

以單寧酸作為還原劑和保護劑的金奈米粒子用於比色檢測泰勒菌素

李冠宏、邱泰嘉*

國立臺東大學應用科學系

摘要

本研究開發一種簡單的比色探針用於檢測泰勒菌素 (Tylosin)，以單寧酸 (Tannic acid, TA) 取代傳統合成金奈米粒子 (Gold Nanoparticles, AuNPs) 的化學方法 (Turkevich 合成法 AuNPs@citrae) (Shi, Buhler, Boué, & Carn, 2017) 中的檸檬酸鈉(Sodium citrate)，將其作為還原劑和保護劑，使四氯金酸(Gold (III) chloride trihydrate)還原成金奈米粒子。單寧酸合成出的金奈米粒子(TA-AuNPs)會因為添加的單寧酸濃度不同，會產生不同顏色，單寧酸濃度過高；顏色會呈現藍色，濃度過低；顏色會呈現藍紫色，若介於之間會呈現紫紅色。當加入泰勒菌素後，溶液顏色會由紫紅色變成淡粉色，可由紫外光-可見光吸收光譜發現金奈米粒子的吸收峰 540 nm 會下降，且吸收峰會變平緩，這是由於加入泰勒菌素後，會使得原本分散在溶液中的 TA-AuNPs 產生聚集。在最佳條件下，檢測泰勒菌素的線性範圍為 0.8~10 μM ， $R^2=0.998$ ， $\text{LOD}=0.399 \mu\text{M}$ 。此檢測方法具簡單且快速合成、簡易檢測、具有良好的選擇性和靈敏度。因此，本研究提出了一種新穎的比色檢測泰勒菌素的方法，並成功應用於檢測水樣中的泰勒菌素。

關鍵字：比色法、金奈米粒子、單寧酸、泰勒菌素

Colorimetric detection of tylosin based on gold nanoparticles using tannic acid as reducing and stabilizing agent

Kuan-Hung Lee, Tai-Chia Chiu*

Department of Applied Science, National Taitung University.

Abstract

The paper reports a simple method for the synthesis of stable and spherical gold nanoparticles (AuNPs) using tannic acid (TA) as both the reducing and stabilizing agent. The nanoparticles are characterized by UV-Vis spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), and dynamic light scattering (DLS) analysis. The influence mole ratio of TA and Au^{3+} and synthesized time on the control of size of TA-AuNPs is investigated. Upon an increase in the concentration of tannic acid, there is a shift in the shape of nanoparticles as evidenced by the change in bandwidth and peak position of the surface plasmon resonance (SPR) band. In the presence of tylosin, the color of TA-AuNPs was changed from red to light pink. The UV-Vis absorption spectra showed that the absorbance of the characteristic peak of TA-AuNPs at 540 nm was decreased owing to the aggregation of TA-AuNPs. Under the optimal conditions, the linear range of tylosin was from 0.8 μM to 10 μM with $R^2 = 0.998$. The calculated LOD was down to 0.399 μM . The approach was also successfully applied for the detection of tylosin in water samples with satisfactory recoveries.

Keywords: Colorimetric method, Gold nanoparticles, Tannic acid, Tylosin

李冠宏，國立臺東大學應用科學系學生。E-mail：10710212@gm.nttu.edu.tw

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

壹、前言

奈米(nanometer, nm)，為長度的單位，為 10^{-9} 公尺。奈米材料的定義為至少一個維度小於 100 nm 的奈米結構。因為表面原子數與表面積與體積比急速增加，使奈米材料的某些特殊物理及化學性質會有大幅度的變化，這些具有特殊性質的奈米科技在各領域之中都發揮著重要的作用，而且不侷限於化學領域，物理、醫學、材料、食品加工業、電子、能源、光電和感測，現在處處可見奈米科技的存在且已經開發出各種金屬和金屬氧化物奈米材料並廣泛的應用。

在各式各樣的奈米粒子之中，以金奈米粒子的應用較為廣泛，因為其具有獨特的光學性質(Singla, et al. 2020; Li, et al. 2019)、電子性質(Teranishi 2003)、優良的抗菌能力(Dharul Salam, et al. 2020; Manuel Xavier, et al. 2020)與良好的生物相容性(Jadhav, et al. 2018; Kumar, et al. 2020)，使其成為最廣泛被研究的金屬奈米材料。

單寧酸(tannic acid, 簡稱 TA)是一種天然的多酚，通常被認為是沒食子醯葡萄糖，但可能有不同數量的沒食子醯基附著在中心葡萄糖單元上(Lopes, et al. 1999)，這取決於從中分離的植物的性質(Liang, et al. 2021; Mueller-Harvey 2001)。其主要存在於許多植物中，具弱酸性， $pK_a = 6$ 。單寧酸被發現是一種有效的抗氧化劑(Gülçin, et al. 2010)，且表現出多種可能對人類健康有益的生物活性，包括：抗腫瘤、抗菌、抗誘變劑和抗氧化活性(Aelenei, et al. 2009; Andrade Jr, et al. 2005; Nepka, et al. 1999)。此外，其被美國食品藥品監督管理局(FDA)認可為安全的化合物，可直接用於藥物中(Sahiner, et al. 2016)。

貳、文獻回顧

2018 年由 Shen-Ming Chen 教授團隊與 Ming-Chin Yu 教授團隊，開發一步綠色合成單寧酸(TA)穩定的金奈米粒子，並結合電化學方法，用於檢測食物中甲基巴拉松(methyl parathion, MP)。製備的 TA@AuNPs/GCE 對甲基巴拉的測定線性範圍為 $0.033\sim 167.7\ \mu\text{M}$ ， R^2 為 0.9943，LOD 為 10.5 nM，對 MP 具有優異的電催化活性。TA@AuNPs 對 MP 的檢測快速，線性範圍寬，偵測極限低，優於許多傳統材料和常規合成的 AuNPs。這些優點使 TA@AuNPs 成為潛在的電催化劑，用於高靈敏度定量測定食品和水樣中的 MP 濃度。(Balasubramanian, et al. 2018)

2019 年 Adina Boldeiu 團隊，使用傳統的 Turkevich 合成法 (AuNPs@citrates) 和綠色替代的蜂蜜介導合成法 (AuNPs@honey) 合成金奈米粒子，並加入含 fetal bovine serum (FBS)的 dulbecco's modified eagle medium (DMEM)培養基和 Roswell Park Memorial Institute (RPMI)培養基中，比較分析培養基的組成如何影響其穩定性。兩種合成法所合成的金奈米粒子大小分別都在 9 至 18 nm 之間，而吸收值分別為 525 nm (AuNPs@citrates) 和 530 nm (AuNPs@honey)。體外細胞毒性研究證明，AuNPs@honey 的毒性較小，最高可達 $15\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ，與 AuNPs @citrates 相比，L929 細胞對 AuNPs@honey 的凋亡誘導的抵抗力比較強。因此，發現蜂蜜介導的金奈米粒子的毒性趨勢取決於細胞類型，奈米粒子的濃度和暴露時間，並使其成為未來生物醫學應用的可行綠色替代品。(Boldeiu, et al. 2019)

2020 年 Jaron Jakmunee 教授團隊，開發一種使用芘陽離子探針(CPP)和金奈米粒子所結合的 AFB1 適體比色感測器，並結合自製的 LED-LDR 比色計，用來快速檢測黃麴毒素 B1。所合成的 CPP 在 495 nm 激發波長下，在 550 nm 放射有最強螢光，檸檬酸合成出的金奈米粒子，平均粒徑為 12.6 nm，在 520 nm 吸收波長下有最強吸收。黃麴毒素 B1 檢

