

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫：利用 N-GQD 螢光淬滅開發偵測氯黴素方法及探討淬滅 *
* 名稱：機制 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 胡曉晴
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-035-M
研究期間： 106年07月01日至107年02月28日止，計8個月
指導教授： 蔡惠燕

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學應用化學系(含碩士班)

中華民國 107年03月21日

簡述

本研究報告利用 N-GQD 螢光淬滅效應開發偵測氯黴素方法及探討其淬滅機制。因 N-GQD 生物相容性佳、毒性較小、水溶性好，故使用其為螢光物質；氯黴素(Chloramphenicol, CAP)是種廣效性抗生素，但因其具有硝基(-NO₂)對人體有潛在毒性，目前已禁止使用於產食動物，在食品中不得檢出。為避免抗生素濫用對環境的影響及對食品安全把關，應從畜牧業源頭把關，所以飼料中是否有 CAP 的檢測是必要的。本專題將開發一種螢光淬滅的方法，並利用微盤高通量、快速、簡單的優點來檢測 CAP，對未來食品安全把關及抗生素藥物濫用的控管能有所幫助。

摘要

氯黴素(Chloramphenicol, CAP)是種廣效性抗生素，但對人體有潛在毒性會造成嚴重副作用，醫學證明氯黴素會抑制骨髓造血功能，進而引發貧血症狀及敗血症亦或是產生抗藥性，目前已禁止使用於產食動物，在食品中不得檢出。取而代之的是氟甲磺氯黴素(Florfenicol, FF)，結構與氯黴素相似，但不含會造成上述提及之副作用的硝基(-NO₂)，故是合法可以使用之抗生素。此兩種抗生素價差高達 50 倍，所以仍有不肖業者違法使用 CAP 的情形，為避免抗生素濫用對環境的影響及食品安全把關，應從禽畜飼料源頭把關，所以飼料中是否有 CAP 的檢測是必要的。

但現有檢測 CAP 的方法步驟過於繁瑣且耗時，故本研究專題將開發一種螢光淬滅的方法，利用微盤高通量、快速、簡單的方法來測量 CAP，可用於飼料查驗或食品動物用藥殘留快篩及定量，對未來食品安全把關及對抗生素藥物濫用的控管能有所幫助。

Abstract

Chloramphenicol (CAP) is a kind of broad-spectrum antibiotics, but the potential toxicity of the human body can cause serious side effects. CAP will inhibit bone marrow hematopoiesis function, and then cause anemia, septicemia and drug resistance. Therefore, CAP is banned to add in the foodstuffs of poultry and can't be found in food. Instead, florfenicol (FF) is a legal antibiotics, which structure is similar to CAP, and it will not cause side effects mentioned above. Due to the cost of florfenicol is 50 times more than that of CAP, some unscrupulous businessmen still use of CAP illegally. In order to avoid abuse of antibiotics and to ensure food safety, we should inspect livestock feed regularly.

The existing method of detecting CAP is too cumbersome and time consuming. This study developed a fluorescence quenching method, which is a fast and simple method to measure CAP. It can be used for fast screening CAP of livestock feed. This method is benefit for ensuring food safety and controlling of the abuse of antibiotics.

目錄

摘要	I
目錄	III
圖目錄	IV
表目錄	VI
第一章、緒論	1
1-1 前言	1
1-2 文獻回顧 含氮石墨烯量子點在螢光淬滅偵測之應用	4
第二章、儀器與實驗	5
2-1 實驗儀器	5
2-2 實驗藥品	6
2-3 實驗	7
第三章、結果討論	9
3-1 TEM of N-GQD	9
3-2 使用 N-GQD 螢光淬滅偵測 CAP 之最適化條件探討	10
3-3 CAP 與 N-GQD 螢光淬滅作用機制探討	19
3-4 實際樣品(雞飼料)前處理及偵測	23
第四章、結論	29
第五章、參考文獻	30

圖目錄

圖 1 氯黴素(Chloramphenicol, CAP)結構圖	2
圖 2 氟甲磺氯黴素(Florfenicol, FF)結構圖	2
圖 3 N-GQD 與 CAP 反應之示意圖	3
圖 4 N-GQD 之 TEM 圖 (0.5mg/mL).....	9
圖 5 0.1mg/mL N-GQD 以放射波長 445nm，掃激發波長之螢光光譜圖 .	10
圖 6 0.1mg/mL N-GQD 以不同激發波長掃發射波長之螢光光譜圖	10
圖 7 (A)N-GQD 螢光強度與濃度關係圖 (B)N-GQD 校正曲線圖	11
圖 8 0.1mg/mL N-GQD 螢光強度與持續曝光時間關係圖 (2 小時)	12
圖 9 0.1mg/mL N-GQD 螢光強度與保存時間關係圖 (4 個月).....	12
圖 10 0.1mg/mL N-GQD 與 pbs 及 CAP，以不同激發波長掃發射波長之螢光光譜圖	13
圖 11 N-GQD 選擇性之螢光光譜圖	14
圖 12 不同 pH 值之磷酸緩衝溶液對 N-GQD 螢光淬滅比例之關係圖	15
圖 13 N-GQD 在不同緩衝溶液之穩定性	16
圖 14 不同濃度 KCl 對 N-GQD 螢光淬滅比例之關係圖	17
圖 15 (A) CAP 濃度對 N-GQD 螢光強度(F/F_0)之關係圖 (B) N-GQD 定量 CAP 之校正曲線	18
圖 16 N-GQD 加不同濃度 CAP 之螢光光譜圖	19
圖 17 CAP 吸收光譜圖與 N-GQD 以激發波長 280nm 所得之螢光光譜圖	20
圖 18 N-GQD 與 CAP 之吸收光譜圖疊圖	21
圖 19 溫度對 CAP 淬滅 N-GQD 之關係圖	22
圖 20 不同有機溶劑對條件最適化之緩衝溶劑螢光維持率(F/F_0)之關係圖	23

圖 21 飼料內成份對 N-GQD 螢光淬滅之關係圖	24
圖 22 添加基質修飾(matrix modification)所得之 CAP 校正曲線	25
圖 23 N-GQD 溶於 0.01M pH=6 之磷酸緩衝溶液，四種飼料添加基質修飾 所得之 CAP 校正曲線	26

表目錄

表 1 儀器設備及廠牌型號.....	5
表 2 藥品名稱及廠牌.....	6
表 3 每克飼料內所添加之 CAP 濃度與回收率關係圖	25
表 4 N-GQD 溶於 0.01M pH=6 之磷酸緩衝溶液，不同種類之雞飼料經標準添加法加入 CAP 後所計算之回收率.....	27

第一章、緒論

1-1 前言

氯黴素(Chloramphenicol, CAP)，結構如圖 1，為廣效性抗生素(對革蘭陽性菌、革蘭陰性菌、某些大型病毒與某些螺旋菌具有抗菌作用)，由於價格便宜，曾被大量用於肉類動物及水產類的傳染性疾病控制。但對人體有潛在毒性或造成嚴重副作用，醫學證明氯黴素會抑制骨髓造血功能，進而導致紅血球發育不全、敗血症及再生不良性貧血，甚至會使心臟衰竭¹。現已為大多數國家所禁用，我國也於 2002 年禁用，依據衛生福利部「動物用藥殘留標準」²，禽畜水產品中氯黴素之殘留規定為「不得檢出」。

可以取而代之的是，氟甲磺氯黴素(Florfenicol, FF)，結構如圖 2，其結構與抗菌活性與氯黴素相似，但其克服了氯黴素易產生耐藥性和造成再生障礙性貧血的問題，具有抗菌譜廣、口服吸收好、體內分布廣泛、生物利用度高、應用安全等特點。因此取代氯黴素的使用，准予應用畜牧獸醫、水產動物的疾病預防與治療。

上述兩種抗生素價差高達 50 倍，所以仍有不肖業者違法使用 CAP 的情形，為避免抗生素濫用對環境的影響及對食品安全把關，應從畜牧源頭就開始把關，控管禽畜飼料不要違法使用 CAP。

目前測定 CAP 常用的技術包含免疫測定法³、GC-MS⁴、HPLC-MS/MS⁵、LC-MS/MS⁶ 等等，這些方法雖然非常靈敏，但皆需要經過繁瑣的樣品前處理後才能上機偵測，並且需昂貴的儀器設備，相當費時費力。或是使用適體接上 CdTe 量子點後和石墨烯的氧化物進行能量轉移，使螢光下降，再加入 CAP 後，CAP 把適體接-CdTe 量子點從石墨烯的氧化物上釋放出，使螢光增強，但此方法需要找適合的適體並合成⁷⁻¹⁰，步驟也較繁瑣。

故本專題研究欲利用含氮的石墨烯量子點(Nitrogen-doped Graphene Quantum Dots, N-GQD)，開發一種螢光淬滅的方法，並利用微盤高通量、快速、簡單的優點來偵測氯黴素，可用於飼料抽驗及動物用藥殘留的快速篩檢。最後將探討 CAP 造成 N-GQD 螢光淬滅的機制。

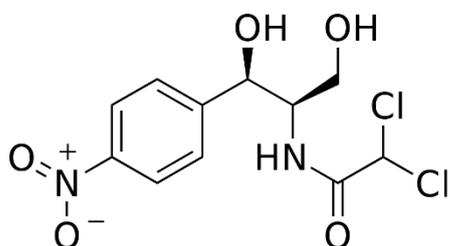


圖 1 氯黴素(Chloramphenicol, CAP)結構圖

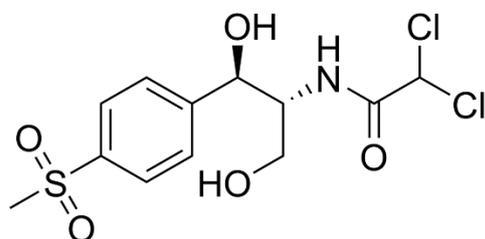


圖 2 氟甲磺氯黴素(Florfenicol, FF)結構圖

本專題研究將由國立暨南大學傅傳博老師研究室提供具良好螢光效率的N-GQD，其毒性低、有良好的螢光穩定性、易於表面修飾、生物相容性佳¹¹。依照文獻所提及，CAP (有-NO₂)可以被還原是電子接受者¹²，並具有 π 電子，可以推測N-GQD可能會和CAP產生 π - π 作用或氫鍵鍵結，進而產生電子轉移(如圖3)；抑或是N-GQD與CAP兩者間存在吸附¹³與碰撞之作用，產生螢光淬滅的現象。本專題研究將做N-GQD偵測CAP之條件最適化及螢光淬滅機制探討。

