

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

使用逆流層析及離子液體製備分離蛋白質中藥藥材和奈米
粒子(二)

研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 97-2113-M-009-013-
執行期間：97年08月01日至98年07月31日
執行單位：國立交通大學應用化學系(所)

計畫主持人：余艇

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：吳印從
碩士班研究生-兼任助理人員：陳琬茹
碩士班研究生-兼任助理人員：許育國
碩士班研究生-兼任助理人員：陳伶宜
碩士班研究生-兼任助理人員：江典祐
博士班研究生-兼任助理人員：林淑慧
博士班研究生-兼任助理人員：沈經緯

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 98 年 10 月 30 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ■ 成果報告

期中進度報告

使用逆流層析及離子液體分離蛋白質中藥藥材和奈米粒子 (二)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2113-M-009-031-

執行期間：97年 8月 1日至 98年 7月 31日

計畫主持人：余艇

共同主持人：

計畫參與人員：林淑慧，沈經緯，吳印從，陳琬茹，許育國，陳玲宜，
江典祐。

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立交通大學應用化學系

中 華 民 國 98 年 10 月 14

一、中文摘要

本報告，是針對以逆流層析儀對於銀奈米粒子進行連續萃取，以粒子的大小來進行分離。我們在親水性的銀奈米粒子的表面修飾羧酸根負電荷，將銀奈米粒子水溶液注入逆流層析儀分離管柱之後，再將含有四級氫鹽(TOAB)的有機溶液(甲苯/己烷體積比為1)做為動相沖提，銀奈米粒子與四級氫鹽產生的離子對化合物的水溶性極低，使得奈米粒子會從水中轉而進入有機溶液，此相轉移的過程與奈米粒子的大小有關，較小的奈米粒子會更容易地進入有機溶液，藉此可分離不同大小的粒子，此萃取之訊號圖譜類似一般的逆流層析圖。經過掃瞄式電子顯微鏡觀測後，以含有20 μ M TOAB的有機相作為動相的分離結果與奈米粒子的回收率比較好，尤其對於較小的奈米粒子的分離。此研究中，成功地應用界面活性劑的動相與靜相系統於逆流層析儀來分離奈米粒子。此外，我們在單一相之逆流層析中，探討大小分子層析峰之形狀和帶寬，對於逆流層析之特性提供新的資訊。

英文摘要

Size separation of silver nanoparticles was investigated in a counter-current chromatograph (CCC) based on continuous extractions. Carboxylate anions were modified on silver nanoparticles to produce water-soluble nanoparticles. The water-dispersible nanoparticles were readily transferred to an organic phase (toluene/ hexane = 1:1, v/v) with the presence of the phase transfer catalyst, tetraoctylammonium bromide (TOAB), due to formation of ion-pair adducts formed by the silver nanoparticle anions and tetraoctylammonium cations. It was found that smaller nanoparticles were more easily transferred to the organic phase than larger nanoparticles. Various concentrations of TOAB in the organic elution phase were investigated in the CCC extraction experiments. The extraction signal of nanoparticles was recorded and the fractions of the effluent were collected. It appeared that 20 μ M of TOAB was an adequate concentration to achieve optimum separation and recovery in the CCC experiments. Particle size distributions, studied using scanning electron microscopy, were found much narrower than those obtained using batch-type extractions, especially for smaller nanoparticles. In addition, we studied analytes of different molecular weights in a single phase CCC. The results provided new information of the characteristics in CCC.

