

國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

以雙水相系統萃取分離不同尺寸的銀奈米粒子

Size separations of silver nanoparticles using
aqueous two-phase systems



研究生：陳琬茹

指導教授：余艇 博士

中華民國九十八年六月

以雙水相系統分離不同尺寸的銀奈米粒子
Size separations of silver nanoparticles using
aqueous two-phase systems

研 究 生:陳琬茹

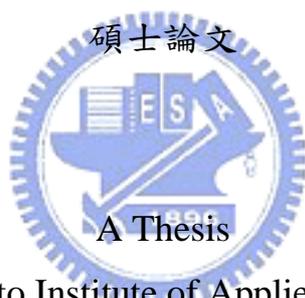
Student : Wan-Ru Chen

指導教授:余 艇 博士

Advisor : Dr. Tiing Yu

國立交通大學

應用化學研究所



Submitted to Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University
in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of
Master of Science
In
Applied Chemistry
June 2009
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國九十八年六月

以雙水相系統分離不同尺寸的銀奈米粒子

學生:陳琬茹

指導教授:余 艇

國立交通大學應用化學所

摘要

本研究之目的是利用雙水相系統 (aqueous two-phase systems, ATPS)，萃取分離不同大小之銀奈米粒子。我們選用聚乙二醇(PEG)加磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)來製備雙水相系統，藉由改變PEG分子量、PEG和 K_2HPO_4 的重量百分比濃度，以及添加尿素分子(Urea)，尋找出理想的雙水相系統，並以批式萃取法分離不同尺寸的奈米粒子。

經過最佳化的實驗之後，選用PEG (M.W. 6000) 15%(w/w)， K_2HPO_4 10%(w/w)雙水相系統，來分離表面修飾上有機分子(11-mercaptoundecanoic acid, MUA)之銀奈米粒子。發現，較大顆粒的銀奈米粒子傾向分佈於上層相，而較小顆粒銀奈米粒子於下層相分佈較多。我們認為MUA分子與雙水相系統中PEG分子之間的疏水性作用力(hydrophobic interaction)，影響銀奈米粒子在兩相中的分佈。

最後使用批式萃取的方法連續萃取三次。第一次萃取，上層相銀奈米粒子平均大小顆粒為 $11.5\pm 1.9\text{nm}$ ，下層相銀奈米粒子平均大小顆粒為 $10.5\pm 1.8\text{nm}$ ；第二次萃取，上層相銀奈米粒子平均大小顆粒為 $13.0\pm 1.9\text{nm}$ ，下層相銀奈米粒子平均大小顆粒為 $11.0\pm 2.1\text{nm}$ ；第三次萃取，上層相銀奈米粒子平均大小顆粒為

13.1±2.1nm，下層相銀奈米粒子平均大小顆粒為 11.1±2.4nm。經由實驗結果證明，利用銀奈米粒子大小尺寸，在雙水相系統兩相中的分佈不同，以批式萃取方法，可分離不同尺寸的銀奈米粒子。



Size separations of silver nanoparticles using aqueous two-phase systems

Student : Wan-Ru Chen

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

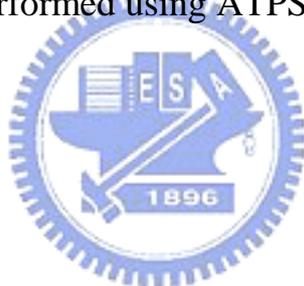
Abstract

The purpose of this study is size-separation of silver nanoparticles (AgNPs) using aqueous two-phase systems (ATPS). Polyethylene glycol (PEG) and K_2HPO_4 were selected to formulate the ATPS. By modifying the ATPS compositions, we could manipulate the partition coefficients of different size AgNPs in the two aqueous phases. The parameters modified in our study included the molecular weight of PEG, the salt concentration, the polymer concentration and the urea addition to the system.

The optimum ATPS was 15% (w/w) PEG (M.W.6000) with 10% (w/w) K_2HPO_4 . This solvent system was applied to extract the AgNPs in which the surface was modified by 11-mercaptoundecanoic acid (MUA). The size distributions of AgNPs in both phases were measured by Scanning Electron Microscopy. The partition of AgNPs with larger size was favored to enter the upper phase, i.e. PEG-rich phase, while the smaller AgNPs would exist in the bottom phase, i.e. K_2HPO_4 -rich

phase. Hydrophobic interaction between the MUA and PEG molecules was considered the major force on the AgNPs partitioning.

Three-step batch extractions were then performed to examine the separation efficiency. The average sizes of AgNPs in the first step extraction were 11.5 ± 1.9 nm in the upper phase and 10.5 ± 1.8 nm in the bottom phase. The AgNPs sizes in the second extraction were 13.0 ± 1.9 nm in the upper phase and 11.0 ± 2.1 nm in the bottom phase. The sizes in the last extraction were 13.1 ± 2.1 nm in the upper phase and 11.1 ± 2.4 nm in the bottom phase. The results showed the partition of AgNPs was size-dependent; therefore the size separation of AgNPs could be successfully performed using ATPS extractions.



謝誌

時間過得很快，兩年的研究生涯就要告一段落了，在這兩年當中，除了課堂上可以學習到專業知識，也從老師跟學長姐教導下學習如何操作實驗、如何處理事務還有應變態度，當中受到許多人的幫忙跟照顧，真的很感謝你們！

首先要感謝的是我的恩師余艇教授，感謝你指引我的研究方向和研究上的指導，也感謝能抽空前來，擔任口試委員的陳月枝教授以及黃賢達教授，使我的論文能臻於完善。接著要感謝同實驗室親切的淑惠學姊，還有什麼都懂得經緯學長，因為有你們的幫助使得實驗可以更加順利；還有實驗室的夥伴印崇、典祐、育國以及小美女伶宜，有你們的陪伴讓實驗生活更加歡樂；碩士同學一起打球講八卦的云琦、總是一起逛大賣場的雅柔、好貼心的室友天心及好脾氣的雨筠，平常和你們一起聊天出遊真得是很開心；一起打球的女排們，和你們一起練球是我最開心的時光！好姊妹雲萍，一起逛街聊心事，感謝你這兩年的陪伴；還有漫爵廚藝超好很照顧我的大哥，以及常告訴我人生道理的老師，真得很謝謝你們照顧。

最後感謝我的家人爸爸、媽媽、妹妹感謝你們對我的支持；在交大照顧我，帶我出遊的我柏帆，也很謝謝你！真的很謝謝大家！

總目錄

中文摘要	i
英文摘要	iii
謝誌.....	v
總目錄.....	vi
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xii
第一章 緒論	1
1-1 前言	1
1-2 奈米科技發展.....	2
1-3 金屬奈米粒子之製備.....	2
1-4 奈米粒子之應用與發展.....	4
1-5 分離不同尺寸奈米粒子.....	4
1-6 研究動機及目的.....	9
第二章 文獻回顧	10
2-1 雙水相系統.....	10
2-1-1 雙水相系統簡介.....	10
2-1-2 雙水相系統相圖.....	11
2-1-3 雙水相系統的分類.....	15

2-1-4 影響分配係數的因素	16
2-1-5 雙水相系統萃取奈米粒子	17
2-2CPC 儀器原理	18
第三章 雙水相萃取實驗	20
3-1 實驗藥品	20
3-2 實驗儀器	21
3-3 實驗方法	22
3-3-1 銀奈米粒子的合成方法	22
3-3-2 配製不同雙水相系統及雙水相系統之比例	22
3-3-3 雙水相的製備	24
3-3-4 偵測銀奈米粒子在雙水相系統中的分佈	25
3-3-5 銀奈米粒子測 SEM 的前置工作	26
3-3-6 雙水相系統批式萃取實驗	27
3-3-7 表面修飾不同分子奈米粒子之合成	29
第四章 實驗結果與討論	31
4-1 觀察不同分子量的雙水相系統	33
4-2 觀察不同鹽類濃度比例的雙水相系統	51
4-3 雙水相系統中添加尿素分子(Urea)	52
4-4 批式萃取銀奈米粒子	55

4-5 探討銀奈米粒子和雙水相系統彼此之間的作用力	57
4-6 雙水相系統分離不同表面修飾的樣品.....	59
第五章 結論	61
參考文獻	62



圖目錄

圖 1-1 場流分離法	6
圖 1-2 微粒過濾法透視圖	8
圖 2-1 雙水相相圖	13
圖 2-2 CPC 儀器示意圖	19
圖 3-3 利用相圖規律選取 9 個點	24
圖 3-4 銀奈米粒子在雙水相系統中光譜訊號	26
圖 3-5 銀奈米粒子萃取三次之實驗步驟示意圖	28
圖 4-1 以 SEM 偵測，表面修飾 MUA 銀奈米粒子之照片	31
圖 4-2 以 EDS 偵測，表面修飾 MUA 銀奈米粒子所含之元素	32
圖 4-3 以 SEM 偵測，表面修飾 MHA 銀奈米粒子之照片	32
圖 4-4-a 銀奈米粒子在 N.O.143 上層相 SEM 圖片	35
圖 4-4-b 銀奈米粒子在 N.O.143 下層相 SEM 圖片	35
圖 4-4-c 銀奈米粒子在 N.O.149 上層相 SEM 圖片	36
圖 4-4-d 銀奈米粒子在 N.O.149 下層相 SEM 圖片	36
圖 4-4-e 銀奈米粒子在 N.O.153 上層相 SEM 圖片	37
圖 4-4-f 銀奈米粒子在 N.O.153 下層相 SEM 圖片	37
圖 4-4-g 銀奈米粒子在 N.O.157 上層相 SEM 圖片	38
圖 4-4-h 銀奈米粒子在 N.O.157 下層相 SEM 圖片	38

圖 4-5-a 銀奈米粒子在 N.O.121 上層相 SEM 圖片	41
圖 4-5-b 銀奈米粒子在 N.O.121 下層相 SEM 圖片	41
圖 4-5-c 銀奈米粒子在 N.O.125 上層相 SEM 圖片	42
圖 4-5-d 銀奈米粒子在 N.O.125 下層相 SEM 圖片	42
圖 4-5-e 銀奈米粒子在 N.O.115 上層相 SEM 圖片	43
圖 4-5-f 銀奈米粒子在 N.O.115 下層相 SEM 圖片	43
圖 4-5-g 銀奈米粒子在 N.O.119 上層相 SEM 圖片	44
圖 4-5-h 銀奈米粒子在 N.O.119 下層相 SEM 圖片	44
圖 4-6-a 銀奈米粒子在 N.O.165 上層相 SEM 圖片	47
圖 4-6-b 銀奈米粒子在 N.O.165 下層相 SEM 圖片	47
圖 4-6-c 銀奈米粒子在 N.O.167 上層相 SEM 圖片	48
圖 4-6-d 銀奈米粒子在 N.O.167 下層相 SEM 圖片	48
圖 4-6-e 銀奈米粒子在 N.O.175 上層相 SEM 圖片	49
圖 4-6-f 銀奈米粒子在 N.O.175 下層相 SEM 圖片	49
圖 4-6-g 銀奈米粒子在 N.O.179 上層相 SEM 圖片	50
圖 4-6-h 銀奈米粒子在 N.O.179 下層相 SEM 圖片	50
圖 4-7 比較有、無 Urea 雙水相系統中，銀奈米粒子之分佈係數.....	53
圖 4-8 銀奈米粒子在 N.O.125 雙水相系統萃取三次的 SEM 分佈圖.	56
圖 4-9 PEG 分子結構	57

圖 4-10 雙水相中 PEG 和 Urea 之間的鍵結方式58



表目錄

表 2-1 不同種類的雙水相系統.....	14
表 4-1 ATPS: PEG 8000 +K ₂ HPO ₄ +DI water 配製比例及 K 值	33
表 4-2 ATPS: PEG 8000 +K ₂ HPO ₄ +Urea+DI water 配製比例及 K 值 .	34
表 4-3 ATPS: PEG 6000 +K ₂ HPO ₄ +DI water 配製比例及 K 值	39
表 4-4 ATPS: PEG 6000 +K ₂ HPO ₄ +Urea+DI water 配製比例及 K 值 .	40
表 4-5 ATPS: PEG 4000 +K ₂ HPO ₄ +DI water 配製比例及 K 值	45
表 4-6 ATPS: PEG 4000 +K ₂ HPO ₄ +Urea+DI water 配製比例及 K 值 .	46
表 4-7 固定 PEG 8000 濃度，改變 K ₂ HPO ₄ 濃度，觀察 K 值變化....	52
表 4-8 固定 PEG 6000 濃度，改變 K ₂ HPO ₄ 濃度，觀察 K 值變化....	52
表 4-9 固定 PEG 4000 濃度，改變 K ₂ HPO ₄ 濃度，觀察 K 值變化....	52
表 4-10 固定 PEG 8000 及 Urea 濃度，改變 K ₂ HPO ₄ 濃度，觀察 K 值 變化.....	54
表 4-11 固定 PEG 6000 及 Urea 濃度，改變 K ₂ HPO ₄ 濃度，觀察 K 值 變化.....	54
表 4-12 固定 PEG 4000 及 Urea 濃度，改變 K ₂ HPO ₄ 濃度，觀察 K 值 變化.....	55
表 4-13 不同表面修飾銀奈米粒子在 ATPS 中的 K 值	60

第一章 緒論

1-1 前言

我們知道物質隨著顆粒尺寸的縮小，表面積顯著增加，在一定的條件下，會引起物質宏觀的物理性質的變化。奈米材料的定義是尺度(Dimension)介於 1 至 100 奈米之間，微米與奈米都是度量衡單位，而材料尺度由微米到奈米所代表的意義，並不只是尺寸上的縮小，同時，獨特的物質特性亦隨之出現。在奈米的尺度下，物質的性質與巨觀相呈現許多特異之處，例如表面積增加、表面曲度變大、熱導性和導電性變佳等。因而引起物理、化學、材料、生物、醫學、電子、光電等科學家廣泛研究。在 1990 年第一屆國際奈米科學與技術學術會議中，正式提出奈米材料科學、奈米生物學、奈米電子學及奈米機械學等概念。同時亦決定出版『奈米技術』(Nanotechnology) (1990) 專業期刊，後續有 Nano Letters、Nanomedicine、Nano Structured Materials、Nature Nanotechnology 等跟奈米有關的期刊出版，開始引起世界各國科技人員廣泛的關注與研究。

目前奈米粒子合成技術已漸趨成熟，但是由於合成出的奈米粒子，還無法控制到顆粒大小為均一尺寸，因此對於分離不同尺寸奈米粒子之相關技術，科學家也開始投入研究。以往所分離奈米粒子的方法，有大小排除層析法、離子配對層析法、場流分離法、膠體電泳法及微粒過濾法等方法，這些類型的分離方法，大都使用到分離儀器以及有靜相固體填充物的管柱。本研究是使用雙水相系統批式萃取方法，此初步之研究，希望探討使用雙水相溶劑系統，是否可用於分離尺寸不同之奈米粒子。

1-2 奈米科技發展

1959年諾貝爾物理獎得主費曼(Richard Feynman 1918-1988)在美國物理學年會中，表示奈米技術在未來發展之重要性，他認為物質隨著尺寸的縮小，其性質有可能變得更豐富。這是在最早期針對奈米技術提出的一大預言。近十幾年來，世界各國競相投入奈米科技發展：2000年美國總統柯林頓設「National Nanotechnology Initiative; NNI」，統籌美國奈米科技研發方向及經費運籌。日本更早於1993年成立Nanospace Lab委員會，推動奈米材料的發展。韓國則在2001年投資一億美元發展奈米技術，成立4座研究中心，計劃大量培養技術人才。歐盟更預計投入13億美元建立「歐洲研究區」。中國大陸每年預計都投入五億人民幣研發奈米技術。台灣從2003年開始推動的「奈米國家型科技計畫」也是冀盼藉此整合學術研究之力量，奠定我國奈米科技發展之厚實基礎。而我們也可以從「奈米國家型科技計畫」網頁上“奈米新聞” [1]可得知最新的奈米科技資訊。