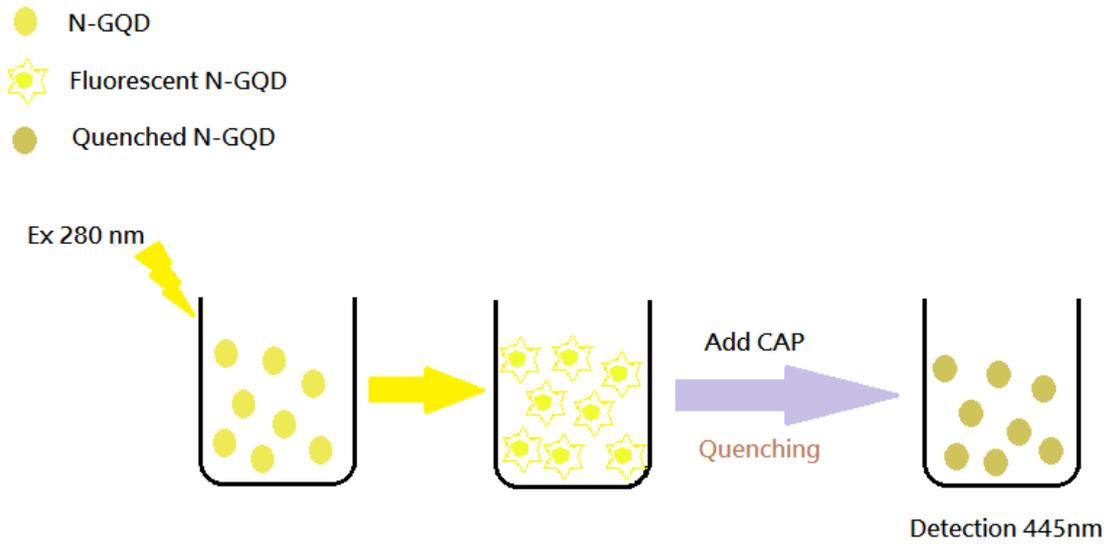


圖 3 N-GQD 與 CAP 反應之示意圖

1-2 文獻回顧 含氮石墨烯量子點 (Nitrogen-doped Graphene

Quantum Dots, N-GQD)在螢光淬滅偵測之應用

將石墨烯以化學或物理方式將其尺寸縮小時，會由於量子侷限效應以及邊際效應而使得其性質改變，當其能階被調控到適當範圍時就有可能會釋放出螢光，視為石墨烯量子點，其在細胞毒性、生物相容性等方面也有比石墨烯更好的表現。

含氮的石墨烯量子點(Nitrogen-doped Graphene Quantum Dots, N-GQD)，毒性低、有良好的螢光穩定性、易於表面修飾、生物相容性佳。由於反應時所添加的試劑不同，可能在其表面上修飾不同官能基，進而利用其具有螢光特性對於不同目標分析物進行偵測及其他應用。

近年來，基於螢光共振能量轉移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)⁷的傳感器常被使用；在過去，有機染料分子常作為能量提供者，與有機染料相比，無機量子點(QD)作為多功能能量供體已受到密切關注。量子點表現出螢光穩定，高量子產率，窄及對稱的發射帶，寬吸收光譜和光致發光(PL)。基於 FRET 的生物傳感器提供了幾個優點:高速、易於製備、操作簡單、高選擇性和低成本。分子距離小於 7nm 通常用此方法轉移能量⁷，因 Nitrogen-doped Graphene Quantum Dots, N-GQD 的直徑大小大概為 2.5nm，故可能使用此方法發出螢光。

有文獻提到 N-GQD 對於 Fe^{3+} 有強的識別性¹⁴⁻¹⁵，因 Fe^{3+} 是缺電子的物質，N-GQD 是電子提供者，故可將電子及能量轉移給 Fe^{3+} ，進而造成螢光淬滅的現象，且螢光淬滅的比例隨著缺電子物質的濃度增加而增加。因此可以預測，或許含硝基的 CAP 亦會造成 N-GQD 螢光淬滅之結果。螢光淬滅現象是能量轉移機制或分子間相互作用的結果，當螢光分子與其他分子互相作用，使螢光減弱之現象稱為-螢光淬滅。但當螢光物質濃度過大時，亦會產生自身淬滅的現象。

第二章、儀器與實驗

2-1 實驗儀器

表 1 儀器設備及廠牌型號

儀器名稱	廠牌	型號
五合一多功能光譜儀	Molecular Devices	SpectraMax M5
電子天秤	Sartorius	CP224S
超純水製備裝置	Purity-UV	SUNTEX EC-410
螺旋混合震盪器	Thermolyne	Type 65800
酸鹼度計	SUNTEX	SP701
96well 微盤	Thermo	
離心機	Hettich	UNIVERSAL 32R

2-2 實驗藥品

表 2 藥品名稱及廠牌

藥品名稱	廠牌
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	SIGMA
Chloramphenicol	SIGMA
Florfenicol	SIGMA
Potassium Chloride	SHOWA
Disodium hydrogen phosphate	SHOWA
Sodium dihydrogen phosphate, monohydrate	THERMO FISHER
Ethanol absolute	PANREAC
Zinc Chloride	SIGMA
Copper(II) Chloride 2-hydrate	KATAYAMA
Calcium Chloride Anhydrous	PANREAC

2-3 實驗

2.3.1 合成 N-GQD

- (1) 秤取尿素及檸檬酸，加入二次水搖勻。
- (2) 放入微波合成儀，加熱 180°，反應 20 分鐘。

2-3.2 使用 N-GQD 螢光淬滅偵測 CAP 之最適化條件探討

1. 探討螢光物質(N-GQD)的最佳激發及發射波長
 - (1) 取 100uL 1mg/mL N-GQD，加入 900uL 二次水，配製濃度為 0.1mg/mL 的 N-GQD 水溶液。
 - (2) 用不同激發波長掃其螢光發射波長範圍 325~750 nm 之螢光光譜圖，觀察其在不同發射波長之螢光強度，找出一個最佳激發及發射波長。
2. 螢光物質(N-GQD)螢光之線性範圍濃度探討
 - (1) 取 1mg/mL N-GQD，加入二次水稀釋成不同濃度的 N-GQD 水溶液。
 - (2) 取 200uL 放入微盤中，在 EX280nm EM445nm 處(實驗用之激發及發射波長)測螢光強度。
3. 探討 N-GQD 螢光穩定性
 - (1) 取 100uL 1mg/mL N-GQD，加入 900uL 二次水，配製濃度為 0.1mg/mL 的 N-GQD 水溶液。
 - (2) 每隔 1 分鐘測一次在 EX280nm EM445nm 的螢光強度，總共測 2 小時。
4. 探討使用 N-GQD 定量 CAP 的最佳激發波長及發射波長
 - (1) 取 100uL 0.1mg/mL N-GQD 加 50uL 0.1mg/mL CAP，加入微盤中均勻混合，在 EX370nm、EX250nm、EX280nm、EX310nm 掃其螢光發射波長範圍 325~750 nm 之螢光光譜圖。
5. 螢光物質(N-GQD)分別和氯黴素(Chloramphenicol, CAP)及氟甲磺氯黴素(Florfenicol, FF)反應，探討其是否有選擇性
 - (1) 取 100uL 0.1mg/mL N-GQD 分別加 50uL 0.1mg/mL CAP、FF，在微盤中均勻混合，在 EX280nm 掃其螢光發射波長範圍 325~750 nm 之螢光

光譜圖。

6. 定量最適化條件探討:pH 值

- (1) 取 1mg/mL N-GQD，分別用不同 pH 值(3、4、5、6、7、7.4、8、9、10) 之磷酸緩衝溶液，配製濃度為 0.1mg/mL 的 N-GQD 溶液。

7. 定量最適化條件探討:不同陰離子對 N-GQD 螢光的穩定性探討

- (1) 配製 pH=6 之緩衝溶液(Sodium phosphate、Sodium hydrogen carbonate、Sodium acetate、Sodium tartate)
- (2) 取 0.1mg/mL 的 N-GQD 溶液分別加入上述四種不同的緩衝溶液。

8. 定量最適化條件探討:鹽類濃度

- (1) 取 1mg/mL N-GQD，利用含不同 KCl 濃度 pH=6 之磷酸緩衝溶液，配製濃度為 0.1mg/mL 的 N-GQD 溶液。

9. N-GQD 定量 CAP 最適化條件之檢量線

- (1) 取 1mg/mL N-GQD，以 pH=6 0.01M KCl 之磷酸緩衝溶液，配製濃度為 0.1mg/mL 的 N-GQD 溶液。
- (2) 取 10mg/mL CAP，加入 pH=6 0.01M KCl 之磷酸緩衝溶液，稀釋成不同濃度(0.2、0.15、0.1、0.075、0.05、0.0375、0.025、0.0125mg/mL)之 CAP 溶液。
- (3) 取上述 0.1mg/mL N-GQD 溶液加入不同濃度(0.2、0.15、0.1、0.075、0.05、0.0375、0.025、0.0125mg/mL)之 CAP 溶液，在微盤中均勻混合，於 EX280nm EM445nm 測螢光強度。

2-3.3 實際樣品(雞飼料)前處理及偵測

1. 萃取飼料

- (1) 分別利用 pH=6 0.01M KCl 之磷酸緩衝溶液及 pH=6 0.1M 之 Sodium hydrogen carbonate 緩衝溶液，配製濃度為 0.1mg/mL 的 N-GQD 溶液。
- (2) 飼料萃取液: 取 1g 雞飼料，加入乙醇 10mL，以 5000rpm. 離心 5 分鐘，取上清液過濾使用。
- (3) 含 CAP 的飼料樣品: 取 1g 雞飼料，加入乙醇 10mL，再加入不同濃度之 CAP 溶液(用乙醇配製)，以 5000rpm. 離心 5 分鐘，取上清液過濾使用。

第三章、 結果討論

3-1 TEM of N-GQD

下圖 4 為 0.5mg/mL N-GQD 之 TEM 圖，可以看到粒子分散，且直徑皆小於 10 奈米，證明其為一量子點。



圖 4 N-GQD 之 TEM 圖 (0.5mg/mL)

