簡易合成銅銀奈米粒子用於比色檢測阿莫西林

李曜丞、王惟昱、邱泰嘉*

摘要

本研究開發以銅銀奈米粒子作為比色探針用來檢測阿莫西林(amoxicillin)，利用檸檬酸鈉作為保護劑，硼氫化鈉作為還原劑並在過程中加入硝酸銀及硝酸銅合成出深綠色溶液的銅銀奈米粒子(copper-silver nanoparticles, Cu@AgNPs)。將溶液稀釋二十倍後呈現淡黃色，當加入阿莫西林後，溶液顏色從淡黃色變成淡紫色，藉由紫外光-可見光光譜(UV-Vis spectra)可知 392 nm 的特徵吸收峰會因為阿莫西林濃度的增加而下降並且在 550 nm 處的吸收峰會上升。由於非特異性相互作用的關係(靜電吸引力、氫鍵作用)，使銅銀奈米粒子產生聚集的現象。在最佳化條件下，檢測阿莫西林的線性範圍為 0.1-1.0 μM，$R^2 = 0.9786$，偵測極限(LOD)為 0.079 μM。此檢測簡單合成、方便操作且具有不錯的選擇性及偵測極限，成功用在檢測水樣中的阿莫西林，且具有不錯的回收率。

關鍵字：阿莫西林、比色法、銅銀奈米粒子、奈米感測器

李曜丞，國立臺東大學應用科學系學生。E-mail: clin7974@gmail.com
王惟昱，國立臺東大學應用科學系學生。E-mail: xx38084013@gmail.com
邱泰嘉(通訊作者)，國立臺東大學應用科學系教授。E-mail: tcchiu@nttu.edu.tw

Facile Synthesis of Copper-Silver Nanoparticles for Colorimetric Detection of Amoxicillin

Yau-Cheng Li , Wei-Yu Wang , Tai-Chia Chiu *

Abstract

This study developed copper-silver nanoparticles as probes for detecting amoxicillin. Sodium citrate was utilized as a stabilizer, while sodium borohydride served as a reducing agent. Silver nitrate and copper nitrate were added during the process to synthesize the deep green solution of copper-silver nanoparticles. After diluting the solution twenty-fold, its color turned pale yellow. Upon the addition of amoxicillin, the color changed from pale yellow to light purple. UV-Vis spectroscopy showed that the characteristic absorption peak at 392 nm decreased with increasing the amoxicillin concentration, while a new peak at 550 nm increased. Due to specific interactions (electrostatic attraction, hydrogen bonding), aggregation of the synthesized copper-silver nanoparticles occurred. Under optimized conditions, the linear range for detecting amoxicillin was 0.1-1.0 μM, with $R^2 = 0.9786$, and a detection limit (LOD) of 0.079 μM was achieved. This detection method is simple to synthesize, easy to operate, and exhibits good selectivity and lower LOD. It was successfully applied to detect amoxicillin in water samples, with satisfactory recovery.

Keywords: amoxicillin, colorimetric method, copper-silver nanoparticles, nanosensor

Yau-Cheng Li, Student, Department of Applied Science, National Taitung University. E-mail: clin7974@gmail.com

Wei-Yu Wang, Student, Department of Applied Science, National Taitung University. E-mail: xx38084013@gmail.com

Tai-Chia Chiu (Corresponding Author), Professor, Department of Applied Science, National Taitung University. E-mail: tcchiu@nttu.edu.tw

壹、前言

奈米粒子是微小的粒子，由好幾百個原子組成，是一種長度單位(10^{-9} m)。奈米材料的定義為至少一個維度小於 100 nm 的奈米結構。尺度縮小在特性上與原先塊材相比具有截然不同的獨特性，每單位體積增加具有更大的表面積，表面積的增加會使物理、化學性質方面有大幅度的變化。這些具有特殊性質的奈米科技在各領域中都發揮其重要的應用，其中不只局限於化學領域，物理、醫學檢測、藥物釋放、觸媒催化、電子、能源、光電和環境感測。現在隨處可見奈米科技的存在，開發出各種金屬和金屬氧化物奈米材料，廣泛應用在不同環境檢測及催化上。

在各式各樣的奈米粒子中，銀奈米粒子是最廣泛應用的金屬奈米材料。其中具有高導電性、導熱性、化學穩定性、催化活性、抗菌能力等。銅奈米粒子則因成本較低(Z. Z. Zhang et al., 2017)、高導電性和優異的加工性能等優點被應用在催化、電子和生物醫療材料。雙金屬核殼(Hussain, Sun, & Pu, 2020)結構是近期熱門的複合方式，透過協同效應增加穩定性及光學性能，因此製備出銅銀核殼結構的奈米粒子並探討其性質。

貳、文獻回顧

2015 年 5 月 Akhond、Absalan、Ershadifar 三位教授開發出一種新穎、簡單且高靈敏度的比色法測定阿莫西林(amoxicillin) (Akhond, Absalan, & Ershadifar, 2015)。利用檸檬酸作為保護劑與還原劑合成出金奈米粒子作為奈米感測器，由於阿莫西林上的硫原子在酸性或鹼性下會產生硫醇基團，破壞原先檸檬酸根產生的靜電排斥作用，導致金奈米粒子聚集。金奈米粒子顏色從紅色變為紫色，AuNPs 表面電漿共振(surface plasmon resonance, SPR)峰強度降低。加入 Amoxicillin 後，在 600-700 nm 的波長範圍內出現了新的吸收帶。選擇 660 nm 和 525 nm 波長處的吸光度比 (A_{600}/A_{525}) 作為與 Amoxicillin 濃度相關的分析訊號。線性範圍為 0.3-4.5 μM (R^2 = 0.9967)，LOD 為 0.15 μM。分析含有阿莫西林的膠囊和口服液在等藥物，成功證明該方法的適用性，未來有機會作為阿莫西林的檢測平台。

2021 年 5 月由 He、Sun 研究團隊成功開發出一種 Au@Ag 核殼奈米顆粒(Au@Ag NPs)檢測氯林絲菌素比色探針(Du et al., 2021)。在 pH5.02 下，氯林絲菌素和 Au@AgNPs 通過靜電吸引和氫鍵相互作用降低 Au@Ag NPs 之間的靜電排斥力，誘導其聚集，導致溶液顏色從亮黃色變為灰藍色，SPR 峰紅移。檢測氯林絲菌素的線性範圍在 6.25×10^{-7}-7.5×10^{-6} M (R^2 = 0.9945)，LOD = 2.00×10^{-7} M。此方法可檢測人體尿液中氯林絲菌素，線性範圍 9.0×10^{-7}-7.5×10^{-6} M (R^2 = 0.9949)，LOD = 3.00×10^{-7} M，LOQ = 1.00×10^{-6} M，回收率介於 99.13-100.8%，RSD 皆小於 1.54% (n = 3)。本研究為氯林絲菌素的檢測提供了一種簡單、快速、直觀、低成本的可視化分析方法。

2022 年 3 月 Dinh 和 Le 及研究團隊成功開發出一種比色和表面增強拉曼散射(surface enhanced Raman scattering, SERS) 雙模感測平臺，透過電化學方法合成出銅奈米粒子(CuNPs)和低成本高純度的銅-氧化石墨烯奈米複合材料(Cu-GO)用於靈敏檢測阿莫西林(Anh et al., 2022)。CuNPs 檢測機制是由於 L-抗壞血酸被氧化成脫氫抗壞血酸並附著在 CuNPs 上當中含有許多羥基與阿莫西林的羥基和胺基形成氫鍵，沒有羥基結構保護的情況下會導致 CuNPs 聚集。Cu-GO 機制是由於氧化石墨烯奈米複合材料含有環氧化物、羰基、羧基和羥基等含氧官能團可以發生更多氫鍵相互作用。此外在阿莫西林中，GO 與芳香環之間的 π-π 堆積導致更強的相互作用，造成 Cu-GO 奈米複合材料聚集。因此 Cu-GO 奈米複合材料與 CuNPs 相比用於阿莫西林檢測較為靈敏。CuNPs 的顏色變化為酒紅色變為淺紅色；Cu-GO 奈米複合材料則是磚紅色變為棕色。線性範圍 5-50 μM，CuNPs 和 Cu-GO 奈米複合材料的 R^2 分別為 0.994 和 0.998。LOD 分別為 2.17 μM 和 1.71 μM。CuNPs 應用檢測自來水中的阿莫西林，回收率範圍為 80.5%至 104.1%，RSD 為 1.1-3.6% (n = 3)。Cu-GO 用於檢測在自來水中的阿莫西林，回收率在 86.2-106.4%之間，RSD (n = 3)在 1.1-1.8%之間。這些結果證明所提出感測系統在檢測阿莫西林方面表現出優異的結果，在現場快速篩選方面具有實際應用前景，且無需任何複雜的樣品前處理。

2023 年 6 月由 Tripathi 教授及團隊開發出一種使用聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)為保護劑的 AgNPs 比色檢測氨苄青黴素(ampicillin) (Mishra et al., 2023)。由於 PVA 對氨苄青黴素的高親和力及特異性結合的能力，AgNPs 與氨苄青黴素相互作用後失去球形從而聚集。402 nm 特徵吸收峰加入氨苄青黴素紅移到 550 nm 顏色變化由黃色轉為橙色。線性範圍為 0.5-40 μM (R^2 = 0.96448)，LOD 與 LOQ 分別為 6.2 μM 和 18.8 μM 。PVA-AgNPs 檢測快速、寬線性範圍，這些優點使 PVA-AgNPs，用於高靈敏度定量測定水樣中的自來水、河水、牛奶中的氨苄青黴素濃度。

2023 年 Cang、Duy 教授開發出一種基於適配體和 Tris-HCl 誘導 AuNPs 聚集的超靈敏比色法檢測阿莫西林(Nguyen & Jang, 2022)。適配體與阿莫西林的特異性結合誘導 AuNPs 聚集，降低適配體在 AuNPs 表面的保護效果，導致 Tris-HCl 緩衝液誘導聚集 AuNPs，使溶液顏色由紅色變為藍色。此方法具有較寬的線性範圍為 0.1-125nM (R^2 = 0.9912)，LOD= 67 pM。此方法實際檢測湖水中的阿莫西林，回收率在 90.42-109.21%，RSD 在 3.83-7.56%之間。這種簡單且超靈敏的比色感測器在監測環境水樣中阿莫西林具有潛在的應用前景。