關鍵詞

逆流層析儀、分離銀奈米粒子、連續萃取、層析峰帶寬、擴散

二、報告內容

(1) 前言

逆流層析(counter-current chromatography, CCC)是一種無固體支撐物的液相-液相分離技術，目前已被廣泛使用在中草藥的分離，能製備大量的中草藥標準品對於醫學研究，藥物開發、以及科學中藥的法令制定有相當大的幫助，除了中草藥的製備之外，逆流層析在對於食品成分、金屬離子以及生化分子的分離製備上，也具有相當大的貢獻。但是在對於一

些親水性大分子的分離，像是蛋白質、親水性的奈米粒子等，因為這些物質極為親水，幾乎不溶於有機相，所以無法使用傳統的有機相-水相溶劑系統分離，必須尋找出合適的動、靜相組成才能做有效的分離。

(2) 研究目的

近年來奈米材料的性質備受重視，利用層析法已發展出許多奈米物質的分離技術，鑒於逆流層析具有製備多量樣品的能力，但逆流層析儀尚未應用在奈米物質的製備分離上，本研究計畫主旨是在發展以逆流層析儀分離奈米粒子，希望藉由界面活性劑改變奈米粒子在水相-有機相中的分佈，基於分配層析法的原理，尋找適當的溶劑系統以及界面活性劑分離親水性奈米粒子。另一研究，為分子量大小不同之分子，在單一相逆流層析中層析峰特質之研究，此研究對於逆流層析層析峰之形狀以及帶寬有更進一步之瞭解，對於逆流層析之特性提供新的資訊。

(3) 文獻探討

表面帶有負電荷的親水性奈米粒子，可以穩定存在於水相中，但在含有較低極性的陽離子界面活性劑的幫助下，會由水相逐漸萃取出極性較低的有機相，相轉移的過程中會因為不同大小奈米粒子而有所差異。在水溶液中合成表面帶有mercaptosuccinic acid (MSA)的金奈米粒子(Au-MSA)，Au-MSA的表面電漿共振吸收約在540 nm，經由穿遂式電子顯微鏡的影像測量，顯示奈米粒子的平均粒徑為4.36 nm，標準差為0.89 nm。

分離的方式是對於平均粒徑為4.36 nm的奈米粒子進行萃取，首先將5 mg的Au-MSA奈米粒子溶解在20 mL的水中，另外以50 mL含有 5×10^{-5} M TOAB的甲苯溶液作為有機萃取相，將兩溶液劇烈混合攪拌之後，含有甲苯有機相逐漸轉變成黃色，顯示出有部份的金奈米粒子從水相轉移到甲苯中，若上層相稱之為萃取相A，將A溶液取出後再加入新鮮配製的40 mL含有 5×10^{-5} M TOAB的甲苯溶液，再一次劇烈攪拌，靜置後的上層相為溶液B，而且B溶液的顏色為深棕色。最後再一次加入新鮮配製的40 mL含有 5×10^{-5} M TOAB的甲苯溶液，劇烈攪拌之後的上層相為溶液C。經過TEM的測量結果，三次萃取相中的奈米粒子分佈大小順序為： $A < B < C$ ，若是將萃取相中的TOAB調為原本的三倍濃度(1.5×10^{-4} M)，在萃取體積不變之下，則所有的奈米粒子皆會被萃取出到上層相，而不會有尺寸大小上的差異。

有關在單一相逆流層析中層析峰特質之研究，並無任何文獻記載，此研究是我們在以逆流層析儀分離奈米粒子時，意外發現的一個現象，因而進行之研究。

(4) 研究方法

4-1 水溶性銀奈米粒子之合成

所有反應瓶先以硝酸(0.1M)以及去離子水清洗，將還原劑(NaBH_4 , 19 mg)溶解在25 mL的去離子水中，再加入1.7 mg 11-mercaptoundecanoic acid (MUA)於 NaBH_4 水溶液中，攪拌5分鐘後等待MUA完全溶解，在劇烈攪拌下逐滴加入 AgNO_3 水溶液(21 mg AgNO_3 溶於 25 mL去離子水)至上述含有還原劑 NaBH_4 以及保護劑MUA的混合溶液，反應約1分鐘後水溶液顏色由透明轉黃色，再由淡黃色逐漸轉為深褐色，持續攪拌24小時之後，即完成反應，將銀奈米粒子溶液的酸鹼值利用0.1 M鹽酸調至pH 2，再經過6000 rpm 離心沉澱以及真空乾