3-2 使用 N-GQD 螢光淬滅偵測 CAP 之最適化條件探討

3-2.1 探討螢光物質(N-GQD)的最佳激發及發射波長

根據文獻 N-GQD 放射波長大約 445nm，但不同方法所製造出的 N-GQD 亦會有所差異，放射波長可能介於 425~520nm 間^{14, 16-18}，先選用放射波長 445nm 掃 N-GQD 之激發光譜圖(圖 5)。圖 6 為根據不同激發光所得之螢光光譜圖，其螢光強度隨波長增加而呈增加的趨勢，但若超過 370nm 的激發光，螢光則呈下降趨勢。本實驗所使用之 N-GQD 發射波長在 445nm，且螢光值最大是在激發波長為 370nm 時。

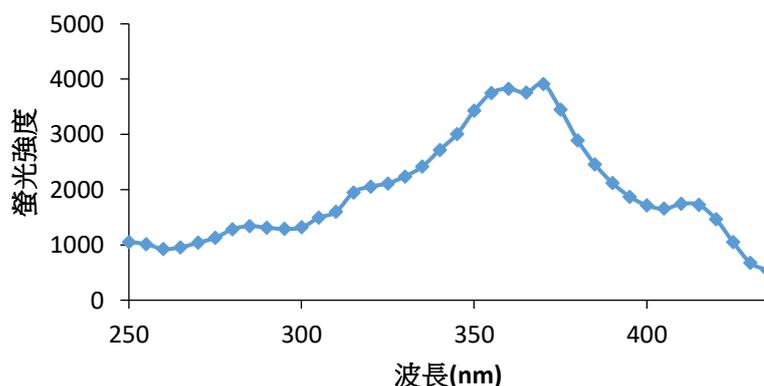


圖 5 0.1mg/mL N-GQD 以放射波長 445nm，掃激發波長範圍 250~435nm 之螢光光譜圖

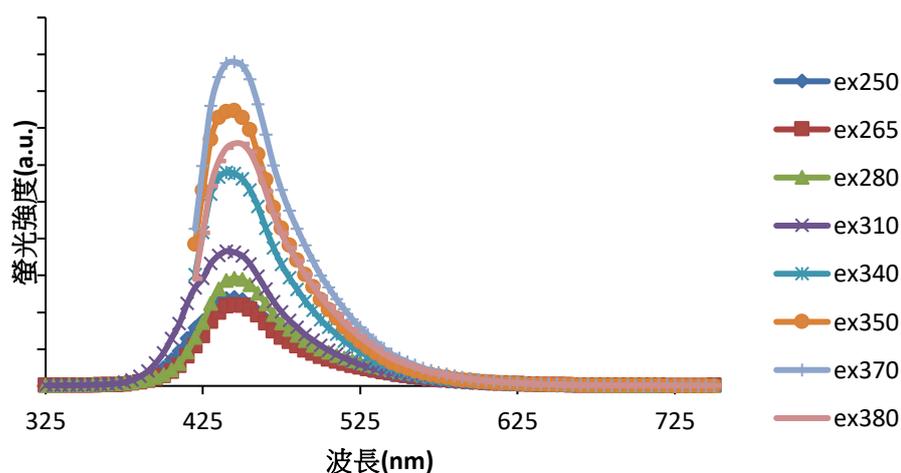


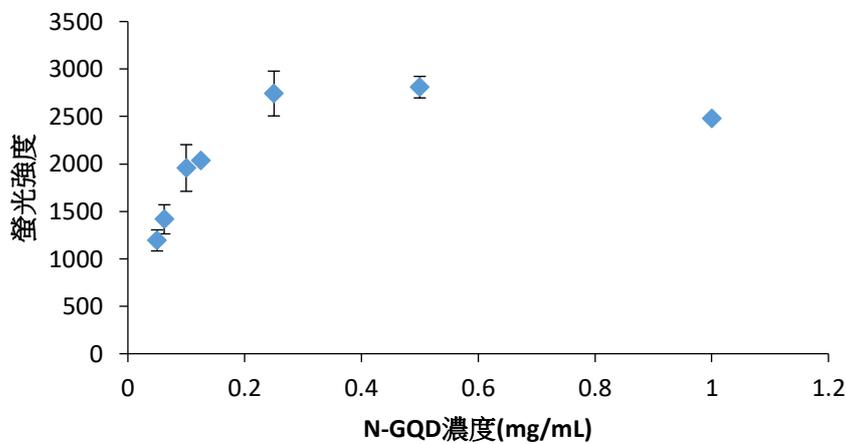
圖 6 0.1mg/mL N-GQD 以不同激發波長掃發射波長範圍 325~750nm 之螢光光譜圖

3-2.2 螢光物質(N-GQD)螢光之線性範圍濃度探討

因螢光物質會在高濃度時產生自身螢光淬滅(self-quenching)之現象，故落在線性範圍內之濃度才可做定量的使用，避免在定量 CAP 時使用過高濃度的 N-GQD，產生螢光物質自身淬滅的影響。

由圖 7(A)可看出，N-GQD 濃度到達 0.5mg/mL 時，螢光強度就開始有下降之趨勢。在濃度 0.05~0.25mg/mL 時，隨著濃度上升，螢光強度亦呈增加趨勢。圖 7(B)所示，在濃度 0.05~0.1mg/mL，可得一 $R^2=0.9980$ 之校正曲線。故本實驗選用之 N-GQD 濃度為 0.1mg/mL，此濃度在 N-GQD 之線性範圍內，故可以用以定量 CAP 含量。

(A)



(B)

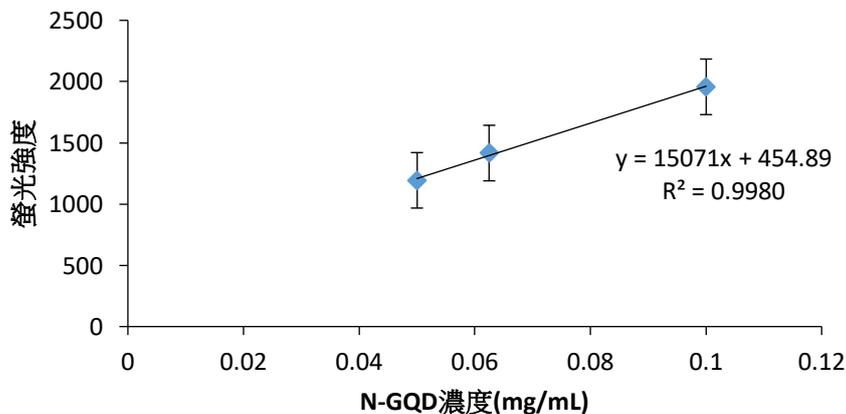


圖 7 (A)N-GQD 螢光強度與濃度關係圖 (B)N-GQD 校正曲線圖，線性範圍 0.05~0.1mg/mL

3-2.3 N-GQD 螢光穩定性探討

由圖 8 可知，一開始 N-GQD 的螢光強度為 2197，經過兩個小時的測量時間，N-GQD 的螢光強度變為 2104；曝光兩小時後 N-GQD 的螢光強度維持在 95% 以上；圖 9 為避光保持四個月後，在 EX280nm EM445nm(定量 CAP 之波長) N-GQD 的螢光強度由 3350 下降至 2991，螢光值的下降可能是因為儀器光源 decay 亦或是樣品經時間儲存所產生的誤差，但經四個月後其螢光強度仍維持在 90%。由圖 8、9 均可說明 N-GQD 有非常良好的螢光穩定。

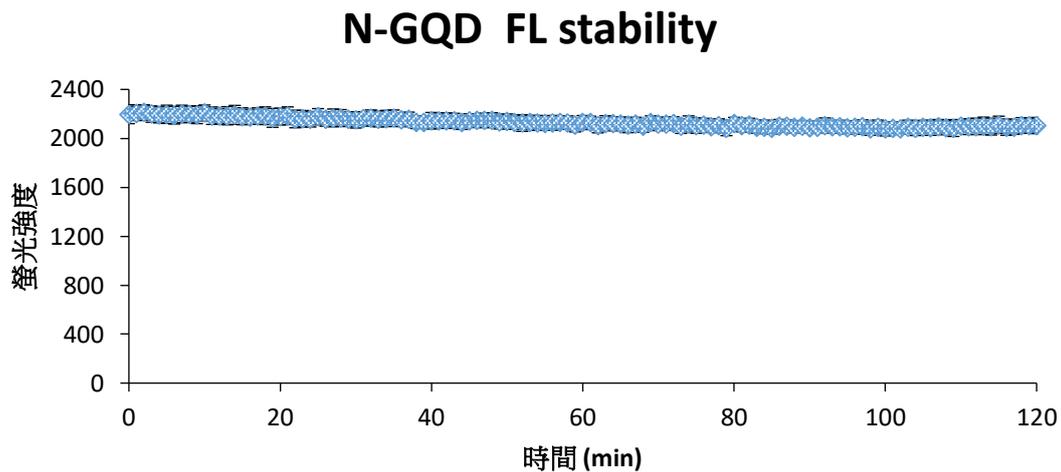


圖 8 0.1mg/mL N-GQD 螢光強度與持續曝光時間關係圖 (2 小時)

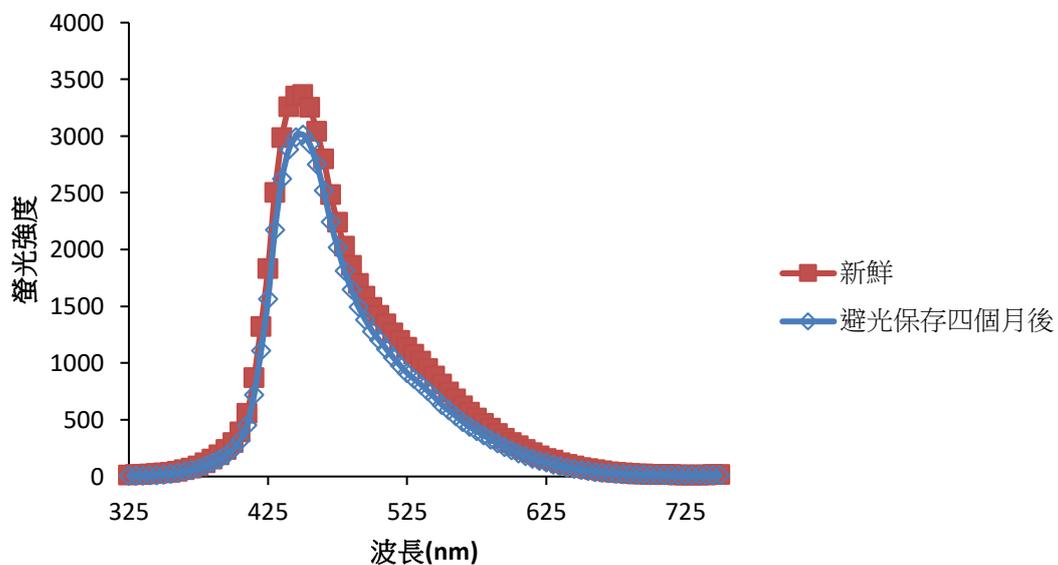


圖 9 0.1mg/mL N-GQD 螢光強度與保存時間關係圖 (4 個月)