參、研究動機

阿莫西林是一種β-內醯胺類的抗生素常作為口服性藥物使用，主要治療微生物所引起的細菌性感染，如：中耳炎、鏈球菌性咽炎、肺炎、蜂窩性組織炎、泌尿道感染等症狀。阿莫西林也是全世界消費量最大的抗生素之一(ul Ain et al., 2018)，可用於治療人體和動物，也有研究發現對植物生長有效。阿莫西林在農業方面能夠治療動物性感染，因此常在飼料中混入阿莫西林藥物，用於治療和預防動物尿道、腸胃道和呼吸道感染以及其他疾病，阿莫西林藥物也可提高畜牧業產量(Bogialli et al., 2004)。然而，抗生素使用不當和過量添加會導致牛奶和其他動物產品中出現不必要的阿莫西林殘留物，若人們誤食可能會發生超敏反應。根據歐盟規定，阿莫西林用於動物組織的最大殘留限量為 50 μg/kg；牛奶是 4.0 μg/kg。因此，監測食品中的阿莫西林濃度是相當重要的。

肆、材料與方法

一、藥品與溶劑

硝酸銅 $Cu(NO_3)_2$、硝酸銀($AgNO_3$)、檸檬酸鈉(sodium citrate)和 9 種抗生素購自美國 Sigma Aldrich 公司。三羥甲基胺基甲烷 (tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris)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電阻值為 18.2 MΩ/cm。

二、儀器介紹

(一) 電子天平(PX124)，購自美國 OHAUS 公司。

(二) 電磁加熱攪拌器(HTS-1003)，購自日本 LMS 公司。

(三) 酸鹼指示計(sp-701)，購自台灣 Suntex 公司。

(四) 超純水機(Purity-Sp)，購自台灣華夏科學有限公司。

(五) 紫外光-可見光譜儀 UV-Vis (Lambda U-2900)，購自日本 Hitachi 公司。

(六) 穿透式電子顯微鏡(JEM-2100)，購自日本 JEOL 公司。

(七) 奈米粒徑及電位分析儀(ZS90)，購自美國 Malvern Panalytical 公司。

(八) 高速離心機 (3K 30)，購自美國 Sigma 公司。

三、Cu@AgNPs 合成

Cu@AgNP 合成步驟，如**圖 1** 所示，以下為詳細步驟：

(一) 取 8.7 mL 蒸餾水，依次分別加入 75 μL 0.1 M 硝酸銅、100 μL 0.1 M 檸檬酸鈉、1 mL 0.05 M 硼氫化鈉，並持續攪拌 15 分鐘。(此時顏色為淡黃色)。

(二) 接著添加 125 μL 0.1 M 硝酸銀並持續攪拌 30 分鐘(加入後顏色會瞬間變成深綠色，表示成功合出 Cu@AgNPs)。

(三) 反應過後，將溶液放置 4°C 冰箱冷藏。

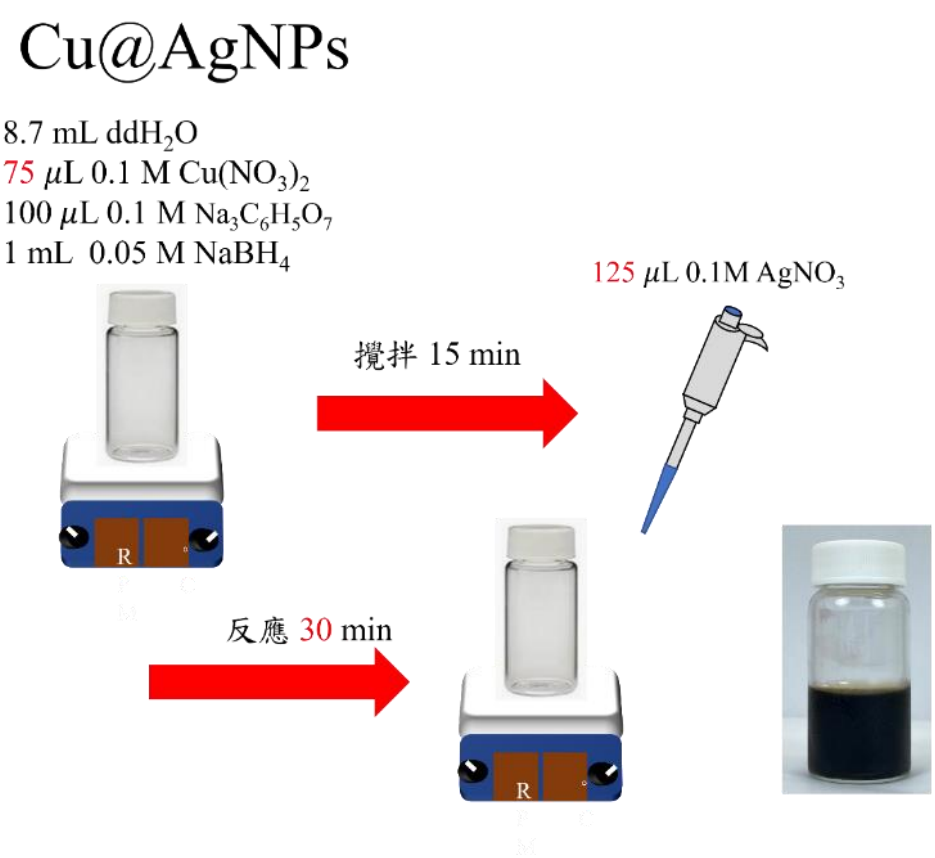

圖 1 Cu@AgNPs 合成步驟圖。

四、Cu@AgNPs 實驗方法探討

(一) Cu@AgNPs 合成最佳時間探討

步驟1.攪拌完15分鐘後，在樣品瓶中加入125 μL 0.1 M AgNPs，分別持續攪拌0、15、30、45、60分鐘後，取2 mL的Cu@AgNPs溶液，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

(二) 不同比例 (Cu：Ag) 對於檢測阿莫西林之影響

2 mL 離心管中，依序添加 1500 μL ddH_2O、200 μL 0.1M Tris-HCl 緩衝溶液(pH 7.0)、100 μL 不同銅銀比例的探針(銅:銀=純銀、1:7、1:3、3:5、1:1、純銅)，最後加入 200 μL 10^{-5} M 阿莫西林抗生素，反應 60 分鐘，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

(三) 不同比例硼氫化鈉對於阿莫西林之影響

2 mL 離心管中，依序添加 1500 μL ddH_2O、200 μL 0.1M Tris-HCl 緩衝溶液(pH 7.0)、100 μL 合成出不同硼氫化鈉濃度的探針(0.01、0.03、0.05、0.08、0.1M)，最後加入 200 μL 10^{-5} M 阿莫西林抗生素，反應 60 分鐘，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

(四) 不同比例檸檬酸鈉對於檢測阿莫西林之影響

2 mL 離心管中，依序添加 1500 μL ddH_2O、200 μL 0.1M Tris-HCl 緩衝溶液(pH 7.0)、100 μL 合成出不同檸檬酸鈉濃度的探針(0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 M)，最後加入 200 μL 10^{-5} M 阿莫西林抗生素，反應 60 分鐘，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

(五) 不同 pH 值對於檢測阿莫西林之影響

配置 100 mL 0.1 M Tris 溶液，加入適量的 0.1M HCl，調製成不同的 pH 值的 Tris-HCl 緩衝溶液。於 2 mL 離心管中，依序添加 1500 μL ddH_2O、200 μL 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液(pH 5.0-9.0)、100 μL Cu@AgNPs 的探針，最後加入 200 μL 10^{-5} M 阿莫西林抗生素，反應 60 分鐘，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

(六) Cu@AgNPs 檢測阿莫西林之反應時間

在樣品瓶中依序加入 12 mL ddH_2O、1.6 mL pH 7.0、0.8 mL Cu@AgNPs 探針、1.6 mL 阿莫西林抗生素，每隔 15 分鐘從樣品瓶中抽取 2 mL 的溶液，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

(七) Cu@AgNPs 之耐鹽性

配置 500 mM 氯化鈉溶液分別稀釋為 10、50、100、250 mM。於 2 mL 離心管中依序添加 1500 μL ddH_2O、200 μL 0.1 M pH 7.0、100 μL Cu@AgNPs 的探針，最後添加 200 μL 不同濃度之氯化鈉溶液，反應 30 分鐘後，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

(八) 抗生素選擇性

在 2 mL 離心管中加入 1500 μL ddH_2O、200 μL 0.1 M pH 7.4、100 μL Cu@AgNPs 的探針、最後添加 200 μL 不同抗生素溶液(10^{-5} M)，反應 60 分鐘，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

(九) 抗生素抗干擾性

在 2 mL 離心管中加入 1300 μL ddH_2O、200 μL 0.1 M pH 7.4、100 μL Cu@AgNPs 的探針、200 μL 不同抗生素溶液(10^{-5} M)、最後添加 200 μL 阿莫西林(10^{-5} M)，反應 60 分鐘，使用紫外光-可見光光譜儀進行分析。

(十) 阿莫西林線性

在 2 mL 離心管中加入 1500 μL ddH_2O、200 μL 0.1M pH7、100 μL Cu@AgNPs 探針、200 μL 不同濃度阿莫西林抗生素 (0.1-1.0 μM)，反應 60 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_{392}/A_{550})作為 y 軸，阿莫西林的濃度為 x 軸分別作圖。

(十一) 真實樣品的檢測

取 10 mL 之真實水樣(國立臺東大學飲用水)至 15 mL 離心管，離心 10000

rpm，10 分鐘，取上清液過膜 (0.22 μm)。之後取 2 mL 離心管加入 1800 μL 飲用水水樣及不同濃度(3、5、8 μM)的阿莫西林溶液，稀釋配置成(0.3、0.5、0.8 μM)。另外再取 2 mL 離心管，加入 1500 μL 超純水，依序加入 200 μL pH 7.4 Tris-HCl 緩衝液、100 μL Cu@AgNPs 探針及 200 μL 前面稀釋後處理完之真實樣品至體積 2 mL 離心管中，反應 1 小時後使用紫外光-可見光光譜儀進行分析，將數據代入檢量線之線性方程式，即可推算該真實樣品中阿莫西林之濃度，最後估計回收率。