燥，樣品外觀上呈現深褐色，其紅外光光譜圖與MUA分子的紅外光光譜，如圖1所示，粒子表面上MUA單分子層的紅外光光譜吸收峰為 1740 cm^{-1} (carboxylic acid)， 1700 cm^{-1} (carboxylate)， 2917 cm^{-1} 以及 2852 cm^{-1} (CH_2)，這些紅外光吸收峰皆與MUA分子相同，但是Ag-MUA奈米粒子在介於 2550 cm^{-1} 到 2660 cm^{-1} 的紅外光吸收峰消失，表示Ag-MUA奈米粒子上的硫氫鍵(S-H)被銀與硫醇分子間的共價鍵(Ag-S)所取代，使得奈米粒子上的S-H紅外光振動消失。所得的銀奈米粒子經過掃瞄式電子顯微鏡測量(圖2)，其粒徑分布如圖3所示，計算其平均大小為 $15.8 \pm 5.3\text{ nm}$ 。

4-2 以逆流層析連續萃取方式分離銀奈米粒子之研究

將體積比為1:1的甲苯/己烷溶液以流速 4 mL/min 填滿逆流層析管柱，待填充完畢之後，將逆流層析的轉速調高為 700 rpm ，隨後注入含有 5 mL 的銀奈米水溶液樣品，同時動相也隨之改變，動相改以含有不同濃度($0.1\text{ mM} \sim 0.01\text{ mM}$)的TOAB的甲苯/己烷(1:1, v/v)有機溶劑進行沖提，UV偵測器波長設定在 430 nm ，動相流速為每分鐘 1 mL ，以每2分鐘為單位分管收集沖提液，並選其中四個收集管以電子顯微鏡測量奈米粒子的分布。

4-3 單一相逆流層析中分析物訊號峰形狀以及擴散之研究

本研究之方法，直接將不同大小(分子量)之樣品分子注入逆流層析儀，在不同轉速之下記錄其分佈曲線，而探討其特性，實驗方法簡單，但是卻提供很有趣的結果。

(5) 結果與討論

5-1 以逆流層析連續萃取方式分離銀奈米粒子

圖4是四個同TOAB濃度萃取銀奈米粒子的訊號圖譜，若我們以較高濃度的TOAB (0.1 mM) 萃取銀奈米粒子(圖4A)，則圖譜中只會出現單一波峰，其波峰出現時間約在 50 min 左右，為進一步確認 0.1 mM 的TOAB對於銀奈米粒子是否具有分離能力，我們收集並以電子顯微鏡測量此波峰裡其中四個收集管中的銀奈米粒子，收集時間與平均大小分別為： $(42\text{ min}, 15.6 \pm 4.5\text{ nm})$ ， $(50\text{ min}, 16.5 \pm 5.9\text{ nm})$ ， $(58\text{ min}, 15.1 \pm 5.2\text{ nm})$ ， $(62\text{ min}, 16.1 \pm 5.8\text{ nm})$ ，由此可見無論是在波峰的前緣(42 min)或是波峰尾端(62 min)，奈米粒子的分布均相差無幾，經由CCC管柱流出後的銀奈米粒子與樣品注入時的大小分布相似(15.8 nm)，也就是說以濃度 0.1 mM TOAB的有機溶液做為沖提液時，所有的銀奈米粒子皆被萃取到有機相，並無大小尺寸上的差異性存在，此結果與文獻中的實驗也相符合，也就是在使用含有高濃度的TOAB的有機溶液的情形之下，單一次的批式萃取便可萃取所有大小的奈米粒子。

圖4(B)是降低TOAB濃度 ($[\text{TOAB}] = 0.03\text{ mM}$)對銀奈米粒子的萃取訊號圖譜，圖譜中出現兩明顯波峰，分別是出現在 60 min 與 75 min ，其中最早出現的波峰的時間比圖4(A)中的波峰時間(50 min)還要來得晚，表示以 0.03 mM TOAB 對於萃取奈米粒子的能力小於含有 0.1 mM TOAB的有機溶液，圖4(B)中對於銀奈米粒的收集時間與平均大小分別為： $(58\text{ min}, 13.8 \pm 2.8\text{ nm})$ ， $(62\text{ min}, 15.4 \pm 3.3\text{ nm})$ ， $(78\text{ min}, 15.9 \pm 4.1\text{ nm})$ ， $(90\text{ min}, 19.2 \pm 5.0\text{ nm})$ ，在 $58\text{-}60$ 分鐘所流析出的銀奈米粒子(13.8 nm)略小於樣品的平均大小(15.8 nm)，隨著流析時間增加，所收集到的奈米粒子大小也隨之增加。