1-3 金屬奈米粒子之製備

直至今日，奈米材料的製備已發展出許多種方法，單就金屬奈米材料而言，其製備方法可分為物理方法、化學方法及生物方法三大類

1.物理方法

(a)氣體蒸氣法(Gas Evaporation Method)[2]

此法乃是將樣品直接加熱至氣態，然後這些氣化的樣品再被凝結至充滿液態氮的旋轉板外層，而直接形成奈米粒子。

(b)雷射剝削法(Laser Ablation Technique)[3]

此方法主要是利用雷射打到樣品上面使粒子發濺出來，此法乃起始於1993年Henglein使用694nm的紅寶石雷射(Ruby laser)，聚焦後打在浸於純溶劑中的金屬或非金屬薄膜上，成功得到金、鎳及碳-60奈米粒子分散在溶劑中[4]。

2.化學方法

(a)沈澱法(Precipitation Method)[5]

沈澱法是將沈澱劑加入金屬鹽溶液中反應，而得到奈米粒子，其特點是操作簡單，但容易引進雜質。

(b)微乳液法(Micro Emulsion Synthesis)[6]

微乳液法是，將金屬鹽和一定的沈澱劑形成微乳狀液，在較小的微泡區內控制膠粒成核及其生長，然後經過熱處理而得到奈米粒子。

(c)水熱合成法(Hydrothermal Synthesis)

是高溫高壓下在水溶液或蒸汽等流體中合成物質，再經過分離及熱處理而得到奈米粒子，其特點是純度高、分散性好、晶形好且大小可以控制。

(d)氧化還原法(Redox Method)[7; 8]

化學方法之中較常使用的為氧化還原法，氧化還原法更可細分為數種，例如將金屬鹽類直接用還原劑還原、或利用水合的電子(hydrated electrons)還原金屬鹽類，此種方法操作簡單，價格低廉。本研究中所合成的銀奈米粒子就是選用氧化還原法所合成，由於合成出的銀奈米粒子尺寸是不均勻的，本研究是使用雙水相系統，萃取不同尺寸銀奈米粒子，依不同尺寸進行分離。

(e)電化學法(Electrochemical Method)[9]

為較新發展出來的電化學法，其中使用簡單的二極電解槽，配合適當的界面活性劑(surfactant)直接電解而得所欲合成之金屬奈米粒子。此方法的特點是製備過程容易、有較佳的經濟效益、產率高以及副產物少。

3.生物方法

(a)微生物合成(Micro-organism Synthesis) [10]:

利用微生物來合成奈米微粒，可避免過程中遭到有毒化學物質的污染，目前科學家已經使用過細菌、黴菌等生物來進行這項工作。

1-4 奈米粒子之應用與發展

目前研究奈米材料主要應用發展有以下五類：

- 1.奈米陶瓷材料:已克服傳統陶瓷材料的脆性，使其具有金屬的柔性和易加工性。
- 2.奈米電子材料:即用奈米電子材料，以開發物質潛在的存儲和處理信息之能力，實現快速信息採集和處理能力的革命性突破。
- 3.奈米生物及醫學材料:即用生化醫學的材料，例：DNA 簡單快速檢測，病毒檢測[11]等。
- 4.奈米光電材料:用現有光電轉換效率的提昇，太陽能效提昇。
- 5.化工領域:高效長壽的催化劑，降低能量使用等。

1-5 分離不同尺寸奈米粒子

通常假設粒子是圓球形或近似圓球形，因此可用粒子半徑或直徑來表示粒子大小。當物質的粒子尺寸進入奈米級時，粒子將具有小尺寸的效應、表面效應等各方面優異性質。然而，當粒子達奈米尺寸時，無法由肉眼所觀察，因此如何分離不同尺寸奈米粒子，也就是所謂粒徑篩選，即是一門學問。以下是目前分離奈米粒子的相關技術：

1.大小排除層析法(Size-exclusion Chromatography)[12-17]

屬於一種層析方法，是廣泛用來純化分析的一項技術，層析管柱填充凝膠靜相，凝膠是由膠體溶液凝結而成的固體物質，內部具有網狀篩孔，利用球狀凝膠內的篩孔，使粒子流過填充凝膠的管柱時，大顆粒粒子無法進入凝膠篩孔，而只流經凝膠及管柱間的孔隙，很快就可以流出管柱，較小顆粒的粒子因為進入凝膠內的篩孔，故在管柱內的停留時間較長，藉由滯留在管柱時間不同，可區分不同尺寸的粒子。凝膠顆粒的粗細與分離效果有直接關係，顆粒細的分離效果好，但流速慢而費時，因此要依據實際的需要來選擇。對於分子量較小的物質，一般採用 polydextran 或 polyacrylamide 材質的凝膠，大分子物質則使用 agarose。

文獻指出[13]，會在動相中多添加一些界面活性劑，可幫助奈米粒子進入到填充靜相物質中，並減少奈米粒子與靜相填充物吸附作用力，改善分離效率，分離尺寸範圍可從 5.3nm 到 38.3nm。

2.離子配對層析法(Ion-Pair Chromatography)[18; 19]

離子配對層析法是逆相分配層析法的一種，以離子對試劑在固定相上生成暫時之離子交換基位，或與分析物生成離子配對而改變分析

物在移動相與固定相間之平衡關係，而達到分離的目的，主要用來分離離子化合物。文獻指出[18]，把直徑為1-2nm金奈米粒子表面修飾上*N*-acetyl-L-cysteine和tiopronin離子基，在甲醇和水比例混合而成的動相，添入tetrabutylammonium fluoride ($\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$)和緩衝液，則樣品和動相會形成離子對($\text{NPs-COO}^-\text{Bu}_4\text{N}^+$)，分離條件視 $\text{NPs-COO}^-\text{Bu}_4\text{N}^+$ 離子對與非極性靜相管柱之間的作用力，整體來說，奈米粒子電荷多寡可反映出奈米粒子大小，結果小尺寸的奈米粒子會變先沖提出。

3.場流分離法(Field Flow Fractionation)[20-24]

一種結合介電泳力與流體力兩種力之分離方法，使不同介電性質粒子，受介電泳力作用漂浮到流場中不同高度，進而利用流場內速度不同而分離樣品，可以去分離帶有磁性的奈米粒子。可看簡易示意圖，如圖1-1。文獻指出[21]，對於 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 或 CoFe_2O_4 ，尺寸範圍在4nm到13nm帶有磁性之奈米粒子，以場流分離法可依尺寸收集到4nm、6nm、8nm、9nm和13nm，不同大小尺寸的奈米粒子。

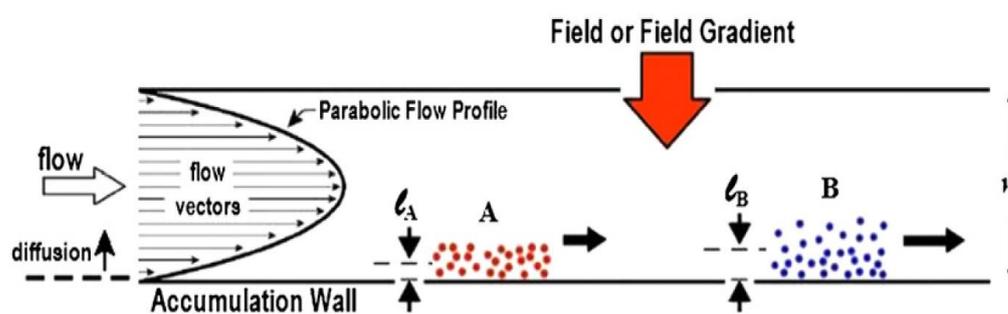


圖1-1場流分離法

帶有磁性的奈米粒子，在有磁場的毛細管管道中，進行分離。帶有磁性的粒子和磁場作用力低，則平均厚度較厚(l_A)，沖提時間較短；若和磁場的作用力高，則平均厚度較薄(l_B)，會有較長沖提時間。

4. 膠體電泳法(gel electrophoresis)[25-28]

藉電場強度作用於具電荷之奈米粒子上，引動奈米粒子於膠體孔隙運動，運動速率大致與使用的電場強度、粒子電荷量多寡、粒子大小、粒子形狀、緩衝溶液酸鹼值、溫度和膠體孔洞大小相關。膠體是指用來分離分子的基質 (matrix)，凝膠是由膠體溶液凝結而成的固體物質。大致上凝膠是個可以被科學家控制多孔性 (porosity) 的交聯聚合物。通常是用不同濃度的丙烯醯胺和一個交聯劑聚合而成，形成不同大小網眼的聚丙烯醯胺網狀系統，樣品通過凝膠時所受阻滯的程度不同，會表現出不同的遷移速率。

文獻指出[25]，使用膠體電泳法可依不同形狀(例如:奈米粒子、奈米線、奈米板)分離奈米粒子，也能依不同尺寸，以5 nm，15 nm，和20 nm大小收集金奈米粒子，進一步可使 15 ± 2.7 nm金奈米粒子達到 15 ± 0.4 nm，使尺寸更為均一。



5. 微粒過濾法(Diafiltration)[29; 30]

奈米級樣品溶液藉由幫浦(pump)注入到管柱中，管柱使用一種中空纖維的微粒過濾薄膜，當樣品流經管柱時，顆粒較小的粒子會滲透到薄膜外，剩餘較大尺寸的粒子則被動相沖提出管柱外，並再進行下一次分離，此過程是一種持續性、循環性的分離系統，示意圖為圖1-2。不同於傳統的過濾方法，微粒過濾法是屬於切向流過濾，簡稱TFF (Tangential Flow Filtration)，是防止濃度極化，造成過濾速度下降的最有效方法，藉由切向流的方法，當液體以一定速度連續流過濾膜表面，在過濾的同時，也對濾膜表面進行了沖洗，使膜表面不易形成凝膠層，減少薄膜的損壞，則可以保持穩定的過濾速度。選擇適

當之薄膜，進行各種不同之分離程序，通常依據待分離物質的性質，例如：粒子之大小、蒸氣壓、親合性、電性、密度及化學性質等去規劃，而薄膜之所以有這效果，主要因為薄膜之安全性、耐高溫、耐酸鹼等性質，比傳統程序更容易設計及控制。

文獻得知[29]，使用微粒過濾法成功的對 1.5 nm 到 3 nm 不均勻之金奈米粒子，可依 2.0 nm，2.5 nm，2.6 nm 及 2.9 nm 尺寸大小收集之，微粒過濾法分離不同尺寸，可做到更細微之篩選。

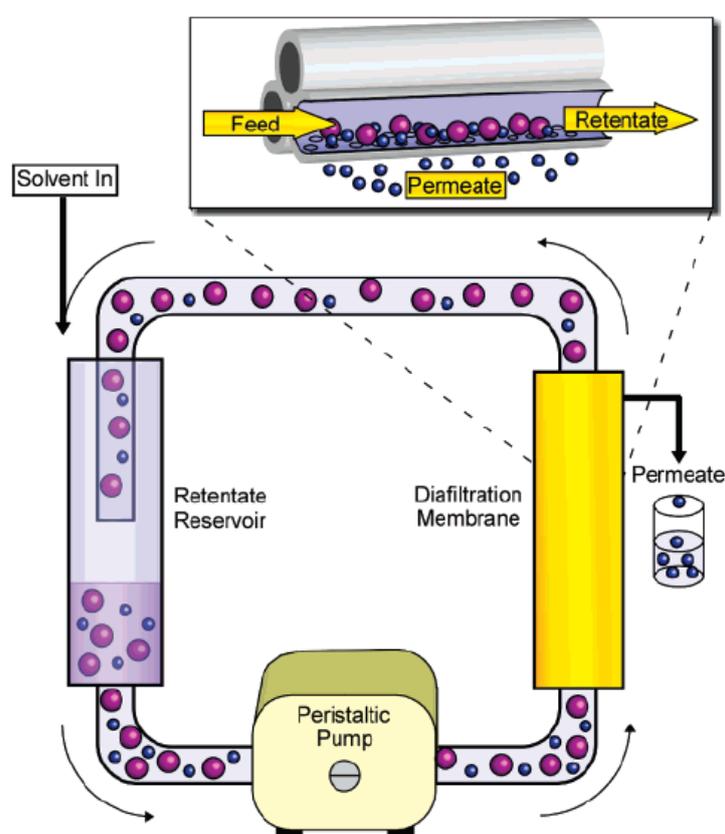


圖1-2微粒過濾法透視圖[29]

蠕動性幫浦把分析物注入到管柱裡，管柱為一種中空纖維的微粒過濾薄膜，當流分析物流經管柱，顆粒較小的粒子會滲透到薄膜外，剩餘較大顆粒則被滯留，並沖提出管柱外，再進行下一次分離。

1-6 研究動機及目的

本研究，是使用雙水相系統批式萃取方式，分離不同尺寸的銀奈米粒子。一般最常用來合成奈米粒子的方法為氧化還原法，實驗過程，是以氧化還原法合成銀奈米粒子，並尋找出理想的雙水相系統，使銀奈米粒子在兩相中會有尺寸上的分佈，接著藉由銀奈米粒子，依不同尺寸在雙水相系統中有不同分佈，進行批式萃取，希望可把原本不均勻的銀奈米粒子，做尺寸上的分離。

雙水相系統，是由高分子聚合物、鹽類和水所組成，選用此系統之優點為低毒性、無污染，藥品低廉，配製容易。本實驗之結果，未來可以使用於本實驗室之離心分佈層析儀 (Centrifugal Partition Chromatography, CPC)，可以把理想的雙水相系統，應用在 CPC 儀器上，做更進一步的分離。



第二章 文獻回顧

2-1 雙水相系統

2-1-1 雙水相系統簡介

在 1896 年由 Beijerinck 發現，他把洋菜 (agar) 與可溶性澱粉混合在水中，結果使原本為單一相的水，形成不互溶的兩相[31]。簡單的解釋，這是由於兩個分子間化學結構的差異而產生排斥力 (exclusion) 所造成的現象，所以我們只要將兩種不同的親水性高分子以適當的比例混合，就可以形成雙水相系統。常用的高分子-高分子雙水相系統，有 PEG-Dextran 雙水相系統，PEG 和 Dextran 以適當比例混合在單一相水溶液中，會使得原本是單一相水溶液，分層成兩相，上層相是 PEG 濃度比例較高的上層相水溶液，下層相是 Dextran 濃度比例較高的下層相水溶液。

經過長久的研究探討，又知道高分子溶液與鹽類以適當的比例混合，也可形成類似的雙水相系統。原理是鹽類所解離的陰離子，會與高分子鏈上具電子對部份 (例如乙醚單體上的氧) 會產生排斥效應，使高分子周圍形成一個不含鹽的區域，稱為“排鹽”現象 (salt-depletion)。這種現象以多價陰離子表現的較為明顯，因此在此類雙水相的分相系統中，所使用的鹽類絕大多數都採用多價陰離子，如磷酸鹽，硫酸鹽或碳酸鹽。本研究是選用高分子-鹽類的雙水相系統，選用 PEG- K_2HPO_4 所配置而成的雙水相系統，分層後的上層相為，PEG 濃度比例較高的上層相水溶液，下層相是 K_2HPO_4 濃度比例較高的下層相水溶液。

在以往的研究發展，雙水相系統是用來分離生物分子，例如蛋白

質、抗體、抗生素以及醫療性酵素等。主要原因是雙水相萃取環境更優於有機相萃取，它能兼顧純化的效果與維持蛋白質活性，目前已有許多以此原理設計的實驗工廠，或在工業製程上用以純化酵素。