測最佳條件：CPP 為 1000 nM，AFB1 適體為 10 nM，20 mM 的 HEPES 緩衝液，pH 值為 7.4，以及 300 μ L AuNPs (11.4 nM)。所得到的線性範圍為 1–10 ng/mL， R^2 為 0.996，LOD 為 0.36 ng/mL，使用自製的 LED-LDR 比色計，線性範圍為 1~6 ng/mL， R^2 為 0.996，LOD 為 0.18 ng/mL。在真實樣品檢測中，兩者都有不錯的回收率。因此，所開發的適體比色感測器，與自製的 LED-LDR 比色計，在檢測真實樣品中的黃麴毒素 B1 中有巨大的潛力。(Lerdsri, et al. 2020)

2021 年由 Tae Jung Park 教授團隊，開發一種使用硫氰酸胍(guanidine thiocyanate, GT) 合成金奈米粒子，用比色法檢測水樣中 Cd^{2+} 離子。GT-AuNPs 平均粒徑 TEM 測量結果為 17.5 ± 3.5 nm，DLS 的數據為 19 ± 2.5 nm，最佳吸收波長為 522 nm。加入 Cd^{2+} 離子，GT-AuNPs 會從紅色轉變成藍色，吸收波長會從 522 nm 變成 682 nm。偵測 Cd^{2+} 線性範圍為 0.025~50 μ M，LOD 值為 10 nM， R^2 為 0.9899。測量真實樣品有良好的回收率，因此 GT-AuNPs 可作為測定實際樣品中 Cd^{2+} 的比色工具，並具有巨大潛力。(Bhamore, et al. 2021)

2021 年由 Geon Dae Moon 教授團隊與 Dong Choon Hyun 教授團隊，開發一種使用單寧酸 (TA) 所修飾的金奈米棒，用於靈敏檢測水樣 Al^{3+} 離子。所修飾 TA-AuNRs 最佳的配方為 AR 4.2 (350 μ L, $AgNO_3$)，長度為 77.98 ± 4.63 nm，寬度為 18.44 ± 2.50 nm，吸收光譜中，在 681 nm 和 782 nm 有明顯的吸收峰。檢測 Al^{3+} 離子的線性範圍為 0.07~7.4 μ M， R^2 為 0.9971，LOD 為 0.09 μ M。在真實樣品部分與 ICP-MS 檢測水樣中 Al^{3+} 離子的結果相似。因此，使用 TA 修飾的 AuNRs 在實際檢測水樣中 Al^{3+} 具有巨大潛力。(Park, et al. 2021)

2021 年詩納卡寧威洛大學 Tongraung Pan 教授團隊，開發了一種使用基於 EDTA 與單寧酸共修飾的銀奈米粒子系統結合智慧型手機的檢測方法，用於比色檢測營養補充品中 Cr^{3+} 離子。EDTA-TA-AgNPs 的平均粒徑大小為 22.37 ± 2.57 nm，加入 Cr^{3+} 離子後，AgNPs 會產生聚集，顏色會從黃色變酒紅色，吸收峰會從 429 nm 轉變成 625 nm。銀奈米粒子偵測 Cr^{3+} 離子，使用分光光度計的線性範圍，為 2-5 ppm，LOD 值為 1.7 ppm， R^2 為 0.9899，使用智慧型手機的線性範圍，為 2-5 ppm，LOD 值為 1.52 ppm， R^2 為 0.9878。這種基於智慧型手機的比色方法測定 Cr^{3+} 離子與分光光度計相比，有良好的精準度和精確度，可以快速檢測各種樣品中 Cr^{3+} 離子，並且可以成功運用在臨場檢測上。(Sangsin, et al. 2021)

2021 年 Lubin Xu 教授與 Lei Yu 教授團隊，利用單寧酸的自聚合且在溫和的反應條件下，用 H_2O_2 分解，合成出可發出螢光的 FPTA 奈米粒子，用於檢測苦味酸(picric acid, PA)的濃度。合成出的 FPTANPs 的平均粒徑大小為 10 nm，在紫外可見光吸收光譜中，在 225 和 265 nm 處有兩個較強吸收峰，最佳激發為 330 nm，最佳放射為 450 nm。偵測 PA 的線性範圍為 1–60 μ M，LOD 值為 0.08 μ M， $R^2 = 0.9956$ 。所製備的 FPTA NPs 具有優異的螢光，良好的水分分散性、生物相容性和生物可分解性。在與 PA 的其他螢光檢測相比，FPTANPs 的感測器具有出色的靈敏度和選擇性並用於分析水樣中的 PA，這不僅滿足靈敏檢測 PA 的要求，而且還為 TA 在感測器的未來應用提供了新的啟發。(Zhao, et al. 2021)

參、研究動機

泰樂菌素(tylosin)是一種大環內酯類動物專用的抗生素，其主要運用在治療乳牛的乳房炎疾病(Ismail, et al. 2018)。泰樂菌素是全球最常用的抗生素之一，因為價格相對較低，而且對各種細菌抑菌的效率很高。然而，抗生素使用不當，可能導致其殘留在動物體內，若人類不小心食用含有這類抗生素動物所生產或加工的產品，可能會引起過敏反應、腸道菌群紊亂、致癌性、致突變性和肝毒性(Moudgil, et al. 2019)。此外，如果含有抗生素的汗

水排放至河川，可能會使含抗藥性或突變的病菌四處傳播，而導致更嚴重環境的危害。目前常見的泰勒菌素檢驗方法有毛細管電泳法(capillary electrophoresis)、質譜法(mass spectrometry)、液相層析法(liquid chromatography; (Tobback, et al. 1999); (Wang, et al. 2005); (Lin, et al. 2019)等等，但這些方法需要昂貴的設備、費力、耗時，並且真實樣品前處理步驟繁瑣，因此開發一種可以簡單檢測泰勒菌素對於人體健康和環境保護是必要的。

肆、材料與方法

一、藥品與溶劑

四氯金酸(HAuCl_4)、單寧酸(Tannic acid)、9種抗生素購自美國 Sigma Aldrich 公司。三羥甲基胺基甲烷(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)購自美國 J.T Baker。鹽酸(HCl)購自澳洲 AENCORE。甲醇(CH_3OH)購自美國 Avantor 公司。氯化鈉(NaCl)購自 Fluka。本實驗使用的超純水為 Milli-Q System 電阻值為 $18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ 。

二、儀器介紹

1. 電子天平(PX124)，購自美國 OHAUS 公司。
2. 電磁加熱攪拌器(HTS-1003)，購自日本 LMS 公司。
3. 酸鹼指示計(sp-701)，購自台灣 Suntex 公司。
4. 超純水機(Purity-Sp)購自台灣華夏科學有限公司。
5. 紫外光-可見光譜儀 UV-Vis (Lambda U-2900) 購自日本 Hitachi 公司。
6. 穿透式電子顯微鏡(JEM-2100)，購自日本 JEOL 公司。
7. 奈米粒徑及電位分析儀(ZS90)，購自美國 Malvern Panalytical 公司。
8. 高速離心機(3K 30)美國 Sigma 公司。