伍、結果與討論

一、探討奈米材料合成條件

(一)合成時間

為了確認合成 Cu@AgNPs 的最佳時間，加入硝酸銀後，分別依序 0、15、30、45、60 分鐘取約 100 μL 溶液並加入 1900 μL 超純水稀釋 20 倍，並測量其吸收值(**圖 2(A)**)，由**圖 2(B)**可以發現在 30 分鐘後，吸收值沒有太大變動，因此選用 30 分鐘當作最佳合成時間。

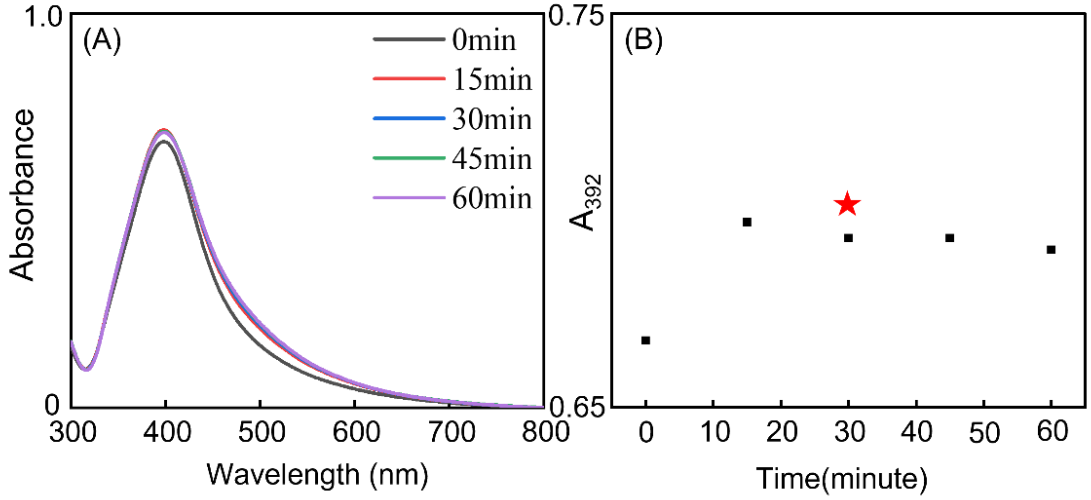

圖 2 (A) Cu@AgNPs 在不同合成時間(0、15、30、45、60 min)的 UV-Vis 吸收光譜圖和(B)相對應吸收波長為 392 nm 的點圖。

二、銀銅奈米粒子的紫外可見光吸收光譜

圖 3 為銅銀奈米粒子的吸收光譜圖，黑線為單純 Cu@AgNPs，Cu@AgNPs 的特徵吸收峰位於 392 nm。藍線為 Cu@AgNPs 加阿莫西林吸收光譜圖，從光譜中可以觀察到 392 nm 特徵吸收峰明顯下降，並且在 550 nm 產生新的吸收峰，可能是銅銀奈米粒子表面官能基與阿莫西林發生作用，使銅銀奈米粒子產生聚集，導致吸收峰的變化。

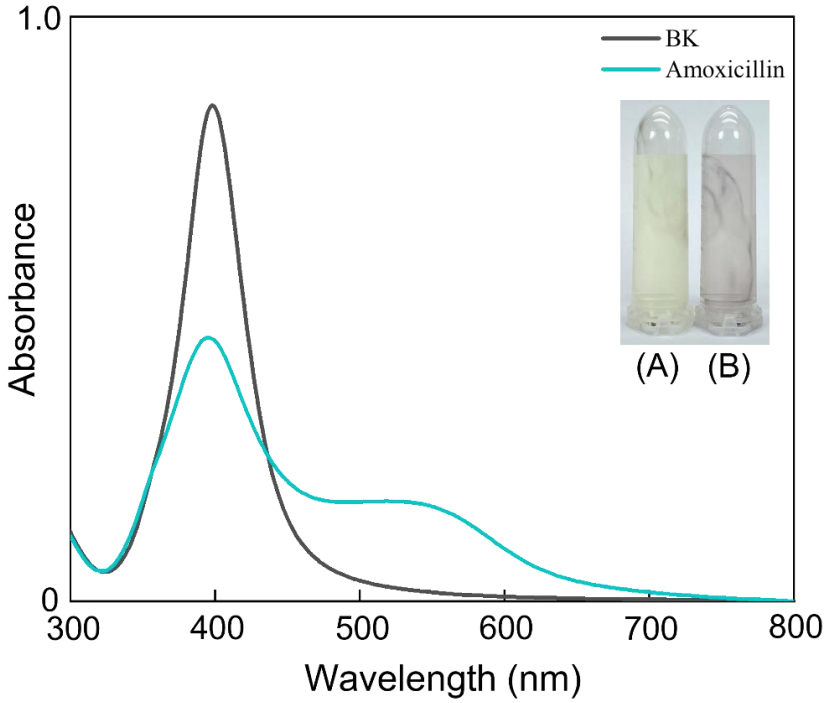

圖 3 銅銀奈米粒子的吸收光譜圖(A)黑線為 Cu@AgNPs 和(B)藍線為 Cu@AgNPs 加阿莫西林(10^{-5} M)，插圖為可見光下的溶液顏色。

三、阿莫西林的檢測機制

圖 4 為本篇 Cu@AgNPs 合成與用於檢測阿莫西林的反應機制圖，利用硼氫化鈉作為還原劑與檸檬酸鈉作為保護劑，將硝酸銀及硝酸銅還原成銅銀奈米粒子。加入阿莫西林後，造成銅銀奈米粒子的聚集。推測聚集原因為阿莫西林上的硫原子，會與 Cu@AgNPs 作用，並利用阿莫西林分子所產生的氫鍵，誘導檸檬酸鹽穩定的 Cu@AgNPs 聚集(Mishra et al., 2023)。

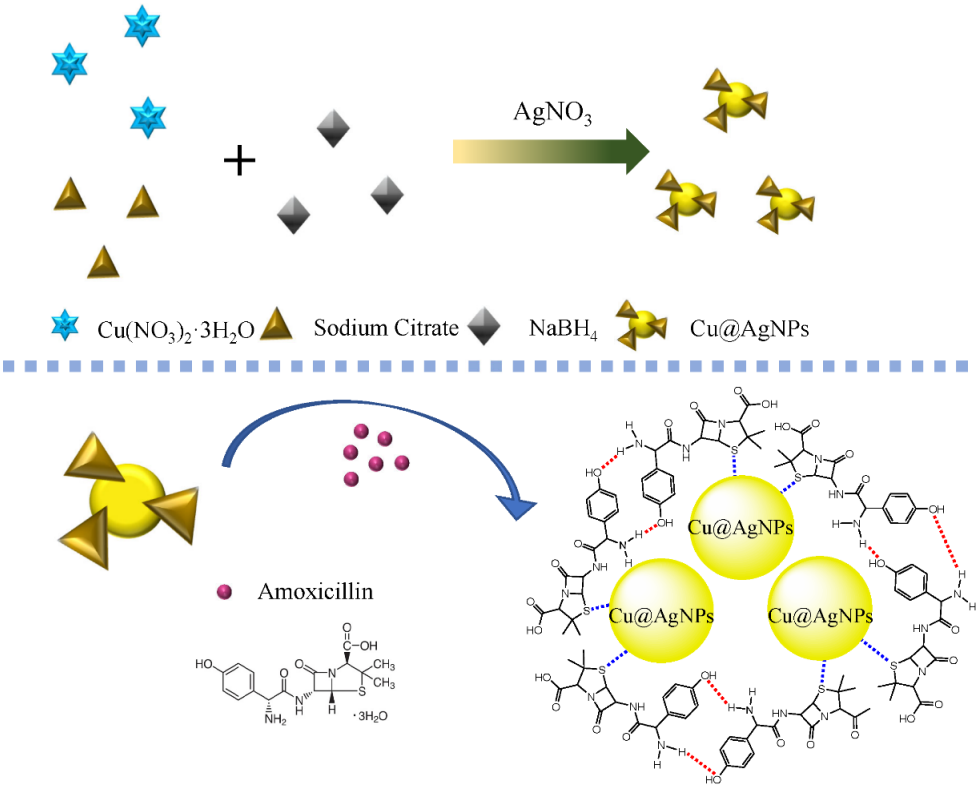

圖 4 合成 Cu@AgNPs 用於檢測阿莫西林反應機制圖。

四、鑑定銅銀奈米粒子

(一) TEM 圖譜

為了探討 Cu@AgNPs 加了阿莫西林之後的粒徑大小的變化，使用穿透式電子顯微鏡 (TEM) 進行分析，**圖 5 (A)**是 Cu@AgNPs 的 EDX 光譜觀察到奈米粒子的組成元素，證明所合成的材料含有碳、銀和銅，其含量分別為 97.2%、1.8%及 0.9%。**圖 5 (B)**為單純 Cu@AgNPs 的 TEM 圖譜，從圖中可以發現 Cu@AgNPs 呈現球形結構並且平均分散在溶液中，**小圖示**為 Cu@AgNPs 之粒徑分布圖，經過統計軟體的數據分析後，結果顯示 Cu@AgNPs 的平均粒徑 7.99 ± 2.69 nm。**圖 5 (C)** 為 Cu@AgNPs 加了阿莫西林之後的 TEM 圖譜，從 TEM 圖譜中可以發現，加入阿莫西林之後會使的原本分散的 Cu@AgNPs 產生聚集。