3-2.4 探討使用 N-GQD 定量 CAP 的最佳激發波長及發射波長

雖然經由實驗找出 N-GQD 螢光值最大的激發波長是在 EX370nm，但圖 10 A 所示，在加入 CAP 後，使用 EX370nm 激發所呈現之螢光光譜圖並無螢光淬滅之現象。故再利用 EX250nm(圖 10 B)、EX280nm(圖 10 C)、EX310nm(圖 10 D)這三種不同的激發波掃螢光光譜圖，可以發現在加入 CAP 後，EM445nm 時會有螢光淬滅之現象，以方程式(1)計算淬滅比例(Q%)，淬滅比例分別為 20.67%、32.44%、17.56%；其中 EX280nm EM445nm 時 N-GQD 螢光淬滅比例最大，達 32.44%。故實驗之後使用 N-GQD 定量 CAP 的激發波長為 280nm，發射波長為 445nm。

$$Q(\%) = \frac{F_0 - F}{F_0} \times 100\% \quad \text{-----方程式(1)}$$

F_0 代表 N-GQD 加 pbs 之螢光強度， F 代表 N-GQD 加 CAP 之螢光強度

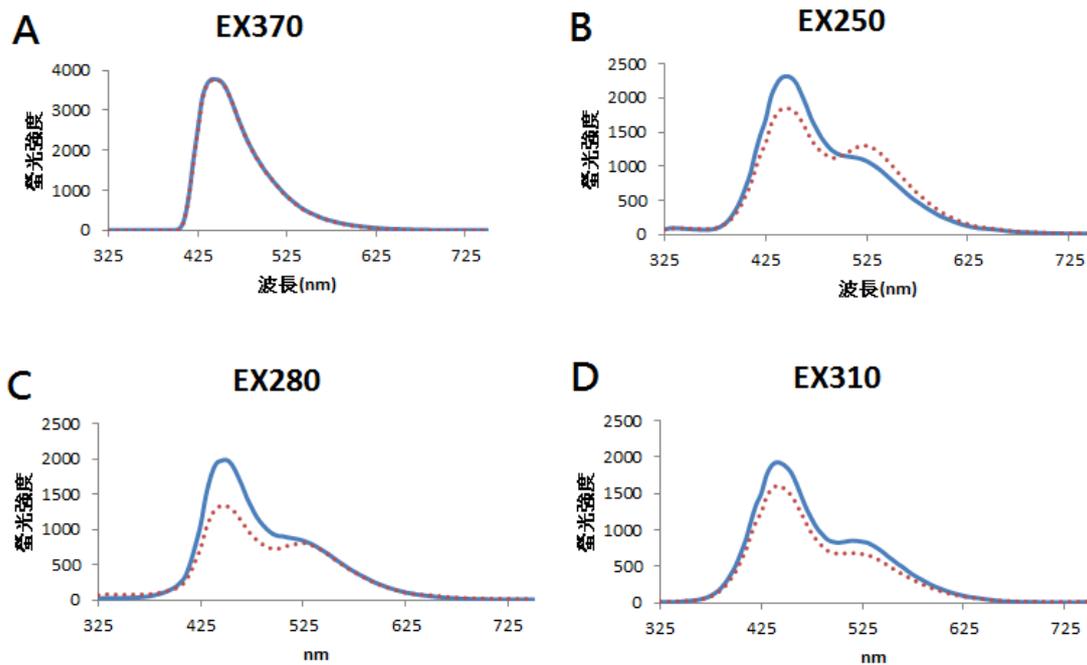


圖 10 0.1mg/mL N-GQD 與 pbs 及 CAP，以不同激發波長掃發射波長範圍 325~750nm

之螢光光譜圖 —表示 N-GQD+pbs ...表示 N-GQD+CAP

3-2.5 螢光物質(N-GQD)分別和氯黴素(Chloramphenicol, CAP)及氟甲磺氯黴素(Florfenicol, FF)反應，探討其是否有選擇性

圖 11 為 N-GQD 分別與 CAP 及 FF 混合後之螢光光譜，結果顯示，用 280nm 作為激發波長，CAP 對 N-GQD 之螢光有明顯的減弱效果，而 FF 則無影響，說明 N-GQD 系統對此兩種抗生素有極佳的選擇性^{11, 17, 19-20}。

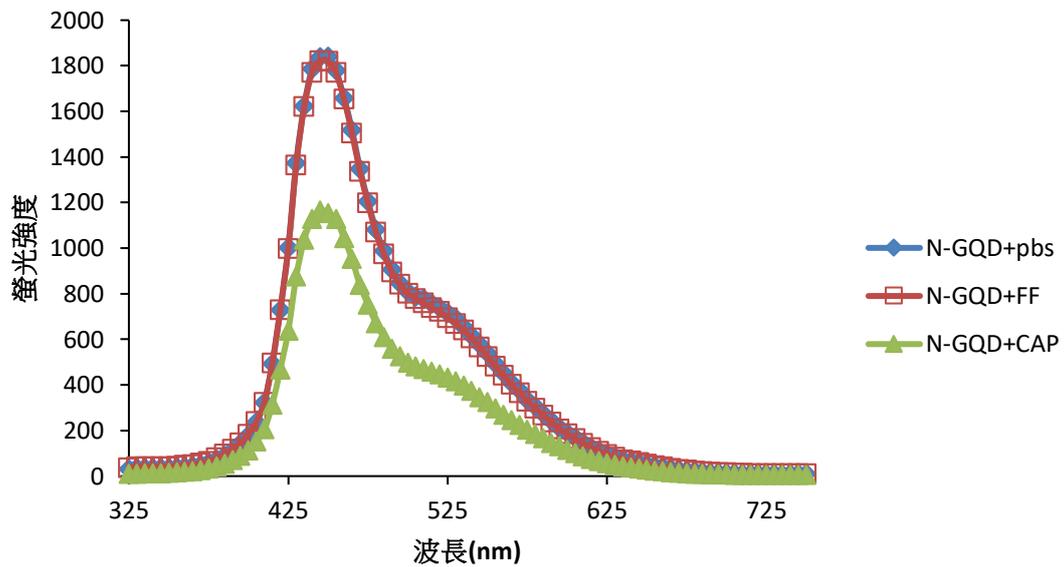


圖 11 N-GQD 選擇性之螢光光譜圖，0.1mg/mL N-GQD 分別與 pbs、0.1mg/mL FF、0.1mg/mL CAP 混合，以波長 280nm 激發所得之螢光光譜圖

3-2.6 定量最適化條件探討:pH 值

N-GQD 與 CAP 反應，依其結構可能產生 π - π 作用或氫鍵鍵結，產生表面能量轉移(surface energy transfer, SET)或電子轉移。因 N-GQD 在 pH3~10 這個範圍螢光很穩定¹¹，故選用這個 pH 範圍的溶液環境加入 CAP 後觀察其淬滅比例之變化。

由圖 12 實驗結果顯示，在 pH=6 磷酸緩衝溶液淬滅比例最高，故做為條件最適化的 pH 值。

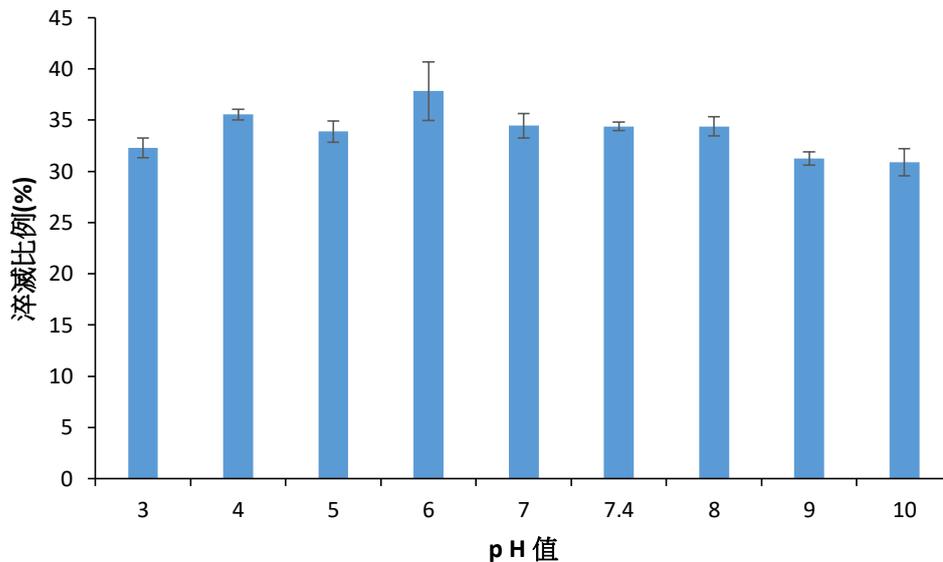


圖 12 不同 pH 值之磷酸緩衝溶液對 N-GQD 螢光淬滅比例之關係圖，0.1mg/mL CAP 與 N-GQD 在不同的 pH 緩衝溶液中，利用 280nm 激發，偵測 445nm 之放射螢光

3-2.7 定量最適化條件探討:不同陰離子對 N-GQD 螢光的穩定性探討

由於 N-GQD 螢光性質受其溶液內粒子大小、粒子分散成度等因素影響^{11, 16}，故這裡探討若使用不同陰離子的鈉鹽作為溶液(pH=6 之緩衝溶液)，觀察 N-GQD 螢光經一小時的穩定性。

由圖 13 實驗結果得知，經一小時後 N-GQD 在 0.1M NaHCO₃ 緩衝溶液中的穩定性最佳，螢光由 856.515 轉為 847.164，僅差 1%。但也可以看到經一小時後，N-GQD 在 0.01M 的磷酸緩衝溶液中螢光強度最大，故選擇此兩溶液做為後續偵測真實樣品時使用標準添加法加入 CAP 後螢光淬滅情形之探討。