三、TA-AuNPs的合成步驟

TA-AuNPs 的合成步驟如下：

1. 取 $10 \text{ mL } 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 四氯金酸加入到雙頸瓶中。
2. 將四氯金酸加熱、回流至沸騰。
3. 加入 $0.5 \text{ mL } 0.025 \text{ M}$ 單寧酸，持續加熱攪拌並回流 5 分鐘。
(當顏色從透明變成紫紅色，表示合成出 TA-AuNPs。)
4. 將合成出的 TA-AuNPs 放置冰浴盆中，冷卻至室溫。
5. 將冷卻後的 TA-AuNPs 裝入樣品瓶中，避光保存於 4°C 冰箱中。

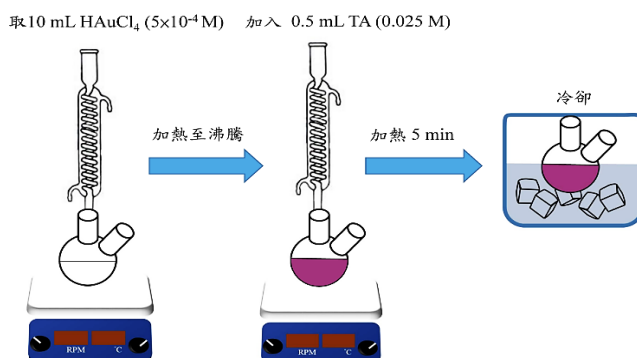


圖1. TA-AuNPs合成示意圖。

四、TA-AuNPs 實驗方法探討

1. TA-AuNPs 合成最佳時間探討

在雙頸瓶中加入 20 mL 5×10^{-4} M 四氯金酸，加熱至沸騰之後加入 1 mL 0.005 M 單寧酸，分別持續加熱攪拌並回流 2、5、10、20、30 分鐘後，依序將其冷卻至室溫後裝入樣品瓶中，避光保存在 4°C 冰箱中。

2. TA-AuNPs 不同合成比例探討

在雙頸瓶中加入 20 mL 5×10^{-4} M 四氯金酸，加熱至沸騰之後加入 1 mL 0.1、0.05、0.025、0.01、0.005、0.0025、0.001 M 單寧酸，持續加熱攪拌並回流 5 分鐘後，將其冷卻至室溫後裝入樣品瓶中，避光保存在 4°C 冰箱中。TA-AuNPs 之單寧酸與四氯金酸莫爾比為 10:1、5:1、2.5:1、1:1、0.5:1、0.25:1、0.1:1。

3. 不同比例 (TA: Au) 對於檢測泰勒菌素之影響

於 2 mL 離心管中，加入 1000 μ L 不同比例合成出的 TA-AuNPs (單寧酸: 四氯金酸為 2.5:1、1:1、0.5:1、0.25:1)，接著 200 μ L 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 7)、600 μ L 超純水、200 μ L 100 μ M 抗生素溶液，反應 90 分鐘，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

4. 不同 pH 值對於檢測泰勒菌素之影響

配置 10 mL 0.1 M Tris 溶液，加入適量的 0.1 M HCl，調製成不同的 pH 值的 Tris-HCl 緩衝溶液。於 2 mL 離心管中，加入 1000 μ L TA-AuNPs、200 μ L 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 5-9)、600 μ L 超純水以及 200 μ L 100 μ M 抗生素溶液，反應 90 分鐘，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

5. TA-AuNPs 檢測泰勒菌素之反應時間

於樣品瓶中加入 10 mL TA-AuNPs、2 mL 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 7)、6 mL 超純水和 2 mL 100 μ M 抗生素溶液，每隔 15 分鐘從其中抽取 2 mL 使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

6. TA-AuNPs 之耐鹽性

將 1 M 氯化鈉溶液分別稀釋為 50、100、150、200、250 mM。於 2 mL 離心管中加入 1000 μ L TA-AuNPs、200 μ L 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 7)、600 μ L 超純水、200 μ L 不同濃度之氯化鈉溶液，反應 15 分鐘後，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

7. 抗生素選擇性

於 2 mL 離心管中加入 1000 μ L TA-AuNPs、200 μ L 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 7)、600 μ L 超純水、200 μ L 100 μ M 不同抗生素溶液，反應 90 分鐘，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

8. 泰勒菌素線性

配置泰勒菌素標準溶液，將 10-3 M 泰勒菌素溶液用超純水分別稀釋成 0.8~10 μ M。於 2 mL 離心管中加入 1000 μ L TA-AuNPs、200 μ L 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 7)、600 μ L 超純水、200 μ L 泰勒菌素溶液 (0.8~10 μ M)，反應 90 分鐘，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。以測得的最佳吸收值 ($A_0 - A/A_0$) 作為 y 軸，泰勒菌素的濃度為 x 軸分別作圖。

9. 真實樣品的檢測

水樣(湖水、自來水)，配置泰勒菌素溶液，濃度為 1 μ M，5 μ M，10 μ M 真實水樣溶液，以 10000 rpm 離心 10 分鐘，以 0.22 μ m 微孔膜過濾，再取 TA-AuNPs 溶液 1 mL，依序加入 pH 7 Tris-HCl 緩衝液 200 μ L、上述真實樣品溶液 200 μ L，反應 30 分鐘上機偵測，將得到之相對螢光值代入檢量線的線性方程式，即可推算該水樣中的泰勒菌素濃度，推算泰勒菌素的濃度與添加濃度相除即得回收率。

伍、結果與討論

一、奈米材料合成探討

1. 合成時間

為了探討 TA-AuNPs 的最佳合成時間，在加了單寧酸之後，分別以 2 min、5 min、10 min、20 min、30 min 進行加熱，並測量其的吸收值，由圖 2 可以看到加熱 2 min、5 min 有較好的吸收，但因為 2 min 合成出來的金奈米粒子的吸收峰比較不穩定，所以選用加熱 5 min 進行下一個實驗探討。

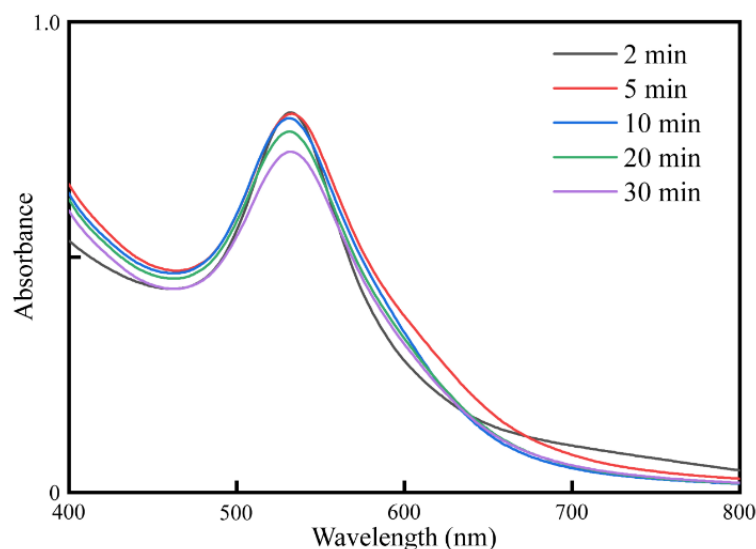


圖 2. 不同加熱時間合成 TA-AuNPs 的吸收光譜圖。

2. 不同單寧酸(TA)濃度對合成金奈米粒子的影響

為了探討不同濃度的單寧酸對於合成 TA-AuNPs 的影響，在合成 TA-AuNPs 時，添加不同濃度的單寧酸 (0.001、0.0025、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1 M)，單寧酸與四氯金酸的莫爾比分別為 (0.1 : 1、0.25 : 1、0.5 : 1、1 : 1、2.5 : 1、5 : 1、10 : 1)。由圖 3 中可以看到，不同比例的單寧酸與四氯金酸所合成出來的 TA-AuNPs 吸收圖譜會有所不同，其最大吸收波長介於 533-581 nm，隨著單寧酸添加濃度不同，顏色變化會呈現深藍色、紫紅色、酒紅色以及藍紫色。這可能是因為附著在 TA-AuNPs 的表面的 TA 官能基數量不同所導致的，若 TA 濃度太高，可能會導致附著在 TA-AuNPs 的表面官能基太多，而導致其聚集。此外，若 TA 濃度太低，也有相同的狀況發生。由於 TA : Au 比 (0.1 : 1、5 : 1、10 : 1) 的合成的 TA-AuNPs 都會產生聚集，因此最後選擇 TA : Au 比 (0.25 : 1、0.5 : 1、1 : 1、2.5 : 1) 這四種合成比例的 TA-AuNPs 進行下一個實驗探討。