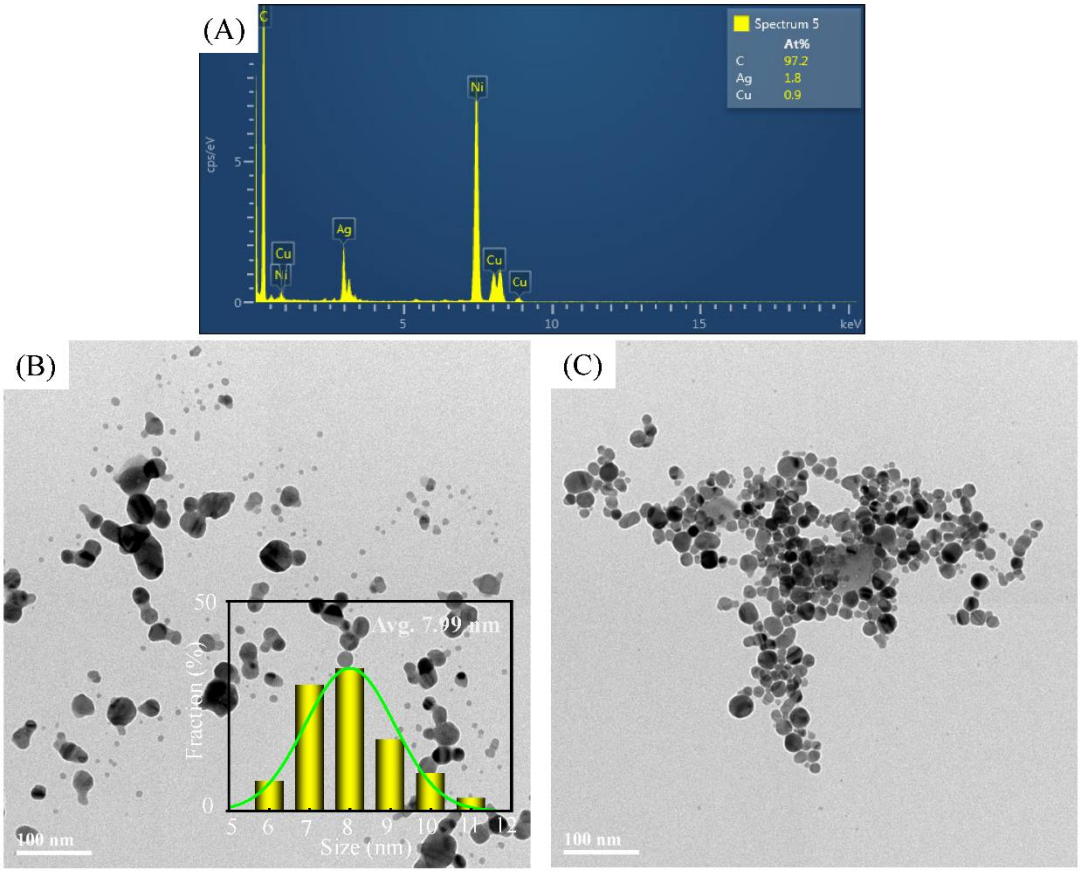

圖 5 (A)為 Cu@AgNPs 的能量散射 X 射線光譜(EDX 圖譜)。(B) Cu@AgNPs 的 TEM 圖，縮圖為 Cu@AgNPs 粒徑分布圖。(C) Cu@AgNPs 加入 Amoxicillin 後的 TEM 圖。

(二) XPS 圖譜

圖 6 (A)在 X 射線光電子能譜有許多不同訊號峰，在 298.03 eV、400.98 eV 、545.03 eV、380.03 eV、965.03 eV 的代表性峰值，分別為 C1s、N1s、O1s、Ag3d、Cu2p。元素分析含量占比分別為 49.39%、47.89%、1.42%、0.73%、0.57%，以上結果可以證明 Cu@AgNPs 探針主要含有碳、氮、氧、銀、銅等元素。**圖 6 (B)**為 C1s 高解析度 XPS 圖譜，可解析出 C-C (284.8 eV) 、C-O (286.4 eV) (Hileuskaya et al., 2023)、C=O (288.3 eV)的訊號。(Abdelgawad, El-Naggar, Eisa, & Rojas, 2017)

圖 6 (C)為 O1s 高解析度 XPS 圖譜，可以解析出 C=O (531.45 eV) (T. Zhao et al., 2010)、C-O-C (533 eV) (Sang, Aisawa, Hirahara, Kudo, & Mori, 2016)、O-H (535.75 eV) (Nakate et al., 2022)的訊號。**圖 6 (D)**為 Ag3d 高解析度 XPS 圖譜，在 $Ag3d_{5/2}$、$Ag3d_{3/2}$ 有 Ag^0 價的訊號峰分別是 368.35 eV(Kelly & Johnston, 2011)、374.35 eV(Gao, Lei, & Ju, 2013)。**圖 6 (E)**為 Cu2p 高解析度 XPS 圖譜，在 $Cu(I)2p_{3/2}$、$Cu(I)2p_{1/2}$ 的訊號峰分別是 932.6eV 和 952.45 (Cheng et al., 2016)。

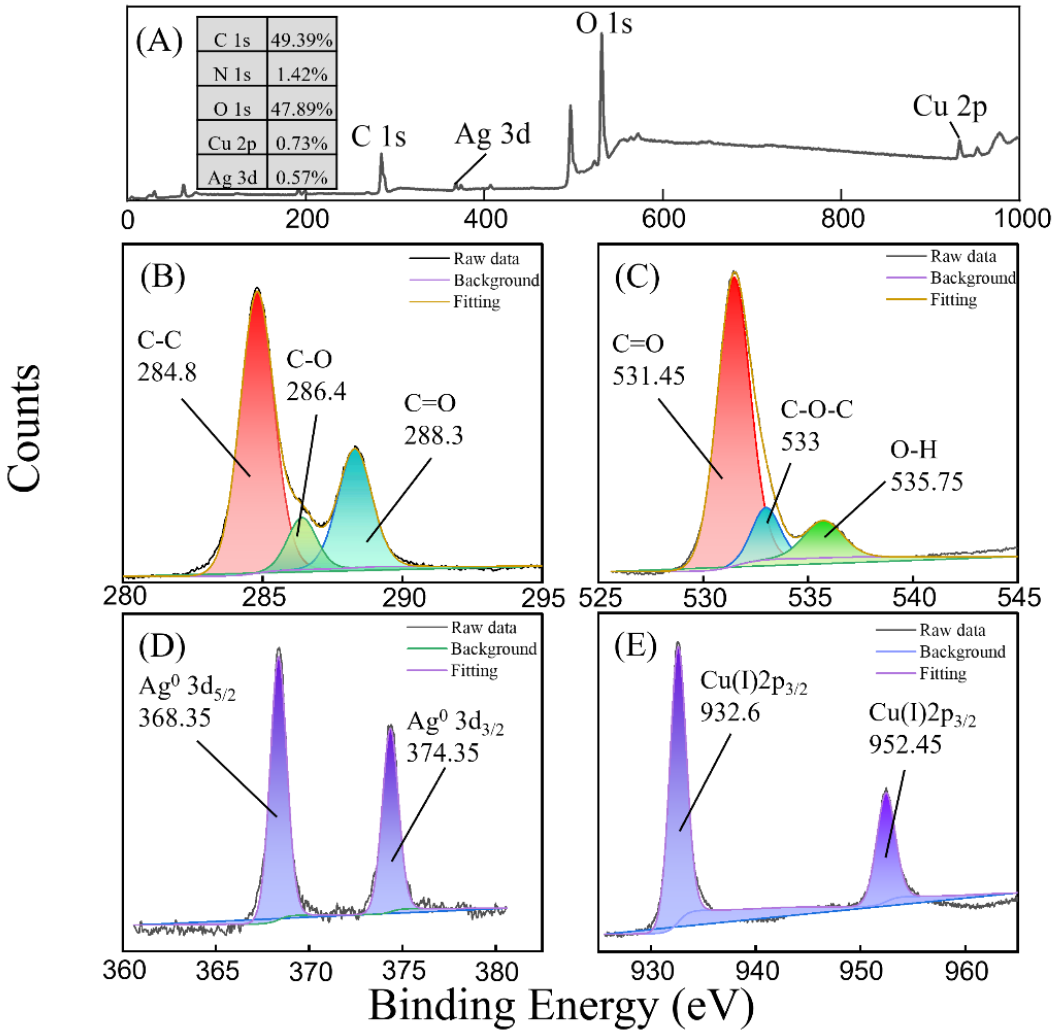

圖 1 Cu@AgNPs 之(A) XPS 全譜圖和高解析(B) C1s、(C) O1s、(D) Ag3d、(E) Cu2p 圖譜。

(三) FT-IR 圖譜

圖 7(A)以 FT-IR 圖譜對於材料中檸檬酸鈉與銅銀奈米粒子相互比對，檸檬酸鈉(紅線)在 3450 cm^{-1} 處有 O-H 拉伸振動、在 2964、2923 cm^{-1}-有 CH_2 拉伸振動、在 1587、1419 cm^{-1} 有不對稱及對稱羧酸鹽類拉伸振動。對應所合成的 Cu@AgNPs 銅銀粒子可以發現在 3450 cm^{-1} 可對應 O-H 拉伸、1587 cm^{-1} 及 1384 cm^{-1} 都有對應上羧酸鹽拉伸振動，表示檸檬酸鈉(保護劑)確實有成功附著在銅銀粒子表面上。

圖 7(B)添加阿莫西林後(黑線)，在 3429 cm^{-1} 有 O-H 拉伸振動、3228 cm^{-1} 有 N-H 拉伸振動、2987 cm^{-1} 有 C-H 拉伸振動、1629 cm^{-1} 有 C=O 拉伸振動、1552 cm^{-1} 有 NH_2 的彎曲振動，在 3500-2600 cm^{-1} 範圍之訊號發生擴張和展寬，推測是因為 Cu@AgNPs 的 O-H 基團與阿莫西林的羥基與胺基之間的氫鍵作用所導致(Mishra et al., 2023)。