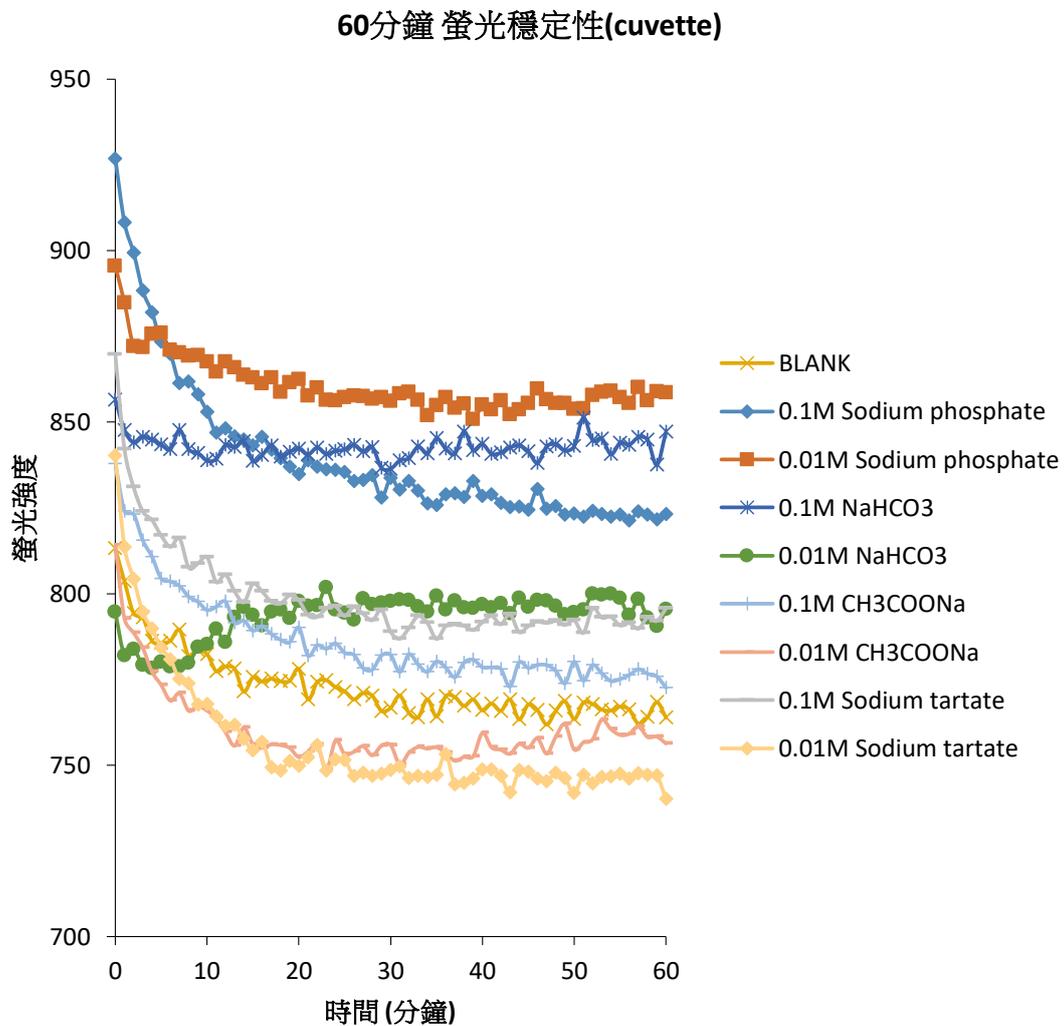


圖 13 N-GQD 在不同緩衝溶液之穩定性

3-2.8 定量最適化條件探討:鹽類濃度

上述提及 N-GQD 螢光性質受粒子大小、粒子分散成度、溶液鹽類等因素影響^{11,16}；故這裡先探討若使用 KCl 作為溶液，並改變其濃度，可能對 N-GQD 及 CAP 間產生靜電作用，對於 CAP 造成 N-GQD 螢光淬滅比例的影響。

由圖 14 實驗結果得知這四組不同濃度的 KCl 溶液與其淬滅比例經 ANOVA 分析後 P 值<0.05，顯示不同濃度的溶液對淬滅比例是有顯著差異的，故選擇淬滅比例最高的 0.01M 做為條件最適化的濃度。

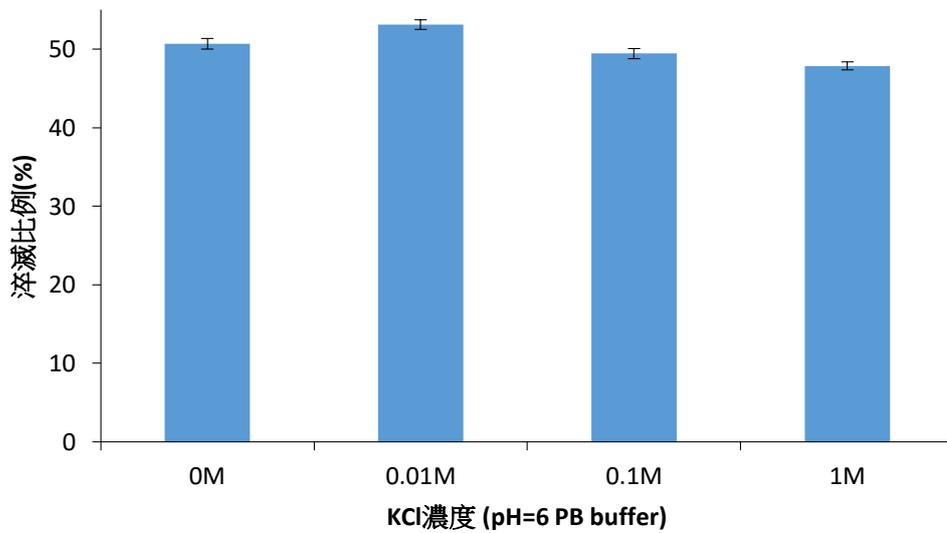


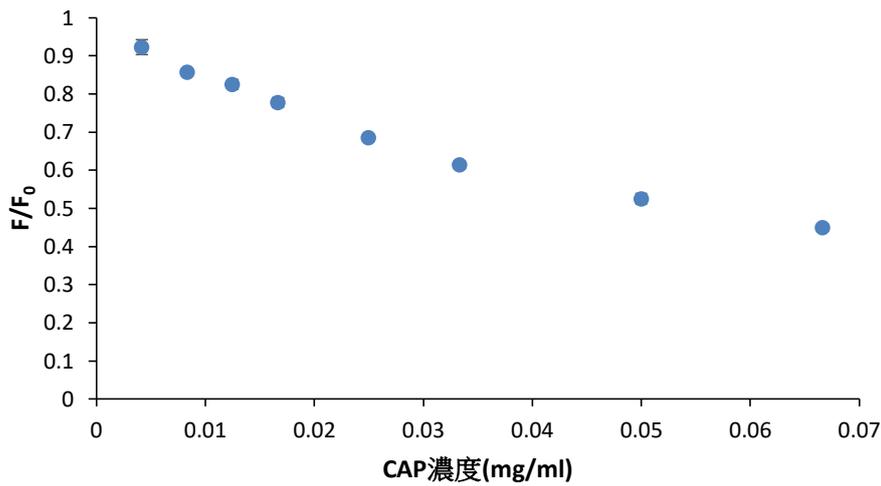
圖 14 不同濃度 KCl 對 N-GQD 螢光淬滅比例之關係圖，0.1mg/mL CAP 與 N-GQD 在不同濃度的 KCl 中，利用 280nm 激發，偵測 445nm 之放射螢光

3-2.9 N-GQD 定量 CAP 最適化條件之檢量線

經由最適化條件的溶液條件-pH=6 0.01M KCl 磷酸緩衝溶液，隨著 CAP 濃度增加， F/F_0 的比例也逐漸下降(淬滅比例增加)，如圖 15(A)。

微盤中 CAP 濃度範圍為 0.1~0.025mg/mL，呈一線性關係， $R^2=0.9965$ ，如圖 15(B)，偵測極限 0.0012mg/mL (使用 3Sb/m)，約為 1.2 ppm。

(A)



(B)

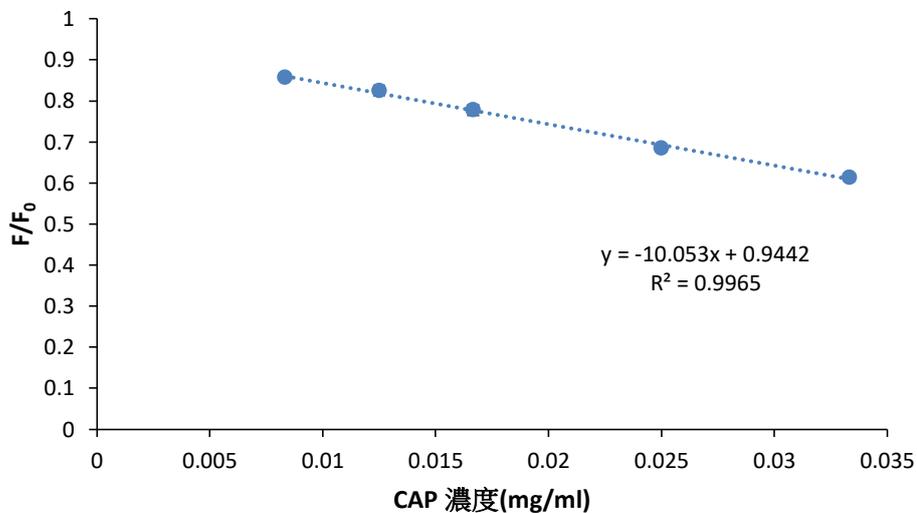


圖 15 (A) CAP 濃度對 N-GQD 螢光強度(F/F_0)之關係圖 (B) N-GQD 定量 CAP 之校正曲線

3-3 CAP 與 N-GQD 螢光淬滅作用機制探討

3-3.1 探討螢光物質(N-GQD)和氯黴素(Chloramphenicol, CAP)間是否有分子作用

據文獻顯示¹⁵，N-GQD 加待測樣品所得之螢光光譜圖，若隨著待測樣品的濃度增大而光譜圖有紅移的現象，表示 N-GQD 與待測樣品間有 $\pi-\pi$ 作用。因兩物質間若有 $\pi-\pi$ 作用，N-GQD 會放出能量，造成能量減少，故螢光放射波長會往長波長處移動，且波長紅移現象會隨待測物濃度增大而越趨明顯。但本實驗所得到之結果圖 16 顯示，螢光光譜圖並無隨著 CAP 濃度增大而有紅移現象發生，說明螢光淬滅的機制可能並非 $\pi-\pi$ 作用力所致。