接著我們再次降低TOAB的濃度，以含有 0.02 mM TOAB的有機溶液做為CCC的動相，

其萃取訊號見圖4(C)，銀奈米的流析時間大幅拉長，收集時間與銀奈米粒子的粒徑測量結果為：(60 min, 13.7 ± 1.9 nm)，(74 min, 14.1 ± 3.5 nm)，(80 min, 19.2 ± 4.9 nm)，(90 min, 22.2 ± 4.3 nm)，相較於含有0.03 mM TOAB 有機溶劑做為動相的分離結果，我們發現以含有0.02 mM TOAB 有機溶劑對於銀奈米粒子的分離效果較好，四支收集管柱中的奈米粒子的電子顯微鏡測量結果見圖5，圖6則是奈米粒子的分布情形，在此濃度下(0.02 mM TOAB)的分離條件之下其統計結果可以得到比其他TOAB濃度更小的標準差，也就是分離後的奈米粒子分佈更為狹窄。

由上述實驗可以得知：以含有較低濃度TOAB 有機溶劑做為動相，可以得到較好的分離結果，但是TOAB 的濃度不能低於0.01 mM，倘若我們以含有0.01 mM TOAB 有機液做為動相，對於同樣的奈米粒子的萃取圖譜如圖4(D)，從圖4(D)的訊號面積可以指出我們所回收的銀奈米粒子遠少於動相含有0.1 mM ~ 0.02 mM TOAB 所得到的銀奈米粒子，當收集200分鐘後實驗結束，以氮氣將CCC內部管柱的液體推出，所推出的溶液中含有部份黑色沉澱固體，此沉澱物為銀奈米粒子聚集之後的顆粒，由此現象我們推測過低濃度TOAB 有機溶劑無法有效萃取表面帶負電的銀奈米粒子，而且還會降低銀奈米粒子在水相中的分散程度，使奈米粒子產生聚集沉澱，因此在本實驗中選用TOAB濃度為0.02 mM 有機溶劑為最適合的分離條件。

本研究發表之論文，列於計畫成果自評。

5-2 單一相逆流層析中分析物訊號峰形狀以及擴散之研究

本研究之結果已經在近期發表，列於計畫成果自評，此處簡單描述其成果。圖七是兩個分子量相差極大的分子（銀奈米粒子和黃色染料分子）在逆流層析中之分佈。從圖中可以看到，小分子的分佈為高斯形狀，但是奈米分子則為比較奇怪的，稱之為convection peak。所以會造成這個原因，是由於在細管徑中流析之時，流體分子和管壁摩擦，因而流速減慢，再加上奈米分子之擴散很慢，因此造成分佈於管子中央部分之分子速度遠大於分佈於管壁之分子，因此產生此種較為奇怪之分佈。

除此之外，我們還發現，當逆流層析儀旋轉時，所有的層析峰都會越趨近於高斯曲線，而且層析峰之帶寬都會變窄，主要時由於旋轉造成縱向混合加強，因此導致分析物分子之分佈變窄，而且轉速和變窄的程度呈現線性關係。這些發現解釋了過去一些逆流層析所觀察到卻無法解釋的現象。

三、參考文獻

- [1] W.D. Conway, *Countercurrent Chromatography: Apparatus Theory and Applications*, VCH Publishers, Inc., 1990.
- [2] Y. Ito, W.D. Conway, *High-Speed Countercurrent Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- [3] Y. Ito, *Anal. Chem.* 56 (1984) 534.
- [4] Y. Ito, G.T. Bramblett, R. Bhatnagar, M. Huberman, L. Leive, L.M. Cullinane, W. Groves, *Sep. Sci. Tech.* 18 (1983) 33.
- [5] Y. Ito, R.L. Bowman, *Anal. Biochem* 82 (1977) 63.
- [6] Y. Ito, J. Sandlin, W.G. Bowers, *J. Chromatogr* 244 (1982) 247.