2-1-2 雙水相系統相圖

製備雙水相，其分層溶劑系統時間可由半分鐘到半小時，系統中主體為水(約佔70~90%)。而此系統是否可以形成雙水相我們可以由相圖來得知，相圖是系統能否形成雙水相系統之指標，可以從中比較系統組成的成分，由表2-1可得知不同種類的雙水相系統的相圖。

典型的相圖為圖2-1[32]，雙節曲線(binodal curve)劃分成兩個區域，在曲線上以及曲線以下的比例混合只會成單一相，必須在曲線以上才能形成雙水相系統。而節線上各點所代表系統總濃度組成，其分相後上下層相的濃度組成皆相同，唯一差異的地方則是其兩相體積比不同，而通過B點的直線為節線(tie line)，上層的濃度組成以C點表示，下層則以D點表示。圖2-1為節線各點之上下層物質濃度示意圖，節線上的三個點(CBD)代表各個不同濃度的雙水相系統總組成，但是每個系統上層相與下層相的濃度組成相同，亦即皆為節線兩端所表示的濃度，所不同的是三者的上下層相體積比。另外，上下層重量百分率可以BD及BC線之長度表示，如圖2-1所示，假設在B點的總組成下，PEG之質量守衡式為：

$$m_0 = m_T + m_B \quad (2-1)$$

其中， m_0 ：PEG 總重， m_T ：PEG 在上層液重， m_B ：PEG 在下層液重。

$$m_O = (V_B \times \tilde{n}_B + V_T \times \tilde{n}_T) \times C_O \quad (2-2)$$

$$m_B = V_B \times \tilde{n}_B \times C_B \quad (2-3)$$

$$m_T = V_T \times \tilde{n}_T \times C_T \quad (2-4)$$

V 、 \tilde{n} 與 C 分別為系統溶液體積、密度與高分子重量百分濃度。下標的 T 與 B 分別代表在上層相與下層相的情況。

由方程式 2-1 ~ 2-4 可以得出：

$$(V_T \times \tilde{n}_T) / (V_B \times \tilde{n}_B) = (C_B - C_O) / (C_O - C_T) \quad (2-5)$$

由式子 2-2 觀察，PEG 於下層相的濃度 (D 點) 和在總組成 (B 點) 的濃度差與 PEG 於上層相 (C 點) 和在 B 點的濃度差之比值，以相似三角形原理得知，等於 BD 線段與 BC 線段之比值：

$$(C_B - C_O) / (C_O - C_T) = BD / BC \quad (2-6)$$

綜合式 2-5 與式 2-6：

$$V_T / V_B = \tilde{n}_B / \tilde{n}_T \times BD / BC \quad (2-7)$$

由於雙水相的密度可約略視為 1，因此式 7 可簡化為 $V_T / V_B = BD / BC$ [31]，亦即雙水相系統上下層體積比可藉由相圖來讀取。

節線的長度是來衡量兩相間相對差別的尺度，系統越長(節線越

長)，兩相間的性質差別越大，反之越小。當系統長度趨向於零時，即在圖2-1曲線上的K點，兩相差別消失，任何溶質在兩相中的分配係數為1，因此K點稱為臨界點(critical point)。

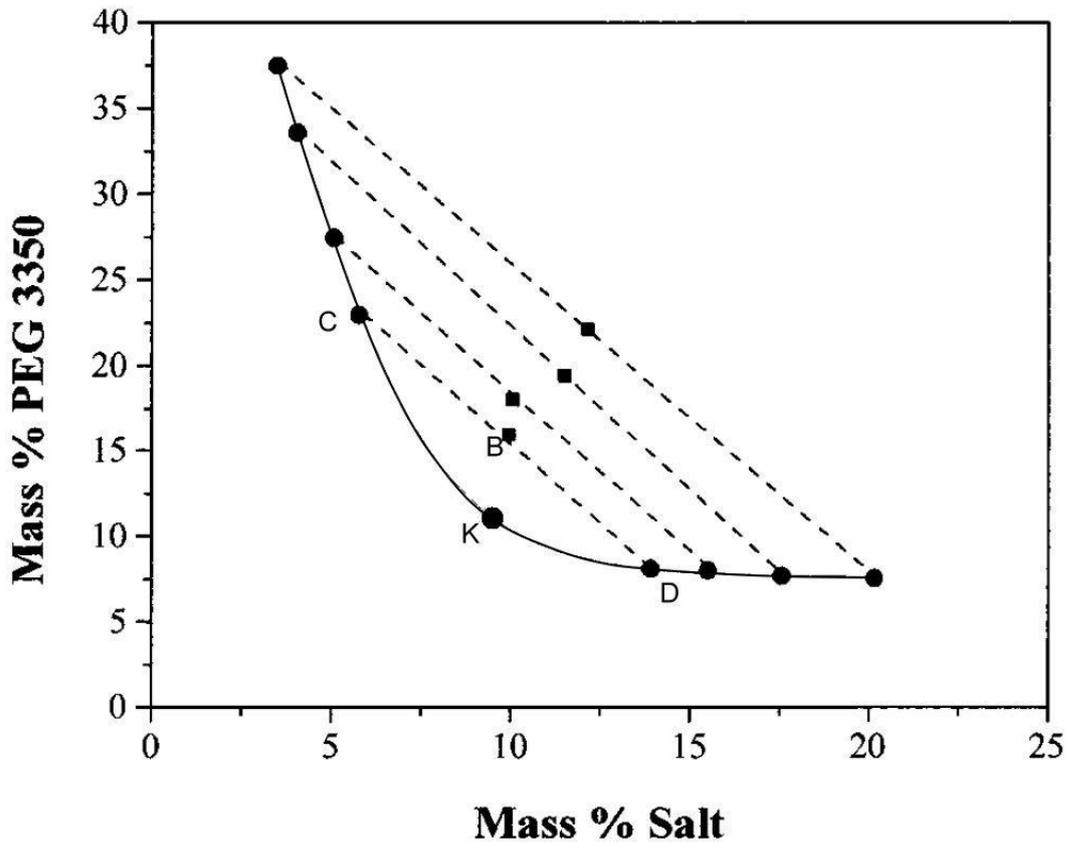


圖2-1雙水相相圖

此雙水相系統為PEG (M.W. 3350) + potassium phosphate+ water, 6 mass % urea, and pH=7, T = 25°C。由點所構成的雙節曲線(binodal curve)，點和點之間連結的虛線為節線(tie line)曲線和節線都可由實驗結果而得，實驗數據越多越精準。

表2-1不同種類的雙水相系統

System	Ref.
Polymer-Polymer	
Nonionic	
Dextran-poly(ethylene glycol)(PEG)	[33]
Dextran-poly(vinyl alcohol)(PVA)	[33]
Dextran-hydroxypropyl dextran	[33]
Dextran-Ficoll	[33]
Dextran-polyvinylpyrrolidone	[33]
PVA-PEG	[34; 35]
Hydroxypropyl starch-PEG	[36]
Pullulan-PEG	[37]
Poly(vinyl methyl ether)-PEG	[38]
Ionic	
Dextran sulfate-PEG	[33]
Carboxymethyl dextran-PEG	[33]
Poly(acrylic acid)-PEG	[39]
Poly(acrylamide)-PVP	[39]
Dextran sulfate-poly(styrene sulfonate)	[40]
Salt-polymer	
Potassium phosphate-PEG	[33]
Ammonium sulfate-PEG	[33]
Magnesium sulfate-PEG	[33]
Potassium citrate-PEG	[41]

2-1-3 雙水相系統的分類

以熱力學的觀點而言，雙水相系統的形成可以典型高分子溶液之 Flory-Huggins theory 為基礎加以推展[42]。根據 Flory-Huggins theory，當兩種高分子混合時，熵值 (entropy) 會增加，易於互溶而形成均勻的單一相。但在高分子鏈很長時，此熵值在整個系統的自由能所佔的影響相對就降低，同時，高分子間的作用力 (主要是斥力) 增加，大於溶解熵值的影響力，於是溶液就被分為兩相[43]。

雙水相最常用的高分子-高分子系統為 PEG 和 Dextran，PEG 主要分佈於雙水相的上層中，Dextran 主要分佈在下層中。PEG 是最常被使用的高分子，主要原因包括它的低毒性、高溶解度以及生物相容性。由兩種水溶性高分子形成兩相的原因，是由於高分子中連續的單體結構與水分子產生氫鍵，使水分子在 PEG 四周聚集結合；同樣的，Dextran 也會與水分子形成類似的結構，隨著濃度增加，兩種結構斥力也越來越大而造成相分離[43]。

高分子-鹽類雙水相系統原理是，鹽類中的陰離子會與高分子鏈上具電子對部份 (例如乙醚單體上的氧) 會產生排斥效應，使 PEG 周圍形成一個不含鹽的區域，稱為 “排鹽” 現象 (salt-depletion)。這種現象以多價陰離子表現的較為明顯，因此在此分相系統中絕大多數都採用多價陰離子，如磷酸鹽，硫酸鹽或碳酸鹽。而此系統在工業上應用較為廣泛，是因為鹽類成本低廉的關係[44; 45]，同時，在連續式的大規模生產，有些高分子像 Dextran，具高黏度的特性，便需要較高的壓力來輸送，造成程序控制的困難，因此高分子-高分子雙水相系統大多用於實驗室規模。

2-1-4 影響分配係數的因素

影響雙水相的變因有很多，例如：高分子的種類、高分子的分子量、高分子及鹽類的重量百分比濃度、環境中pH值、離子強度和溫度等。變因多是優點亦是缺點，當變因多則我們可以從多方面尋找最適當的萃取條件，可大幅提高產物的分離效果，但也由於變因太多以至於無法的得知哪項是主要因素，則須花費時間，改變每個因素，才能找出最適當的系統。

1.不同系統組成對相圖的影響

在雙水相系統中，總濃度和分子量會決定節線的長度，Tie Line Length(TLL)，根據定義[46]：

$$TLL = (\Delta PEG^2 + \Delta Dx^2)^{0.5} \quad (2-8)$$

ΔPEG 為上下層PEG的濃度差，而 ΔDx 為上下層Dextran的濃度差，則加入的濃度不一樣TLL長度也不一樣，而高分子分子量也會影響TLL，當高分子分子量越大，彼此排斥力也越大，分相所需濃度越低，雙節曲線（binodal curve）會向兩座標軸飄移；因此當分子量高時，則可以減少加入高分子的濃度，即可分成兩相，在同一個相組成百分比下，高分子分子量越大，TLL也越大[47]。TLL 越大，兩相間斥力越大，表面張力也隨之增加，使得蛋白質分子在相間的移動更為困難，對於生物大分子萃取會有不利的影響。

2.pH值的影響

當萃取物會因環境中酸鹼性不同而帶正負電(例如:蛋白質)，則我們就可以改變環境的pH值，而得到高的萃取效果。

3. 鹽類添加的影響

不同種類和濃度的鹽類會影響萃取物在兩相中的分佈。舉例來說在PEG-K₂HPO₄的系統，磷酸根離子並非是均勻的分佈於上下層，而是傾向於分佈至下層相中，當加入鹽類濃度不同，則上下層的電位差也有所差異，因此對萃取物的分配效率有很大的影響。

4. 溫度的影響

溫度的影響較複雜，相關的研究文獻是相對較少。主要是會影響到溶液的性質，例如密度與黏度，以及高分子疏水作用力的改變，造成相圖中binodal curve的飄移。通常在低溫下，有利於雙水相系統的分層，但在某些例子會有特例。舉例來說，PEG-Dextran雙水相系統須在低溫下(0°C~5°C)才易分層，而PEG-K₂HPO₄雙水相系統，在室溫下就可分層。

5. 高分子的種類的影響

不同高分子種類，導致雙水相環境(例如:黏度、介面張力不同)對於萃取物的作用力也跟著不同[48; 49]，常用的高分子種類為PEG-Dextran雙水相系統，但近期也有其他高分子種類被研究[50-52]。

2-1-5 雙水相系統萃取奈米粒子

早期雙水相系統發展研究主要是分離蛋白質、細胞及生物分子等等。近期有 Keating 博士等人，開始探討雙水相系統與奈米粒子彼此之間的作用力[53; 54]，作者發現到在同樣雙水相系統下，不同大小尺寸的金奈米粒子，在兩相中會有不一樣的分佈。在作者選用的PEG-Dextran 雙水相系統中，小顆粒的金奈米粒子會傾向分佈於上層

相中，當加入之金奈米粒子顆粒越大，粒子重力大過界面張力，則大顆粒的金奈米粒子，就會傾向分佈在下層相中，接著作者把奈米粒子與 DNA 鍵結，試圖讓有鍵結奈米粒子之 DNA，可以在雙水相中有更好的萃取率。

本研究是利用，銀奈米粒子表面有修飾上 MUA 長碳鏈分子，在雙水相系統中 MUA 會與上層相的 PEG(含多碳的高分子聚合物)作疏水性作用力(hydrophobic interaction)，大顆粒的銀奈米粒子，表面所修飾上的 MUA 也越多，則會傾向分佈在上層相中，藉由銀奈米粒子，其大小顆粒在兩相的分佈不同，則可以利用批式萃取法而分離之。

2-2CPC 儀器原理

CPC(Centrifugal Partition Chromatography)，是一種液相層析技術，隸屬於逆流層析，因為他的靜相填充物為液體，此種分離方法可視為連續性的批式萃取[55]。

而 CPC 主要是利用離心力場，使靜相液體滯留在管柱中，圖 2-2 是 CPC 儀器的示意圖。目前新型的 CPC 利用離心場可以使靜相滯留物高達到 50~80 百分比，混合區域變大，便可大幅提高分離效率，並且可以使用黏度高的雙水相系統。使用 CPC 儀要注意到，我們的樣品在動靜相中的理想分佈係數(K 值)在 0.5 到 2 之間，如果 K 值太大，則樣品在管柱中的滯留時間就會拉長；若 K 值太小，則樣品容易隨著動相被沖提出管外，K 值太大或太小會降低分離效率。

