

不同型態奈米粒子為基材的側流免疫快篩試紙製備與檢測 美耐皿餐具中三聚氰胺之研究

黃文鍵¹ 洪浩誠² 吳國輝^{3*} 鄭根發³

¹國防大學理工學院國防科學研究所

²中山科學研究院化學研究所

³國防大學理工學院化學及材料工程學系

摘 要

側流免疫層析法以抗體為主要偵測物，可準確檢測少量物質，具有快速、簡單、經濟等優點。本研究使用檸檬酸鈉、3-巰基丙酸和聚乙二醇對銀及磁性奈米粒子標記物作表面修飾，進而結合三聚氰胺抗體製備偶聯體，利用 XRD、UV-vis-NIR 和 TEM 進行結構及特性分析，並應用於美耐皿餐具 MEL 殘留檢測。經實驗結果，以 Ag-TSC-mAb 為偶聯體之 MEL 側流免疫快篩試紙擁有較佳檢測效果。能有效針對盛裝溶液的美耐皿餐具 MEL 溶出物做出即時檢測判斷，可作為後續的食品檢測研究參考。

關鍵詞：側流免疫層析法，三聚氰胺，銀奈米粒子，磁性奈米粒子

Application of Nanoparticle Probe-based Lateral Flow Immunochromatography Technology to Detect Melamine in Melamine Tableware

Wen-Chien Huang¹, Hao-Cheng Hung², Kuo-Hui Wu^{3*}, and Ken-Fa Cheng³

¹ School of Defense Science, Chung Cheng Institute of Technology, National Defense University

² Chemical Systems Research Division, Chung Shan Institute of Science and Technology

³ Department of Chemical and Materials Engineering, Chung Cheng Institute of Technology, National Defense University

ABSTRACT

The lateral flow immunochromatography assay is widely used in various fields owing to its rapidity, simplicity, low cost and accurate measurement for the detection of small quantities of substances. In this study, sodium citrate, 3-mercaptopropionic acid and polyethylene glycol were used to surface-modify labeled probes such as silver nanoparticles and magnetic nanoparticles. Conjugation was performed and the results analyzed using different techniques, including XRD, UV-vis-NIR and TEM. The Ag-TSC-mAb conjugate exhibited increased sensitivity. This test strip proved to be a useful screening method for the detection of melamine residues in melamine tableware, and provided a frame of reference for subsequent study of melamine in food samples.

Keywords: lateral flow immunochromatography assay, melamine, silver nanoparticles, magnetic nanoparticles.

文稿收件日期 107.06.05; 文稿修正後接受日期 107.11.15; *通訊作者

Manuscript received June 5, 2018; revised November 15, 2018; * Corresponding author

一、前言

近年來食品安全相關議題備受國人重視，相關報導也層出不窮，就食安問題探討不外乎標示不實、摻偽、非法食品添加物或農畜用藥殘留等，例如三聚氰胺、瘦肉精、抗生素及農藥殘留等。為因應相關事件並為食品安全把關，衛福部於 2016~2020 年食品安全政策白皮書的目標與策略中，針對「研發與建構完備食安檢驗技術方法」做出詳盡的規劃[1]。另外 2017 年行政院「前瞻基礎建設計畫」八大建設計畫之「食品安全建設」中亦針對「強化中央食安藥安與毒品檢驗量能」提出精進做法[2]。

三聚氰胺廣泛用於化學工業中作為生產三聚氰胺甲醛樹脂的原料，因三聚氰胺富含氮(66%)，所以被不法業者摻入富含蛋白質的產品中，如寵物食品，牛奶和嬰兒配方，藉以提高蛋白質含量，因此分別造成 2007 年寵物食安事件，造成貓、狗嚴重疾病和死亡；以及 2008 年的嬰兒配方奶粉事件，造成近 30 萬人生病，5 萬名嬰兒住院，其中 6 人死亡，究其主因是經三聚氰胺污染的產品，易引起腎結石等腎臟問題，進而影響動物體健康[3]。此外自 50 年代起，因為美耐皿餐具輕便好用、不易破損又便宜，所以美耐皿餐具被廣泛應用於家庭和餐館，無論是路邊攤或小火鍋店，甚至是高級餐廳。但美耐皿遇熱即可能釋出有毒物質，分別已於 2010 年及 2013 年的研究報告中證實，美耐皿餐具遇熱會釋出三聚氰胺，且通過食物吃下肚，長期使用對健康有嚴重風險[4,5]。

針對現行食品安全檢驗方法多以氣相層析質譜儀(Gas Chromatography-Mass Spectroscopy, GC-MS)、液相層析質譜儀(Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer, LC-MS)和高效液相層析儀(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)等儀器檢測為主，但檢測儀器昂貴，需專業人員操作，且樣品檢測及分析需耗時數日，緩不濟急，無法達到即時檢測之目的。因此，如何達到檢測快速、靈敏、範圍寬、製備簡單的問題，是當下非常迫切須要解決的課題。化生免疫檢測在化學毒物殘留檢測技術中具有發展應用潛力，免疫分析法是基於蛋白抗原和抗體之間，或者小分子半抗原和抗體之間的特異反應分析方

法，對於小分子量化學毒物，只有將它們與大分子蛋白質載體結合製備人工抗原，才能刺激機體免疫系統產生抗體，此技術不受限於化學毒物類別，每種化學毒物均有機會研發相對應的抗體，具有辨識專一性、可定量、高靈敏度及檢測便利、快速等優點，可滿足化學毒物快篩需求[6]。

側流免疫層析分析法提供低成本，簡便，快速，穩定性和便攜性等優勢而被廣泛使用，可用於定性及定量分析待測物 [7]。其組成大致可分為四個部分：樣品墊(Sample Pad)，結合墊(Conjugate Pad)，硝酸纖維素膜(Nitrocellulose Membrane)以及吸收墊(Absorbent Pad)。將含有分析物之溶液置於樣品墊，由於吸收墊的吸水能力及毛細管原理，溶液沿著硝酸纖維素膜移動至結合墊，其內含有奈米金等有色粒子，這些有色粒子上偶聯一級抗體可與分析物專一性結合，繼續往吸收墊移動；在檢測區，其測試線(T 線)上含有可與偶聯體結合的半抗原，如果溶液中偶聯體未與分析物結合，則有色粒子在此呈色，而控制線(C 線)上的二級抗體可與有色粒子上的一級抗體結合，控制線將呈色。所以，當測試線及控制線均呈色或控制線上未呈色，均判定為失效[8,9]。