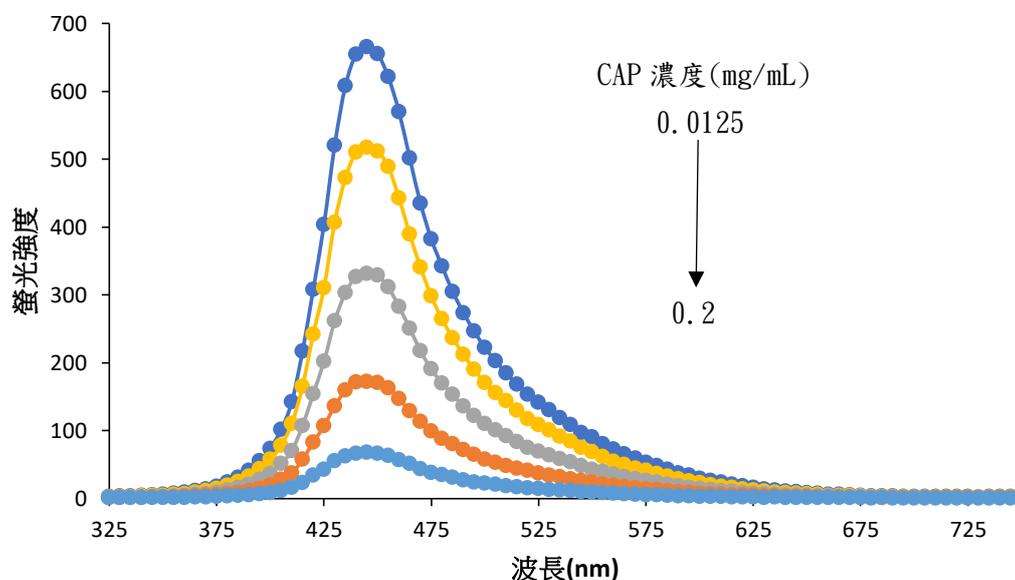


圖 16 N-GQD 加不同濃度 CAP 之螢光光譜圖，0.1mg/mL N-GQD in pH=6 0.01M KCl 磷酸緩衝溶劑，利用 280nm 激發，所得之螢光光譜圖

3-3.2 探討螢光物質(N-GQD)和氯黴素(Chloramphenicol, CAP)間是否有螢光共振能量轉移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)

據文獻顯示¹⁴，N-GQD 的螢光發射光譜圖與待測物之吸收光譜圖，若有相互重疊之現象，表示 N-GQD 與待測樣品間有螢光共振能量轉移。圖 17 所示，N-GQD 的螢光發射光譜圖與 CAP 之吸收光譜圖相互重疊的波長區域甚小，在 EM445nm 處，CAP 的吸收值更趨近於 0，說明 CAP 使螢光淬滅的機制可能並非螢光共振能量轉移所致。

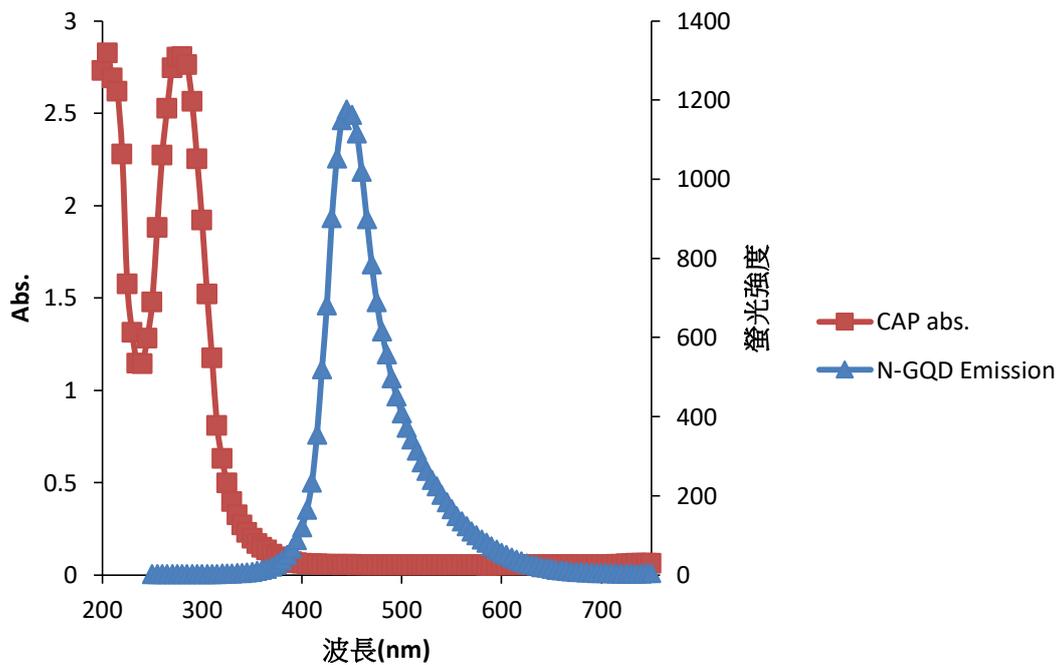


圖 17 CAP 吸收光譜圖(■)與 N-GQD 以激發波長 280nm 所得之螢光光譜圖(▲)，0.1mg/mL CAP 之吸收光譜圖與 0.1mg/mL N-GQD，利用 280nm 激發，所得之螢光光譜圖

3-3.3 探討螢光物質(N-GQD)和氯黴素(Chloramphenicol, CAP)間是否有作用

圖 18 為 N-GQD 與 CAP 之吸收光譜圖，兩者混合的吸收理論值，以「curve1+curve2」表示；實際 N-GQD 加 CAP 混合反應後所測出的吸收值，以「N-GQD+CAP 實驗值」表示。

可以發現在 280nm 處「N-GQD+CAP 實驗值」小於「curve1+curve2」，故可說明 CAP 造成 N-GQD 螢光淬滅並非全因在 280nm (CAP 吸收值最大處) 時 CAP 吸光所導致¹⁷，因此 N-GQD 及 CAP 間仍有其他作用力存在。

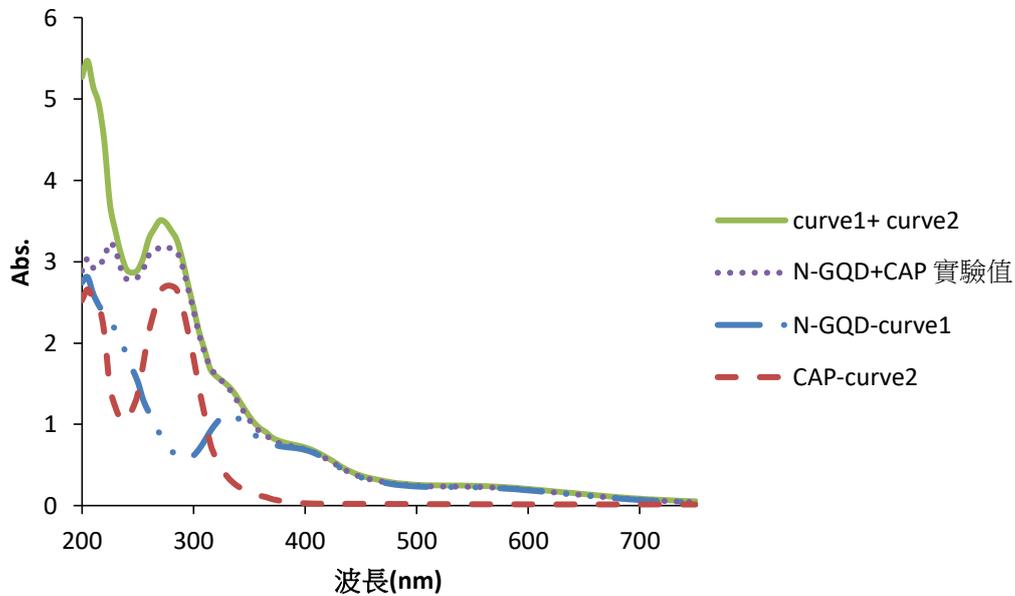


圖 18 N-GQD 與 CAP 之吸收光譜圖疊圖，0.1mg/mL N-GQD 與 0.1mg/mL CAP 個別與混合後之吸收光譜圖

3-3.4 探討螢光物質(N-GQD)和氯黴素(Chloramphenicol, CAP)反應時的溫度對淬滅效果影響

由實驗結果可推測 CAP 造成 N-GQD 螢光淬滅並非因為 $\pi-\pi$ 作用、螢光共振能量轉移，又 N-GQD 的 LUMO 為-1.8eV，HOMO 為-5.15eV；CAP 的 LUMO 為-2.34eV，HOMO 為-7.27eV，故亦可排除電子轉移的可能性。

N-GQD 與 CAP 間可能存在吸附與碰撞的關係。若兩者間是吸附作用，會隨著溫度增加而減少吸附的作用，進而減少 CAP 造成 N-GQD 螢光淬滅的比例；若兩者間是碰撞作用，會隨著溫度增加而增加碰撞作用，進而增加 CAP 造成 N-GQD 螢光淬滅的比例¹³。圖 19 實驗結果所示，取濃度較高的 5 個範圍分別做 ANOVA 分析，P 值皆小於 0.05，說明各溫度間是有顯著差異的；再經由兩兩 paired t-test 做分析，僅 25°C 與 60°C 間是無顯著差異的。說明了吸附與碰撞這兩種作用力可能同時存在，故隨著溫度的改變，CAP 造成 N-GQD 螢光淬滅的比例呈現一鐘型分佈。溫度高時，吸附作用減少、碰撞作用增加；溫度低時，反之。在 30°C 時，N-GQD 與 CAP 間吸附與碰撞作用達到最理想之狀態，造成淬滅比例最高。