當我們奈米粒子在雙水相系統中，有不同尺寸上的分佈，除了可以批式萃取分離不同尺寸的奈米粒子，進一步可以把雙水相系統的

上下層相，當成 CPC 的動靜相，使用 CPC 層析儀，可以對更大量的樣品進行分離。

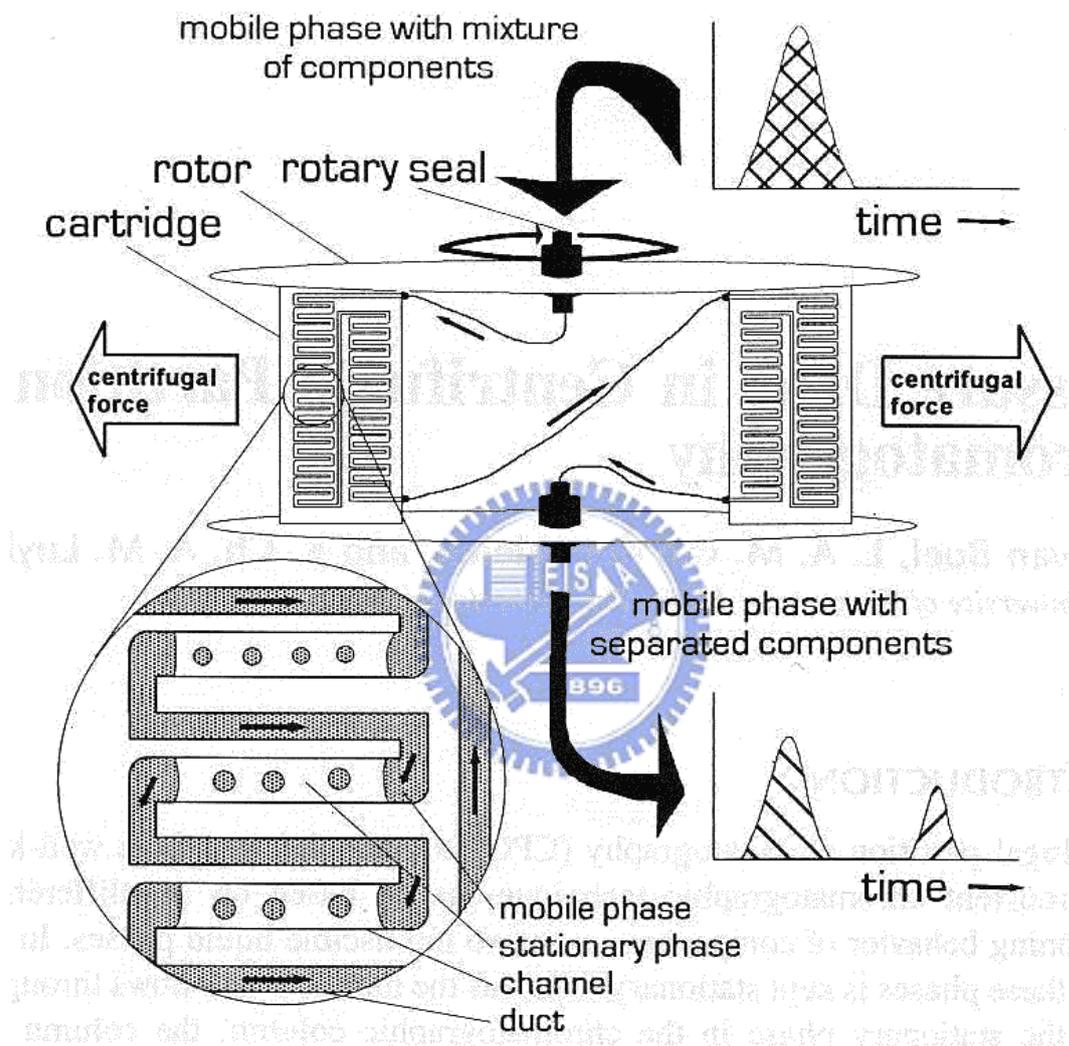


圖2-2 CPC儀器示意圖

第三章 雙水相萃取實驗

3-1 實驗藥品

(1) Silver nitrate , AgNO_3 , M.W. 169.87 , 99.8 % , GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

(2) Sodium borohydride , NaBH_4 , M.W. 37.83 , 98 % , GR grade (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA)

(3) 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) , M.W. 218.36 , 95% , GR grade (Aldrich, St. Louis, MO, USA)

(4) Dipotassium phosphate , K_2HPO_4 , M.W. 174.18 , 99% , GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

(5) Polyethylene glycol , M.W. 8000 , GR grade (Sigma, St. Louis, MO, USA)

(6) Polyethylene glycol , M.W. 6000 & 4000 , GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

(7) N-[3-(trimethoxy silyl)propyl]-ethylenediamine , M.W. 222.36 , 97% , GR grade (Aldrich, St. Louis, MO, USA)

(8) Urea , M.W. 60.06 , 99.7% , ACS grade (J. T. Baker, San Francisco, CA, USA)

(9) Tri(hydroxymethyl)-aminomethane , M.W. 121.14 , 99.96% , ACS grade (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

(10) Colloidal Graphite , GR grade (TED PELLA. INC., San Francisco, CA, USA)

(11) Hydrochloric acid , HCl , M.W. 36.45 , 35.0~37.0% , GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

- (12) Trisodium citrate dihydrate, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$, M.W. 294.1
， ACS grade (Showa, Tokyo, Japan)
- (13) 16-Mercap-decanoic acid (MUA), M.W. 288.5, 95%, GR
grade (Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- (14) Ficoll[®] 400, M.W. 400000, GR grade (Sigma, St. Louis, MO, USA)

3-2 實驗儀器

- (1) 紫外光-可見光譜儀 (UV-Visible Spectrophotometer)

Hewlett Packard 8453, (Waldronn, Germany)

- (2) 酸鹼度計 (pH meter)

型號為 Microprocessor pH meter SP-2200, 購自上泰 (Suntex) 儀器股份有限公司, 其電極是使用 Mettler Toledo InLab[®] 422

- (3) 離心機 (Centrifuges)

(a) 型號為 EBA20 (Hettich, Germany)

最大轉速 6000 rpm, 最大離心力為 3421 g

(b) 型號為 Z323K (Hermle, Germany)

最大轉速 17000 rpm, 最大離心力為 27000

- (4) 掃描式電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscopy)

型號為 JEOL JSM-7401F, 由 JEOL 公司製造 (Tokyo, Japan)

- (5) 能量散佈光譜分析儀 (Energy Dispersive Spectrometer)

型號為 EDS7585, 由 Oxford 公司製造 (England)

3-3 實驗方法

3-3-1 銀奈米粒子的合成方法

取 100 ml 的反應瓶，先配好 20 mM，25 ml 的 NaBH_4 溶液(19 mg NaBH_4 加到 25 ml 去離子水中)再加入 27 mg 的 MUA(MUA 和 AgNO_3 莫耳濃度比例為 1:1)，劇烈攪拌至 MUA 完全溶解後，在劇烈攪拌的情況下以滴加方式加入 5 mM，25 ml 的 AgNO_3 溶液(先配製 0.1 M 的 AgNO_3 再稀釋至 5 mM)，滴加時間約為十分鐘，剛開始滴入數滴 AgNO_3 溶液時，溶液顏色會由無色轉變為棕色，加入的 AgNO_3 溶液越多，最後整個溶液呈現為棕黑色，攪拌 24 小時，停止反應[56]。MUA 在此是當修飾劑，還原出的銀奈米粒子會和 MUA 分子上的硫原子鍵結，銀奈米粒子表面修飾上 MUA 分子，可防止銀奈米粒子自身聚集。

濃縮銀奈米粒子，取 1 M 的 HCl 加到剛合成好的銀奈米粒子溶液當中，直到溶液 pH 值成為 4.5，離心(離心轉速 6000 rpm，離心時間為 5 分鐘)，取出沉澱的銀奈米粒子(把雜質溶液去除)，再加入 pH8，12.5 ml 的緩衝溶液(Tris(hydroxymethyl)-aminomethane 0.1M HCl 所配製的 buffer，50 mM)，濃縮後之銀奈米粒子，在緩衝溶液中的濃度約為 0.127%(w/w)，濃縮後的濃度，參考類似文獻[54]。本實驗所使用的 PEG- K_2HPO_4 的雙水相系統，溶液 pH 值在 8~10 之間，在鹼性的環境下，銀奈米粒子表面修飾上的 MUA 分子易解離，使銀奈米粒子更易溶於水中[57; 58]。

3-3-2 配製不同雙水相系統及雙水相系統之比例

一開始曾嘗試使用 PEG-Ficoll、PEG-Dextran 及 PEG-Dxtrin 的雙水相系統。

1.PEG-Ficoll 雙水相系統:

平衡所需時間長，分層時間約 30 分鐘。由於未來希望把雙水相系統應用在 CPC 儀，進行分離，動靜相的平衡時間需快速，所以此系統不是我們理想的系統。

2.PEG-Dextran 雙水相系統:

須在低溫下(0~5°C)才會分層，此系統要控制溫度，由於 CPC 儀，沒有恆溫裝置，所以此系統也不是理想的系統。

3.PEG-Dextrin 雙水相系統:

Dextrin 藥品低廉，但是銀奈米粒子在兩相中沒有分佈，絕大部分的銀奈米粒子都分佈在上層相中，因此此系統也不適用。

最後所選用 PEG-K₂HPO₄ 雙水相系統，此系統在室溫下即可分層，分層速度快，並且銀奈米粒子在兩相中也有理想的分佈 (K=0.5~2)。接著改變 PEG- K₂HPO₄ 的重量百分比比例，首先觀察 PEG- K₂HPO₄ 雙水相系統的相圖，從最接近臨界點的區塊先取點，主要原因是希望，在配製雙水相系統時，所加入高分子或鹽類重量百分比的量，以少量為主(希望降低系統環境的黏稠度)，接著在相圖上有規律的選取 9 個點，配製 9 個不同重量百分比的雙水相系統，並觀察銀奈米粒子在兩相中分佈的情況，圖 3-3。

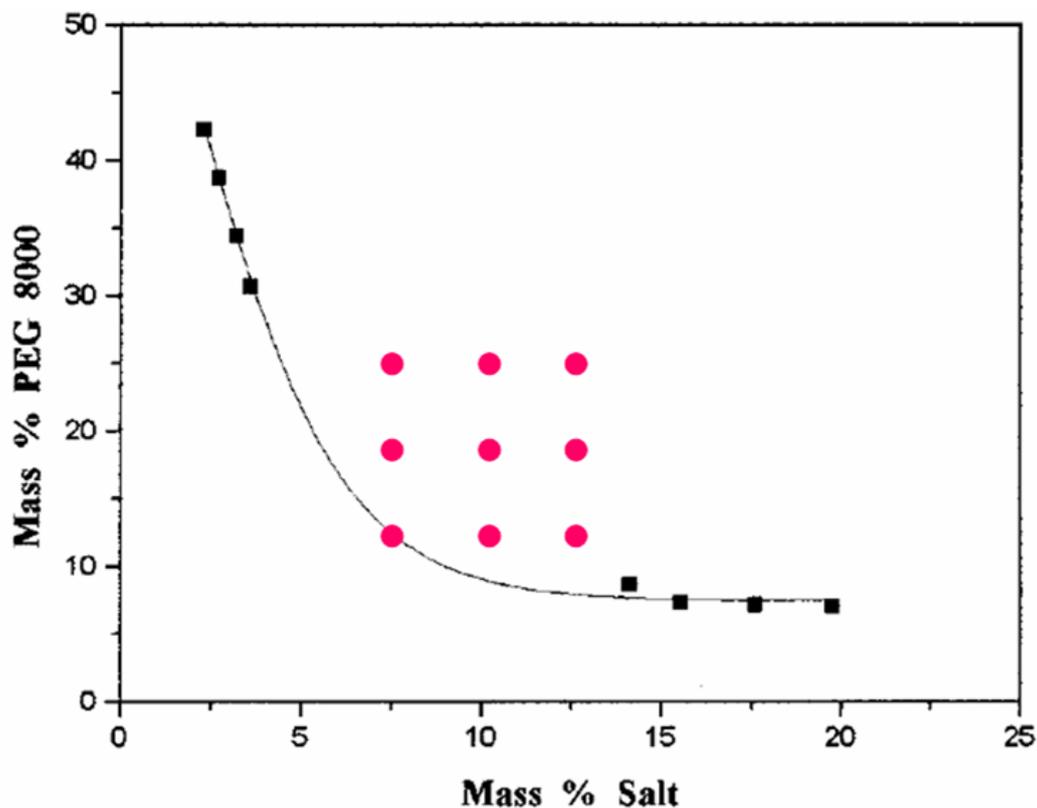


圖3-3利用相圖規律選取9個點

在雙水相相圖中先選取九個點，並觀察銀奈米粒子系統中的分佈情形

3-3-3 雙水相的製備

我們先配製一瓶 40%(w/w) PEG 水溶液，和一瓶 40%(w/w) K_2HPO_4 水溶液，兩者依不同比例混合，即可配製出不同比例的雙水相系統。

本研究是使用高分子-鹽類的雙水相系統，高分子是使用 PEG，鹽類是使用 K_2HPO_4 ，探討系統的變因主要是 PEG 分子量、改變 PEG 及 K_2HPO_4 不同的重量百分比濃度，以及添加尿素分子(Urea)所帶來之影響。我們先觀察三種不同分子量的雙水相系統，分子量分別為

4000、6000 和 8000，接著再改變 PEG 和 K_2HPO_4 重量百分比濃度的比例，最後再添加尿素分子(Urea)。雙水相系統配製，是先在相圖上有規律的選取 9 個點，配製出 9 個不同重量百分比濃度雙水相系統。

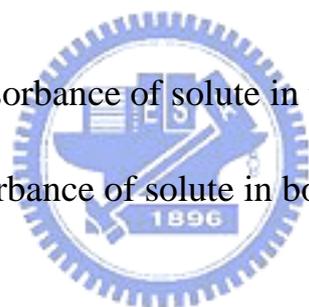
3-3-4 偵測銀奈米粒子在雙水相系統中的分佈

在實驗過程中，銀奈米粒子在上層相以及下層相吸收光譜在最大値之比，此值大體上可視為銀奈米粒子在兩相之分佈，以 K_c 來代表

$$K_c = \frac{A_t}{A_b} \quad (3-1)$$

A_t : absorbance of solute in top phase

A_b : absorbance of solute in bottom phase



將所配製 10 ml 的雙水相系統，加入 0.1 ml，0.127%(w/w)的銀奈米粒子溶液，待至平衡後，上、下層相各取一毫升，並加入去離子水兩毫升(稀釋溶液)，分別測 UV-Vis 光譜儀，得到的表面電漿光譜訊號(約 420 nm)，見圖 3-4，取其最大吸收度之比例，可視為奈米粒子在兩相中的分佈(K_c)。

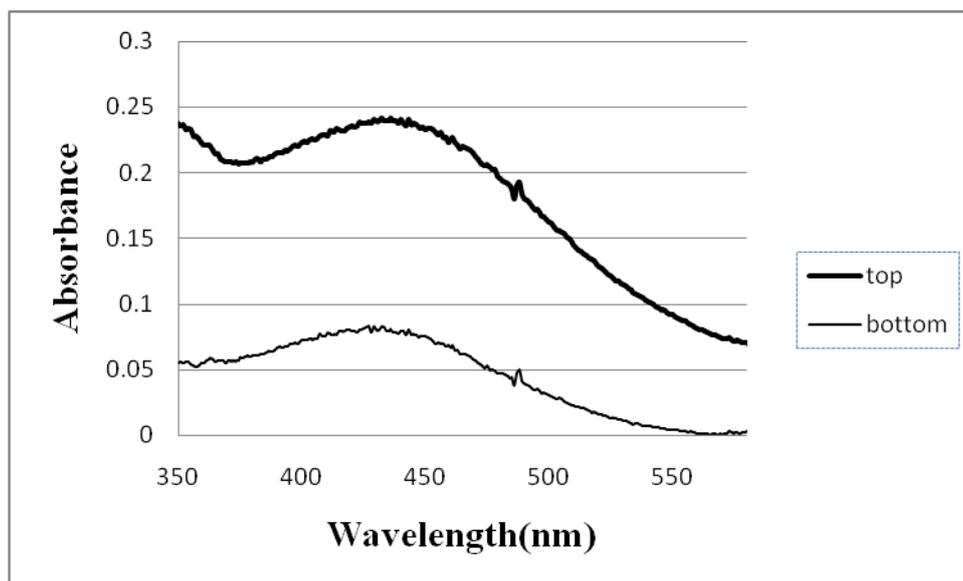


圖3-4銀奈米粒子在雙水相系統中光譜訊號

ATPS: PEG 6000(10%) K_2HPO_4 (12%)，粗線為上層相吸收光譜之訊號，最大吸收度為 0.241；細線為下層相吸收光譜之訊號，最大吸收度為 0.0828，上、下層相最大吸收度之比值即為 $K_c(0.29)$ 。

