO 能有效作為偵測 3-AP 的 SERS 基板。與此不同的是，以 NB 作為待測物分子所獲得的拉曼光譜中，絲毫觀察不到 DMAB 該有的特徵訊號，甚至連 N=N 雙鍵的訊號也沒有，光譜中僅出現位在 1360 cm^{-1} 和 1600 cm^{-1} 處 GO 的 D 帶和 G 帶訊號。這結果證明，NB 分子無法與 AgNPs/GO 上的 4-ATP 進行二聚化反應形成 DMAB，由於 DMAB 的二聚化反應必須經由兩個相同的官能基 (NH_2 或 NO_2) 進行，顯示了 4-ATP 官能化的 AgNPs/GO 確實能作為特定官能基選擇性偵測平台。

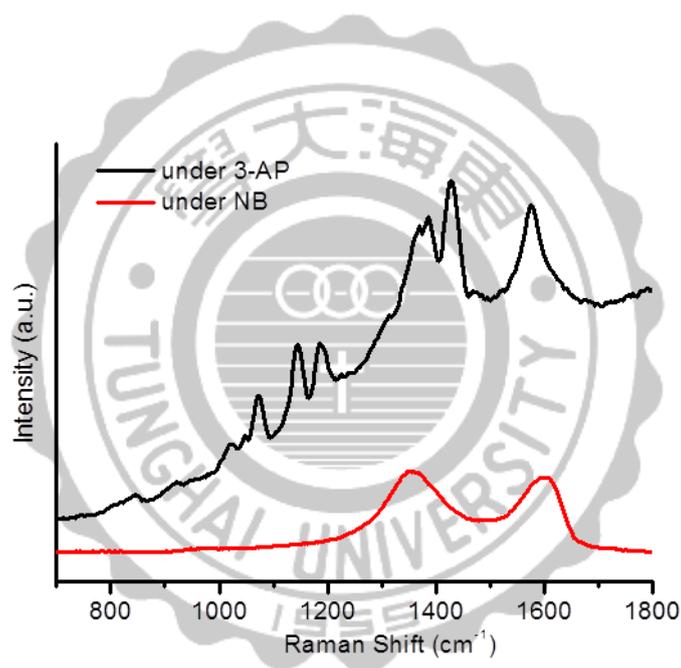


圖 5-5 分別為 SERS 基板用作偵測 3-AP (黑色線) 和 NB (紅色線) 的 SERS 光譜圖。拉曼光譜使用波長為 532 nm 雷射，雷射功率為 1.5 mW，積分時間為 1 秒。

5-3 結語

在這個章節，我們利用電漿驅動化學反應，利用 NH_2 二聚化反應成功的進行偵測與回收循環(偵測 3-AP→還原處理→偵測 ABA)在同一個 SERS 基板上。進行二聚化反應的 SERS 基板經過清洗後，仍可以在表面上觀察到 3-AP 分子以

及 DMAB 特有拉曼訊號，證明 N=N 雙鍵形成，3-AP 分子已固定在 AgNPs/GO 上，而經過硼氫化鈉處理，能夠有效還原 N=N 雙鍵使 SERS 基板恢復到初始狀態，能再次作為 NH₂ 官能基分子偵測平台。除此之外，經過 NO₂ 官能基分子控制實驗，也證明了該二聚化反應必須是由兩個相同官能基 (NH₂ 或 NO₂) 才可以進行，這顯示 4-ATP 官能化的 AgNPs/GO 確實能作為特定官能基選擇性偵測平台。



第 6 章 結論與未來工作

本研究提出了一個簡單的濕式方法將銀奈米粒子裝飾在 GO 奈米薄片表面成功合成出銀奈米粒子/氧化石墨烯複合材 (AgNPs/GO)。並且將此材料應用在高靈敏且具有專一性的 DNA 偵測，並且作為光驅動催化反應平台催化並偵測 4-NTP 分子在 AgNPs/GO 表面上的結構變化，同時結合這個光驅動催化反應作為具有特定官能基分子的選擇性感測器。