側流免疫層析分析法藉由有色粒子放大檢測訊號，金奈米粒子(Gold Nanoparticle, AuNPs)是最早出現、研究最多的奈米材料之一，根據檢測區顯色條的有無、顏色的深淺、光反射信號的密度來定性或定量。它在生物標記、感測器構建及生物晶片檢測等領域都有廣泛的應用[10]。AuNPs 又稱為膠體金(Colloidal Gold)，因表面電漿共振(Surface Plasma Absorption)效應，造成在波長 520 nm 形成吸收峰，而使得其顏色為紅色而不再是金黃色，其粒徑容易控制且具良好穩定性及生物相容性，故常用於檢測蛋白質、DNA 等生物物質。自 1981 年 Leuvering 等人首次將 AuNPs 免疫層析法用於檢測後，這項技術在多個領域得到廣泛應用，在化學毒物檢測運用上，2011 年 Kim[11]等人開發了 AuNPs 作為標記物的競爭性抗原免疫層析測定(ICA)，用於檢測有機磷殺蟲劑毒死蜱。其檢測結果於 10 分鐘內顯示，針對毒死蜱標準品及模擬樣品檢測極限分別為 10.0 和 50.0 ng/ml，適用於現場快速測試毒死蜱。同年 Li [12]等人運用添加不同濃度檸

檸檬酸鈉控制 AuNPs 之粒徑大小，顏色隨其顆粒由小到大呈橘紅色到紫紅色變化，挑選出對比色最佳條件後與三聚氰胺抗體結合完成偶聯體製備，並用以製成競爭型快篩試片，成功完成各類乳製品、鮮奶及奶粉中三聚氰胺的半定性檢測，其中鮮奶樣品中可達 0.05 ppm 的檢測極限。2012 年龔雲飛[13]等人亦運用檸檬酸鈉還原法製備 AuNPs，將標記純化的三聚氰胺單克隆抗體，噴於試紙的結合墊，另將三聚氰胺和卵清白蛋白(MEL-OVA)的偶聯物和純化的羊抗鼠 IgG 分別噴於試紙的檢測線和控制線處，研製成三聚氰胺金奈米粒子免疫層析試紙條，靈敏度檢測極限可達 50 µg/L。試紙條對牛奶、奶粉和飼料中的三聚氰胺殘留的檢測極限分別為 100 µg/L、100 ng/g 和 200 ng/g。有鑑於銀粒子奈米化後亦可得到大比表面積，使銀的功能大幅增加，連帶開發出許多奈米銀的新應用，例如均勻分散在溶液中的高濃度奈米銀膠體，可以利用膠體銀免疫層析技術，應用於免疫快篩檢測中，同時基於銀奈米粒子具有表面電漿帶的吸收在 390 到 400 nm 之間及表面薄膜帶的吸收係數比金的大 4 倍等二項重要因素，使得該材料在生物標定基材中是理想材料，此外在光學偵測系統的運用上也比 AuNPs 更加適合[14]。另外以磁性奈米粒子(MNPs)為主體的磁珠免疫層析技術，是一種將磁性奈米材料的磁信號與免疫層析技術相結合的技術。通常由磁性元素(如 Fe、Co、Ni)和它們的氧化物組成，其特點不僅具有粒徑小、比表面積大、穿透性強、可快速移動及超順磁性、生物相容性及分散性良好等特性，可在磁場下定位、集中和分離，更重要的是 MNPs 比 AuNPs 價格便宜。2013 年 Dian-Bing 等人[15]開發超順磁性側向流動層析快速檢測炭疽桿菌芽孢，研究指出該系統具有 4×10^3 - 10^6 CFU/ml 的線性範圍，且對奶粉及土壤等模擬樣品的檢測極限分別為 200 及 130 spores/mg，即使在高濃度狀況下，也沒有其他芽孢桿菌孢子的交叉反應，具有良好的穩定性。在本研究中，主要是藉由不同材質、尺寸和形狀的金屬奈米粒子結合三聚氰胺抗體形成各式偶聯體，作為側流免疫層析試紙的基材，除分析其特徵外，並針對 MEL 快篩試紙的靈敏度及美耐皿餐具的實測應用進行討論。

二、實驗

2.1 實驗材料及藥品

硝酸銀 (Silver Nitrate, AgNO_3) 購自 UNI-ONWARD Corp；檸檬酸鈉 (Trisodium Citrate, TSC, Na_3CA) 購自 J.T. Baker Chemical Company；硼氫化鈉 (Sodium Borohydride, NaBH_4) 和 3-巰基丙酸 (3-Mercaptopropionic acid, 3-MPA) 購自 Sigma-Aldrich。六水三氯化鐵 (Ferric Chloride Hexahydrate, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 購自島久藥品株式會社。七水硫酸亞鐵 (Ferrous Sulfate Heptahydrate, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 購自 J.T. BAKER。(a,ω-Dicarboxyl-terminated PEG)(平均分子量 $M_n=250$) 購自 Alfa Aesar。二乙二醇 (Diethylene Glycol, DEG)，1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide hydrochloride, EDC)，N-羥基琥珀醯亞胺磺酸鈉鹽 (N-Hydroxysulfosuccinimide Sodium Salt；NHS) 和海藻糖 (Trehalose, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) 購自 Alfa Aesar。2-嗎啉乙磺酸 (2-(N-morpholino)-ethanesulfonic Acid, MES) 購自 SIGMA。牛血清白蛋白 (Bovine serum Albumin, BSA) 購自 Jackson ImmunoResearch Inc.；Tween-20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate) 購自 BioBasic Inc。三聚氰胺 (Melamine, MEL, $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$)，抗 MEL 單克隆抗體 (Monoclonal Antibody, mAb)，山羊抗兔免疫球蛋白 (IgG)，硝酸纖維素膜 (NC 膜)，樣品墊和吸收墊均購自台灣尖端先進生技醫藥公司。實驗所配置的溶液及濃度如下：(1) 磷酸鹽緩衝液 (PBS 緩衝液)：0.01 M，含有 8.000 g NaCl、0.200 g KCl、1.420 g Na_2HPO_4 、0.270 g KH_2PO_4 、pH 7.4。(2) PBST 洗滌液：0.01 M，含有 99.9% PBS 溶液和 0.1% Tween-20，pH 7.4。(3) MES 溶液：0.01 M，pH 6.0。(4) MEST 洗滌液：含有 99.5% MES 溶液和 0.5% Tween-20，pH 6.0。(5) 封閉液：含有 95% PBS 溶液和 5% BSA，pH 7.4。以上所有化學藥品均為分析級，不需進一步純化即可使用。

2.2 儀器測試

X 射線繞射儀 (X-Ray Diffractometer, XRD)，型號 Bruker D2 PHASER。紫外光-可見光-近紅外光分光光譜儀 (UV-vis-NIR Spectrophotometer, UV-vis-NIR)，型號為

ChromTech CT 8600。高解析場發射穿透式電子顯微鏡 (High-Resolution Transmission Electron Microscopy, HR-TEM)，型號 FEI Tecnai G2，200 kV。使用 ASUS 手機之內建相機獲取快篩試紙的光學圖像，然後運用 ImageJ 軟體處理以分析測試線的光密度。