3-3-5 銀奈米粒子測 SEM 的前置工作

待測物溶液中含有 PEG 和鹽類雜質，使 SEM 偵測不易，所以先用高速離心方法把大部分雜質洗掉，高速離心(轉速 15000 rpm，離心時間為 15 min)，用 pH 11 緩衝溶液清洗兩遍。接著在矽晶片(SiO_2 wafer)修飾上 N-[3-(trimethoxy silyl)propyl]-ethylenediamine 使矽晶片帶正電 [59]，把修飾表面帶正電的矽晶片浸泡到待測物溶液裡，浸泡 24 小時，由於待測物是帶負電的銀奈米粒子，會因正負電吸引力，鍵結到矽晶片表面，取出矽晶片以去離子水把表面清洗乾淨後，黏到圓盤(holder)上。可以在矽晶片旁塗上碳液(Colloidal Graphite)，增加導電度，使 SEM 更易偵測出樣品。

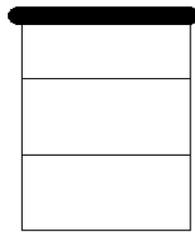
3-3-6 雙水相系統批式萃取實驗

經過最佳化的實驗，選用合適的雙水相系統，連續進行三次萃取並觀察不同大小顆粒的銀奈米粒子在兩相中的分佈程度。

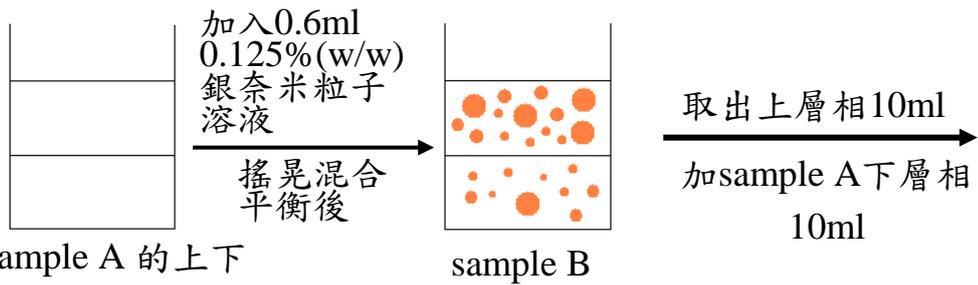
配製一瓶雙水相系統(總重為 100 g)，裝到容量為 100 ml 的 A 樣品瓶中，從 A 樣品瓶的上下層相各取 14 ml 裝到容量為 50 ml 的 B 樣品瓶裡，加入 0.6 ml 的銀奈米粒子溶液，平衡後從 B 樣品瓶取上層相 10 ml，以及 A 樣品瓶下層相水溶液 10 ml，一起加到容量為 20 ml 的 C 樣品瓶裡，混合再次平衡後，取 C 樣品瓶上層相 6 ml，和 A 樣品瓶下層相 6 ml，一起加到容量為 20 ml 的 D 樣品瓶裡，再次混合平衡，圖 3-5 為實驗步驟示意圖。最後把樣品瓶 B、C、D 的上、下層相，以 SEM 測量，觀察其大小顆粒的分佈。



實驗步驟：



先配製一大瓶雙水相系統(總重 100 克)
為 fresh sample A



從 sample A 的上下
層相，各取出 14ml

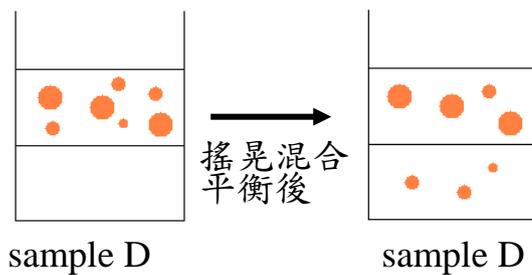
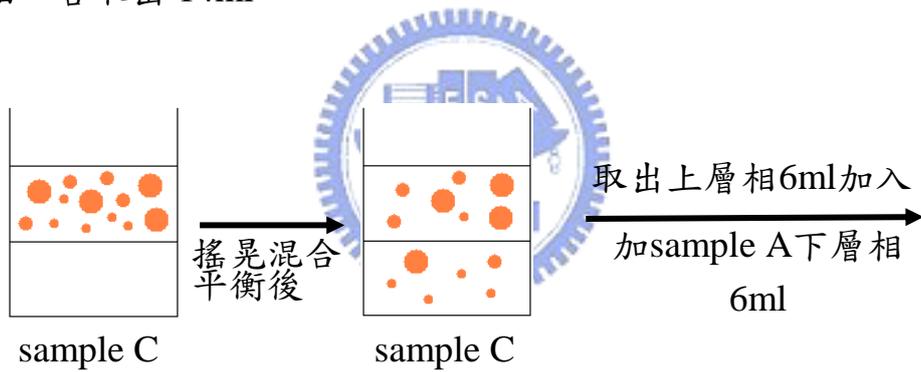


圖3-5銀奈米粒子萃取三次之實驗步驟示意圖

3-3-7 表面修飾不同分子奈米粒子之合成

(a)合成表面修飾檸檬酸的銀奈米粒子

配製一瓶 AgNO_3 溶液(0.25 mM, 200 ml)加入 trisodium citrate(0.25 mM)，再配製新鮮的 NaBH_4 (6 ml, 10 mM)，然後把 NaBH_4 溶液滴入 AgNO_3 溶液中，攪拌 30 分鐘，靜置一天。

(b)合成表面修飾檸檬酸的金奈米粒子[59]

配製 HAuCl_4 (10 ppm, 50 ml)溶液，加熱至沸騰 3 分鐘後，加入 1 ml tri-sodium citrate-2-hydrate 溶液(1%)，此時溶液會變色，繼續沸騰 5 分鐘，靜置至室溫。

(c)表面修飾微量 MUA 銀奈米粒子之合成

取 100 ml 的反應瓶，先配製好 NaBH_4 (2 mM, 25 ml)溶液，並加入 1.7 mg 的 MUA(MUA 和 AgNO_3 莫耳濃度比例為 1:16)，劇烈攪拌至 MUA 完全溶解後，在劇烈攪拌的情況下以滴加方式加入 AgNO_3 (5 mM, 25 ml)溶液，滴加時間約為十分鐘，持續攪拌 24 小時後，停止反應。剛開始滴入數滴 AgNO_3 時，溶液顏色會由無色轉變為棕色，加入的 AgNO_3 越多，最後整個溶液呈現為棕黑色。

(d)合成表面有 MHA 修飾的銀奈米粒子

取 100 ml 的反應瓶，先配好 20 mM, 25 ml 的 NaBH_4 (19 mg NaBH_4 加到 25 ml 去離子水中)溶液再加入 36 mg 的 MUA(MHA 和 AgNO_3 莫耳濃度比例為 1:1)，劇烈攪拌至 MHA 完全溶解，之後在劇烈攪拌的情況下以滴加方式加入 5 mM, 25 ml 的 AgNO_3 溶液，滴加時間約

為十分鐘，持續攪拌 24 小時後，停止反應。滴入數滴 AgNO_3 時，溶液顏色會由無色轉變為棕色，加入的 AgNO_3 越多，最後整個溶液呈現為棕黑色。



第四章 實驗結果與討論

圖 4-1 是以 SEM 儀偵測表面修飾 MUA 銀奈米粒子之照片，圖 4-2 是 EDS 儀偵測表面修飾 MUA 銀奈米粒子之結果，圖 4-3 為 SEM 儀偵測表面修飾 MHA 之照片，由照片結果得知，使用化學氧化還原法，所合成出的銀奈米粒子，其顆粒大小是不均勻。接著改變不同雙水相系統，找出顆粒不均勻之銀奈米粒子，在雙水相系統中，有理想分佈係數，再以批式萃取法分離之。

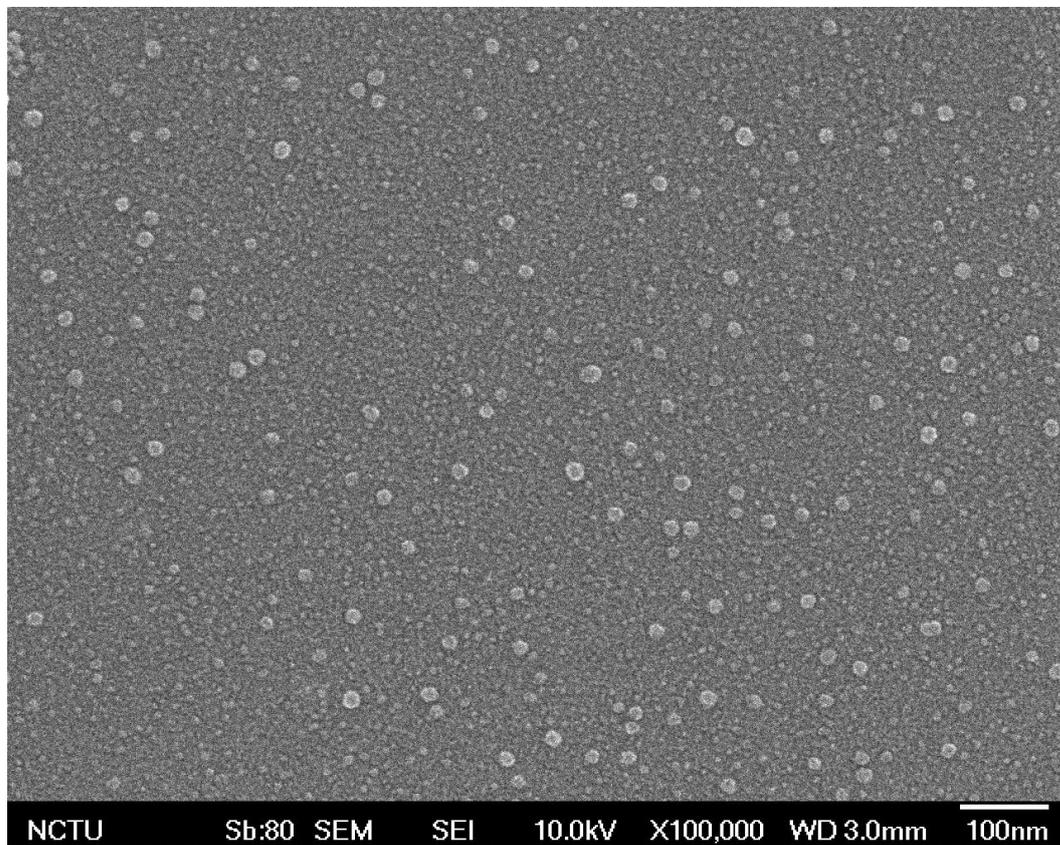


圖4-1以SEM偵測，表面修飾MUA銀奈米粒子之照片
顆粒平均大小為 11.3 ± 4.1 nm

Element	Weight%	Atomic%
S	4.75	14.35
Ag	95.25	85.65
Totals	100	100

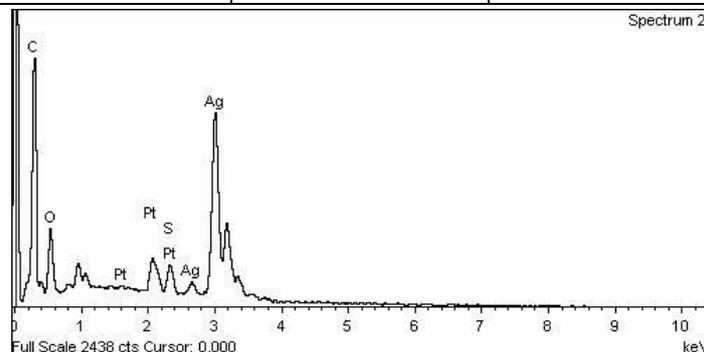


圖4-2以EDS偵測，表面修飾MUA銀奈米粒子所含之元素
偵測樣品含有 Ag 和 S 元素，可代表 MUA 分子有鍵結在銀奈米粒子
表面

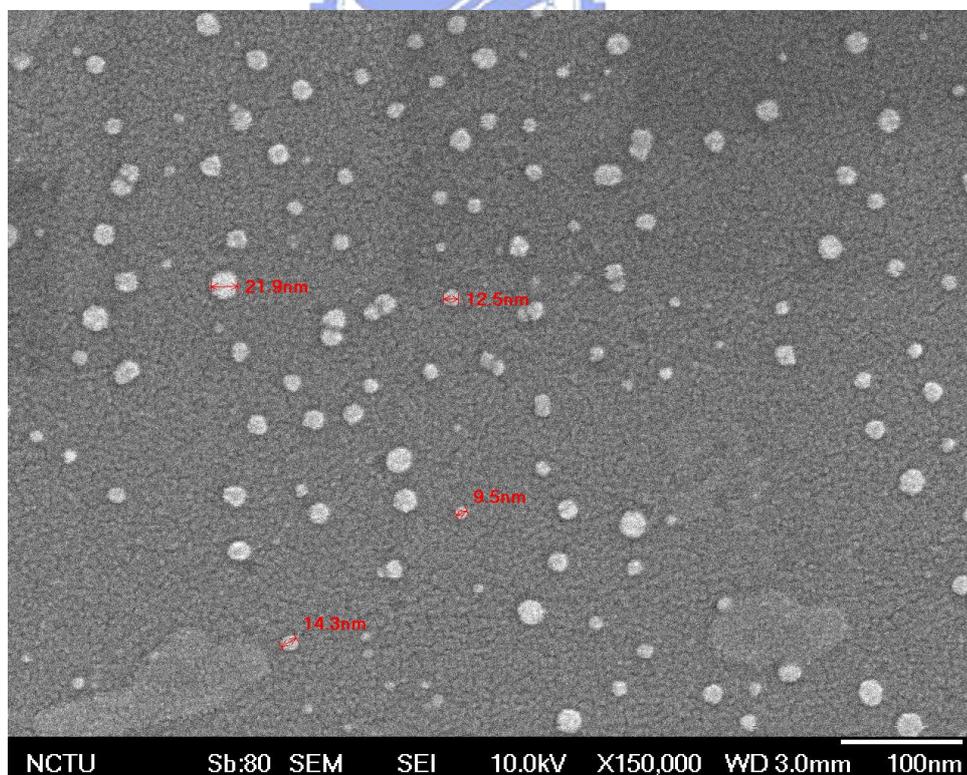


圖4-3以SEM偵測，表面修飾MHA銀奈米粒子之照片
顆粒平均大小為 $12.9 \pm 3.4\text{nm}$

4-1 觀察不同分子量的雙水相系統

首先觀察 PEG 8000 系列雙水相系統，由 UV-Vis 光譜儀可測得 Kc 值，紀錄在表 4-1 和 4-2，與 PEG 6000 及 PEG 4000 系列的雙水相系統作比較，銀奈米粒子在 PEG 8000 雙水相系統 K 值(0.5~3.42)偏高。圖 4-4-a~4-4-h 為 SEM 所觀察到的結果，可看出銀奈米粒子在此系統中容易聚集，並且會有一些不規則形狀 PEG 分子出現。主要因為 PEG 分子量越高，黏稠性越高，即使高速離心也比較不容易把 PEG 高分子與奈米粒子給分離開來。

表4-1 ATPS: PEG 8000 +K₂HPO₄+DI water配製比例及K值

單位:重量百分比

N.O.	PEG 8000(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	DI water(%)	Kc
141	10	8	82	0.44
142	10	10	80	1.58
143	10	12	78	3.77
144	15	8	77	0.72
145	15	10	75	2.08
146	15	12	73	4.71
147	20	8	72	1.12
148	20	10	70	2.29
149	20	12	68	3.42

PEG 8000 = polyethylene glycol (M.W. 8000)

Kc: 銀奈米粒子在雙水相系統中的分佈

N.O.: 雙水相系統編號

表4-2 APTS: PEG 8000 +K₂HPO₄+Urea+DI water配製比例及Kc值

單位:重量百分比

N.O.	PEG 8000(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Urea(%)	DI water(%)	Kc
151	10	8	6	76	0.18
152	10	10	6	74	1.87
153	10	12	6	72	3.4
154	15	8	6	71	0.96
155	15	10	6	69	2.64
156	15	12	6	67	3.6
157	20	8	6	66	1.82
158	20	10	6	64	2.71
159	20	12	6	62	3.19