- [7] H.T. Lu, J.A. Yue, F. Chen, *Journal of Chromatography A* 1017 (2003) 117.
- [8] X.L. Cao, Y. Tian, T.Y. Zhang, Y. Ito, *Journal of Chromatography A* 898 (2000) 75.
- [9] X.F. Ma, P.F. Tu, Y.J. Chen, T.Y. Zhang, Y. Wei, Y.C. Ito, *Journal of Chromatography A* 1023 (2004) 311.
- [10] K. Shinomiya, T. Komatsu, T. Murata, Y. Kabasawa, Y. Ito, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 23 (2000) 1403.
- [11] E. Kitazume, N. Sato, Y. Saito, Y. Ito, *Analytical Chemistry* 65 (1993) 2225.
- [12] Y.R. Jin, L.Z. Zhang, S.J. Han, L.X. Zhang, J.M. Zhang, G.Q. Zhou, H.B. Dong, *Journal of Chromatography A* 888 (2000) 137.
- [13] Y. Ma, Y. Ito, *Analytical Chemistry* 67 (1995) 3069.
- [14] P. Franco, J. Blanc, W.R. Oberleitner, N.M. Maier, W. Lindner, C. Minguillon, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 4175.
- [15] C.W. Shen, S.K. Boon, Y.P. Chang, T. Yu, *Journal of Chromatography A* 1123 (2006) 66.
- [16] C.W. Shen, T. Yu, *Journal of Chromatography A* 1151 (2007) 164.
- [17] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* (1994) 801.
- [18] W.L. Cheng, E. Wang, *Journal of Physical Chemistry B* 108 (2004) 24.
- [19] M.C. Daniel, D. Astruc, *Chemical Reviews* 104 (2004) 293.
- [20] Y. Yang, J.L. Shi, T. Tanaka, M. Nogami, *Langmuir* 23 (2007) 12042.
- [21] T. Huang, P.D. Nallathamby, D. Gillet, X.H.N. Xu, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 7708.
- [22] H. Yao, O. Momozawa, T. Hamatani, K. Kimura, *Chemistry of Materials* 13 (2001) 4692.
- [23] Y. Yang, K. Kimura, *Chemistry Letters* 35 (2006) 462.
- [24] C.H. Fischer, *Journal of Liquid Chromatography* 17 (1994) 3593.
- [25] M. Harada, T. Kido, T. Masudo, T. Okada, *Analytical Sciences* 21 (2005) 491.
- [26] Y. Ito, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 11 (1988) 1.
- [27] P.S. Fedotov, B.Y. Spivakov, V.M. Shkinev, *Analytical Sciences* 16 (2000) 535.