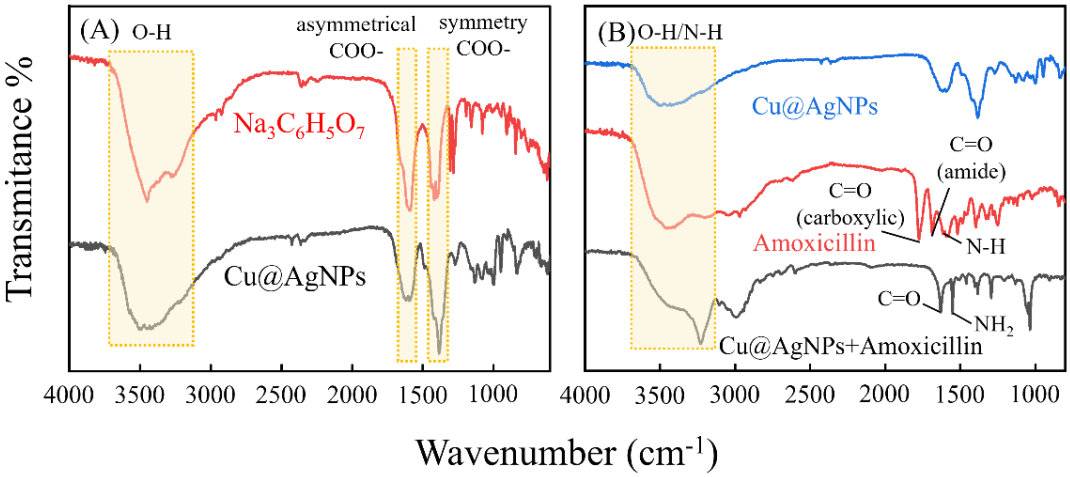

圖 7 (A) Cu@AgNPs 和(B) Cu@AgNPs + Amoxicillin FT-IR 圖譜。

(四) Zeta 電位

為了解 Cu@AgNPs 在不同 pH 值的表面電荷，所以使用奈米粒徑及介面電位量測儀分析其帶電狀況。**圖 8** 為 Cu@AgNPs 在不同 pH 值下的 Zeta 電位，Cu@AgNPs 在 pH 5.0-9.0 的環境下的 Zeta 電位為 -5.57 mV、-7.04 mV、-16.1 mV、-19.06 mV、-22.4 mV、-24.3 mV，Cu@AgNPs 在酸性環境下帶電性較少，而在愈鹼性的環境下會帶較多負電，可歸因於檸檬酸根離子中羧酸根的解離。(Wagener, Schwenke, & Barcikowski, 2012) (Gicheva & Yordanov, 2013)

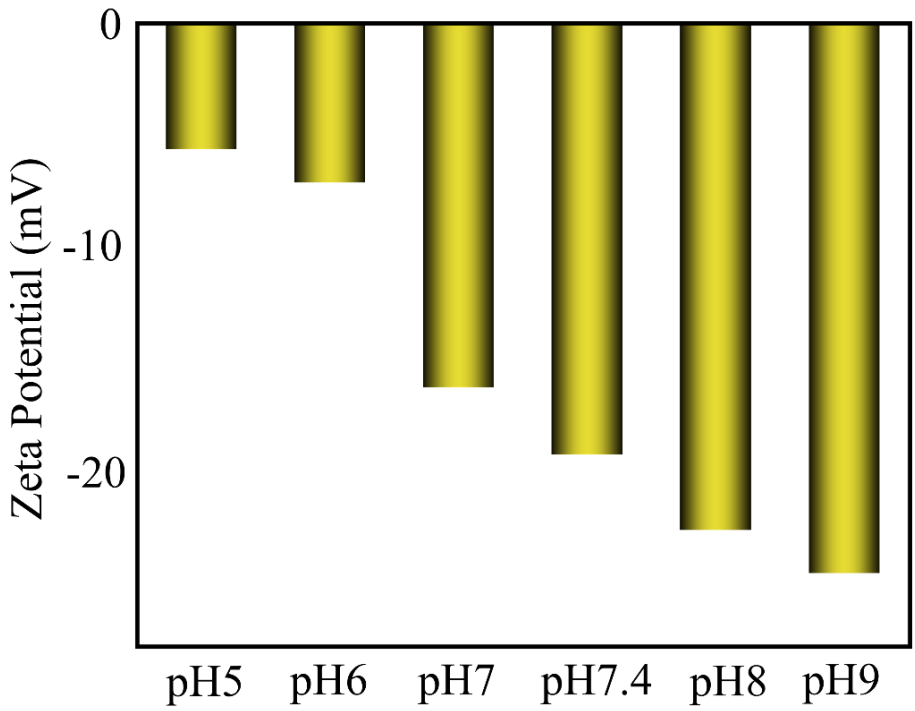

圖 8 Cu@AgNPs 在不同 pH 值的 Zeta 電位。

圖 9 是 Cu@AgNPs 在添加阿莫西林前後的 Zeta 電位圖譜，圖中可以發現當 Cu@AgNPs 加入阿莫西林之後會導致電位發生改變。原先 Cu@AgNPs 的 Zeta 電位為-19.06 mV 添加後變成-7.68 mV，因為電位的改變而導致粒子聚集。

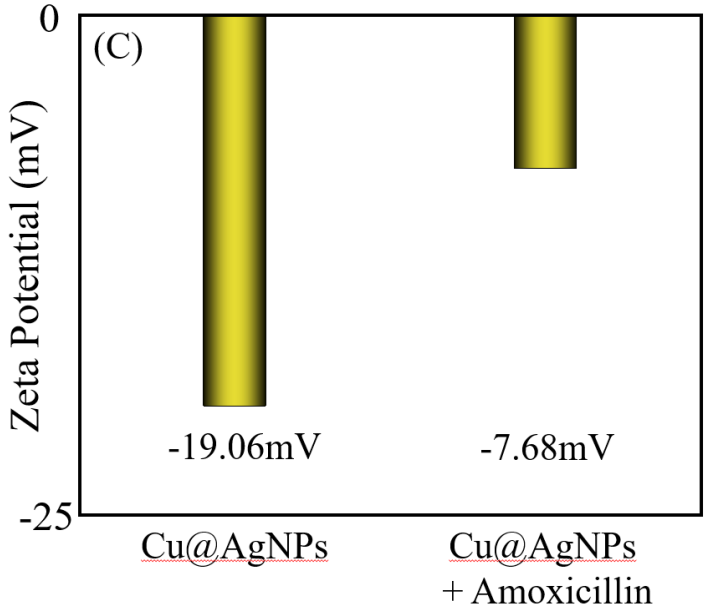

圖 9 (A) Cu@AgNPs 有無添加 Amoxicillin 的 Zeta Potential 的柱狀圖。

五、Cu@AgNPs 的穩定性

圖 10 為 Cu@AgNPs 耐鹽性之柱狀圖，為了確認 Cu@AgNPs 之穩定性，本實驗測試耐鹽性和存放穩定性。**圖 10 (A)**中我們添加了 0-25 mM 的 NaCl，實驗結果證明對於銅銀奈米粒子添加到 25 mM 會因離子強度太強而聚集。為了測試 Cu@AgNPs 的存放穩定性，將合成後的 Cu@AgNPs 保存在 4°C 冰箱中，每天測量並記錄其吸收變化，從**圖 10 (B)**可以看出在放置三週後，Cu@AgNPs 吸收光譜並無明顯的變化，表示所製備的 Cu@AgNPs 具有良好的存放穩定性。

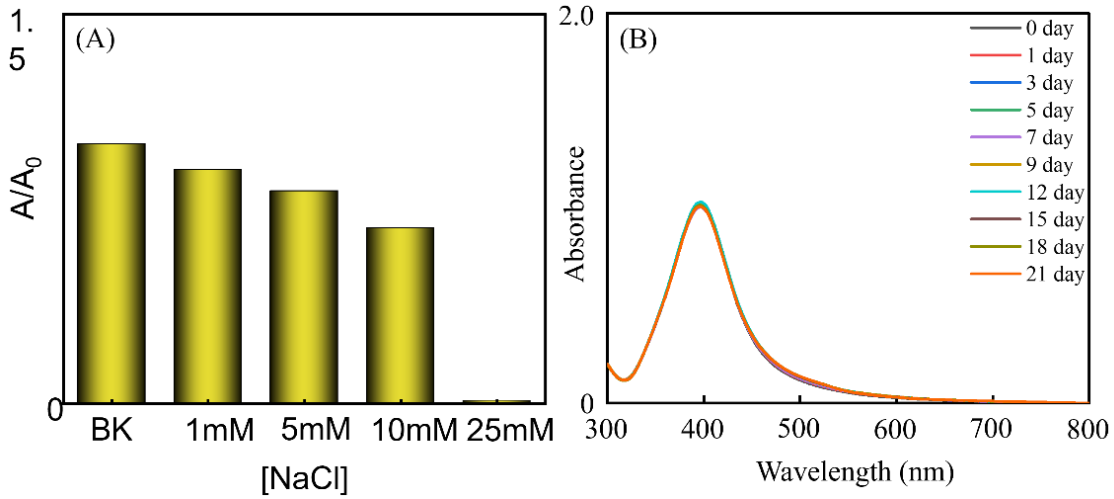

圖 10 (A) Cu@AgNPs 耐鹽性。(B) Cu@AgNPs 三週穩定性吸收圖譜。

六、最佳化檢測條件探討

(一)不同比例 (Cu：Ag) 對於檢測阿莫西林之影響

為了探討檢測阿莫西林的最佳條件因此合成不同濃度的銅銀比例，在合成 Cu@AgNPs 時，添加不同體積(μL)的硝酸銀與硝酸銅，比例依序(Cu:Ag)分別為 0:200、25:175、50:150、75:125、100:100 五種合成比例去檢測阿莫西林，結果如**圖 11 (A)**。從**圖 11(B)**可以發現，乍看之下使用 Cu：Ag 為 100:100 (μL)對於檢測阿莫西林效果最佳，但是粒子處於相當不穩定的狀態，很容易聚集，造成再現性不佳。從**圖 11** (C)看到稀釋 20 倍後溶液顏色呈現灰黑，表示所合成的奈米粒子顆粒分布不均且有大顆粒的奈米粒子。**圖 11**(D)是製備加入超過 100 μL 硝酸銅的原液照片，可以證實當銅含量超過 100 μL 會導致奈米粒子聚集，因此本方法最後選用 Cu:Ag 比為 25:175 (μL)進行以下的實驗。