PEG 8000 = polyethylene glycol (M.W. 8000)

Kc: 銀奈米粒子在雙水相系統中的分佈

N.O.: 雙水相系統編號

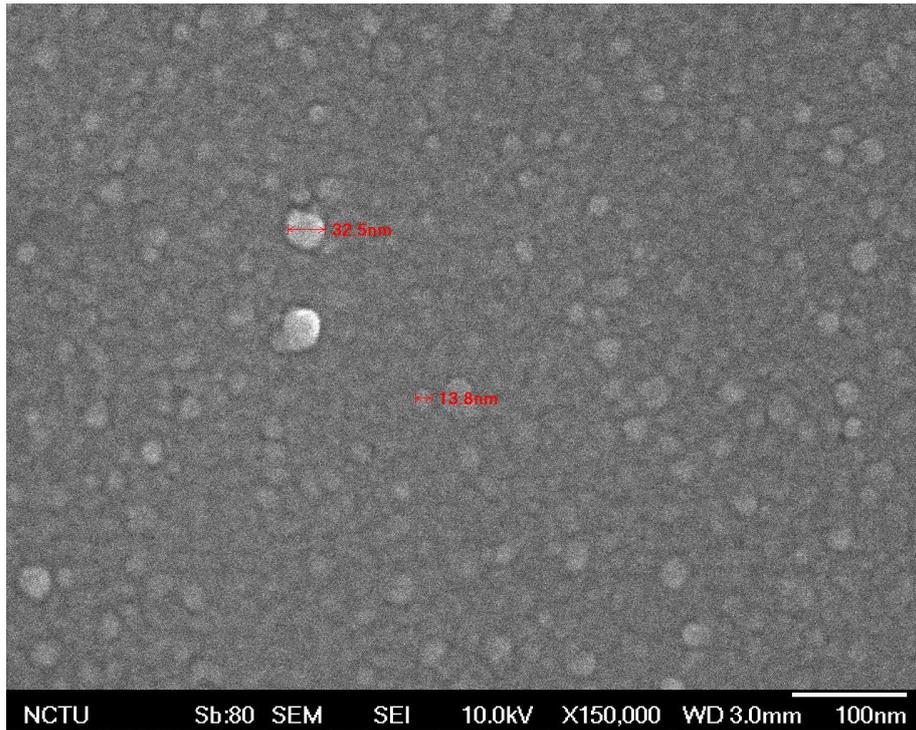


圖4-4-a銀奈米粒子在N.O.143上層相 SEM圖片

N.O.143 ATPS: PEG 8000(10%) K_2HPO_4 (12%) DI water(78%)

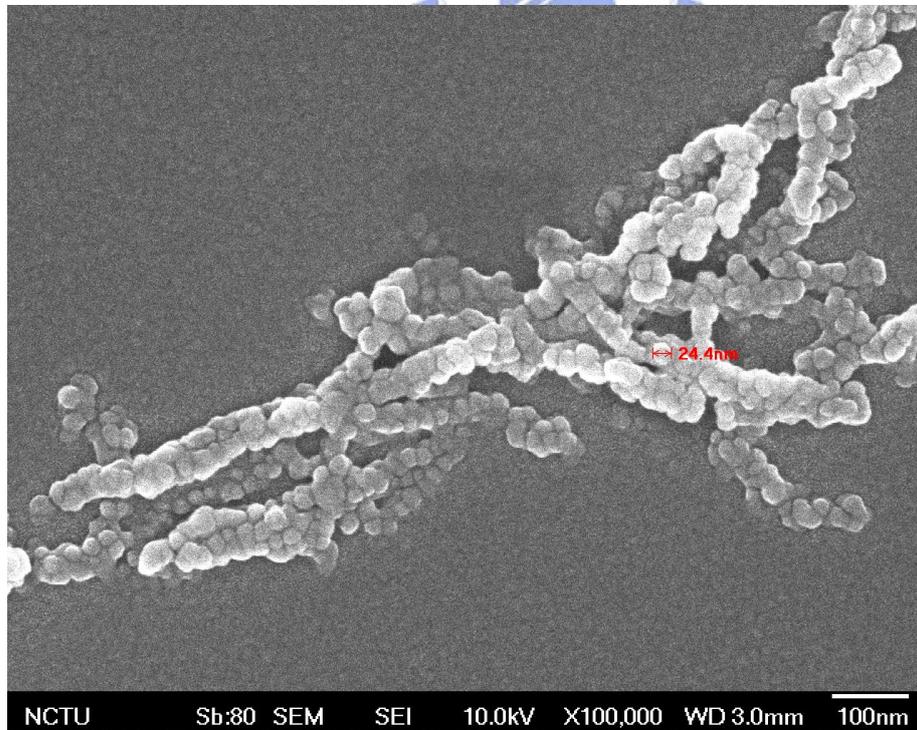


圖4-4-b銀奈米粒子在N.O.143下層相 SEM圖片

N.O.143 ATPS: PEG 8000(10%) K_2HPO_4 (12%) DI water(78%)

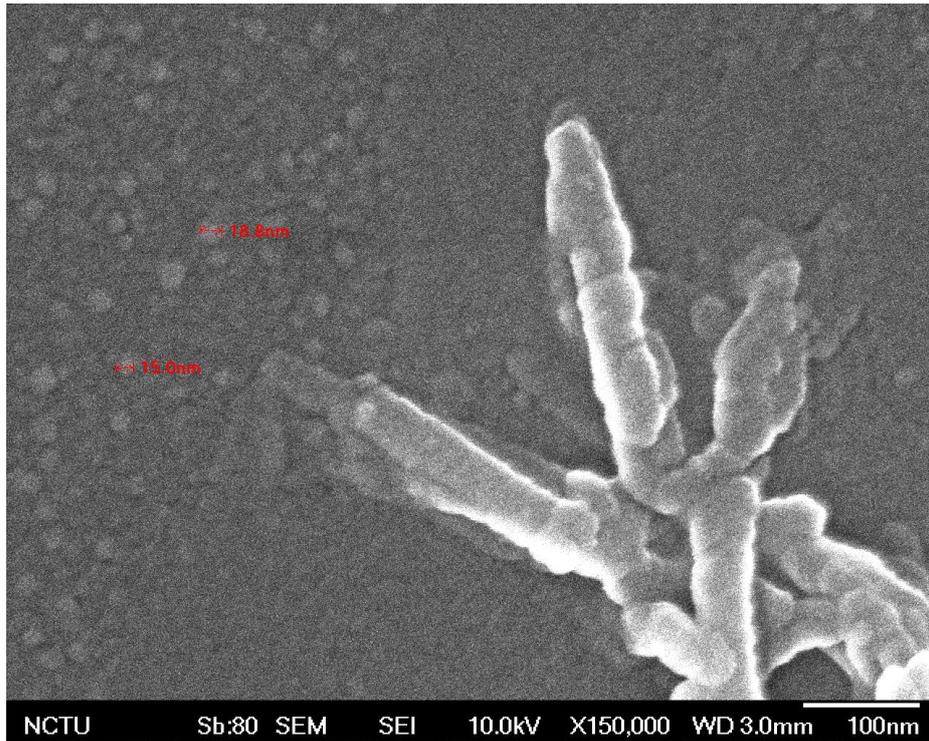


圖4-4-c銀奈米粒子在N.O.149上層相 SEM圖片

N.O.149 ATPS : PEG 8000(20%) K_2HPO_4 (12%) DI water(68%)

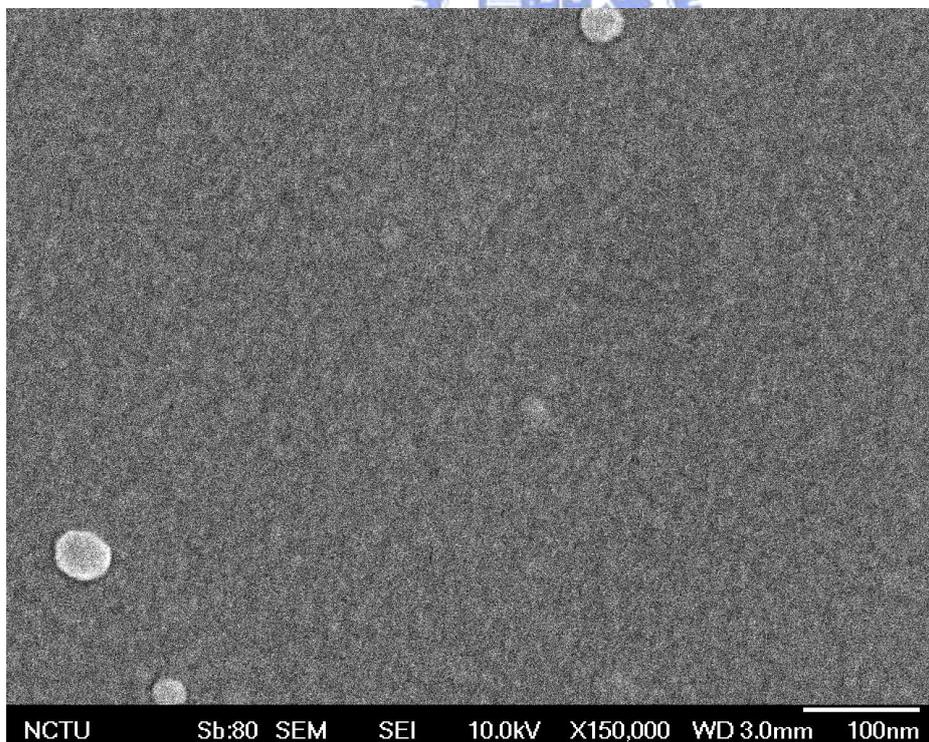


圖4-4-d銀奈米粒子在N.O.149下層相 SEM圖片

N.O.149 ATPS : PEG 8000(20%) K_2HPO_4 (12%) DI water(68%)

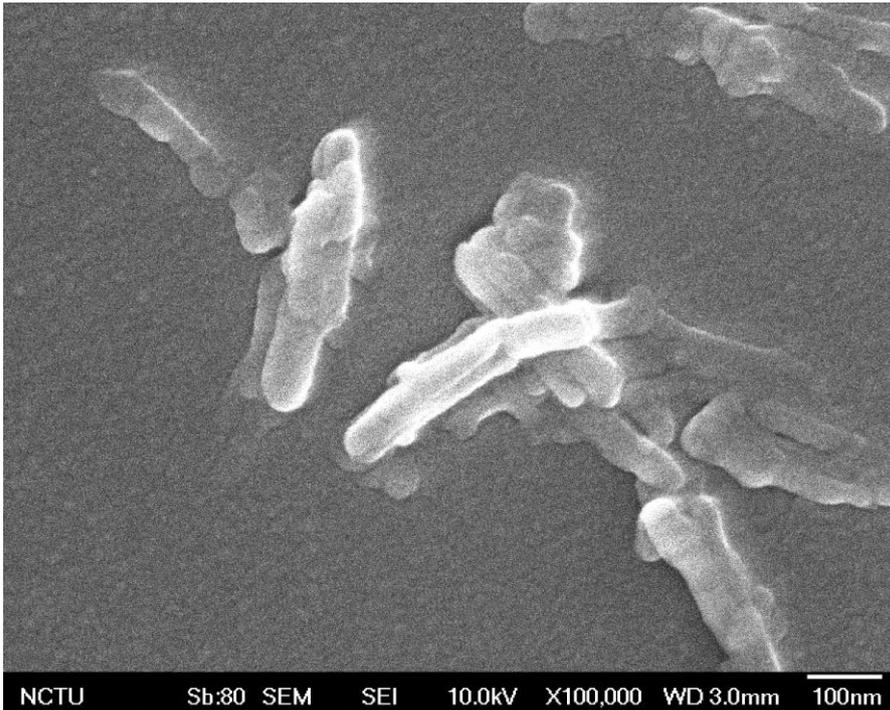


圖4-4-e銀奈米粒子在N.O.153上層相 SEM圖片

N.O.153 ATPS:PEG 8000(10%) K_2HPO_4 (12%) Urea(6%)
DI water(68%)

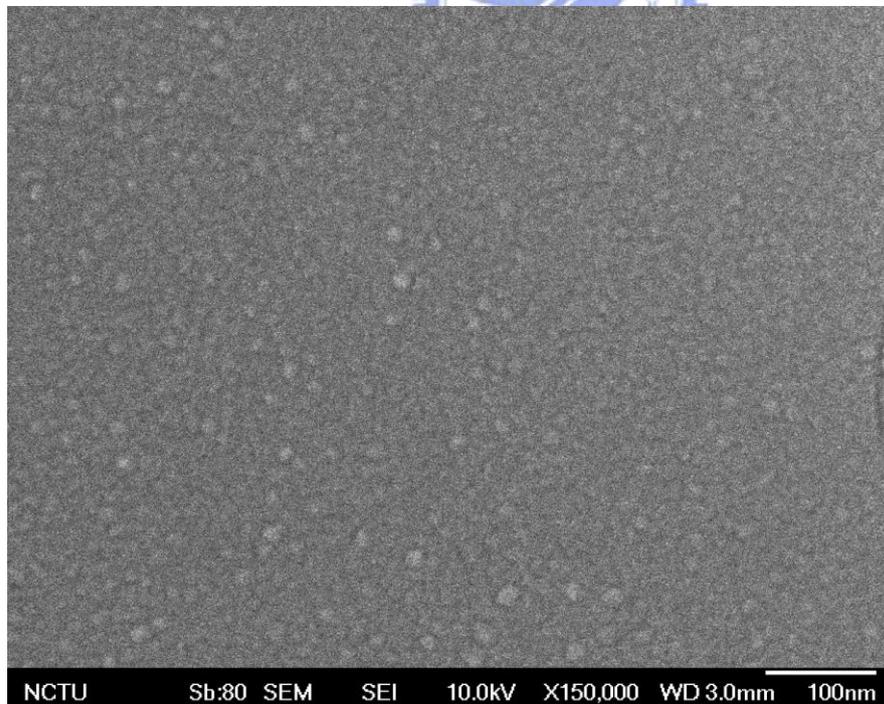


圖4-4-f銀奈米粒子在N.O.153下層相 SEM圖片

N.O.153 ATPS:PEG 8000(10%) K_2HPO_4 (12%) Urea(6%)
DI water(68%)

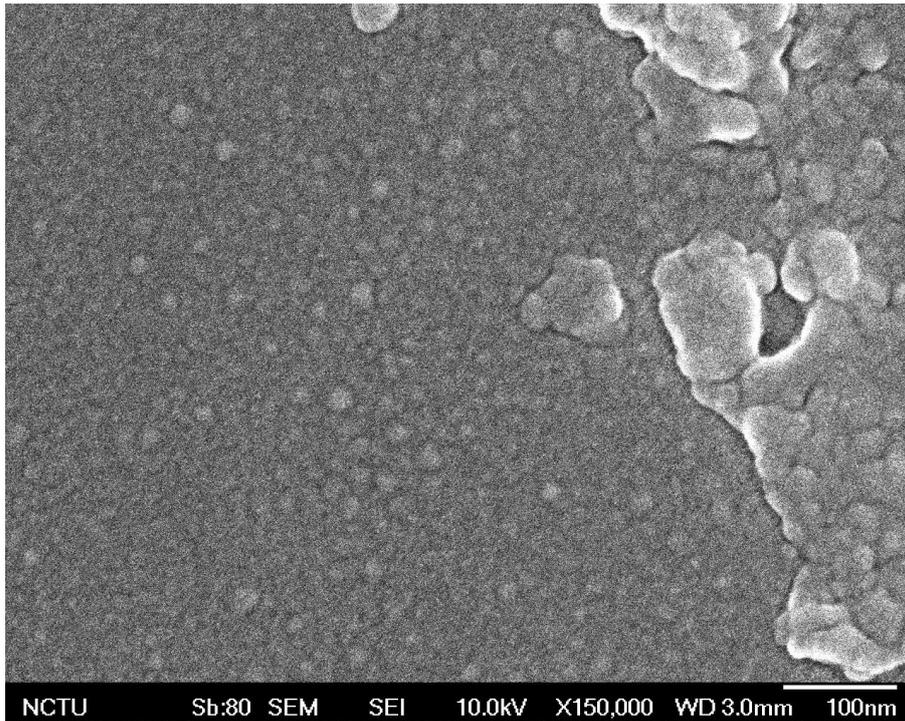


圖4-4-g銀奈米粒子在N.O.157上層相 SEM圖片

N.O.157 ATPS : PEG 8000(20%) K_2HPO_4 (8%) Urea(6%)
 DI water(66%)