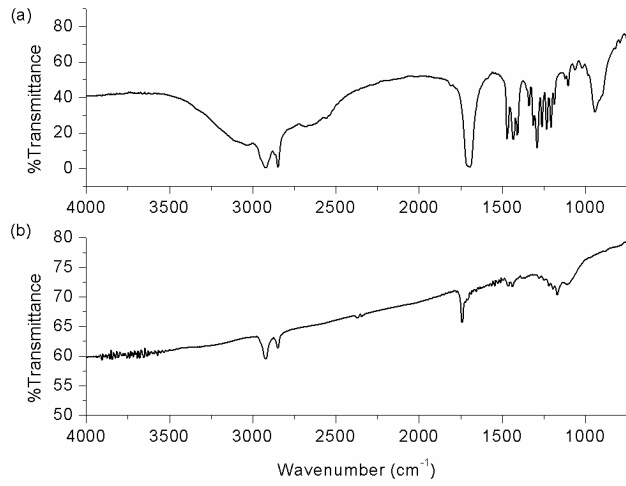


圖 1、FT-IR 光譜圖(a) MUA 分子
(b)Ag-MUA 銀奈米粒子

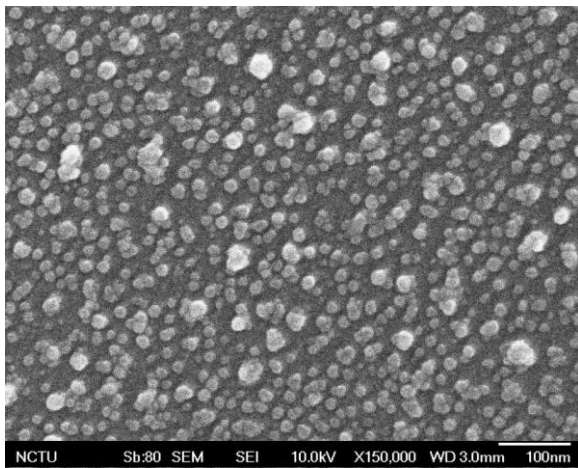


圖 2、掃描式電子顯微鏡下的銀奈米粒子

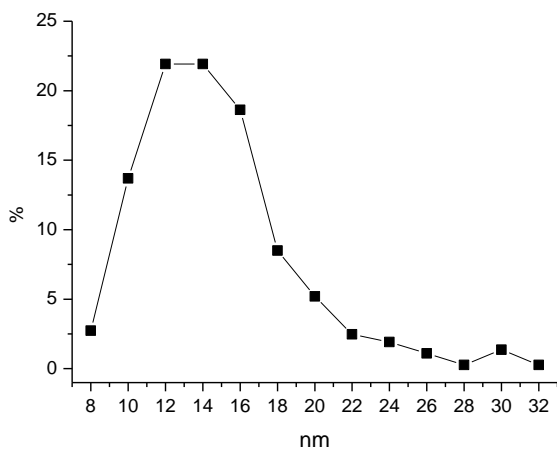


圖 3、利用 NaBH_4 還原 AgNO_3 所製備而成的
銀奈米粒子的粒徑分布

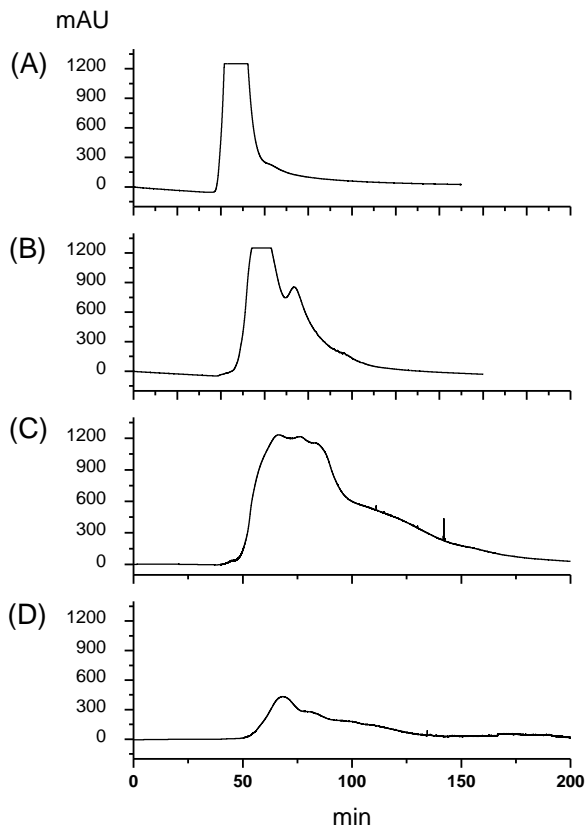


圖 4、含有不同 TOAB 濃度之下的有機溶劑對銀奈米粒子的萃取訊號圖(430 nm)，[TOAB] = 0.1 mM (A), 0.03 mM (B), 0.02 mM (C), 0.01 mM (D).