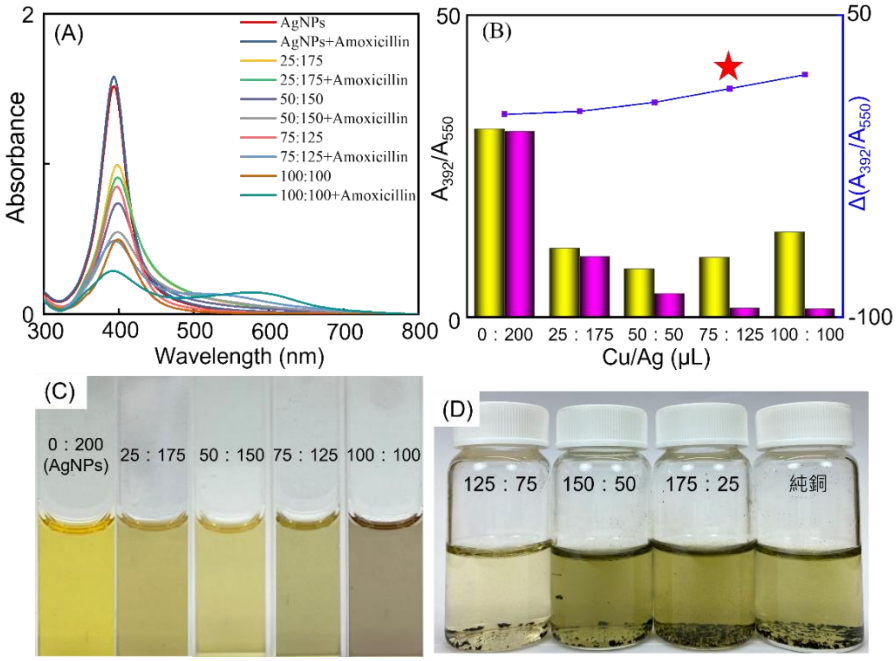

圖 11 不同比例 Cu@AgNPs 對 Amoxicillin 檢測影響。(A)為原始 UV-Vis 圖譜。(B)為比例式 A_{392}/A_{550} 之柱狀圖。(C)為不同銅銀比例稀釋 20 倍在可見光下的照片。(D)添加高比例銅離子的奈米粒子溶液照片。

(二) 不同濃度硼氫化鈉對於檢測阿莫西林之影響

為了探討不同 $NaBH_4$(還原劑)對於檢測阿莫西林的影響，本實驗探討 $NaBH_4$ 的濃度分別為 0.01、0.03、0.05、0.08、0.1 M 用於檢測阿莫西林，結果如**圖 12 (A)**。**圖 12 (B)**柱狀圖中很明顯發現 $NaBH_4$ 0.05 M 濃度的檢測效果是最佳的，**圖 12 (C)**照片可觀察到 $NaBH_4$ 0.05 M 顏色差異。由文獻所表示(Wang, Qiao, Chen, & Ding, 2005)，少量的 $NaBH_4$ 會減少銅銀奈米表面的電子密度導致聚集；而過量的 $NaBH_4$ 顯示出粒子分散穩定，但檢測效果不佳。為了檢測開發檢測阿莫西林的奈米感測器，最終是選用 0.05 M $NaBH_4$ 作為最佳條件。

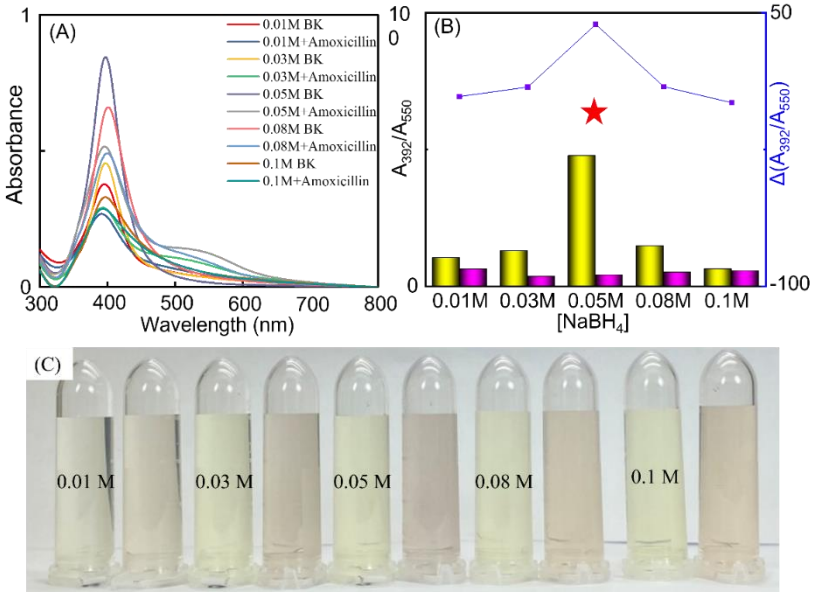

圖 12 (A)不同濃度 $NaBH_4$ 對於 Amoxicillin 的檢測影響 UV-Vis 圖譜。(B)比例式 A_{392}/A_{550} 之柱狀圖。(C)在可見光下，不同濃度 $NaBH_4$ 對於 Amoxicillin 的檢測影響的照片。

(三) 不同濃度檸檬酸鈉對於檢測阿莫西林之影響

為探討不同檸檬酸鈉(保護劑)對於檢測阿莫西林的影響，本實驗探討檸檬酸鈉的濃度分別為 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 M 用於檢測阿莫西林，結果如**圖 13 (A)**。**圖 13 (B)**柱狀圖中很明顯發現檸檬酸鈉 0.1 M 濃度的檢測效果是最佳的，**圖 13 (C)**照片可觀察到檸檬酸鈉 0.1 M 顏色差異。最終選用檸檬酸鈉 0.1 M 作為最佳條件。

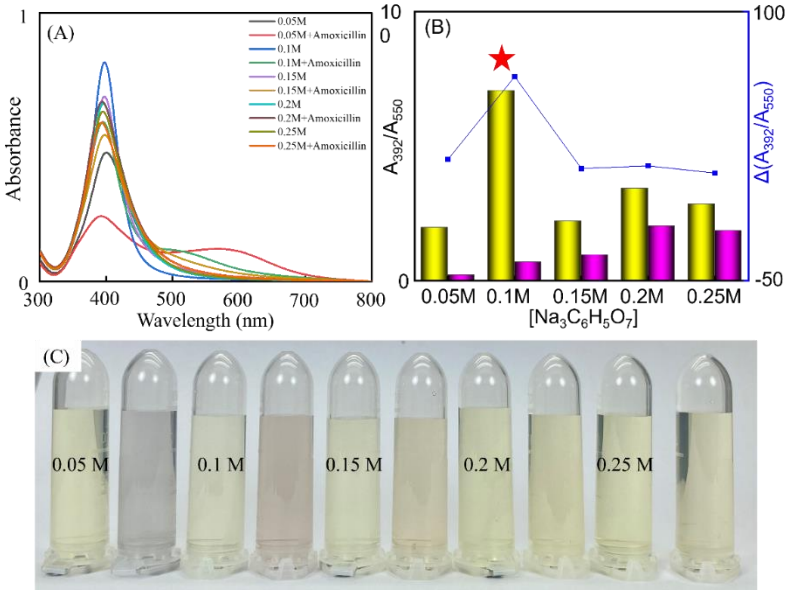

圖 13 (A)不同比例檸檬酸鈉對於 Amoxicillin 的檢測影響 UV-Vis 圖譜。(B)比例式 A_{392}/A_{550} 之柱狀圖。(C) 在可見光下，不同比例檸檬酸鈉對於 Amoxicillin 的檢測影響的照片。

(四) 不同pH值對於檢測阿莫西林之影響

圖 14 (A)為 Cu@AgNPs 在不同 pH 值檢測阿莫西林的影響。**圖 14 (B)**可以發現單純 Cu@AgNPs 在 pH 7.4、8、9 有較高的吸收值。此結果圖 8 的 zeta 電位的量測結果相符，較高 pH 值造成 Cu@AgNPs 表面電位有更大的靜電排斥力，增加 Cu@AgNPs 的穩定性。但是，與**圖 14 (D)**相互對照會發現在鹼性環境下對於檢測阿莫西林效果明顯不佳，這與阿莫西林 *p*Ka 有關當 pH < 2.68 時是陽離子的(帶正電)，在 pH > 7.49 時是陰離子(帶負電)的，在中性 pH 時是兩性離子的(Khan, Siddiqui, & Khan, 2020)。因此選用 pH 7.4 進行下一步實驗。

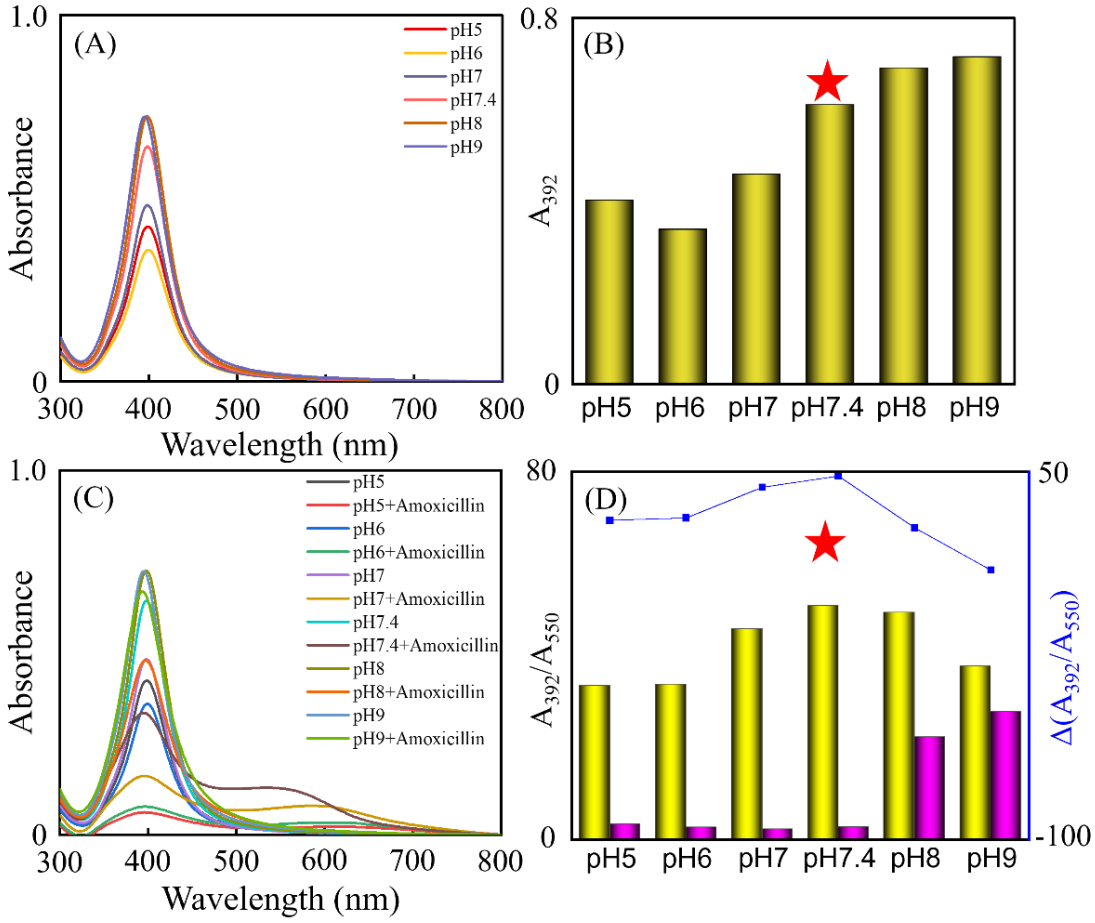

圖 14 Cu@AgNPs 在不同 pH 下的(A) UV-Vis 吸收光譜圖和(B) A_{392} 的柱狀圖。Cu@AgNPs + Amoxicillin 在不同 pH 下的(C) UV-Vis 吸收光譜圖及(D)比例式柱狀圖(A_{392}/A_{550})。