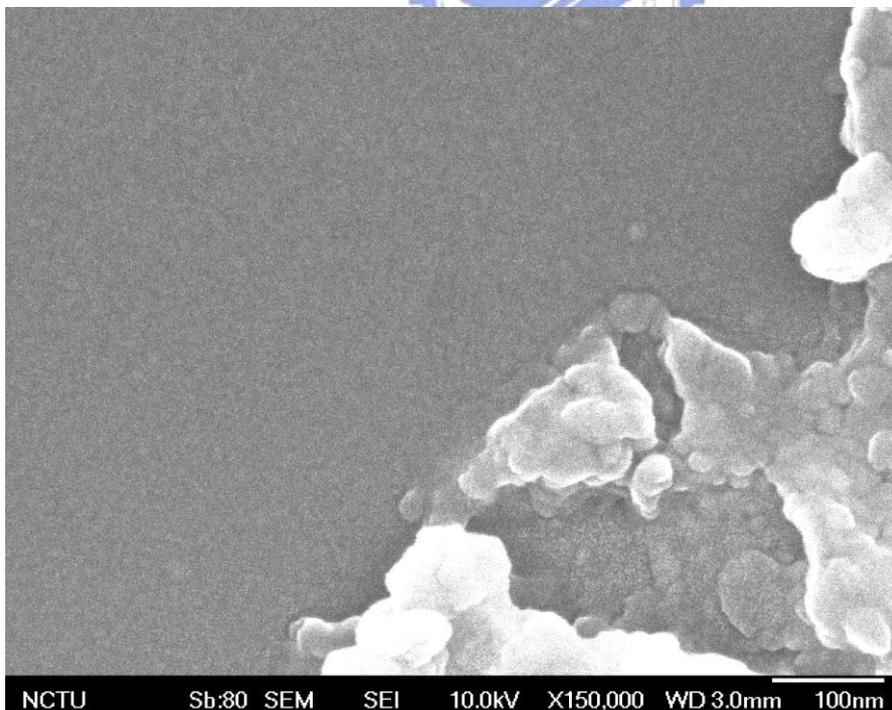


圖4-4-h銀奈米粒子在N.O.157下層相 SEM圖片

N.O.157 ATPS : PEG 8000(20%) K_2HPO_4 (8%) Urea(6%)
 DI water(66%)

接著觀察 PEG 6000 系列雙水相系統，由 UV-Vis 光譜儀可測得 Kc 值，紀錄在表 4-3 和表 4-4，銀奈米粒子在此系統中，Kc 值範圍約在 0.09~2.98，符合我們的理想 K 值(0.5~2)。在此所指的理想 K 值是指把此樣品拿到 CPC 儀器分離，希望樣品在動靜相中有理想的分佈，如果當 K 值太大，樣品滯留在管柱時間長，分離時間跟著拉長；若 K 值太小，則樣品會快速跟隨動相一起沖提出管柱，因此 K 值太大或太小，都無法達到好的分離效果。圖 4-5-a~4-5-h 為 SEM 所觀察到的結果，銀奈米粒子在此系統不易有聚集現象產生，並且大顆粒銀奈米粒子傾向於分佈於上層相，較小顆粒銀奈米粒子傾向分佈於下層相中，可以分離不同大小顆粒之粒子。

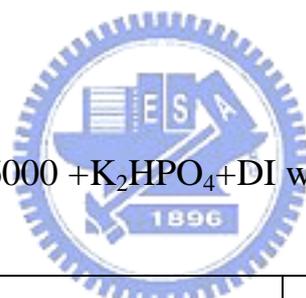


表4-3 ATPS: PEG 6000 +K₂HPO₄+DI water配製比例及Kc值

單位:重量百分比

N.O.	PEG 6000(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	DI water(%)	Kc
121	10	8	82	0.17
122	10	10	80	1.56
123	10	12	78	2.92
124	15	8	77	0.75
125	15	10	75	2.19
126	15	12	73	2.26
127	20	8	72	1.39
128	20	10	70	1.69
129	20	12	68	2.98

PEG 6000 = polyethylene glycol (M.W. 6000)

Kc: 銀奈米粒子在雙水相系統中的分佈

N.O.: 雙水相系統編號

表4-4 ATPS: PEG 6000 +K₂HPO₄+Urea+DI water配製比例及Kc值

單位:重量百分比

N.O.	PEG 6000(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Urea(%)	DI water(%)	Kc
111	10	8	6	76	0.09
112	10	10	6	74	1.35
113	10	12	6	72	2.22
114	15	8	6	71	0.76
115	15	10	6	69	1.51
116	15	12	6	67	1.94
117	20	8	6	66	1.04
118	20	10	6	64	1.8
119	20	12	6	62	1.18

PEG 6000 = polyethylene glycol (M.W. 6000)

Kc: 銀奈米粒子在雙水相系統中的分佈

N.O.: 雙水相系統編號

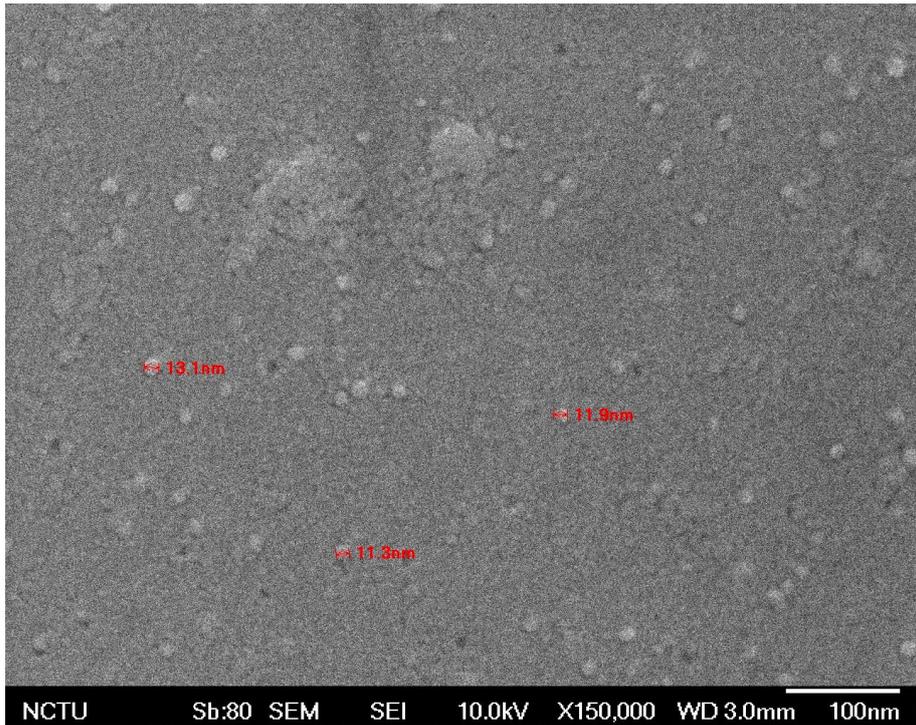


圖4-5-a銀奈米粒子在N.O.121上層相 SEM圖片

顆粒平均大小 12.2 ± 1.7 nm

N.O.121 ATPS: PEG 6000(10%) K_2HPO_4 (8%) DI water(82%)

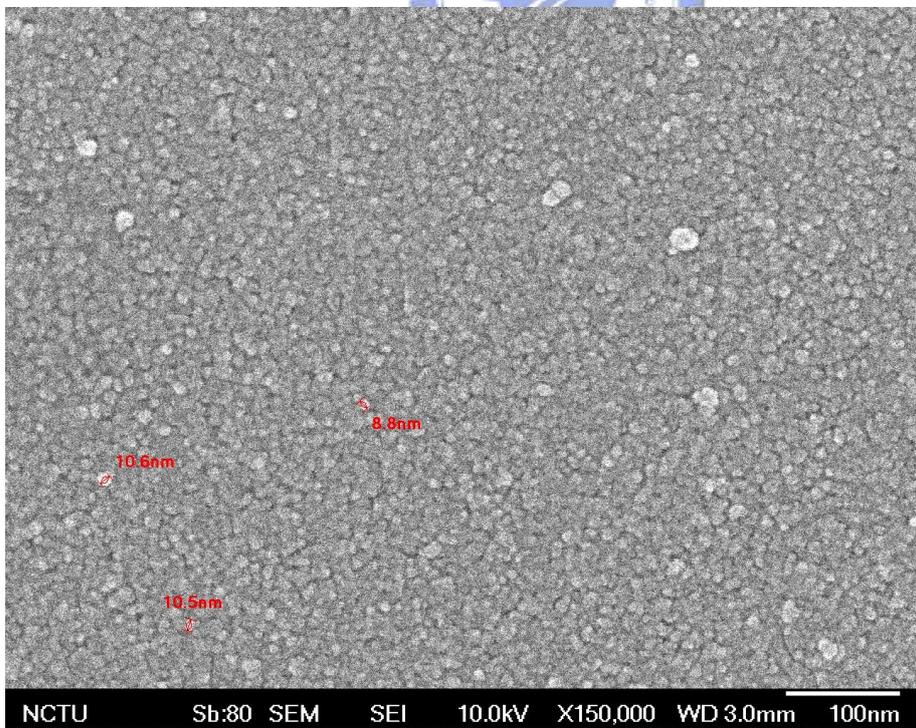


圖4-5-b銀奈米粒子在N.O.121下層相 SEM圖片

顆粒平均大小 8.3 ± 2.1 nm

N.O.121 ATPS: PEG 6000(10%) K_2HPO_4 (8%) DI water(82%)

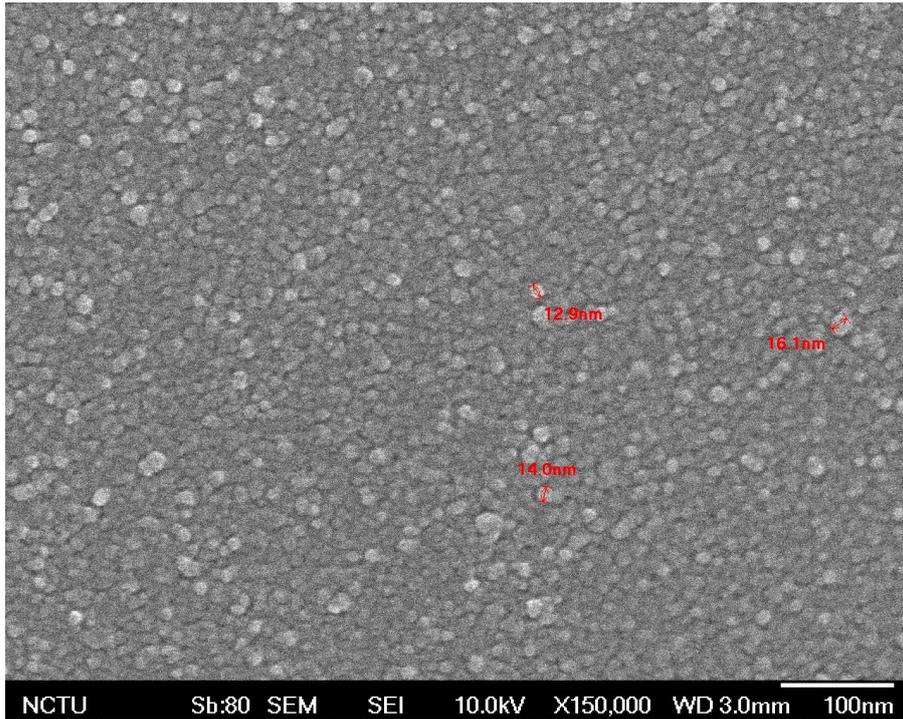


圖4-5-c銀奈米粒子在N.O.125上層相 SEM圖片

顆粒平均大小 $11.2 \pm 2.2 \text{ nm}$

N.O.125 ATPS: PEG 6000(15%) K_2HPO_4 (10%) DI water(75%)

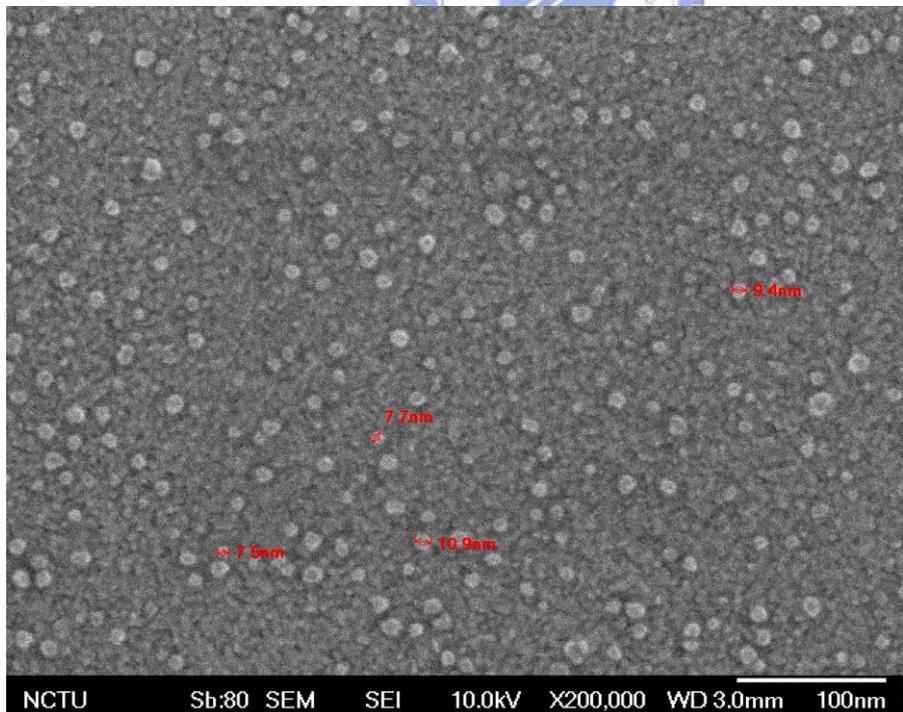


圖4-5-d銀奈米粒子在N.O.125下層相 SEM圖片

顆粒平均大小 $8.5 \pm 1.4 \text{ nm}$

N.O.125 ATPS: PEG 6000(15%) K_2HPO_4 (10%) DI water(75%)