使用石墨烯作為基板具有合成方便且廉價的優點，同時在其表面裝飾 AgNPs 能夠很容易的將標定過的 DNA 序列組裝到基板上，經過 AgNPs 的電場增強，SERS 訊號強度在 AgNPs/GO 表面可以產生顯著地增強。除此之外，利用互補 DNA 序列彼此會產生雜合的特性，設計能夠在平台上產生雙奈米粒子系統藉此形成熱點來使 SERS 訊號更加提升，以便偵測出更低的 DNA 濃度，偵測極限可以達到 1 pM。並且根據改變所使用的探針 DNA 和標定分子，則能夠在相同的 SERS 平台上偵測複數的目標 DNA。最重要的是，這個方式不同於傳統螢光法偵測 DNA，可以克服相似螢光團訊號的干擾。

催化反應部分，我們在單一的 AgNPs/GO 奈米薄片上進行了連續的轉換 (4-NTP→DMAB→4-ATP→DMAB)。這個結果證明 AgNPs/GO 奈米薄片不只是能夠有效地催化分子的轉換，同時通過 GO 奈米薄片上的 AgNPs 的 SPR 能夠靈敏地偵測吸附分子的結構變化。在 AgNPs/GO 表面上形成 DMAB 經過 UV/vis 吸收光譜確認後發現 AgNPs 附近的局部電磁場有增強的現象。與 AgNPs/GO 比較，可以發現 DMAB 官能化 AgNPs/GO 的最大表面電漿共振吸收波長出現紅位移。DMAB 的形成不只減少 GO 表面上相鄰的 AgNPs 之間的距離，同時增加 AgNPs 周圍的介電常數。這些影響導致 DMAB 官能化 AgNPs/GO 的最大表面電漿共振波長紅位移，並且提升 AgNPs 附近的局部電磁場，這意味著 DMAB 官能化 AgNPs/GO 具有更為良好 SERS 活性。並且成功地證明了當 DMAB 官能化 AgNPs/GO 作為 SERS 基板時，R6G 的偵測靈敏度比起先前合成的 AgNPs/GO 提

高了 3 個數量級。

最後，利用電漿驅動化學反應機制，使 NH_2 官能基分子發生二聚化反應成功的進行偵測與回收循環（偵測 3-AP→還原處理→偵測 ABA）在同一個 SERS 基板上。進行二聚化反應的 SERS 基板經過清洗後，仍可以在表面上觀察到 3-AP 分子以及 DMAB 特有拉曼訊號，證明 $\text{N}=\text{N}$ 雙鍵形成，3-AP 分子已固定在 AgNPs/GO 上，而經過硼氫化鈉處理，能夠有效還原 $\text{N}=\text{N}$ 雙鍵使 SERS 基板恢復到初始狀態，能再次作為 NH_2 官能基分子偵測平台。除此之外，經過 NO_2 官能基分子控制實驗，也證明了該二聚化反應必須是由兩個相同官能基（ NH_2 或 NO_2 ）才可以進行，這顯示 4-ATP 官能化的 AgNPs/GO 確實能作為特定官能基選擇性偵測平台。以這個工作為基礎，是否能夠發展成偵測含有 NH_2 官能基生物分子如胺基酸的偵測平台，將會是未來研究之方向。



第 7 章 參考文獻

1. <http://mmrl.cgu.edu.tw/rehab/mme/rehab/organize/chap2/sensor/no2.htm>
2. Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. *Chem Rev.* **1999**, *99*, 2957–2976.
3. Baena, J. R.; Lendl, B. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8*, 534–539.
4. Chao, R. S.; Khanna, R. K.; Lippincott, E. R. *Journal of Raman Spectroscopy* **1975**, *3*, 121–131.
5. Willets, K.A.; Van Duyne, R.P. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267–297.
6. Faraday, M. *Philos. Trans.* **1857**, *147*, 145–181.
7. Mie, G. *Ann. Phys.* **1908**, *25*, 377–445.
8. Kreibig, U.; Vollmer, M. *Optical Properties of Metal Clusters* **1995**, *25*, 125.
9. Nath, N.; Chilkoti, A. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 504–509.
10. Chen, Y.; Munechika, K.; Jen-La Plante, I.; Munro, A. M.; Skrabalak, S. E.; Xia, Y.; Ginger, D. S. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *93*, 053106–053109.
11. Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 163–166.
12. Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1977**, *84*, 1–20.
13. Albrecht, M. G.; Creighton, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5215–5217.
14. 吳民耀; 劉威志 *物理雙月刊* **2006**, *廿八*, 486.
15. Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari R. R.; Feld M. S. *J. Phys.: Condens. Matter* **2002**, *14*, R597–R624.
16. <http://proj.ncku.edu.tw/research/articles/c/20130524/4.html>
17. Le Ru, E.C.; Etchegoin, P.G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6079.
18. Liz-Marzan, L.M. *Langmuir* **2006**, *22*, 32.