(五) Cu@AgNPs檢測阿莫西林之反應時間

圖 15(A)為 Cu@AgNPs 檢測阿莫西林反應時間吸收變化，為了探討 Cu@AgNPs 對阿莫西林檢測的最佳反應時間，因此在 Cu@AgNPs 加入阿莫西林之後，每隔 15 分鐘測量一次吸收值，並記錄其吸收變化，**圖 15 (B)**可以觀察到在 60 分鐘後吸收度的差異漸漸趨緩，最終選用 60 分鐘作為檢測阿莫西林的反應時間。

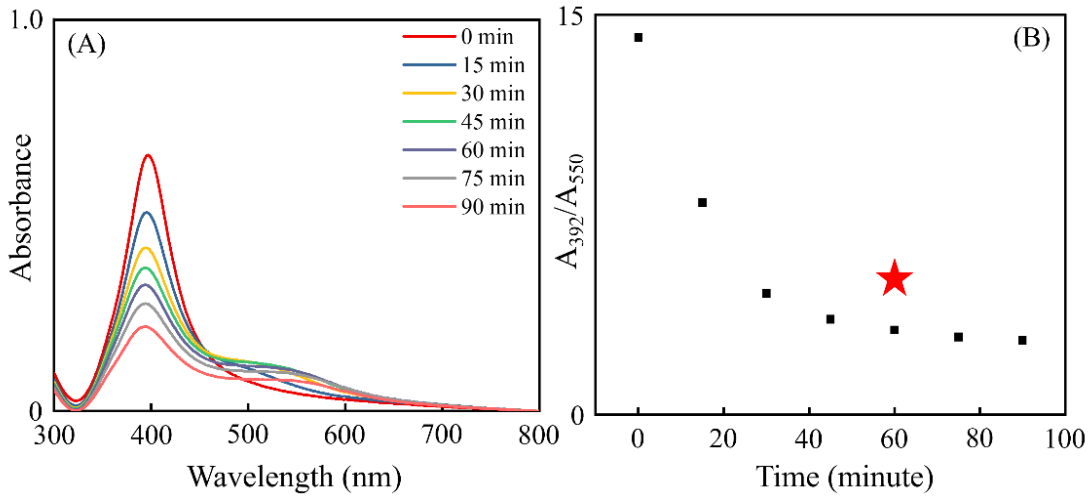

圖 15 (A)Cu@AgNPs 檢測阿莫西林反應時間 UV-Vis 圖譜。

七、Cu@AgNPs 的選擇性

圖 16 (A)為 Cu@AgNPs 的選擇性，這裡選擇九支不同的抗生素，加入 Cu@AgNPs 後的 UV-Vis 吸收光譜圖。從**圖 16 (B)**由左至右分別為頭袍拉定(Cefradine)、頭孢力欣(Cephalexin)、四環素(Tetracycline)、林可黴素(Lincomycin)、氯四環素(Chlortetracycline)、阿莫西林(Amoxicillin)、氧四環素(Oxytetracycline)、頭孢卓西 (Cefalexin)以及泰勒菌素(Tylosin)。在**圖 16 (B)**可以發現 Cu@AgNPs 對於阿莫西林有良好的選擇性，這可能是因為 Cu@AgNPs 的表面官能基與阿莫西林結合導致聚集，使其 392nm 吸收值下降，550 nm 的吸收值上升。

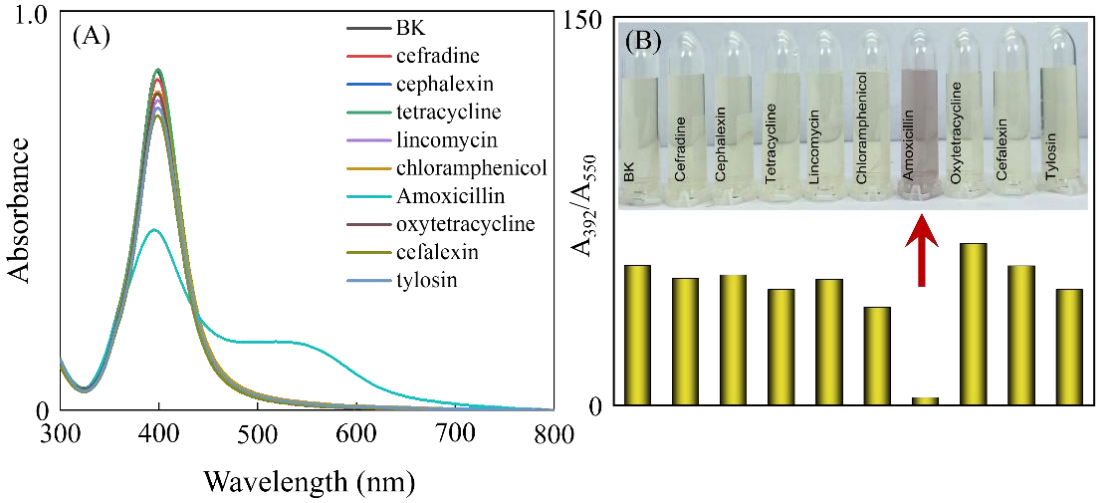

圖 16 Cu@AgNPs 對不同抗生素(10^{-5}M) 選擇性：(A) UV-Vis 吸收光譜圖。(B)選擇性柱狀圖以及 Cu@AgNPs 加入不同抗生素的照片。

八、Cu@AgNPs 抗干擾實驗

圖 17 為探討 Cu@AgNPs 抗干擾實驗，選擇 8 支不同的抗生素(10^{-5}M)加入含有 10^{-5}M 阿莫西林 Cu@AgNPs 溶液。從**圖 17 (B)**由左至右分別為頭袍拉定(Cefradine)、頭孢力欣(Cephalexin)、四環素(Tetracycline)、林可黴素(Lincomycin)、氯四環素(Chlortetracycline)、氧四環素(Oxytetracycline)、頭孢卓西(Cefalexin)以及泰勒菌素(Tylosin)。在**圖 17(A)**的 UV-Vis 吸收圖譜和**圖 17(B)**的比例柱狀圖中可以發現，這些抗生素並不會對於 Cu@AgNPs 檢測阿莫西林有明顯的干擾，因此具有良好的抗干擾性。

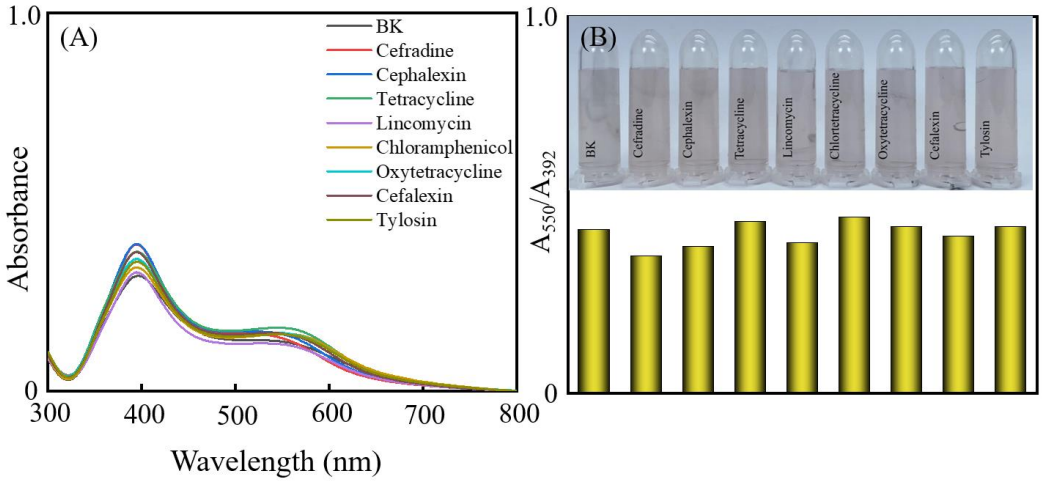

圖 17 Cu@AgNPs 對不同抗生素(10^{-5}M) 抗干擾實驗：(A)吸收光譜圖，(B)為抗干擾柱狀圖以及 Cu@AgNPs 在阿莫西林存在下，添加不同抗生素的照片。

九、阿莫西林的檢測線性範圍

為了探討 Cu@AgNPs 檢測阿莫西林的線性範圍，添加不同濃度的阿莫西林(0.1-1.0 μM)。由**圖 18(A)**中可發現，Cu@AgNPs 的吸收度隨著阿莫西林的濃度上升而下降。根據檢測的穩定性這邊做了三重複實驗，結果如**圖 18(B)**所示(比例式 A_{550}/A_{392} 以正斜率表示)，檢測阿莫西林的濃度的範圍為 0.1-1.0 μM，R^2 為 0.9786，偵測極限(LOD)為 0.079 μM (3σ/S)。