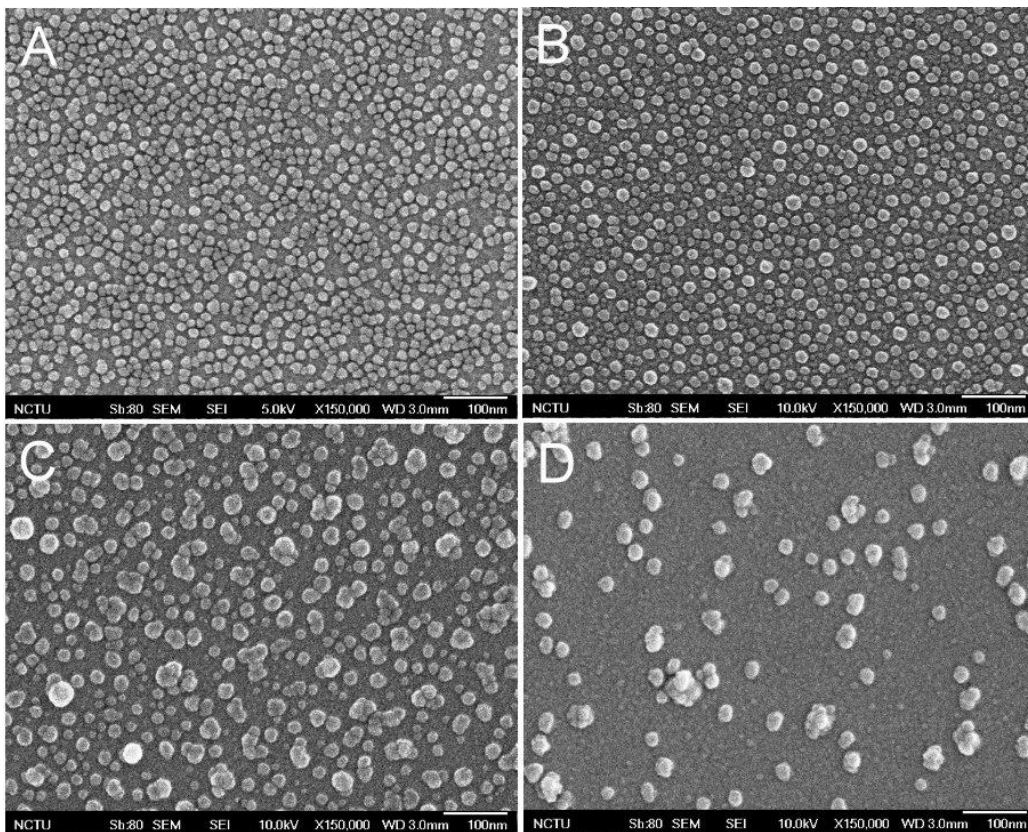


圖 5、以電子顯微鏡測量含有 0.02 mM TOAB 萃取後的銀奈米粒子收集液，收集時間分別

為 60-62 min (A), 74-76 min (B), 88-90 (C), 110-112 min (D).