19. Lu, X. M.; Rycenga, M.; Skrabalak, S. E.; Wiley, B.; Xia, Y. N. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 167–192.
20. Lin, C.; Tao, K.; Hua, D.; Ma, Z.; Zhou, S. *Molecules* **2013**, *18*, 12609-12620.
21. Zhang, Z.; Wu, Y. *Langmuir* **2010**, *26*, 9214–9223.
22. Wang, C. C.; Luconi, M. O.; Masi, A. N.; Fernández, L. P. *Talanta* **2009**, *77*, 1238–1243.
23. Wan, M.; Liu, Z.; Li, S.; Yang, B.; Zhang, W.; Qin, X.; Guo, Z. *Applied Spectroscopy* **2013**, *67*, 761–766.
24. Goncalves, G.; Marques, P. A. A. P.; Granadeiro, C. M.; Nogueira, H. I. S.; Singh, M. K.; Grácio, J. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 4796–4802.
25. Tsvetkov, M. Y.; Khlebtsov, B. N.; Khanadeev, V. A.; Bagratashvili, V. N.; Timashev, P. S.; Samoylovich, M. I.; Khlebtsov, N. G. *Nanoscale Research Letters* **2013**, *8*:250
26. Ma, W.; Sun, M.; Xu, L.; Wang, L.; Kuang, H.; Xu, C. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4989-4991.
27. Hong, S.; Li, X. *Journal of Nanomaterials* **2013**, *2013*, Article ID 790323, 9 pages.
28. Gao, T.; Xu, Z.; Fang, F.; Gao, W.; Zhang, Q.; Xu, X. *Nanoscale Research Letters* **2012**, *7*, 399.
29. Oriňáková, R.; Škantárová, L.; Oriňák, A.; Demko, J.; Kupková, M.; Andersson, J. T. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 80–99.
30. Chervinskii, S.; Matikainen, A.; Dergachev, A.; Lipovskii, A. A.; Honkanen, S. *Nanoscale Res Lett.* **2014**, *9*, 398.
31. Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V.; Grigorieva, I. V.; Firsov, A. A. *Science* **2004**, *306*, 666.
32. Ling, X.; Xie, L.; Fang, Y.; Xu, H.; Zhang, H.; Kong, J.; Dresselhaus, M. S.;

- Zhang, J.; Liu, Z. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 553–561.
33. Wojcik, A.; Kamat, P. V. *ACS Nano* **2010**, *4*, 6697–6706.
34. Emery, J. D.; Wang, Q. H.; Zarrouati, M.; Fenter, P.; Hersam, M. C.; Bedzyk, M. *J. Surf. Sci.* **2011**, *605*, 1685–1693.
35. Park, S.; Dikin, D. A.; Nguyen, S. T.; Ruoff, R. S. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 15801–15804.
36. Xu, Y.; Zhao, L.; Bai, H.; Hong, W.; Li, C.; Shi, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13490–13497.
37. Wang, S.; Nai, C. T.; Jiang, X.-F.; Pan, Y.; Tan, C.-H.; Nesladek, M.; Xu, Q.-H.; Loh, K. P. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, 2332–2336.
38. Ng, Y. H.; Lightcap, I. V.; Goodwin, K.; Matsumura, M.; Kamat, P. V. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2222–2227.
39. Park, S.; Ruoff, R. S. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 217–224.
40. Murphy, S. Huang, L. Kamat, P. V. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 4740–4747.
41. He, S.; Liu, K. K.; Su, S.; Yan, J.; Mao, X.; Wang, D.; He, Y.; Li, L.-J.; Song, S.; Fan, C. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4622–4627.
42. Su, C.-Y.; Xu, Y.-P.; Zhang, W.-J.; Zhao, W.-J.; Tang, X.-H.; Tsai, C.-H.; Li, L.-J. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 5674.
43. Lin, T.-W.; Su, C.-Y.; Zhang, X.-Q.; Zhang, W.; Lee, Y.-H.; Chu, C.-W.; Lin, H.-Y.; Chang, M.-T.; Chen, F.-R.; Li, L.-J. *Small* **2012**, *8*, 1384–1391.
44. Sun X.; Liu Z.; Welsher, K.; Robinson, J. T.; Goodwin, A.; Zaric, S.; Dai, H. *Nano Res.* **2008**, *1*, 203–212.
45. Pasricha, R.; Gupta, S.; Srivastava, A. K. *Small* **2009**, *5*, 2253–2259.
46. Jasuja, K.; Berry, V. *ACS Nano* **2009**, *3*, 2358–2366.
47. Kim, Y.-K.; Na, H.-K.; Lee, Y. W.; Jang, H.; Han, S. W.; Min, D.-H. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3185–3187.