2.3 實驗方法

2.3.1 Ag-TSC 奈米粒子及 Ag-TSC-mAb 偶聯體製備

使用 NaBH_4 作為還原劑及 TSC 為保護劑合成 Ag-TSC 奈米粒子。取 30.0 ml 濃度為 0.04 M 的 NaBH_4 加入錐形瓶中，另取 10.0 ml 濃度為 0.01 M 的 AgNO_3 以 1 滴/秒的速度滴入攪拌中的 NaBH_4 溶液。待滴定完後停止攪拌，加入 1.0 ml 濃度為 0.02 M 的 TSC 溶液以穩定銀奈米粒子溶液，完成 Ag-TSC 奈米粒子製備。取 10.0 ml 上述 Ag-TSC 奈米粒子溶液，使用 0.1 M 的 K_2CO_3 溶液調整酸鹼值至 pH 9.0，然後加入 80 μl 的抗三聚氰胺單克隆抗體 (1.0 mg/ml)，經由物理吸附作用將抗三聚氰胺多克隆抗體偶聯至 Ag-TSC 奈米粒子表面，在 37°C 下反應 30 分鐘。隨後加入 2.50 ml 含有 5% 牛血清白蛋白(BSA)的封閉劑，使溶液中的 BSA 最終濃度為 1%，在 37°C 下反應 15 分鐘，藉以封閉未偶聯的 Ag-TSC 奈米粒子表面。之後在 6,000 xg 下離心，去除上清液，再以 PBST 洗滌液沖洗離心。最後，將偶聯體 (Ag-TSC-mAb) 重新回溶於 PBS 緩衝液中，儲存於 4°C 環境下備用，如圖 1 (a)。

2.3.2 Ag-MPA 奈米粒子及 Ag-MPA-mAb 偶聯體製備

使用 NaBH_4 作為還原劑及 3-MPA 為保護劑合成 Ag-MPA 奈米粒子。取 30.0 ml 濃度為 0.04 M 的 NaBH_4 加入錐形瓶中，另取 10.0 ml 濃度為 0.01 M 的 AgNO_3 以 1 滴/秒的速度滴入攪拌中的 NaBH_4 溶液。待滴定完後停止攪拌，加入 1.0 ml 濃度為 0.0002 M 的 3-MPA 溶液以穩定銀奈米粒子溶液，完成 Ag-MPA 奈米粒子製備。

取 10.0 ml 上述 Ag-MPA 奈米粒子溶液，分別加入 1.0 ml 濃度 1.0 mg/ml 之 EDC/PBS 溶液及 NHS/PBS 溶液，在 37°C 下活化 1 小

時。隨後將 80 μl 三聚氰胺抗體 (1.0 mg/ml) 逐滴加入，並放置於 37°C 烘箱中。2 小時後加入 3.0 ml 含有 5% 牛血清白蛋白(BSA)的封閉劑，使溶液中的 BSA 最終濃度為 1%，持續於 37°C 烘箱中反應。1 小時之後將混合物在 6,000 xg 下離心，去除上清液，再以 PBST 洗滌液沖洗離心。最後，將 Ag-MPA-mAb 偶聯體重新回溶於 PBS 緩衝液中，儲存於 4°C 環境下備用，如圖 1 (a)。

2.3.3 Fe_2O_3 -PEG 奈米粒子及 Fe_2O_3 -PEG-mAb 偶聯體製備

取 0.005 mol 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.0025 mol 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 0.200 g 的 DEG 溶於 50.0 ml 去離子水中，在室溫下攪拌 1 小時。隨後將 0.04 mole 的 PEG 加入混合溶液中，在氮氣環境下加熱至 200°C， Fe^{3+} 與 Fe^{2+} 在 PEG 溶液加熱迴流系統中生成 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ，然後逐滴加入 32.0 ml 濃度為 0.1 M 的氨水調整溶液 pH 值至 10.0，持續機械攪拌 1 小時。待反應冷卻後獲得 Fe_2O_3 -PEG 奈米粒子，運用磁石收集，並以去離子水和乙醇重複清洗，去除未結合之 PEG，直到 pH 值達到 7.0。

取 300 μl Fe_2O_3 -PEG 奈米粒子溶液，運用磁石分離除去上清液後分別加入 150 μl 濃度為 1.0 mg/ml 的 EDC/MES 溶液及 300 μl 濃度為 1.0 mg/ml 的 NHS/MES 溶液，在 37°C 下活化 1 小時。經活化後使用 500 μl 的 MEST 溶液沖洗，並運用磁石分離去除上清液，再加入 200 μl 的 MES 溶劑及 60 μl 三聚氰胺抗體 (1.0 mg/ml)，在 4°C 下旋轉反應 16 小時。經偶聯反應後，MNP-PEG-mAb 以 500 μl 的 PBST 洗滌液沖洗，去除未鍵結之抗體，並以 PBS 緩衝液重新回溶，保存於 4°C 下，如圖 1 (b)。

2.3.4 三聚氰胺側流免疫層析快篩試片製備

側流免疫層析快篩試紙係由樣品墊，結合墊，吸收墊和硝酸纖維素膜組成，如圖 1(c)。首先，在硝酸纖維素膜上距離吸收墊 5 mm 處塗佈山羊抗兔 IgG (1.0 mg/ml) 作為控制線，距離結合墊 15 mm 處塗佈 MEL 抗體 (mAb; 0.4 mg/ml) 作為測試線。將結合墊浸沒在 pH 7.4 的 PBS 緩衝液 (0.01 M) (內含有 0.1% (w/v) BSA, 10% (w/v) 海藻糖, 0.05% (w/v) Tween 20) 中 30 分鐘後，在 37°C 下乾燥 2 小時。然後，