故經實驗推測 CAP 造成 N-GQD 螢光淬滅可能是藉由彼此間的碰撞與吸附作用而導致。

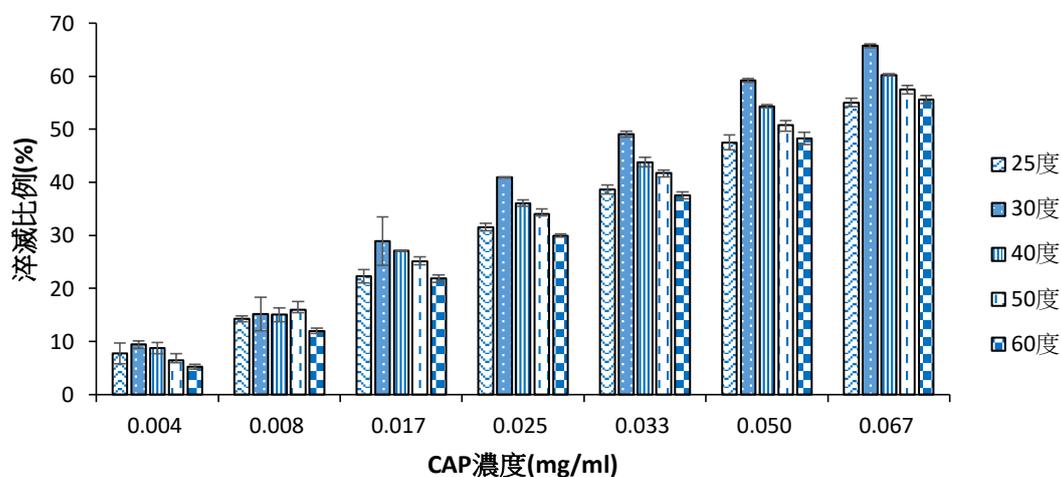


圖 19 溫度對 CAP 淬滅 N-GQD 之關係圖，0.1mg/mL N-GQD 與各濃度 CAP 在不同溫度下，利用 280nm 激發，偵測 445nm 之放射螢光

3-4 實際樣品(雞飼料)前處理及偵測

3-4.1 探討有機溶劑對 N-GQD 螢光的影響

CAP 的萃取溶劑常見的有乙酸乙酯、甲醇、乙醇……等有機溶劑^{4-5,21}，故本次實驗使用上述所提及的三種有機溶劑與條件最適化所使用之溶液做螢光比較的測試。

圖 20 結果顯示，乙酸乙酯與乙醇對條件最適化所使用之 pH=6 0.01M KCl 磷酸緩衝溶液的螢光維持率高達 95% 左右，但因乙酸乙酯為油溶性，其與 N-GQD 之水溶性系統相容性不佳，會有分離之現象。且因 CAP 對乙醇溶解度大，又乙醇萃取所需試劑用量少、污染小、生物毒性也較低、萃取效率高、省時故此實驗最後選用乙醇萃取飼料中所添加之 CAP。

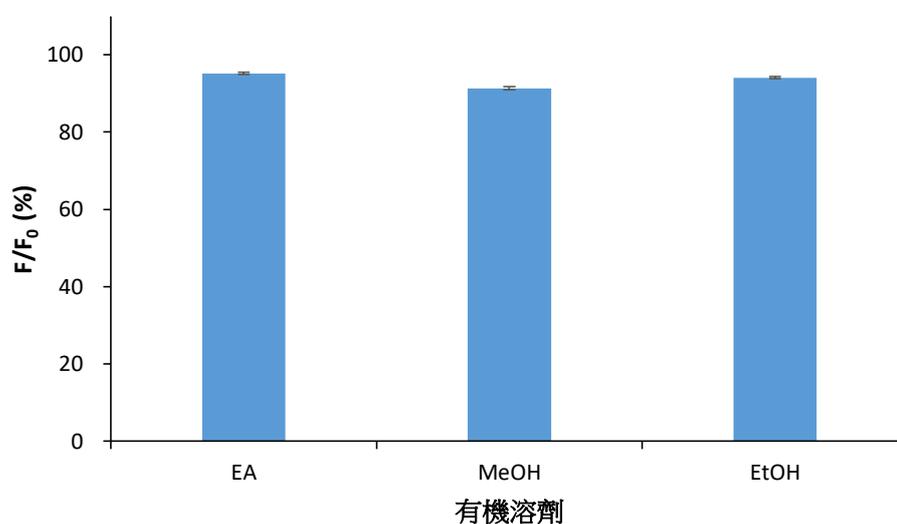


圖 20 不同有機溶劑對條件最適化之緩衝溶劑螢光維持率(F/F_0)之關係圖， F 代表 N-GQD 在不同有機溶劑中的螢光強度， F_0 代表 N-GQD 在 pH=6 0.01M KCl 磷酸緩衝溶劑中的螢光強度

3-4.2 探討飼料內其他成份對 N-GQD 螢光的影響

所選用的飼料為廣成牌大山雞飼料，包裝標示此飼料中含 120 ppm ZnCl₂、30 ppm CuCl₂、0.8% CaCl₂，故欲探討這些成份是否會對此系統偵測 CAP 造成影響。

圖 21，以大於飼料外包裝上所標示的濃度與 N-GQD 混合，結果顯示與 ZnCl₂、CaCl₂ 反應後螢光是增加的，淬滅比例為負值；其與 CuCl₂ 反應後螢光與和 CAP 反應後有相同之趨勢，螢光都會變小，也就是有淬滅現象發生。飼料內的 Zn、Ca 會使螢光增強，Cu 會使螢光減弱；且銅離子對 N-GQD 的淬滅不可忽視，因此樣品測試應考慮基質效應。

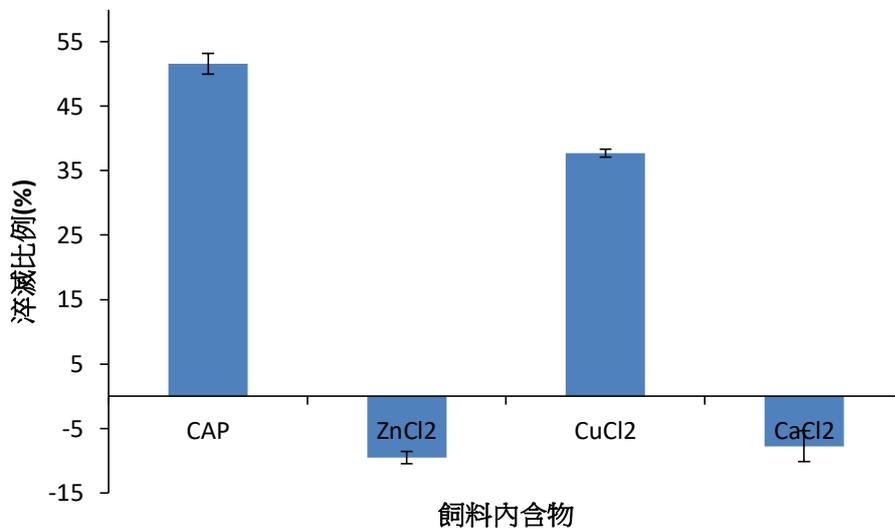


圖 21 飼料內成份對 N-GQD 螢光淬滅之關係圖，各物質濃度為 CAP:33 ppm、ZnCl₂:133 ppm、CuCl₂:33 ppm、CaCl₂:1.2%

3-4.3 探討實際樣品(廣成牌大山雞飼料)添加 CAP 後的萃取回收率 (recovery)

圖 22 為添加無 CAP 之飼料萃取液做基質修飾所得之 CAP 的檢量線，隨著 CAP 濃度增加， F/F_0 的比例也逐漸下降(淬滅比例增加)，呈一線性關係， $R^2=0.9996$ ，如圖 22。線性範圍為 0.02~0.0025mg/mL，偵測極限可達 0.0018mg/mL(使用 3Sb/m)，約為 1.8 ppm。

在雞飼料中添加兩種不同濃度的 CAP 樣品，經萃取、分析，將所得的兩個螢光強度帶入圖 22 所得的校正曲線，所算出的萃取回收率分別為 $97.1\pm 0.2\%$ 、 $102.6\pm 0.2\%$ (表 3)。

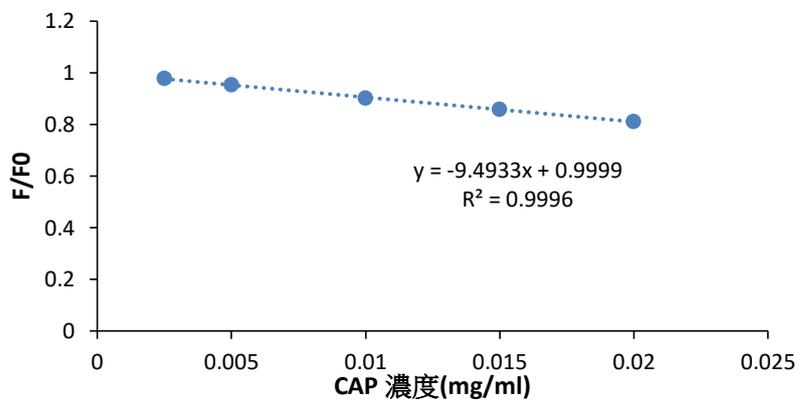


圖 22 添加基質修飾(matrix modification)所得之 CAP 校正曲線

表 3，每克飼料內所添加之 CAP 濃度與回收率關係圖

CAP 樣品含量(mg)	測得樣品中 CAP 含量(mg)	Recovery(%)
0.5	0.513±0.001	102.6±0.2
1	0.971±0.002	97.1±0.2

3-4.4 探討不同種類的實際樣品(雞飼料)添加 CAP 後的萃取回收率 (recovery) - N-GQD 溶於 0.01M pH=6 之磷酸緩衝溶液

N-GQD 於 0.01M pH=6 之磷酸緩衝溶液中螢光強度最佳，圖 23 為四種不同種類之雞飼料(廣成牌大山雞、福壽牌小雞、廣成牌小雞、台糖牌小雞飼料)添加無 CAP 之飼料萃取液做基質修飾所得之 CAP 的檢量線，可以看到隨著 CAP 濃度增加，F/F₀ 的比例也逐漸下降(淬滅比例增加)，呈一線性關係。經 ANOVA 分析乙醇與四種雞飼料萃取液，P<0.05 說明每做一種飼料的檢測需使用標準添加法先做一條檢量線。