二、金奈米粒子的紫外可見光吸收光譜

圖 4. 為 TA-AuNPs 吸收光譜圖，黑線為單純的 TA-AuNPs，TA-AuNPs 的最佳吸收峰為 540 nm。紅線為 TA-AuNPs 加了泰勒菌素吸收光譜圖，從光譜圖中可以清楚看到 540 nm 的吸收峰有明顯的下降，是因為附著在金奈米粒子的表面的官能基與泰勒菌素結合，導致金奈米粒子聚集，使其特徵吸收峰下降。

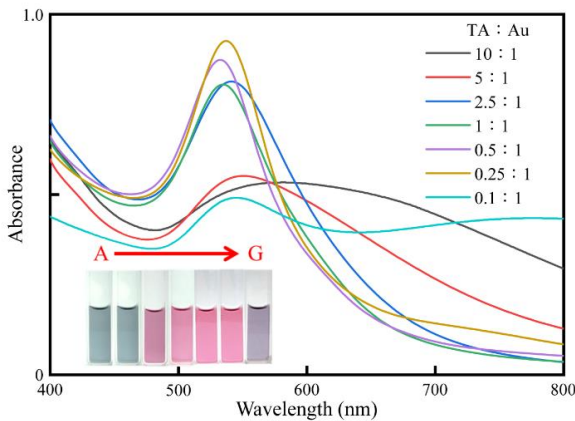


圖 3.不同 TA : Au ((A) 10 : 1 → (G) 0.1 : 1) TA-AuNPs 吸收光譜圖，左下圖為可見光下的照片。

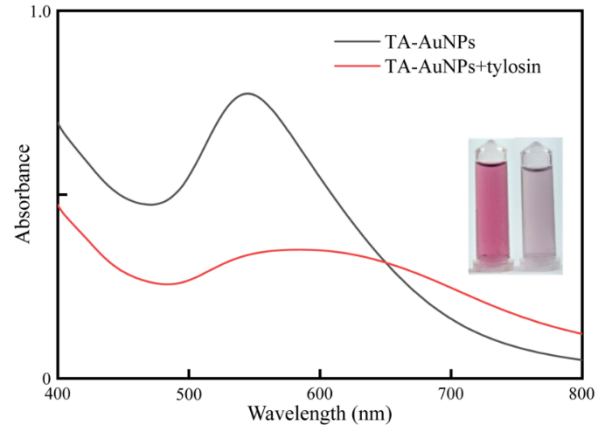


圖 4.金奈米粒子的吸收光譜圖 (A)黑線為 TA-AuNPs (B)紅線為 TA-AuNPs 加泰勒菌素，右上圖為可見光下的顏色。

三、檢測泰勒菌素之反應機制

圖 5.為本篇的反應機制圖，本篇是利用單寧酸作為還原劑與保護劑，使四氯金酸還原成金奈米粒子。單寧酸為沒食子酸(gallic acid)和葡萄糖(glucose)的聚合物，為一種具有多酚(polyphenol)結構的抗氧化試劑(antioxidant)。在還原金奈米粒子過程中，金離子會被單寧酸結構上的羥基還原，進而合成金奈米粒子。另外，單寧酸會吸附到金奈粒表面並露出 COO⁻，透過靜電排斥力讓金奈米粒子穩定存在溶液中(Aswathy Aromal and Philip 2012)。當加入泰勒菌素之後，其會與 TA-AuNPs 的表面官能基產生反應，使得原本分散的金奈米粒子產生聚集，產生顏色變化，用於檢測泰勒菌素的濃度。

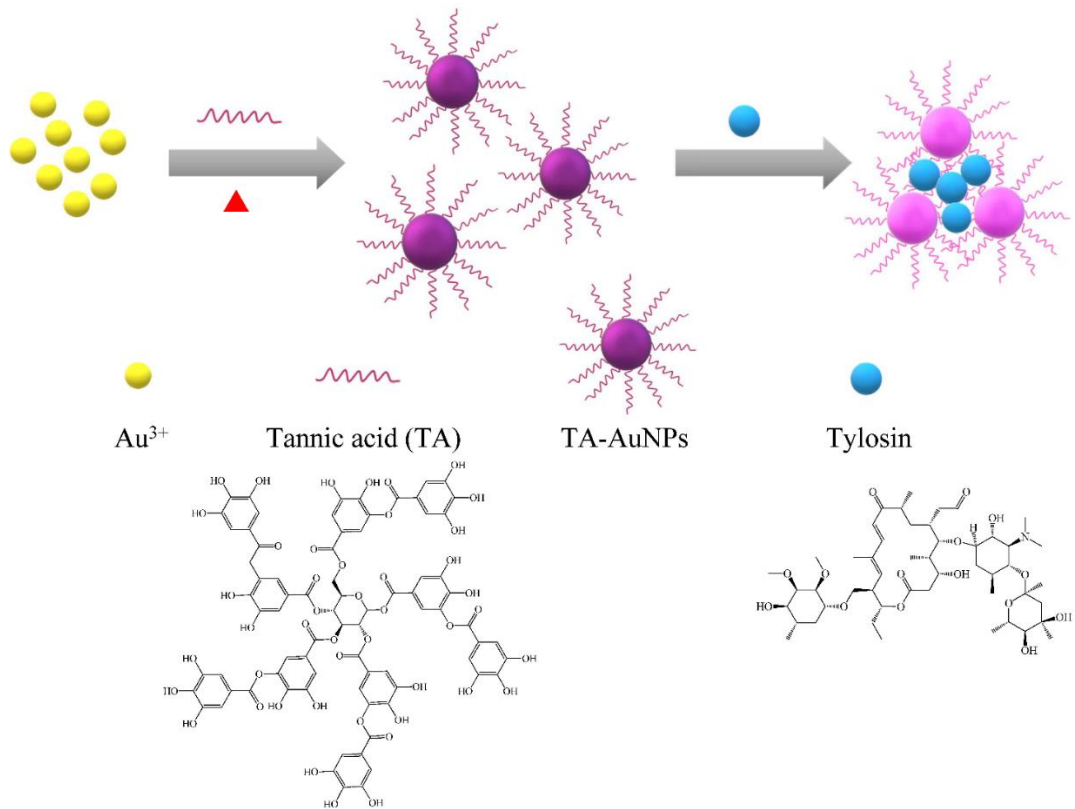


圖 5.以 TA-AuNPs 檢測泰樂菌素的反應機制圖。

四、奈米材料之基本鑑定

1. TEM 圖譜

為了探討 TA-AuNPs 加了泰勒菌素之後的粒徑大小的變化，因此使用了穿透式電子顯微鏡(TEM)進行分析，圖 6.(A)為單純 TA-AuNPs 的 TEM 圖譜，從圖中可以發現 TA-AuNPs 平均分散在溶液中，圖 6.(A)的插圖為 TA-AuNPs 之粒徑分布圖，經過統計軟體的數據分析後，結果顯示 TA-AuNPs 之平均粒徑 29.6 ± 3.8 nm。圖 6.(B)為 TA-AuNPs 加了泰勒菌素之後的 TEM 圖譜，從 TEM 圖譜當中可以發現，加入泰勒菌素之後會使的原本平均分散的 TA-AuNPs 產生聚集，並且 TA-AuNPs 的粒徑有增大的趨勢。