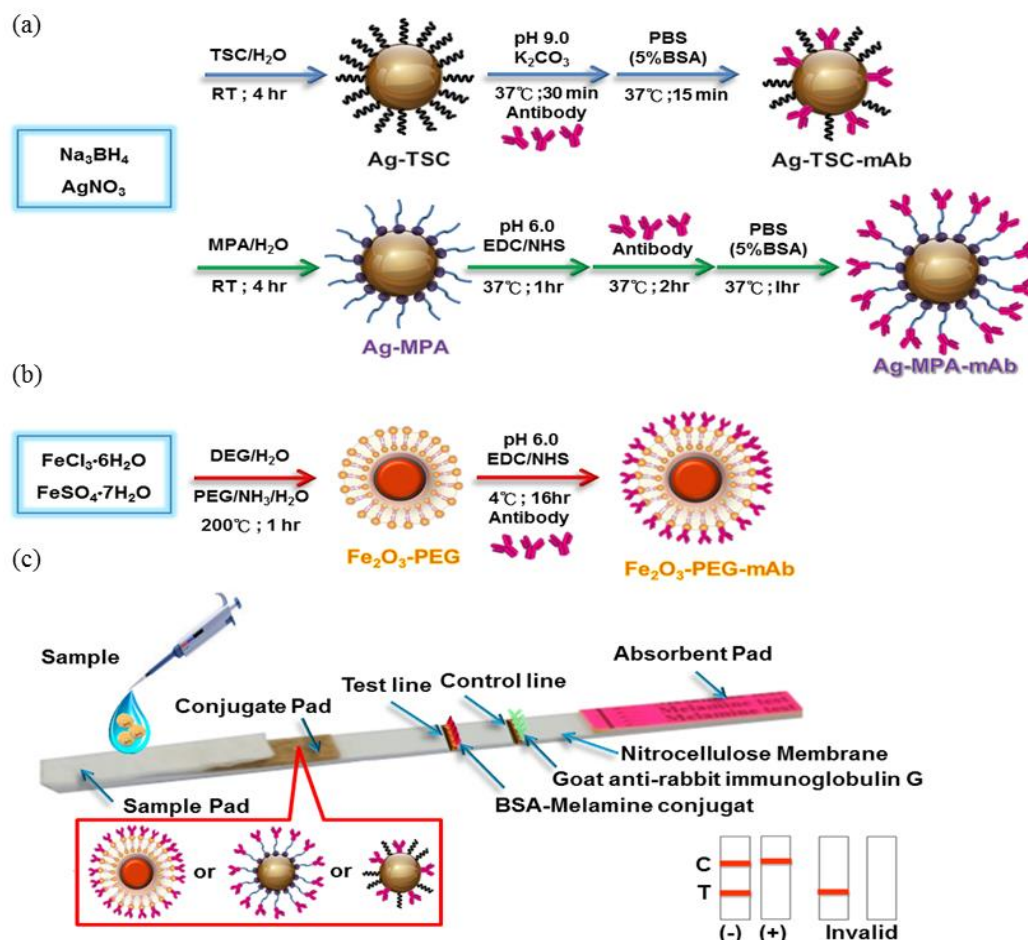


圖 1 (a)Ag-TSC-mAb 和 Ag-MPA-mAb 的製備示意圖；(b) Fe₂O₃-PEG-mAb 的製備示意圖；(c)三聚氰胺側流免疫層析快篩試紙的製備和組裝(左)及試紙的結果判定(右)

各取 2 μ l 的 Ag-TSC-mAb 溶液、Ag-MPA-mAb 溶液及 Fe₂O₃-PEG-mAb 溶液滴在結合墊上，並在 37°C 下乾燥 2 小時。在 PVC 底板上依次黏附硝酸纖維素膜、結合墊、樣品墊及吸收墊，然後將測試裝置切割成 5 mm 寬的快篩試紙，並在室溫下乾燥儲存。

2.3.5 靈敏度試驗

以 0.01 M 的 PBS 緩衝液將 MEL 標準品稀釋成 0.1、0.3、0.5、0.7 和 0.9 ppm 等不同濃度的待測樣品。檢測時，自待測樣品溶液中各取 100 μ l 滴入樣品墊上，反應 15 分鐘後，檢視側流免疫層析快篩試紙的呈色反應。視覺檢測極限濃度定義係以空白樣品作對照組，比較經不同濃度待測樣品測試後，快篩試紙上測試線的顏色變化，以肉眼看不到明顯顏色所需的最低分析物濃度，即為該快篩試紙的視覺檢測極限濃度[16]。最後，使用 ASUS 手機之內

建相機獲取快篩試紙上測試線的光學圖像，然後再運用 Image J 軟體對測試線實施全面積掃描將其轉換成平均光密度值，以空白樣品作對照組，並藉由該吸收峰的積分面積比來判別。經不同濃度待測樣品測試後，快篩試紙上測試線的積分面積比變化，當相對光密度(ROD)降低 10%所需的最低分析物濃度，即為該快篩試紙的光學檢測極限濃度。相對光密度(ROD)定義為 T 線面積(樣品)/ T 線面積(對照組空白樣品)[17,18]。

2.3.6 檢測美耐皿餐具

使用加熱器將 7 組 500.0 ml 去離子水分別加熱至 30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C 和 90°C 後，放入美耐皿餐具，靜置 30 分鐘；對照組為 30°C 條件下在燒杯中靜置 30 分鐘的 500.0 ml 去離子水。然後以微量滴管各吸取 100 μ l 待測液滴入含有 Ag-TSC-mAb 偶聯

體的 MEL 快篩試紙中實施檢測，探討不同溫度與三聚氰胺溶出濃度之關係 [4,5]。

三、結果與討論

3.1 不同型態奈米粒子結合抗體前後之特性分析

3.3.1 XRD 分析

圖 2 顯示了 Ag-TSC、Ag-MPA 和 γ -Fe₂O₃ 奈米顆粒的 XRD 圖。Ag-TSC 和 Ag-MPA 奈米粒子在 $2\theta=38.2^\circ$ 、 44.4° 、 64.6° 及 77.5° 等處均有特徵衍射峰的顯現，經比對 JCPDS 資料庫卡號 04-0783，分別對應於銀的 (111)、(200)、(220) 和 (311) 晶面，說明 Ag-TSC 和 Ag-MPA 奈米粒子均為面心立方結構的奈米銀。 γ -Fe₂O₃ 奈米粒子在 $2\theta=30.3^\circ$ 、 35.7° 、 43.3° 、 53.6° 、 57.3° 和 63.0° 處的特徵衍射峰，經比對 JCPDS 資料庫卡號 39-1346，分別對應於 γ -Fe₂O₃ 的 (220)、(311)、(400)、(422)、(511) 和 (440) 晶面，為面心立方結構的 γ -Fe₂O₃ 奈米粒子。上述奈米粒子的粒徑可藉由 Scherrer 公式進行估算：

$$D = \lambda \kappa / \beta \cos \theta$$

式中 D 為奈米粒子的粒徑， λ 為 X 射線的波長， κ 為峰型因數，一般取 0.9， β 為衍射峰的半高寬，以弧度表示， θ 為衍射峰對應的角度，銀奈米粒子和 Fe₂O₃ 奈米粒子各別採用 (111) 晶面及 (311) 晶面對應的衍射峰計算 (如表 1)。從表 1 可看出，本研究所合成之銀奈米粒子粒徑約 10~20 nm。銀奈米粒子在生成過程中以 TSC 和 MPA 作為穩定劑，不但可以防止銀粒子發生團聚發生，而且 TSC 和 MPA 均會針對 (111) 晶面優先抑制，進而影響其形貌，從而控制銀奈米粒子的生成 [19, 20]。

3.3.2 UV-vis-NIR 分析

當金屬粒子粒徑遠小於入射光波長時，表面電子因受到入射光的激發，引起金屬奈米粒子集體式的偶極振盪行為，造成表面電子偏極化，稱為「表面電漿共振」(Surface Plasmon Resonance)。這種表面電漿共振現象會隨著金屬的種類、粒徑、形狀、分散溶劑及保護劑的不同而有所差異，金黃色是銀奈米粒子所獨