添加到微盤中的 CAP 經由其螢光淬滅比率(取淬滅比例>0 者)計算 recovery 範圍為 94~110.7%，如表 4 所示。

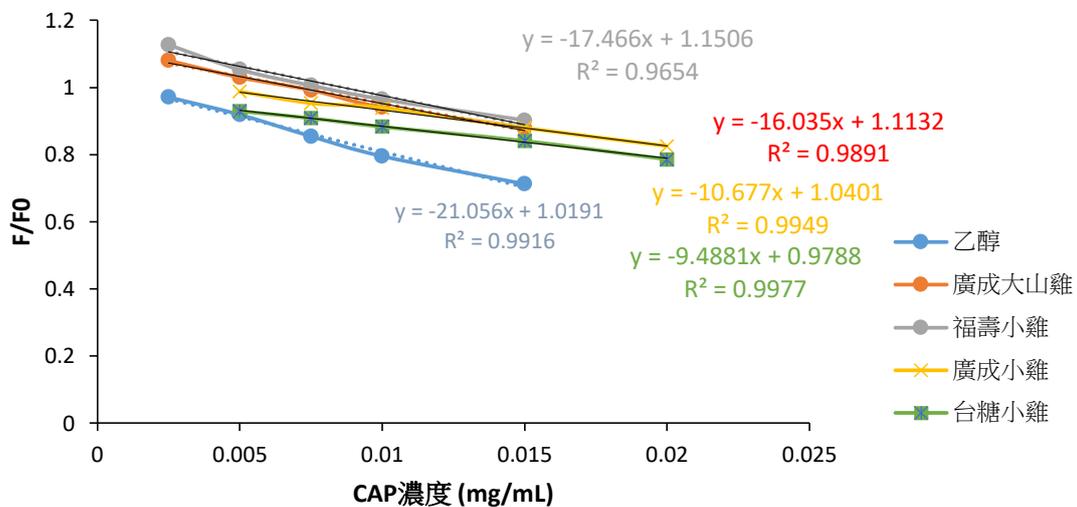


圖 23 N-GQD 溶於 0.01M pH=6 之磷酸緩衝溶液，四種飼料添加基質修飾(matrix modification)所得之 CAP 校正曲線

表 4 N-GQD 溶於 0.01M pH=6 之磷酸緩衝溶液，不同種類之雞飼料經標準添加法加入 CAP 後所計算之回收率

廣成大山雞			
CAP 添加濃度(ppm)	Q (%)	推算 CAP 濃度(ppm)	Recovery (%)
7.5	0.78%	7.5	100%
10	5.89%	10.7	107%
15	11.95%	14.5	96.7%

廣成小雞			
CAP 添加濃度(ppm)	Q (%)	推算 CAP 濃度(ppm)	Recovery (%)
5	1.19%	4.9	98%
7.5	4.65%	8.1	108%
10	6.04%	9.4	94%
15	12.02%	15	100%
20	17.43%	20.1	100.5%

台糖小雞			
CAP 添加濃度(ppm)	Q (%)	推算 CAP 濃度(ppm)	Recovery (%)
5	7.05%	5.2	104%
7.5	9.14%	7.4	98.7%
10	11.68%	10.1	101%
15	15.93%	14.6	97.3%
20	21.38%	20.3	101.5%

福壽小雞			
CAP 添加濃度(ppm)	Q (%)	推算 CAP 濃度(ppm)	Recovery (%)
10	3.49%	10.6	110.7%
15	9.75%	14.2	94.7%

3-4.5 探討不同種類的實際樣品(雞飼料)添加 CAP 後的萃取回收率 (recovery) - N-GQD 溶於 0.1M pH=6 之 NaHCO₃ 緩衝溶液

從 3-2.7 不同陰離子對 N-GQD 螢光的穩定性探討可以得知 N-GQD 於 0.1M pH=6 之 NaHCO₃ 緩衝溶液中穩定性最好。但若將 N-GQD 溶於此溶液中做真實樣品測定，其 CAP 濃度與 F/F₀ 之線性關係並無使用 0.01M 之磷酸緩衝溶液來的佳；說明在偵測真實樣品時，最適化條件為將 N-GQD 溶於 0.01M pH=6 之磷酸緩衝溶液中做後續測定。

第四章、 結論

本研究利用 N-GQD 螢光淬滅開發偵測氯黴素方法，發現在激發波長 280nm 時加入氯黴素會造成 N-GQD 螢光淬滅的現象，且在發射波長 445nm 時淬滅比例最高，可用以定量氯黴素。就 N-GQD 與 CAP 間的作用機制來說，因加入 CAP 後 N-GQD 的螢光淬滅比例隨著溫度的改變而呈一鐘型分佈，但最低溫(25°C)及最高溫(60°C)的實驗數據兩者間又是沒有顯著差異的；溫度高，吸附作用減少、碰撞作用增加；溫度低，吸附作用增加，碰撞作用減少，說明了 N-GQD 與 CAP 間可能同時存在吸附與碰撞的作用而造 N-GQD 螢光淬滅。

在真實樣品部份，為了從源頭就對此禁藥做把關，選用的是最可能含非法添加氯黴素的家禽養殖類飼料-雞飼料。規範中提到飼料中若加入粗製的抗菌素最多不可超過 1000 ppm，氯黴素為一種抗生素，涵蓋於抗菌素範圍內²²。本研究結果顯示，以 N-GQD 偵測飼料中氯黴素之最適化條件為添加 pH=6 0.01M KCl 的磷酸緩衝溶液，線性範圍 0.02~0.0025mg/mL，偵測極限可達 1.8 ppm，回收率達 97~102%。且樣品只需用乙醇萃取、過濾後即可直接與 N-GQD 反應，不需繁複的前處理，故若以此方法偵測家禽飼料中是否違法添加氯黴素是可行的。

第五章、參考文獻

1. 動物用藥氯黴素、氟甲磺氯黴素、甲磺氯黴素檢驗.
<https://www.superlab.com.tw/s177/> (accessed 2017/09/04).
2. 動物用藥殘留標準. <http://law.moj.gov.tw/LawClass/LawAll.aspx?PCode=L0040026> (accessed 2017/09/04).
3. Berlina, A. N.; Taranova, N. A.; Zherdev, A. V.; Vengerov, Y. Y.; Dzantiev, B. B., Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405* (14), 4997-5000.
4. Liu, T.; Xie, J.; Zhao, J.; Song, G.; Hu, Y., Magnetic Chitosan Nanocomposite Used as Cleanup Material to Detect Chloramphenicol in Milk by GC-MS. *Food Analytical Methods* **2014**, *7* (4), 814-819.
5. Wu, J.; Chen, L.; Mao, P.; Lu, Y.; Wang, H., Determination of chloramphenicol in aquatic products by graphene-based SPE coupled with HPLC-MS/MS. *J Sep Sci* **2012**, *35* (24), 3586-92.
6. Liu, H. Y.; Lin, S. L.; Fuh, M. R., Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in milk and honey using modified QuEChERS extraction coupled with polymeric monolith-based capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* **2016**, *150*, 233-9.
7. Alibolandi, M.; Hadizadeh, F.; Vajhedini, F.; Abnous, K.; Ramezani, M., Design and fabrication of an aptasensor for chloramphenicol based on energy transfer of CdTe quantum dots to graphene oxide sheet. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2015**, *48*, 611-9.
8. Miao, Y.; Gan, N.; Li, T.; Cao, Y.; Hu, F.; Chen, Y., An ultrasensitive fluorescence aptasensor for chloramphenicol based on FRET between quantum dots as donor and the magnetic SiO₂@Au NPs probe as acceptor with exonuclease-assisted target recycling. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, *222*, 1066-1072.
9. Miao, Y. B.; Ren, H. X.; Gan, N.; Cao, Y.; Li, T.; Chen, Y., Fluorescent aptasensor for chloramphenicol detection using DIL-encapsulated liposome as nanotracer. *Biosens Bioelectron* **2016**, *81*, 454-9.
10. Miao, Y. B.; Ren, H. X.; Gan, N.; Zhou, Y.; Cao, Y.; Li, T.; Chen, Y., A homogeneous and "off-on" fluorescence aptamer-based assay for chloramphenicol using vesicle quantum dot-gold colloid composite probes. *Anal Chim Acta* **2016**, *929*, 49-55.
11. Kaur, M.; Mehta, S. K.; Kansal, S. K., Nitrogen doped graphene quantum dots: Efficient fluorescent chemosensor for the selective and sensitive detection of 2,4,6-trinitrophenol. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *245*, 938-945.

12. Pan, D.; Zhang, J.; Li, Z.; Wu, M., Hydrothermal route for cutting graphene sheets into blue-luminescent graphene quantum dots. *Adv Mater* **2010**, *22* (6), 734-8.
13. Zhou, Y.; Wang, P.; Su, X.; Zhao, H.; He, Y., Colorimetric detection of ractopamine and salbutamol using gold nanoparticles functionalized with melamine as a probe. *Talanta* **2013**, *112*, 20-5.
14. Xu, H.; Zhou, S.; Xiao, L.; Wang, H.; Li, S.; Yuan, Q., Fabrication of a nitrogen-doped graphene quantum dot from MOF-derived porous carbon and its application for highly selective fluorescence detection of Fe³⁺. *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3* (2), 291-297.
15. Xu, T.-T.; Yang, J.-X.; Song, J.-M.; Chen, J.-S.; Niu, H.-L.; Mao, C.-J.; Zhang, S.-Y.; Shen, Y.-H., Synthesis of high fluorescence graphene quantum dots and their selective detection for Fe³⁺ in aqueous solution. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *243*, 863-872.
16. Lin, L.; Rong, M.; Lu, S.; Song, X.; Zhong, Y.; Yan, J.; Wang, Y.; Chen, X., A facile synthesis of highly luminescent nitrogen-doped graphene quantum dots for the detection of 2,4,6-trinitrophenol in aqueous solution. *Nanoscale* **2015**, *7* (5), 1872-8.
17. Ju, J.; Zhang, R.; He, S.; Chen, W., Nitrogen-doped graphene quantum dots-based fluorescent probe for the sensitive turn-on detection of glutathione and its cellular imaging. *RSC Adv.* **2014**, *4* (94), 52583-52589.
18. Liu, Q.; Guo, B.; Rao, Z.; Zhang, B.; Gong, J. R., Strong two-photon-induced fluorescence from photostable, biocompatible nitrogen-doped graphene quantum dots for cellular and deep-tissue imaging. *Nano Lett* **2013**, *13* (6), 2436-41.
19. Kaur, M.; Mehta, S. K.; Kansal, S. K., A fluorescent probe based on nitrogen doped graphene quantum dots for turn off sensing of explosive and detrimental water pollutant, TNP in aqueous medium. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2017**, *180*, 37-43.
20. Sai, N.; Wu, Y.; Sun, Z.; Yu, G.; Huang, G., A novel photonic sensor for the detection of chloramphenicol. *Arabian Journal of Chemistry* **2016**.
21. Determination of Chloramphenicol Residues in Foods by ELISA and LC-MS/MS Coupled with Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction. *Analytical Letters* **2010**, *43* (17), 2798-2807.
22. 養雞飼料的認識與利用. <http://www.miobuffer.com.tw/fnm/198901/04.htm> (accessed 2017/09/04).