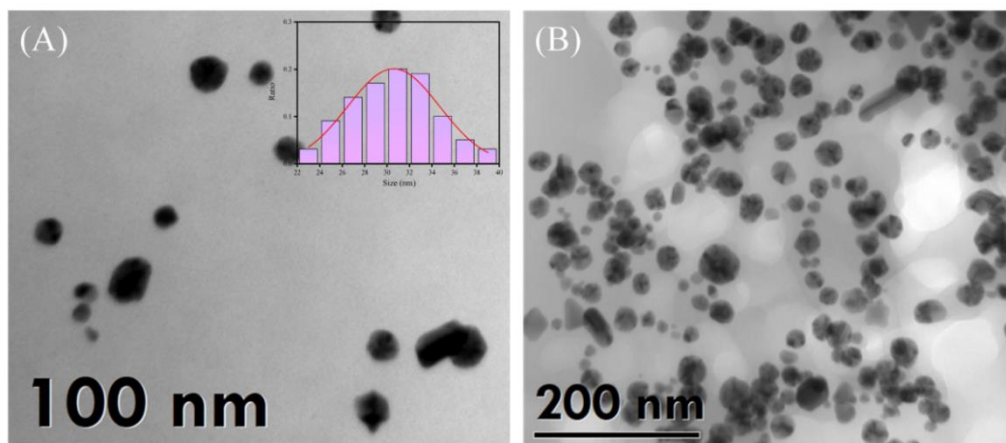


圖 6. (A) TA-AuNPs 的穿透式電子顯微鏡影像及粒徑分布圖。(B) TA-AuNPs 與泰勒菌素作用後的的穿透式電子顯微鏡影像。

2. Zeta 電位

圖 7.為 TA-AuNPs 在不同 pH 值下的 Zeta 電位的柱狀圖，為了解 TA-AuNPs 在不同 pH 值下的表面電荷，所以使用了奈米粒徑及電位分析儀分析其帶電狀況，TA-AuNPs 在 pH 5-9 的環境下的 Zeta 電位為 -0.152 mV、 -21.4 mV、 -26 mV、 -29.1 mV、 -30.8 mV，TA-AuNPs 在酸性環境下為電中性，而在越鹼性的環境下會帶負電，這可能是因為附著在 TA-AuNPs 的表面的 COO^- 官能基團，隨著 pH 值增加導致更多的 COOH 解離，使其帶更多的負電荷 (Rahim, et al. 2014)。

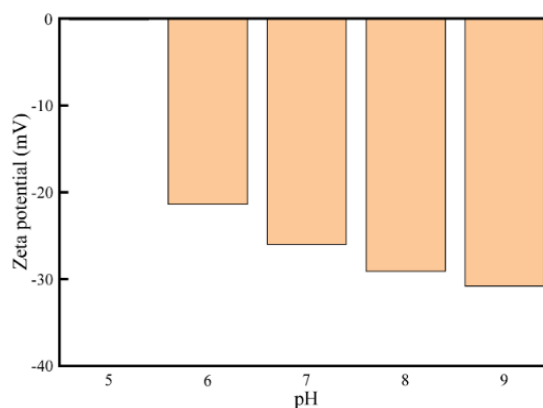


圖 7. TA-AuNPs 的 Zeta 電位柱狀圖。

圖 8.為 TA-AuNPs 有無加入泰勒菌素的 Zeta 電位圖譜，從圖中可以發現，當 TA-AuNPs 加入泰勒菌素之後會導致電位改變，TA-AuNPs 的 Zeta 電位會從 -26 mV 變成 -16 mV，這可能是因為 TA-AuNPs 加入泰勒菌素之後產生聚集，而電位改變可能表示 TA-AuNPs 的表面官能基與泰勒菌素之間可能有作用力產生而導致聚集。

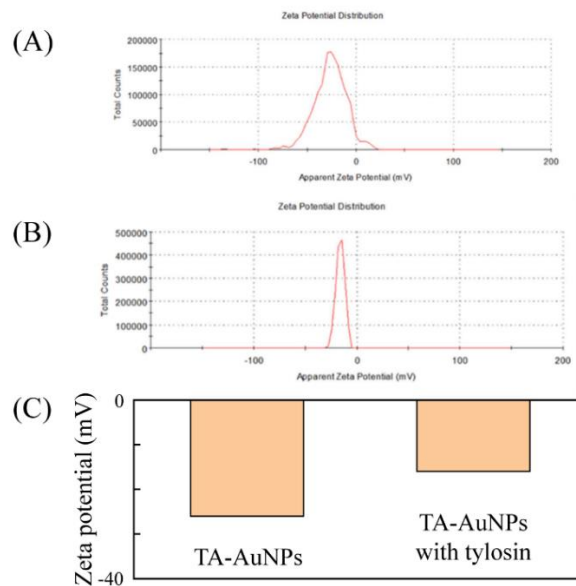


圖 8. (A) TA-AuNPs, (B) TA-AuNPs +Tylosin (100 μ M)的 Zeta 電位圖譜, (C) TA-AuNPs 有無加入 Tylosin 的 Zeta 電位。

五、TA-AuNPs 的穩定性

圖 9(A)為 TA-AuNPs 耐鹽性之柱狀圖,為了確認 TA-AuNPs 之穩定性,本實驗測試了和耐鹽性。我們添加了 0-25 mM 的 NaCl, 實驗結果說明添加了 25 mM 的 NaCl 後對 TA-AuNPs 沒有太大變化,因此本方法製備出的 TA-AuNPs 具有相當好的耐鹽性。圖 9(B)為 TA-AuNPs 兩週穩定性吸收圖譜,為了測試 TA-AuNPs 的穩定性,將製備好的 TA-AuNPs 避光保存在 4°C 冰箱中,每天測量記錄其吸收變化,可以發現,在一週內,其吸收沒有很明顯的變化,代表所製備的 TA-AuNPs 擁有良好的存放穩定性。