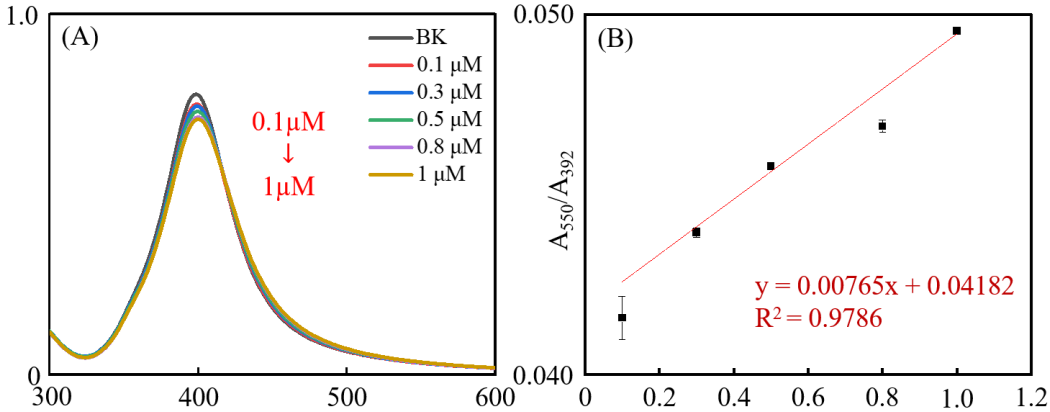

圖 18 (A)不同濃度 Amoxicillin 對於 Cu@AgNPs 的 UV-Vis 吸收光譜圖，(B)Amoxicillin 之檢量線。

十、文獻比較

表 1 為本篇方法與其他文獻結果進行比較，從表中可以發現本篇檢測阿莫西林的線性範圍雖然不是特別廣，但具有不錯的 LOD 值，與表中利用不同方法檢測相同抗生素的結果相比，得出的結果可以證明本方法具有良好的檢測能力。

表 1 與其他文獻比較檢測阿莫西林之線性範圍

Probe	Method	Linear range (μM)	LOD (μM)	Ref.
-	HPLC	0.137–1368	4.38×10^{-2}	(Unutkan, Bakırdere, & Keyf, 2018)
QDs-P6LCPEDOT; PSS/GCE	Electrochemistry	0.9~69	5×10^{-2}	(Wong et al., 2020)
B-CQD	Fluorescence	1.43~429.12	8.25×10^{-1}	(X. Zhang, Ren, Ji, & Fan, 2020)
Qt AgNPs	UV-Vis	10 ~ 95	4.46	(ul Ain et al., 2018)
Cu@AgNPs	UV-Vis	0.1 ~ 1.0	7.9×10^{-2}	This work

HPLC: high performance liquid chromatography
QD: Quantum Dot
P6LC: Printex 6L Carbon
PEDOT(PSS): poly (3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrene sulfonate)
GCE: Glassy Carbon Electrode
CQD: Carbon Quantum Dots
Qt: Quercetagetin

十一、真實樣品

為了評估本方法是否能夠實際檢測，我們利用 Cu@AgNPs 作為探針來偵測真實樣品中的阿莫西林含量。水樣取自國立臺東大學之飲用水。結果如 **Table 2**，飲用水的回收率為 84-101.3%，RSD 皆小於 10.3% (n=3)。證明此方法確實可應用於檢測水樣中的阿莫西林。

表 2 檢測阿莫西林之真實樣品之飲用水(n = 3)。

Sample	**Spiked (μM)**	**Found (μM)**	**Recovery (%)**	**RSD (%)**
Drinking Water	0.3	0.28	93.0	10.3
	0.5	0.42	84.0	4.8
	0.8	0.81	101.3	6.9

陸、結論

本篇開發出一種使用檸檬酸鈉為保護劑和硼氫化納作為還原劑，並利用化學還原方式合成出銅核及銀殼的銅銀奈米粒子(Cu@AgNPs)。Cu@AgNPs 平均粒徑 7.99 ± 2.69 nm，加入阿莫西林後由於靜電吸引力和氫鍵作用的關係，導致銅銀奈米粒子聚集，顏色從淡黃色變為淡紫色。加入阿莫西林後在 392 nm 處 Cu@AgNPs 表面電漿共振峰強度降低.，在 550 nm 的波長出現了新的吸收帶。選擇吸光度比（A_{550}/A_{392}）正斜率方式，作為與阿莫西林濃度間接相關的分析信號。線性範圍為 0.1-1.0 μM ($R^2 = 0.9786$)，LOD 為 0.079 μM。此外，本方法已成功應用於水樣中阿莫西林檢測，回收率介於 84.0-101.3%，RSD 皆小於 10.3% (n = 3)。未來將嘗試應用於檢測其他真實樣品中阿莫西林的濃度。

柒、參考文獻

Akhond, M., Absalan, G., & Ershadifar, H. (2015). Highly sensitive colorimetric determination of amoxicillin in pharmaceutical formulations based on induced aggregation of gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 143*, 223-229.

Anh, N. T., Dinh, N. X., Van Tuan, H., Doan, M. Q., Anh, N. H., Khi, N. T., Trang, V. T., Tri, D. Q., & Le, A.-T. (2022). Eco-friendly copper nanomaterials-based dual-mode optical nanosensors for ultrasensitive trace determination of amoxicillin antibiotics residue in tap water samples. *Materials Research Bulletin, 147*, 111649.

Abdelgawad, A. M., El-Naggar, M. E., Eisa, W. H., & Rojas, O. J. (2017). Clean and high-throughput production of silver nanoparticles mediated by soy protein via solid state synthesis. *Journal of Cleaner Production, 144*, 501-510.

Bogialli, S., Capitolino, V., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., & Sergi, M. (2004). Simple and rapid liquid chromatography−tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues and milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(11), 3286-3291.

Cheng, Y., Lin, Y., Xu, J., He, J., Wang, T., Yu, G., Shao, D, Wang, W.-H., Lu, F., Li, L., Du, X., Wang, W., Liu, H., & Zheng, R. (2016). Surface plasmon resonance enhanced visible-light-driven photocatalytic activity in Cu nanoparticles covered Cu_2O microspheres for degrading organic pollutants. *Applied Surface Science, 366*, 120-128.

Du, Q., Jing, Z., Qi, H., Zuo, L., Zhou, L., He, H., & Sun, Z. (2021). Visual recognition and detection of clindamycin by Au@Ag core–shell nanoparticles. *ACS Omega, 6*(22), 14260-14267.

Gao, F., Lei, J., & Ju, H. (2013). Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy for sensitive DNA detection by DNA-mediated silver nanoparticle growth. *Analytical Chemistry, 85*(24), 11788-11793.

Gicheva, G., & Yordanov, G. (2013). Removal of citrate-coated silver nanoparticles from aqueous dispersions by using activated carbon. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 431*, 51-59.

Hussain, A., Sun, D.-W., & Pu, H. (2020). Bimetallic core shelled nanoparticles (Au@AgNPs) for rapid detection of thiram and dicyandiamide contaminants in liquid milk using SERS. *Food Chem, 317*, 126429.

Hileuskaya, K., Ihnatsyeu-Kachan, A., Kraskouski, A., Saichuk, A., Hileuskaya, A., Nikalaichuk, V., Kulikouskaya, V., & Kim, S. (2023). Aspects of the interaction of pectin-coated Ag nanoparticles with methylene blue with regard to photodynamic applications. *Materials Today Communications, 35*, 105597.

Kelly, F. M., & Johnston, J. H. (2011). Colored and functional silver nanoparticle-wool fiber composites. *ACS Applied Materials & Interfaces, 3*(4), 1083-1092.

Khan, S. A., Siddiqui, M. F., & Khan, T. A. (2020). Synthesis of poly(methacrylic acid)/montmorillonite hydrogel nanocomposite for efficient adsorption of amoxicillin and diclofenac from aqueous environment: Kinetic, isotherm, reusability, and thermodynamic investigations. *ACS Omega, 5*(6), 2843-2855.

Mishra, A., Kukreja, E. A., Pudake, R. N., Kumar, R., Singh, M. P., Yadav, L., Pandey, I., Sheikh, F. A., & Tripathi, R. M. (2023). Label-free selective and sensitive colorimetric detection of ampicillin in milk and water using silver nanoparticles. *Journal of Food Composition and Analysis, 119*, 105256.

Nakate, Y. T., Sangale, S. S., Shaikh, S. F., Shinde, N. M., Shirale, D. J., & Mane, R. S. (2022). Human urine-derived naturally heteroatom doped highly porous carbonaceous material for gas sensing and supercapacitor applications. *Ceramics International, 48*, 28942-28950.

Nguyen, D. K., & Jang, C.-H. (2022). Ultrasensitive colorimetric detection of amoxicillin based on Tris-HCl-induced aggregation of gold nanoparticles. *Analytical Biochemistry, 645*, 114634.

Sang, J., Aisawa, S., Hirahara, H., Kudo, T., & Mori, K. (2016). Self-reduction and size controlled synthesis of silver nanoparticles on carbon nanospheres by grafting triazine-based molecular layer for conductivity improvement. *Applied Surface Science, 364*, 110-116.

ul Ain, N., Anis, I., Ahmed, F., Shah, M. R., Parveen, S., Faizi, S., & Ahmed, S. (2018). Colorimetric detection of amoxicillin based on querecetagetin coated silver nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical, 265*, 617-624.

Unutkan, T., Bakırdere, S., & Keyf, S. (2018). Development of an analytical method for the determination of amoxicillin in commercial drugs and wastewater samples, and assessing its sability in simulated gastric digestion. *Journal of Chromatographic Science, 56*(1), 36-40.

Wagener, P., Schwenke, A., & Barcikowski, S. (2012). How citrate ligands affect nanoparticle adsorption to microparticle supports. *Langmuir, 28*(14), 6132-6140.

Wang, H., Qiao, X., Chen, J., & Ding, S. (2005). Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 256*(2), 111-115.

Wong, A., Santos, A. M., Cincotto, F. H., Moraes, F. C., Fatibello-Filho, O., & Sotomayor, M. D. P. T. (2020). A new electrochemical platform based on low cost nanomaterials

for sensitive detection of the amoxicillin antibiotic in different matrices. *Talanta, 206*, 120252.

Zhang, X., Ren, Y., Ji, Z., & Fan, J. (2020). Sensitive detection of amoxicillin in aqueous solution with novel fluorescent probes containing boron-doped carbon quantum dots. *Journal of Molecular Liquids, 311*, 113278.

Zhang, Z.-Z., Xu, J.-J., Shi, Z.-J., Cheng, Y.-F., Ji, Z.-Q., Deng, R., & Jin, R.-C. (2017). Short-term impacts of Cu, CuO, ZnO and Ag nanoparticles (NPs) on anammox sludge: CuNPs make a difference. *Bioresource Technology, 235*, 281-291.

Zhao, T., Sun, R., Yu, S., Zhang, Z., Zhou, L., Huang, H., & Du, R. (2010). Size-controlled preparation of silver nanoparticles by a modified polyol method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 366*(1), 197-202.