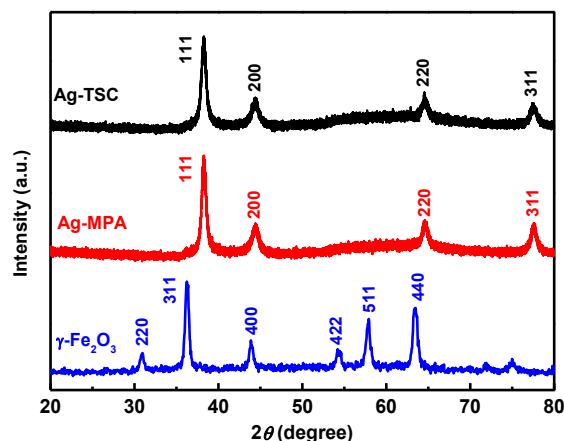


圖 2 不同型態奈米粒子 XRD 圖

表 1 不同型態奈米粒子粒徑表

樣品	Ag-TSC	Ag-MPA	γ -Fe ₂ O ₃
晶面	(111)	(111)	(311)
粒徑(nm)	12.5	13.8	15.8

有。因此，在銀奈米粒子的製備過程中，不僅可以從反應溶液顏色的變化得到判斷，亦可由 UV-vis-NIR 吸收光譜變化結果得到證明。為了驗證 Ag-TSC-mAb、Ag-MPA-mAb、Fe₂O₃-PEG-mAb 偶聯體的形成，應用 UV-vis-NIR 吸收光譜法監測每個衍生步驟中的反應產物。

圖 3 表示 Ag-TSC、mAb 和 Ag-TSC-mAb 偶聯體的 UV-vis-NIR 光譜，檸檬酸鹽封端的銀奈米顆粒在 387 和 428 nm 處呈現表面等離子體共振帶 (SPR)，而 MEL 抗體在 280 nm 處具有最大吸收峰。第一個峰位於 387 nm，歸因於銀奈米粒子的 SPR 譜帶，而第二個峰位於 428 nm，歸因於較大的銀奈米粒子。除此之外，一些較大奈米顆粒的共存可能有助於第一階段銀核/顆粒的形成，在第二階段經奧斯特華德熟化 (Ostwald ripening) 並轉化成較大的銀奈米顆粒，從而完成生長過程 [21]。在 Ag-TSC-mAb 偶聯體的情況下，AgNPs 在與 MEL 抗體反應後的 UV-vis-NIR 光譜顯示寬峰，在 393 和 449 nm 處轉移到較高波長，並且吸光度值的降低。這表明，AgNPs 在與 anti-MEL mAb 反應後，發生了銀奈米顆粒的聚集。

圖 4 表示 Ag-MPA、mAb 和 Ag-MPA-mAb 偶聯體的 UV-vis-NIR 光譜。Ag-MPA 奈米粒

子在 388 nm 處呈現表面等離子共振帶(SPR)的強吸收峰，另外在 500-700 nm 處有寬大的側鋒出現，此結果與 Ag-TSC 奈米粒子相比較顯示出 Ag-MPA 奈米粒子有部分 Ag 顆粒聚集形成較大顆粒。而 Ag-MPA-mAb 偶聯體在 388 nm 處有銀奈米粒子的吸收峰且位移 6 nm，在 500-700 nm 處同樣有寬大的側鋒出現。anti-MEL mAb 則在 280 nm 處有最大吸收峰，屬於 MEL 抗體的特性吸收峰。

圖 5 表示 Fe_2O_3 -PEG、mAb 和 Fe_2O_3 -PEG-mAb 偶聯體的 UV-vis-NIR 光譜，在 600-230 nm 範圍內，隨著波長的減小， Fe_2O_3 奈米顆粒的吸光度穩定增加。基於相同的原因， Fe_2O_3 -PEG 的寬吸收峰和 anti-MEL mAb 的最大吸收波長 280 nm 被記錄。將 anti-MEL mAb 固定在 Fe_2O_3 -PEG 奈米粒子的表面上後，在 278 nm 處檢測到顯著的吸收峰，表明存在 anti-MEL mAb 共軛物。結果顯示 Fe_2O_3 -PEG-mAb 在偶聯反應中成功產生[22]。

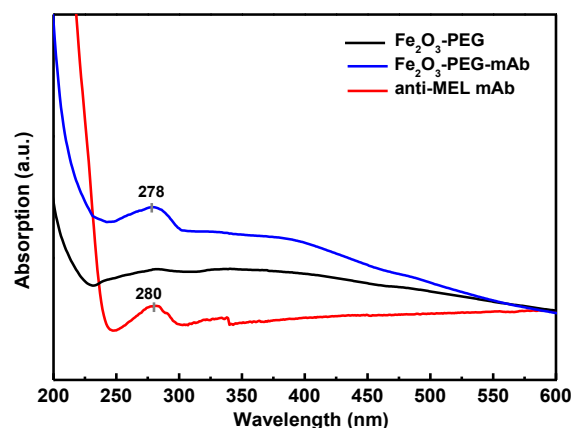


圖 5 Fe_2O_3 -PEG、 Fe_2O_3 -PEG-mAb 和 anti-MEL mAb 的 UV-vis-NIR 光譜圖

3.3.3 TEM 圖分析

使用 TEM 測量來評估 Ag-TSC-mAb、Ag-MPA-mAb、 Fe_2O_3 -PEG-mAb 偶聯體的尺寸分佈和表面形態。由圖 6 (a)和圖 6(b)中可以觀察到大部分 Ag-TSC 奈米粒子和 Ag-TSC-mAb 偶聯體顆粒的大小一致，沒有棒狀、多角形等形貌出現，與 UV-vis-NIR 光譜分析相呼應，表示 Ag-TSC 奈米粒子大多以球狀形貌存在，僅有小部分因保護劑特定方向晶面堆積，而造成形貌些許改變。平均粒徑小於 20 nm 的球形奈米晶體，且分佈良好。

由圖 6(c)中可以發現，Ag-MPA 奈米粒子顆粒形貌不均一，呈現鏈狀排列方式，與 UV-vis-NIR 分析中 500~800 nm 側鋒出現相呼應，表示具有不同形貌的銀奈米粒子存在。在經 anti-MEL mAb 偶聯後，所得的 Ag-MPA-mAb 偶聯體分散，並且粒徑尺寸約 20~30 nm，如圖 6(d)，這表明 anti-MEL mAb 在 Ag-MPA 奈米顆粒上的包覆成功，具有分散功能。

如圖 6 (e)所示，所得到的 Fe_2O_3 奈米粒子具有球狀形態，並具有一定的聚集性，平均粒徑約為 12 nm。在經 PEG 修飾和 anti-MEL mAb 偶聯後，所得的 Fe_2O_3 -PEG-mAb 偶聯體聚集，並且尺寸增加到超過 15 nm，如圖 6 (f)，這表明 PEG 和 anti-MEL mAb 在 Fe_2O_3 奈米顆粒上的成功固定化。

值得注意的是，Ag-TSC-mAb 偶聯體的分散性較 Ag-MPA-mAb 和 Fe_2O_3 -PEG-mAb 偶聯體來的好，具有顯著更少聚集。這些結果表明 Ag-TSC 奈米粒子與抗體偶聯後在懸浮液中能保持分散穩定，此為免疫層析快篩中的重要關