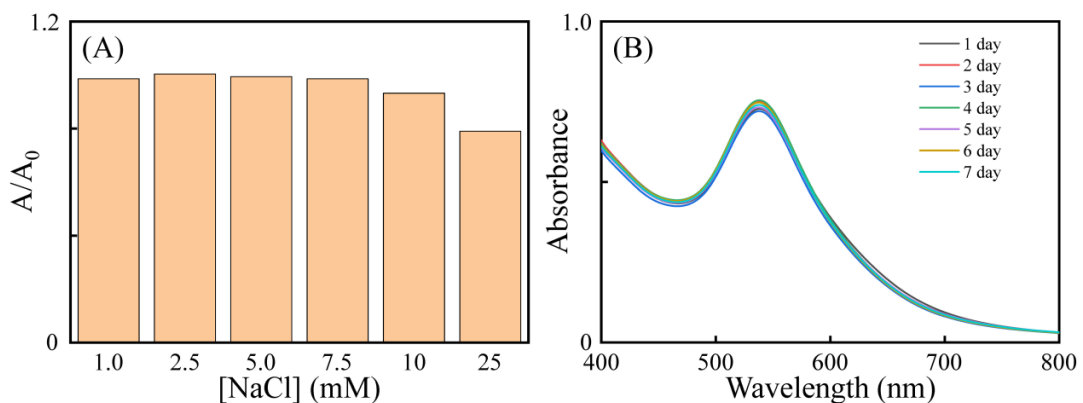


圖 9. (A) TA-AuNPs 耐鹽性之柱狀圖。(B) TA-AuNPs 一週穩定性吸收圖譜。

六、最佳化條件探討

1. 不同比例 (TA : Au) 對檢測泰勒菌素之影響

圖 10(A)為使用不同合成比例合成出的 TA-AuNPs 對於檢測泰勒菌素的影響,本實驗選用 TA : Au 為 0.25 : 1、0.5 : 1、1 : 1、2.5 : 1 四種合成比例去檢測泰勒菌素。從圖中可以發現,使用 TA : Au 為 2.5 : 1 對於檢測泰勒菌素有最佳的效果。由圖 3 所示,當 TA 添加濃度超過 0.025 M 時,TA-AuNPs 本身就會聚集,所以才未選用比 2.5 : 1 (TA : Au) 更高比例檢測,因此本方法最後選用 TA : Au 為 2.5 : 1 進行後續的實驗。

2.不同 pH 值對檢測泰勒菌素之影響

圖 10(B)為 TA-AuNPs 在不同 pH 值檢測泰勒菌素的影響，圖 10(B)為 TA-AuNPs 在不同 pH 值的吸收變化，從圖中可以發現 TA-AuNP 的最大吸收在 pH 5-9 下沒有太大變化。加了泰勒菌素後，從圖 10(C)可以顯示出 TA-AuNPs 在 pH 7 的環境，對於檢測泰勒菌素的效果最好，因此選用 pH 7 的緩衝溶液作為後續實驗的條件。至於為何 TA-AuNPs 在鹼性環境下檢測泰勒菌素效果不佳，這可能與泰勒菌素的 pKa 有關，泰勒菌素的 pKa = 7.1，而其在酸性環境下帶正電荷，而鹼性環境下幾乎不帶電荷 (Melliti, et al. 2021; Guo, et al. 2016)，因此其在酸性環境下比鹼性較容易和 TA-AuNPs 表面官能基產生反應，但由於酸性環境下 TA-AuNPs 所帶的負電荷較少，因此檢測的能力有限，故這可能是中性檢測效果最佳的原因。

3. TA-AuNPs 檢測泰勒菌素之反應時間

圖 10(D)為 TA-AuNPs 對泰勒菌素檢測反應時間吸收的變化圖，為了探討 TA-AuNPs 對泰勒菌素檢測的最佳反應時間，因此在 TA-AuNPs 加入泰勒菌素之後，每隔 15 分鐘測量一次吸收值，並記錄其吸收變化。從圖 10(D)中可以顯示出在反應 90 分鐘之後其的吸收變化就變得不太明顯，因此選用 90 分鐘做為最佳反應時間。

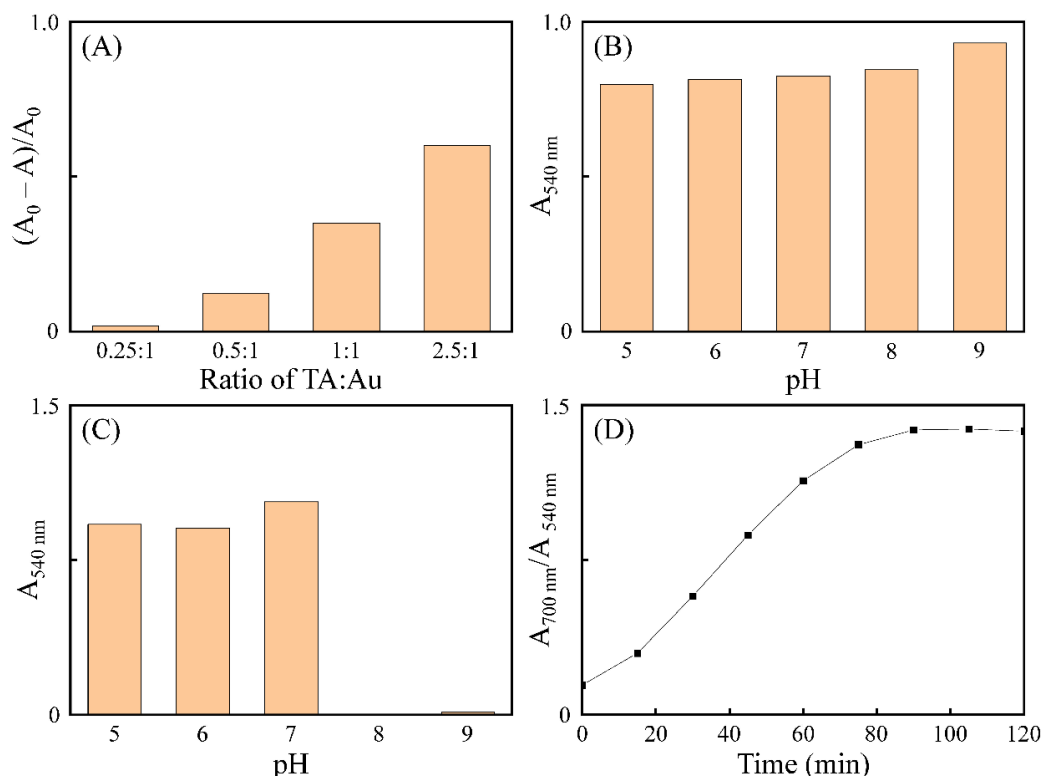


圖 10. (A)不同比例 TA-AuNPs 對檢測 Tylosin 影響。(B) TA-AuNPs、(C) TA-AuNPs +Tylosin 在不同 pH 值下 540 nm 的吸收度變化。(D) TA-AuNPs 和 Tylosin 反應時間對吸收度作圖。

七、TA-AuNPs 之選擇性

為了評估 TA-AuNPs 對泰勒菌素的選擇性，這裡選擇了 9 支不同的抗生素。在圖 11.(A) 的吸收圖譜中可以發現，TA-AuNPs 對於泰勒菌素有良好的選擇性，這可能是因為 TA-AuNPs 的表面官能基與泰勒菌素結合，而導致聚集，使得吸收下降。