48. Hsieh, C.-W.; Lin, P.-Y.; Hsieh, S. *J. Nanophoton.* **2012**, *6*, 063501.
49. Zayats, A. V.; Smolyaninov, I. I.; Maradudin, A. A. *Phys. Rep.* **2005**, *408*, 131.
50. Xu, P.; Kang, L.; Mack, N. H.; Schanze, K. S.; Han, X.; Wang, H.-L. *Scientific Reports* **2013**, Article number 2997.
51. Sun, M. T.; Xu, H. *Small* **2012**, *8*, 2777–2786.
52. Yadav, B. S.; Ali, I.; Kumar, P.; Yadav, P. *Indian J. Pure & Appl. Phys.* **2007**, *45*, 979–983.
53. Lang, X.-F.; Yin, P.-G.; Tan, E.-Z.; You, T.-T.; Guo, L. *J. Raman Spectrosc.* **2013**, *44*, 425–432.
54. Huang, Y.; Fang, Y. R.; Yang, Z.; Sun, M. T. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 18263–18269.
55. Sun, M. T.; Zhang, Z. L.; Zheng, H. R.; Xu, H. *Scientific Reports* **2012**, Article number:647.
56. Hu, M.; Ghoshal, A.; Marquez, M.; Kik, P. G. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 7509–7514.
57. Okamoto, T.; Yamaguchi, I. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 10321–10324.
58. Jain, P. K.; El-Sayed, M. A. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 4347–4352.
59. Kinnan, M. K.; Kachan, S.; Simmons, C. K.; Chumanov, G. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 7079–7084.
60. Dai, Z. G.; Xiao, X. H.; Zhang, Y. P.; Wu, W.; Zhang, S. F.; Zhou, J.; Mei, F.; Jiang, C. Z. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 335701.
61. Fang, Y. R.; Li, Y.; Xu, H.; Sun, M. T. *Langmuir* **2010**, *26*, 7737–7746.
62. Xie, W.; Walkenfort, B.; Schlücker, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1657–1660.
63. Kang, L.; Xu, P.; Zhang, B.; Tsai, H.; Han, X.; Wang, H.-L. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3389–3391.
64. Kim, K.; Kim, K. L.; Shin, K. S. *Langmuir* **2013**, *29*, 183–190.

65. Xie, L.; Ling, X.; Fang, Y.; Zhang, J.; Liu, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9890–9891.
66. Rout, C. S.; Kumar, A.; Xiong, G.; Irudataraj, J.; Fisher, T. S. *Appl. Phys. Lett.* **2010**, *97*, 133108.
67. Ko, H.; Singamaneni, S.; Tsukruk, V. V. *Small* **2008**, *4*, 1576–1599.
68. Kwon, Y.-H.; Ossig, R.; Hubenthal, F.; Kronfeldt, H.-D. *J. Raman Spectrosc.* **2012**, *43*, 1385–1391.
69. Fang, C.; Wu, G. *Spectrochimica Acta Part A* **2008**, *71*, 1588–1593.