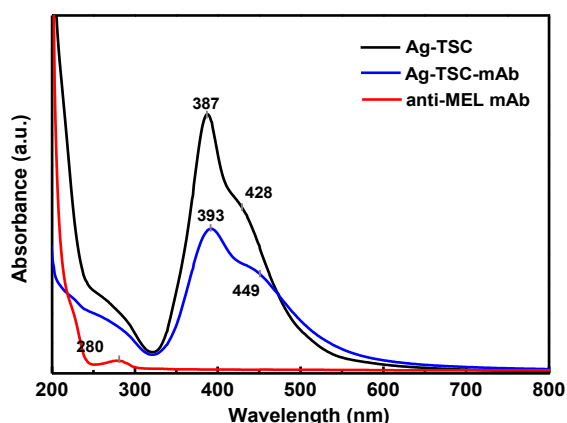


圖 3 Ag-TSC、Ag-TSC-mAb 和 anti-MEL mAb 的 UV-vis-NIR 光譜圖

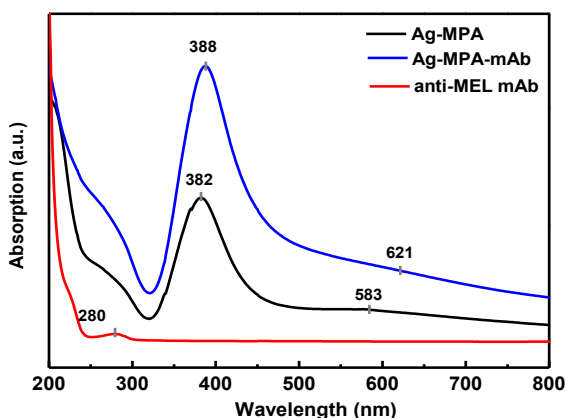


圖 4 Ag-MPA、Ag-MPA-mAb 和 anti-MEL mAb 的 UV-vis-NIR 光譜圖

鍵因素，因為偶聯體的懸浮穩定性在 LFIA 中起著重要作用，可避免因偶聯體的聚集，而阻斷其在 NC 膜中的流動。

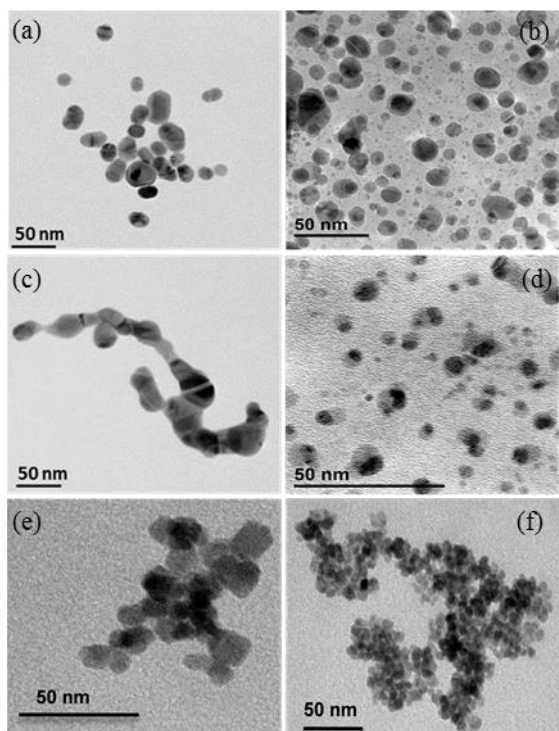


圖 6 不同型態奈米粒子與三聚氰胺抗體偶聯 TEM 圖：(a) Ag-TSC；(b) Ag-TSC-mAb；(c) Ag-MPA；(d) Ag-MPA-mAb；(e) Fe₂O₃-PEG；(f) Fe₂O₃-PEG-mAb

3.2 靈敏度檢測

在本研究中，Ag-TSC-mAb、Ag-MPA-mAb、Fe₂O₃-PEG-mAb 偶聯體為基材的 MEL 快篩試紙藉由免疫競爭型測定進行 MEL 檢測。檢測原理如下，將含有 MEL 的水溶液滴入樣品墊上時與偶聯體進行水合作用，並且隨後釋放到流動液體中，在毛細管力驅動下流動穿過測試線和控制線。由於溶液中的 MEL 和固定在測試線上的半抗原都可以與偶聯體特异性結合，它們將競爭結合偶聯體上的有限結合位點。因此，由偶聯體的量決定測試線的顏色，進而反應了 MEL 的量。相反，所有流動穿過測試線的顆粒將被固定在控制線上的第二抗體捕獲，與 MEL 和偶聯體之間的組合無關。因此，控制線的顏色反映偶聯體從結合墊的有效釋放，並且用於測試運行的有效性。檢測極限的值被定義為抑制測試線上顯色發展的最低 MEL 濃度。當樣品中不含 MEL 時，

則測試線和控制線兩條線均呈褐色。若樣品中 MEL 濃度低於檢測限值，則結合墊中未結合 MEL 之偶聯體將與測試線上之半抗原結合，致使測試線和控制線兩條線均呈現褐色表現，但與前述未含 MEL 之測試線顏色相比，則顏色略顯為淡。相反，如果樣品中的 MEL 濃度高於檢測限值，則結合墊中的偶聯體將全數與 MEL 結合，致使偶聯體無多餘之結合點與測試線上的半抗原結合，所以則僅控制線呈現褐色表現，而測試線則無顏色呈現。

圖 7 顯示了 Ag-TSC-mAb 偶聯體組成的 MEL 側流免疫層析快篩試紙對濃度從 0 到 0.9 ppm 的 MEL 標準品實施靈敏度檢測，結果顯示，當 MEL 標準品濃度為 0.5 ppm 時，快篩試紙顯示 T 線趨於消失，由此可知，該快篩試紙的視覺檢測極限為 0.5 ppm；光學檢測極限則為 0.1 ppm，檢測時間為 15 分鐘。

圖 8 顯示了採用 Ag-MPA-mAb 偶聯體組成的 MEL 側流免疫層析快篩試紙對濃度從 0 到 0.9 ppm 的 MEL 標準品實施靈敏度檢測，結果顯示，該快篩試紙的視覺檢測極限為 0.9 ppm；光學檢測極限為 0.3 ppm，檢測時間為 15 分鐘。

圖 9 顯示了採用 Fe₂O₃-PEG-mAb 偶聯體組成側流免疫層析快篩試紙對濃度從 0 到 0.6 ppm 的 MEL 標準品實施靈敏度檢測，該快篩試紙的視覺檢測極限為 0.6 ppm；光學檢測極限為 0.4 ppm，檢測時間為 15 分鐘。

以上實驗均重複三次結果一致，靈敏度穩定性較好。相較之下，Ag-TSC-mAb 偶聯體的視覺檢測限達到 0.5 ppm，較 Ag-MPA-mAb 偶聯體和 Fe₂O₃-PEG-mAb 偶聯體顯著降低，這表示使用 Ag-TSC-mAb 偶聯體具有較高度敏感的側流免疫層析效果。