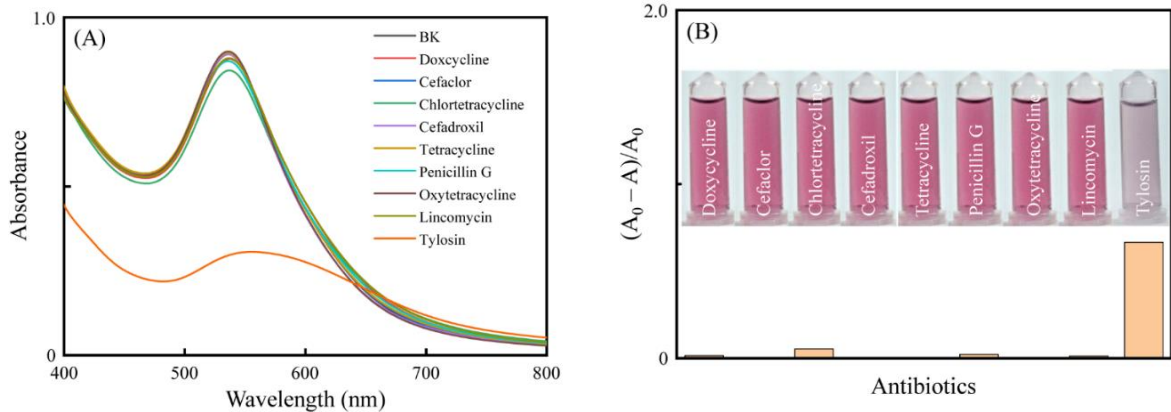


圖 11. TA-AuNPs 的抗生素(100 μM)選擇性：(A)吸收光譜圖，(B)為在可見光下照片與選擇性柱狀圖。

八、 泰勒菌素線性

為了探討 TA-AuNPs 檢測泰勒菌素的線性範圍，這邊加入不同濃度的泰勒菌素(0.8-10 μM)。由圖 12.(A)中可發現，TA-AuNPs 的吸收值會因為泰勒菌素的濃度上升而下降。根據這個趨勢，將其作出一條線性，結果如圖 12.(B)，檢測泰勒菌素的濃度的範圍為 0.8-10 μM ， R^2 為 0.998，偵測極限為 0.399 μM ($3\sigma/S$)。

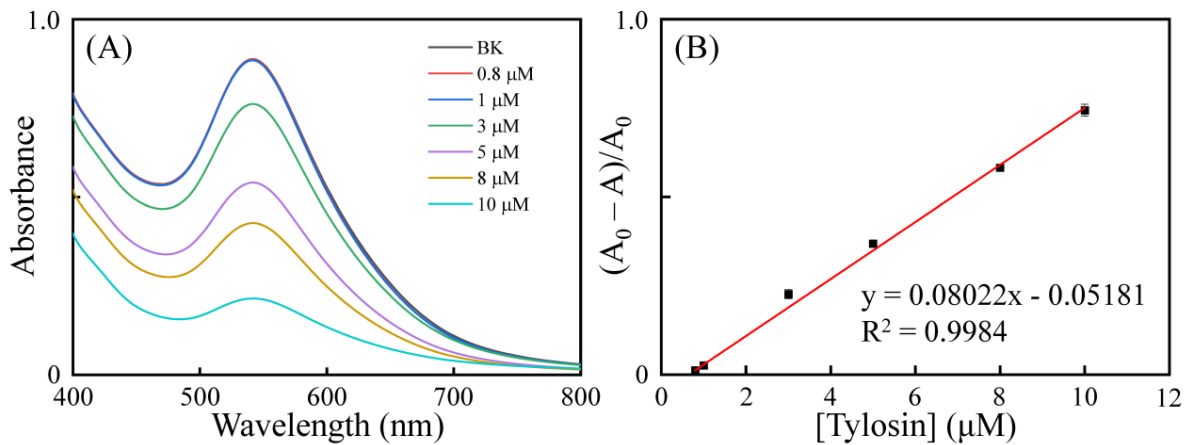


圖 12. (A)不同濃度 Tylosin 對於 TA-AuNPs 影響之吸收光譜圖，(B) Tylosin 之檢量線。

九、 文獻比較

表 1 為本方法與其他文獻做比較，從表中可看出本方法與其他檢測泰勒菌素的文獻相比有良好的線性及相近的 LOD 值，因此可以代表本方法具有良好的檢測能力。

表 1 與其他文獻比較檢測泰勒菌素之線性範圍

Probe	Method	Linear range (μM)	LOD (μM)	Ref.
--	HPLC	0.5 ~ 10	1.9	(Granados-Chinchilla, et al. 2012)
--	FT-IR	0 ~ 0.109	--	(Gomes Marques de Freitas, et al. 2021)
AuNPs	SERS	5.45 ~ 38.2	--	(Wang, et al. 2021)
GAMI-AuNPs	ICA	0.0017 ~ 0.0117	0.0001	(Hendrickson, et al. 2020)
TA-AuNPs	UV-Vis	0.8~10	0.399	This work

FT-IR : Fourier transform infrared spectroscopy

GAMI-AuNPs : Goat antibodies against mouse immunoglobulins–gold nanoparticles

SERS : Surface-enhanced Raman scattering

ICA : Immunochromatographic analysis

表 2 檢測泰勒菌素之真實樣品(n = 3)。

Sample	Added (μM)	Found (μM)	Recovery (%)	RSD (%)
Tap water	1.00	0.92	92.8	3.9
	5.00	5.45	109.5	4.1
	10.00	8.98	89.8	2.2
Lake water	1.00	0.83	83.0	2.0
	5.00	4.11	82.0	4.9
	10.00	10.17	101.7	2.9

十、真實樣品

為了評估本方法的實用性，我們利用 TA-AuNPs 作為探針來偵測真實樣品中的泰勒菌素含量。水樣取自國立臺東大學分析實驗室之自來水以及靜心湖之湖水。結果如表 2，泰勒菌素的回收率為 82.0-109.5%，RSD 皆小於 5% (n = 3)。證明此方法確實可應用於檢測水樣中的泰勒菌素。

陸、結論

本篇開發一種使用單寧酸做為還原劑與保護劑，利用化學方法將四氯金酸還原成金奈米粒子。單寧酸金奈米粒子(TA-AuNPs)平均粒徑為 29.6 ± 3.8 nm，當加入泰勒菌素之後，會使 TA-AuNPs 產生聚集，顏色會從紫紅色變成淡粉色，金奈米粒子之吸收光譜中的 540 nm 特徵峰會下降。TA-AuNPs 對泰勒菌素具有良好的選擇性及靈敏性。在最佳條件下(TA: Au 比為 2.5:1, pH =7)，檢測的線性範圍為 0.8~10 μM ， R^2 為 0.998，LOD 為 0.399 μM 。

此外，本方法已成功應用於水樣中泰勒菌素檢測，回收率介於 82.0-109.5%，RSD 皆小於 5%。因此，本篇開發的比色檢測方法對於檢測水樣中泰勒菌素具有巨大的潛力，並且可以嘗試運用於其他水樣之中。

柒、參考文獻

- Aelenei, N., Popa, M. I., Novac, O., Lisa, G., & Balaita, L. (2009). Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(5), 1095-1102.
- Andrade Jr, R. G., Dalvi, L. T., Silva Jr, J. M. C., Lopes, G. K., Alonso, A., & Hermes-Lima, M. (2005). The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 437(1), 1-9.
- Aswathy A. S., & Philip, D. (2012). Facile one-pot synthesis of gold nanoparticles using tannic acid and its application in catalysis. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 44(7), 1692-1696.
- Balasubramanian, P., Balamurugan, T. S. T., Chen, S.-M., Chen, T.-W., Sharmila, G., & Yu, M.-C. (2018). One-step green synthesis of colloidal gold nano particles: A potential electrocatalyst towards high sensitive electrochemical detection of methyl parathion in food samples. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 87, 83-90.
- Bhamore, J. R., Gul, A. R., Kailasa, S. K., Kim, K.-W., Lee, J. S., Park, H., & Park, T. J. (2021). Functionalization of gold nanoparticles using guanidine thiocyanate for sensitive and selective visual detection of Cd^{2+} . *Sensors and Actuators B: Chemical*, 334, 129685.
- Boldeiu, A., Simion, M., Mihalache, I., Radoi, A., Banu, M., Varasteanu, P., Kusko, M. (2019). Comparative analysis of honey and citrate stabilized gold nanoparticles: In vitro interaction with proteins and toxicity studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 197, 111519.
- de Freitas, G. M., Minho, L. A. C., de Magalhães, B. E. A., dos Santos, W. N. P., Santos, L. S., & de Albuquerque Fernandes, S. A. (2021). Infrared spectroscopy combined with random forest to determine tylosin residues in powdered milk. *Food Chemistry*, 365, 130477.