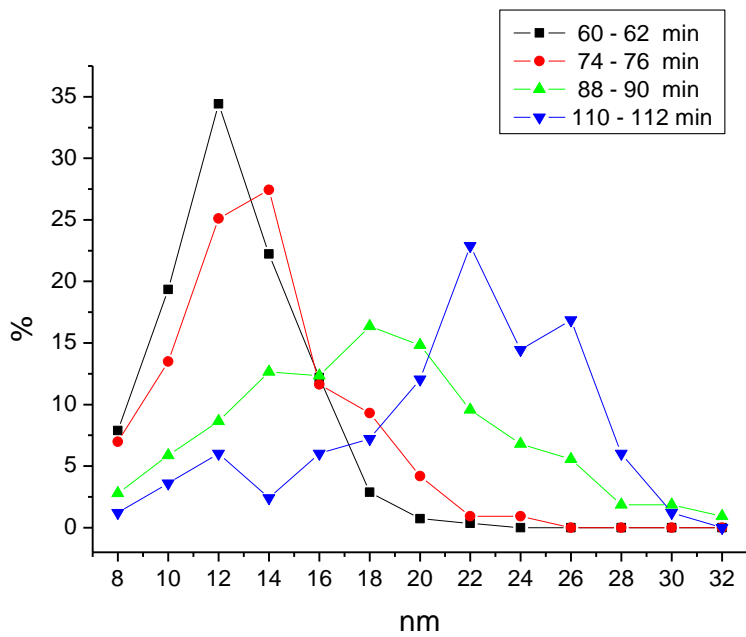


圖 6、在實驗圖 5 中，四支收集管中的粒徑分布圖

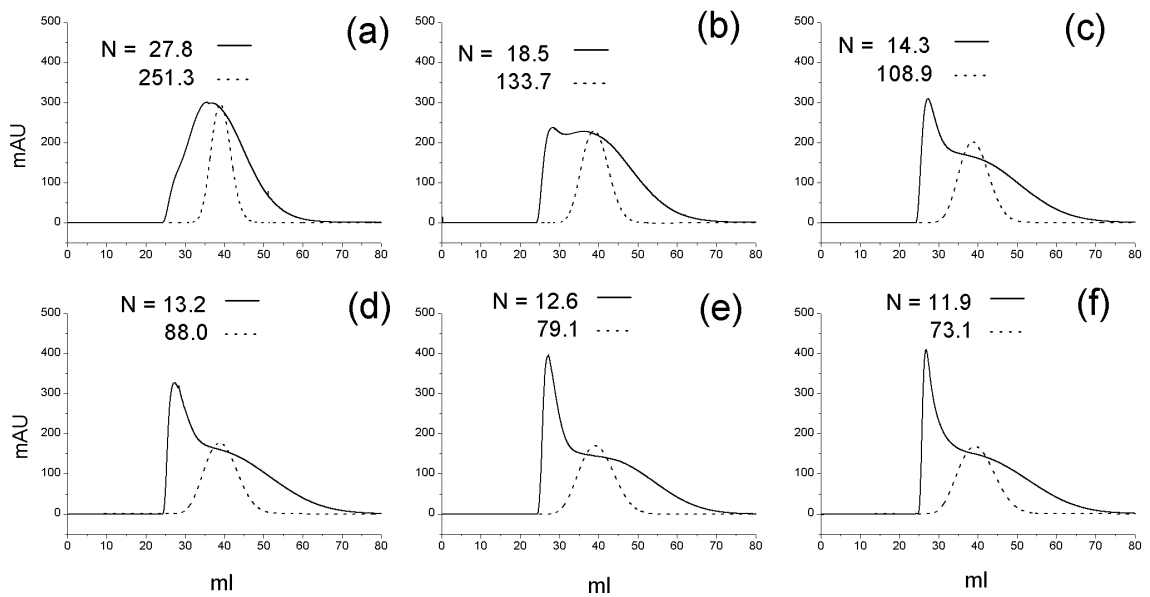


圖 7 Peak profiles obtained for AgNPs (solid line, 奈米大分子) and tartrazine (dash line, 染料小分子) samples eluted in a static CCC coiled tube. The flow rate was set to (a) 0.5 ml/min, (b) 1 ml/min, (c) 1.5 ml/min, (d) 2.0 ml/min, (e) 2.5 ml/min, and (f) 3.0 ml/min.

四、計畫成果自評

已發表和本計畫相關的兩篇論文：

- 1 Ching-Wei Shen, Tiing Yu*, 2009/6 "Size-fractionation of silver nanoparticles using ion-pair extraction in a counter-current chromatograph" 1216, 5962-5967, **SCI**, NSC-95-2113-M-009-031
- 2 Ching-Wei Shen, Tiing Yu*, 2009/10 "Peak shape and dispersion behavior of solutes in counter-current chromatography with a single phase" J. Chromatogr. A, 1216, 6789-6795, **SCI**, NSC-97-2113-M-009-031- (accepted).

我們的成果，非常符合此計畫原先設定之目標。