3.3 美耐皿餐具檢測

圖 10 顯示了採用最佳條件的 Ag-TSC-mAb 偶聯體組成側流免疫層析快篩試紙，測定不同溫度下 30 分鐘後美耐皿餐具是否溶出 MEL，取其液體經快篩試紙檢測後之情形。結果顯示，當美耐皿餐具盛裝 90℃ 溶液 30 分鐘後，測試線與對照組測試線相比，顏色轉淡，表示盛裝 90℃ 溶液的美耐皿餐具具有較多的 MEL 溶出，進而抑制測試線的呈色，由此可知，該快篩試紙的視覺檢測極限為 90℃ 的待

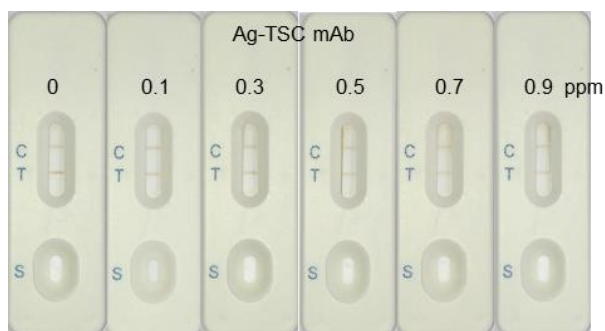


圖 7 Ag-TSC-mAb 偶聯體製備之側流免疫層析快篩試紙針對不同濃度 MEL 標準品運用視覺觀測及 ImageJ 軟體對 T 線實施光密度分析

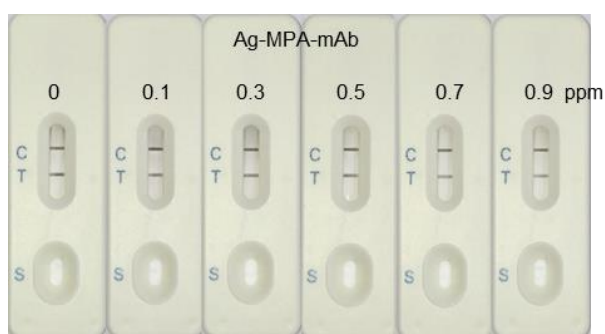
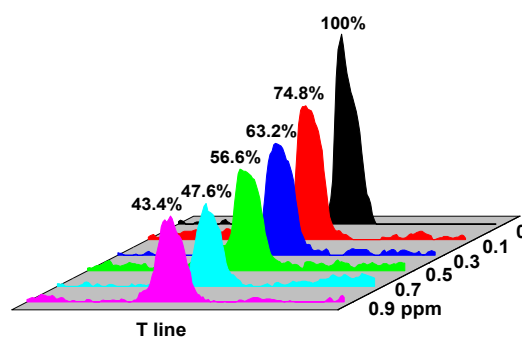


圖 8 Ag-MPA-mAb 偶聯體製備之側流免疫層析快篩試紙針對不同濃度 MEL 標準品運用視覺觀測及 ImageJ 軟體對 T 線實施光密度分析

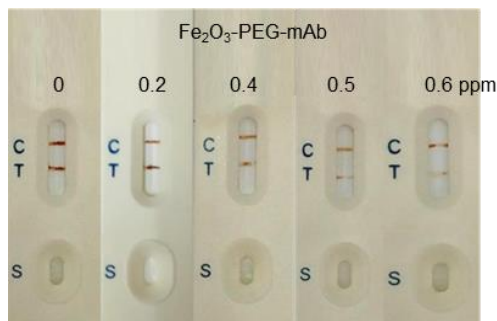
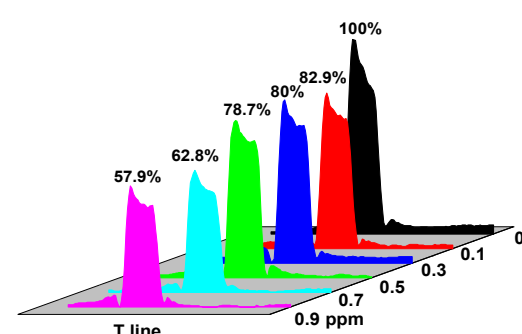


圖 9 Fe_2O_3 -PEG-mAb 偶聯體製備之側流免疫層析快篩試紙針對不同濃度 MEL 標準品運用視覺觀測及 ImageJ 軟體對 T 線實施光密度分析

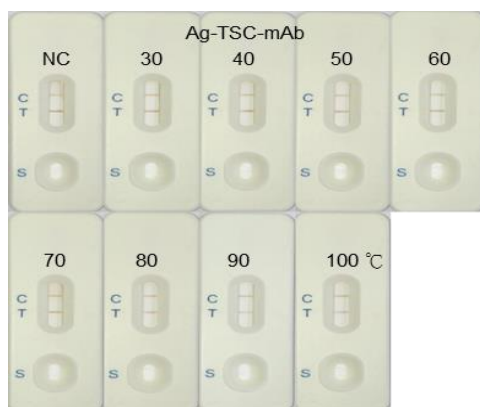
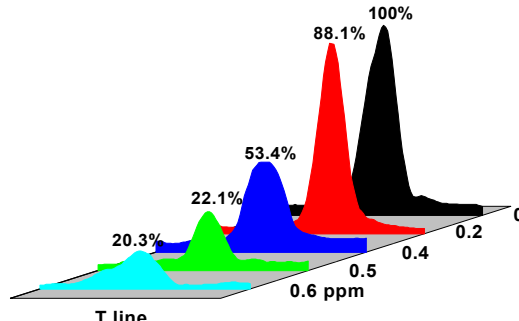
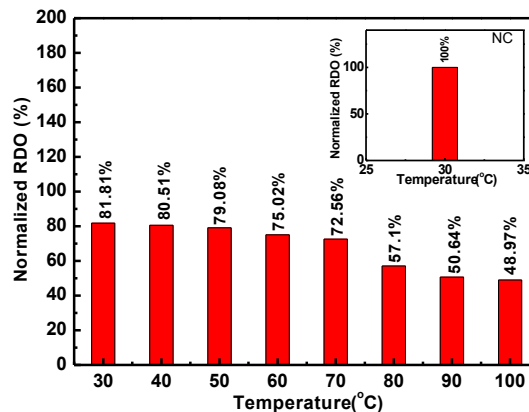


圖 10 Ag-TSC-mAb 偶聯體製備之側流免疫層析快篩試紙運用視覺觀測及 Image J 軟體對 T 線實施光密度分析以測定不同溫度下美耐皿餐具中的 MEL 溶出狀況



測液；另經 ImageJ 軟體對測試線實施光密度分析，與對照組相比，則盛裝 30°C 溶液的美耐皿餐具即可被檢測出光學檢測極限。此結果可應證 2013 年吳明蒼等人針對美耐皿餐具和陶瓷餐具在盛裝 90°C 湯麵的穩定性研究，發現使用美耐皿餐具吃麵的尿液樣本測出 8.35 μg 的 MEL，比陶瓷餐具的 1.31 μg 多出約 6~7 倍的毒物量[5]，證實高溫下美耐皿餐具會釋出 MEL，並且可由本研究開發之快篩試紙檢測出。