- Granados-Chinchilla, F., Sánchez, J., García, F., & Rodríguez, C. (2012). A novel green chemistry method for nonaqueous extraction and high-performance liquid chromatography detection of first-, second-, and third-generation tetracyclines, 4-epitetracycline, and tylosin in animal feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7121-7128.
- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53.
- Guo, X., Miao, Y., Yang, C., Zhang, Q., Gao, L., & Hu, Y. (2016). Sorption of tylosin on black carbon from different sources. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(3), 3393-3400.
- Hendrickson, O. D., Zvereva, E. A., Zherdev, A. V., Godjevargova, T., Xu, C., & Dzantiev, B. B. (2020). Development of a double immunochromatographic test system for simultaneous determination of lincomycin and tylosin antibiotics in foodstuffs. *Food Chemistry*, 318, 126510.
- Ismail, Z. B., Muhaffel, M. M., & Abu-Basha, E. (2018). The effect of dry cow therapy using systemic tylosin in combination with common intramammary medications on mastitis rate, cull rate, somatic cell count, and milk production in dairy cows affected with subclinical mastitis. *Veterinary world*, 11(9), 1266-1271.
- Jadhav, K., Hr, R., Deshpande, S., Jagwani, S., Dhamecha, D., Jalalpure, S., Baheti, D. (2018). Phytosynthesis of gold nanoparticles: Characterization, biocompatibility, and evaluation of its osteoinductive potential for application in implant dentistry. *Materials Science and Engineering: C*, 93, 664-670.
- Kumar, S., Jha, I., Mogha, N. K., & Venkatesu, P. (2020). Biocompatibility of surface-modified gold nanoparticles towards red blood cells and haemoglobin. *Applied Surface Science*, 512, 145573.
- Lerdsri, J., Chananchana, W., Upan, J., Sridara, T., & Jakmune, J. (2020). Label-free colorimetric aptasensor for rapid detection of aflatoxin B1 by utilizing cationic perylene probe and localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 320, 128356.
- Li, Y., Zhai, M., & Xu, H. (2019). Controllable synthesis of sea urchin-like gold nanoparticles and their optical characteristics. *Applied Surface Science*, 498, 143864.
- Liang, X., Cao, K., Li, W., Li, X., McClements, D. J., & Hu, K. (2021). Tannic acid-fortified zein-pectin nanoparticles: Stability, properties, antioxidant activity, and *in vitro* digestion. *Food Research International*, 145, 110425.
- Lin, Q., de Waal, T., Van Schepdael, A., & Adams, E. (2019). A mass spectrometer-compatible liquid chromatographic method for the analysis of tylosin and its impurities using a superficially porous particle column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 165, 147-154.
- Lopes, G. K., Schulman, H. M., & Hermes-Lima, M. (1999). Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472(1-2), 142-152.
- Melliti, A., Srivastava, V., Kheriji, J., Sillanpää, M., & Hamrouni, B. (2021). Date Palm Fiber as a novel precursor for porous activated carbon: Optimization, characterization and its application as Tylosin antibiotic scavenger from aqueous solution. *Surfaces and Interfaces*, 24, 101047.
- Moudgil, P., Bedi, J. S., Aulakh, R. S., & Gill, J. P. S. (2019). Antibiotic residues and mycotoxins in raw milk in Punjab (India): a rising concern for food safety. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 5146-5151.
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal feed science and technology*, 91(1-2), 3-20.
- Nepka, C., Sivridis, E., Antonoglou, O., Kortsaris, A., Georgellis, A., Taitzoglou, I., Kouretas, D. (1999). Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid administration in hepatoma bearing C3H male mice. *Cancer Letters*, 141(1-2), 57-62.

- Park, J. H., Seo, H. J., Lu, P., Moon, G. D., & Hyun, D. C. (2021). Tannic acid-coated gold nanorod as a spectrometric probe for sensitive and selective detection of Al³⁺ in aqueous system. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 94, 507-514.
- Rahim, M. A., Ejima, H., Cho, K. L., Kempe, K., Müllner, M., Best, J. P., & Caruso, F. (2014). Coordination-Driven Multistep Assembly of Metal–Polyphenol Films and Capsules. *Chemistry of Materials*, 26(4), 1645-1653.
- Sahiner, N., Sagbas, S., Aktas, N., & Silan, C. (2016). Inherently antioxidant and antimicrobial tannic acid release from poly(tannic acid) nanoparticles with controllable degradability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142, 334-343.
- Salam, F. D., Nadar Vinita, M., Puja, P., Prakash, S., Yuvakkumar, R., & Kumar, P. (2020). Anti-bacterial and anti-biofilm efficacies of bioinspired gold nanoparticles. *Materials Letters*, 261, 126998.
- Sangsri, S., Srivilai, P., & Tongraung, P. (2021). Colorimetric detection of Cr³⁺ in dietary supplements using a smartphone based on EDTA and tannic acid-modified silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246, 119050.
- Shi, L., Buhler, E., Boué, F., & Carn, F. (2017). How does the size of gold nanoparticles depend on citrate to gold ratio in Turkevich synthesis? Final answer to a debated question. *Journal of Colloid and Interface Science*, 492, 191-198.
- Singla, S., Achanta, V. G., Pandey, O. P., & Sharma, G. (2020). Influence of the size of gold nanoparticles dispersed in glass matrix on optical properties. *Ceramics International*, 46(7), 9907-9912.
- Teranishi, T. (2003). Fabrication and electronic properties of gold nanoparticle superlattices. *Comptes Rendus Chimie*, 6(8), 979-987.
- Tobback, K., Li, Y. M., Pizarro, N. A., De Smedt, I., Smeets, T., Van Schepdael, A., Hoogmartens, J. (1999). Micellar electrokinetic capillary chromatography of macrolide antibiotics: Separation of tylosin, erythromycin and their related substances. *Journal of Chromatography A*, 857(1), 313-320.
- Wang, J., Leung, D., & Butterworth, F. (2005). Determination of five macrolide antibiotic residues in eggs using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 1857-1865.
- Wang, T., Liu, M., Huang, S., Yuan, H., Zhao, J., & Chen, J. (2021). Surface-enhanced Raman spectroscopy method for classification of doxycycline hydrochloride and tylosin in duck meat using gold nanoparticles. *Poultry Science*, 100(6), 101165.
- Xavier, H. F. M., Nadar, V. M., Patel, P., Umamathy, D., Velanganni Joseph, A., Manivannan, S., Ponnuchamy, K. (2020). Selective antibacterial and apoptosis-inducing effects of hybrid gold nanoparticles – A green approach. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 59, 101890.
- Zhao, Y., Xu, L., Kong, F., & Yu, L. (2021). Design and preparation of poly(tannic acid) nanoparticles with intrinsic fluorescence: A sensitive detector of picric acid. *Chemical Engineering Journal*, 416, 129090.