四、結論

本研究開發 Ag-TSC-mAb、Ag-MPA-mAb 和 Fe_2O_3 -PEG-mAb 等三種不同形態之偶聯體製備側流免疫層析快篩試紙檢測 MEL。就實驗結果，三者均能有效藉由競爭法對 MEL 實施檢測，其中除了 Ag-TSC-mAb 和 Fe_2O_3 -PEG-mAb 偶聯體所製備之快篩試紙檢測極限可與台灣尖端先進生技醫藥公司市售之金奈米粒子三聚氰胺快速檢測試劑最低靈敏度 0.5 ppm 相比擬外，另外銀奈米粒子及磁性奈米粒子又較金奈米粒子製備價格低廉，所以可有效降低製作成本；此外利用 Ag-TSC-mAb 偶聯體製備之快篩試紙實測美耐皿餐具安全性，亦可有效針對 30°C 和 90°C 做出判斷，究其原因分析，推斷可能是因為 Ag-TSC 形貌和粒徑大小所造成。以 TSC 為保護劑所製備之 Ag-TSC 具有球狀形貌且顆粒粒徑小於 20 nm 之特性，經偶聯抗體後之 Ag-TSC-mAb 偶聯體仍維持球狀形貌，且粒徑尺寸仍保有 20~30 nm 左右，分散性良好，有助於捕捉 MEL 及在 NC 膜流動。本研究成功開發不同型態奈米粒子結合抗體之快篩試紙，不僅操作簡便、分析快速，且製備價格較金奈米粒子來的低廉，進而解決廣大基層單位困於設備和經費等考量，而無法立即有效針對食品中三聚氰胺實施檢測和監控等問題，提供新的檢測選擇，具有重要的經濟和社會價值。

誌謝

本研究承蒙行政院國科會提供經費補助(計畫編號 MOST 107-2623-E-606-006-D)，特此誌謝。

參考文獻

- [1] 衛生福利部，食品安全政策白皮書 2016-2020，2016。
- [2] [https://achievement.ey.gov.tw/cp.aspx?n= 1E42BEB0F68720CB](https://achievement.ey.gov.tw/cp.aspx?n=1E42BEB0F68720CB)。
- [3] http://www.pac.gr/bcm/uploads/fpf_dossier_02_melamine.pdf
- [4] 錢昭誼，“美耐皿餐具溶出高濃度三聚氰胺之相關研究”，碩士論文，高雄醫學大學，高雄，2010。
- [5] Wu, C. F., Hsieh, T. J., Chen, B. H., “A Crossover Study of Noodle Soup Consumption in Melamine Bowls and Total Melamine Excretion in Urine”, JAMA Intern Med., Vol. 173, pp. 317-319, 2013.
- [6] 申屠萱、張淑貞、高靜華，“農藥殘留免疫檢測技術在農產品安全上的應用”，農業試驗所技術服務季刊，第 111 期，第 17-20 頁，2017。
- [7] 林啟萬、張家禎、裴琮亮、王大欣、呂慧歆、劉建昇，“表面電漿子共振生物感測器之最新發展”，化學，第 69 卷，第 3 期，第 211-222 頁，2011。
- [8] 劉正哲、侯勁毅，“運用金奈米粒子的層流法生物感測器”，化學，第 69 卷，第 3 期，第 249-254 頁，2011。
- [9] Fu, X., Xie, R., Wang, J., Chen, X., Wang, X., Sun, W., Meng, J., Lai, D., Zhou, L., Wang, B., “Development of Colloidal Gold - Based Lateral Flow Immunoassay for Rapid Qualitative and SemiQuantitative Analysis of Ustiloxins A and B in Rice Samples”, Toxins, Vol. 9, pp.79, 2017.
- [10] Huang, X., Aguilar, Z. P., Xu, H., Lai, W., Xiong, Y., “Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review”, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 75, pp. 166-180, 2016.
- [11] Kim, Y.A., Lee, E.H., Kim, K.O., Lee, Y.T., Hammock, B.D., Lee, H.S., “Competitive immunochromatographic assay for the detection of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos”, Analytica Chimica Acta., Vol. 693, pp.106-113, 2011.
- [12] Li, X., Luo, P., Tang, S., Beier, R.C., Wu, X., Yang, L., Li, Y., Xiao, X., “Development of an Immunochromatographic Strip Test for

- Rapid Detection of Melamine in Raw Milk, Milk Products and Animal Feed”, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 59, pp. 6064-6070, 2011.
- [13] 龔雲飛、陳宗倫、奚茜、李沐潔、王唯芬、王旻子、應永飛、張明洲，“三聚氰胺膠體金免疫層析試紙條的研製”，*生物工程學報*，第 28 卷，第 7 期，第 887-898 頁，2012。
- [14] 楊正義、陳吉峰、葉怡均、陳正龍、陳家俊，“金屬、半導體奈米晶體在生物檢測及分析上的應用”，*物理雙月刊*，第 23 卷，第 6 期，第 667-677 頁，2001。
- [15] D.B. Wang, B. Tian, Z.P. Zhang, J.Y. Deng, Z.Q. Cui, R.F. Yang, X.Y. Wang, H.P. Wei, X.E. Zhang, “Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores using a super-paramagnetic lateral flow immunological detection system”, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 42, pp. 661-667, 2013.
- [16] Liu, L., Luo, L., Suryoprabowo, S., Peng, J., Kuang, H., Xu, C., “Development of an Immunochromatographic Strip Test for Rapid Detection of Ciprofloxacin in Milk Samples”, *Sensors*, Vol. 14, pp. 16785-16798, 2014.
- [17] Blažková, M., Mičková-Holubová, B., Rauch, P., Fukal, L., “Immunochromatographic colloidal carbon-based assay for detection of methiocarb in surface water”, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 25, pp. 753-758, 2009.
- [18] Liu, C., Jia, Q., Yang, C., Qiao, R., Jing, L., Wang, L., Xu, C., Gao, M., “Lateral Flow Immunochromatographic Assay for Sensitive Pesticide Detection by Using Fe₃O₄ Nanoparticle Aggregates as Color Reagents”, *Anal. Chem.*, Vol. 83, pp. 6778-6784, 2011.
- [19] 王春霞、李英琳、徐磊，“PVP 保護下納米銀顆粒的液相化學還原法製備及表徵”，*貴金屬*，第 35 卷，第 4 期，第 30-34 頁，2014。
- [20] Thomas, K. G. “Tuning functional properties: From nanoscale building blocks to hybrid nanomaterials”, *Indian Academy of Sciences*, pp. 53-66, 2009.
- [21] Agnihotri, S., Mukherji, S., Mukherji, S., “Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy”, *RSC Adv.*, Vol. 4, pp. 3974–3983, 2014.
- [22] Tang, D. P., Yu, Y.L., Niessner, R., Miró, M., Knopp, D., “Magnetic bead-based fluorescence immunoassay for aflatoxin B1 in food using biofunctionalized rhodamine B-doped silica nanoparticles”, *Analyst*, Vol. 135, pp. 2661-2667, 2010.