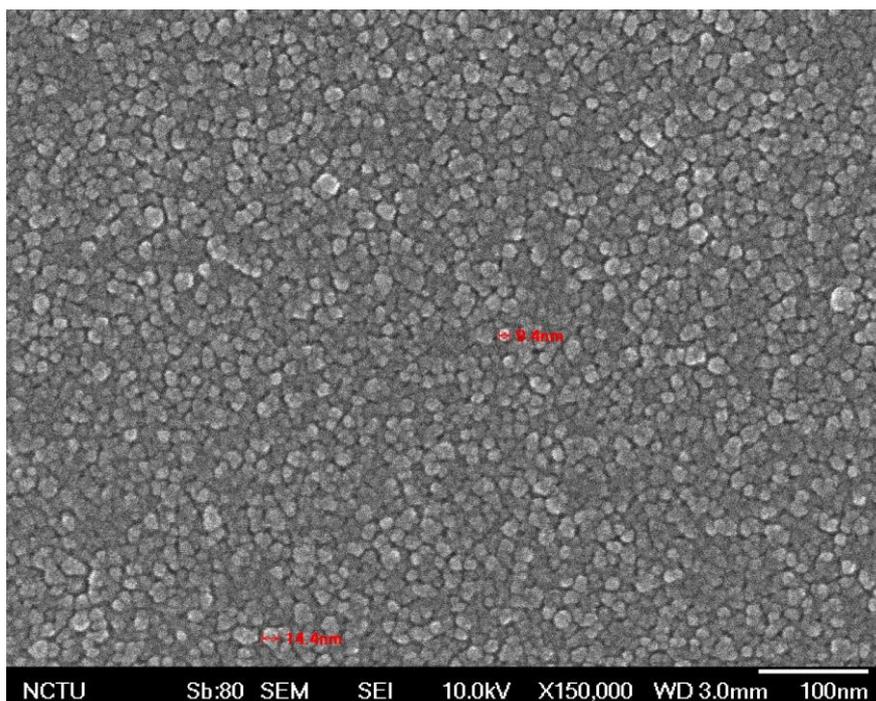


圖4-5-e銀奈米粒子在N.O.115上層相 SEM圖片

顆粒平均大小 11.5 ± 2.3 nm

N.O.115 ATPS: PEG 6000(15%) K_2HPO_4 (10%) Urea(6%)
 DI water(69%)

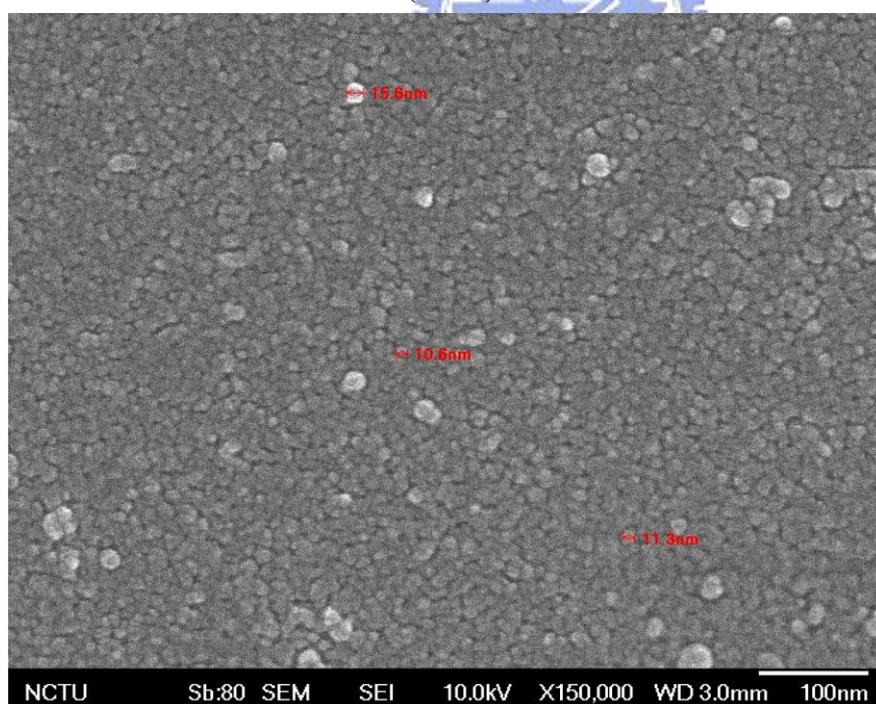


圖4-5-f銀奈米粒子在N.O.115下層相 SEM圖片

顆粒平均大小 10.3 ± 4.1 nm

N.O.115 ATPS: PEG 6000(15%) K_2HPO_4 (10%) Urea(6%)
 DI water(69%)

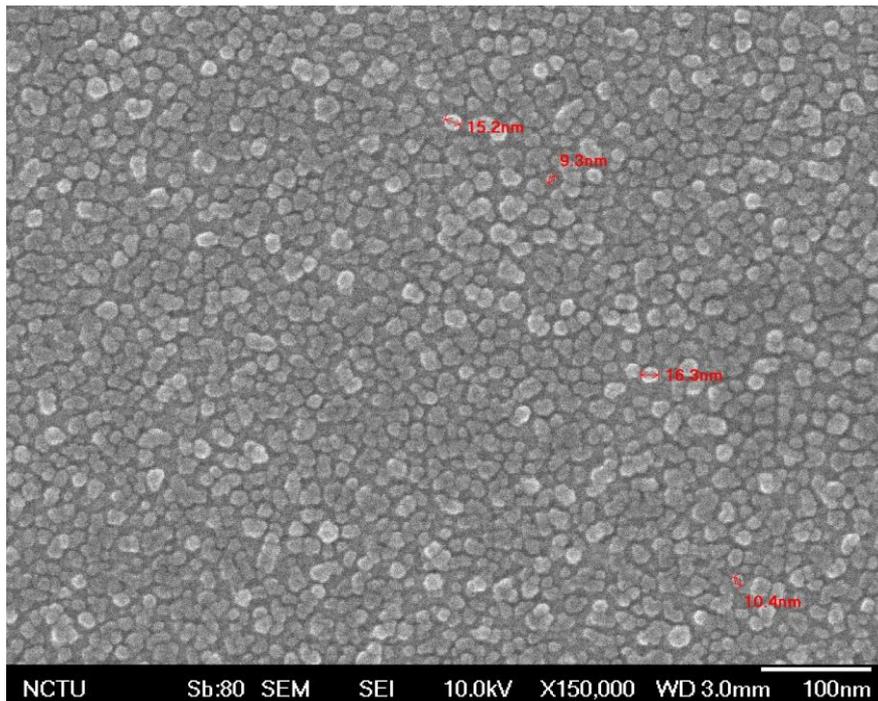


圖4-5-g銀奈米粒子在N.O.119上層相 SEM圖片

顆粒平均大小 12.9 ± 2.8 nm

N.O.119 ATPS:PEG 6000(20%) K_2HPO_4 (12%) Urea(6%)
DI water(62%)

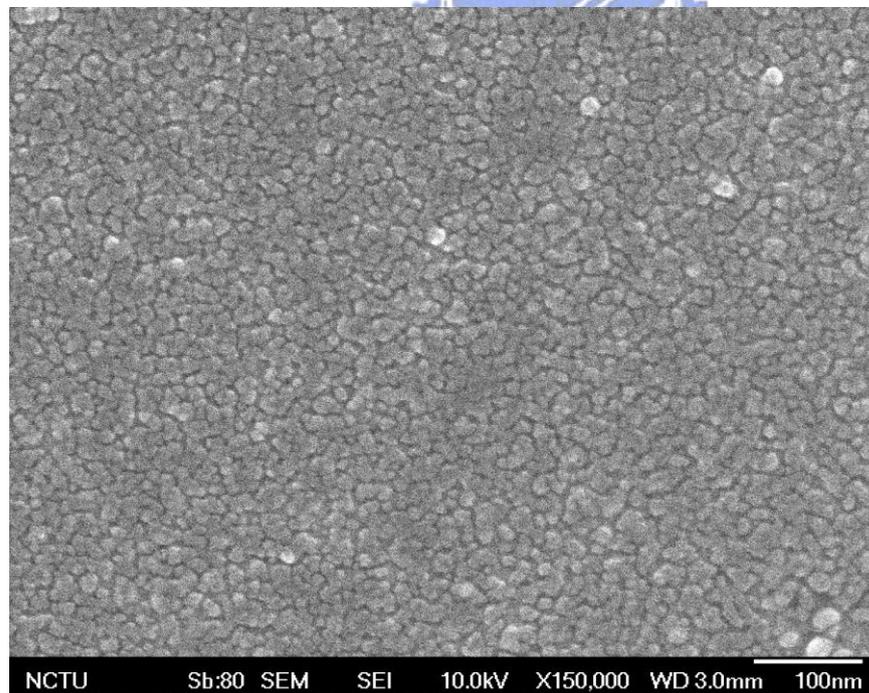


圖4-5-h銀奈米粒子在N.O.119下層相 SEM圖片

顆粒平均大小 10.0 ± 2.4 nm

N.O.119 ATPS:PEG 6000(20%) K_2HPO_4 (12%) Urea(6%)
DI water(62%)

PEG 4000 系列雙水相系統，由 UV-Vis 光譜儀測得之 K_c 值紀錄在表 4-5 和表 4-6，與 PEG 8000 及 PEG 6000 整體的雙水相系統作比較，PEG 4000 雙水相系統之 K_c 值(0.13~1.2)是偏小的。圖 4-6-a~4-6-h 為 SEM 所觀察到的結果，銀奈米粒子在此系統的兩相中，並無顆粒大小分離的情況。

表4-5 APTS: PEG 4000 + K_2HPO_4 +DI water配製比例及 K_c 值

單位:重量百分比

N.O.	PEG 4000(%)	K_2HPO_4 (%)	DI water(%)	K_c
161*	10	8	82	X
162	10	10	80	0.23
163	10	12	78	0.5
164	15	8	77	0.19
165	15	10	75	0.25
166	15	12	73	1.44
167	20	8	72	0.29
168	20	10	70	1.02
169	20	12	68	1.2

N.O. 161*:沒有形成雙水相系統。

PEG 4000 = PEG polyethylene glycol (M.W. 4000)

K_c : 銀奈米粒子在雙水相系統中的分佈

N.O.: 雙水相系統編號

表4-6 APTS: PEG 4000 +K₂HPO₄+Urea+DI water配製比例及Kc值

單位:重量百分比

N.O.	PEG 4000(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Urea(%)	DI water(%)	Kc
171*	10	8	6	76	X
172	10	10	6	74	0.13
173	10	12	6	72	0.39
174	15	8	6	71	0.05
175	15	10	6	69	0.44
176	15	12	6	67	0.93
177	20	8	6	66	0.29
178	20	10	6	64	1.03
179	20	12	6	62	0.84

N.O. 171*:沒有形成雙水相系統。

PEG 4000 = polyethylene glycol (M.W. 4000)

Kc: 銀奈米粒子在雙水相系統中的分佈

N.O.: 雙水相系統編號

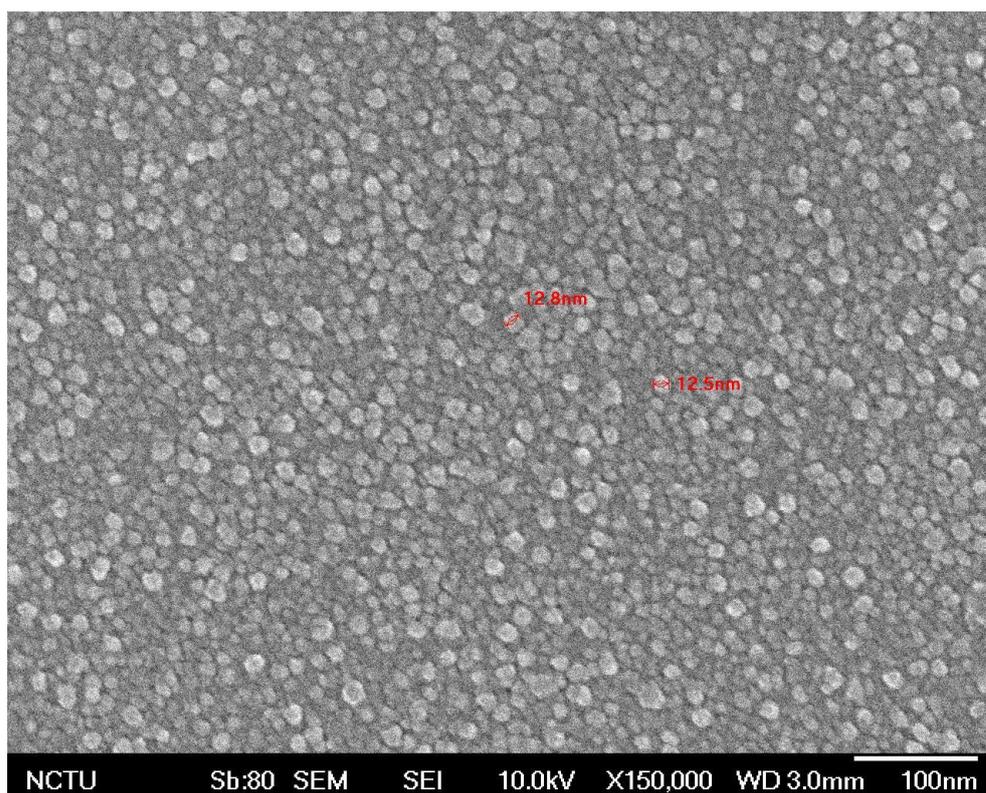


圖4-6-a銀奈米粒子在N.O.165上層相 SEM圖片
N.O.165 ATPS:PEG 4000(15%) K_2HPO_4 (10%) DI water(75%)

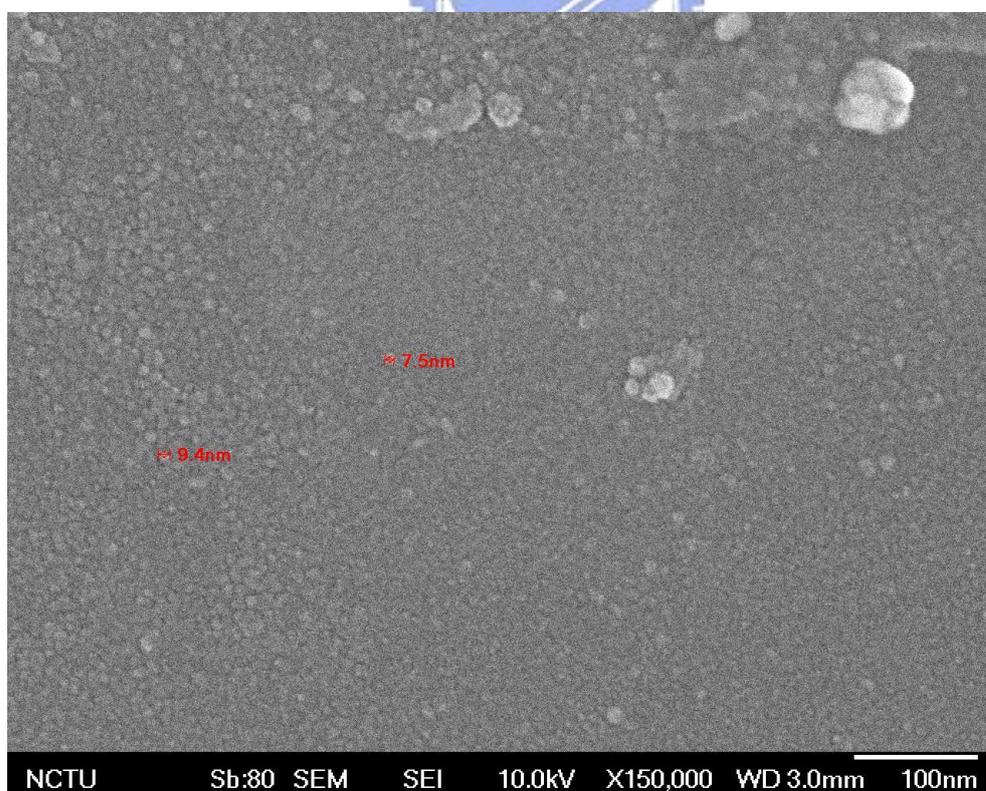


圖4-6-b銀奈米粒子在N.O.165下層相 SEM圖片
N.O.165 ATPS:PEG 4000(15%) K_2HPO_4 (10%) DI water(75%)

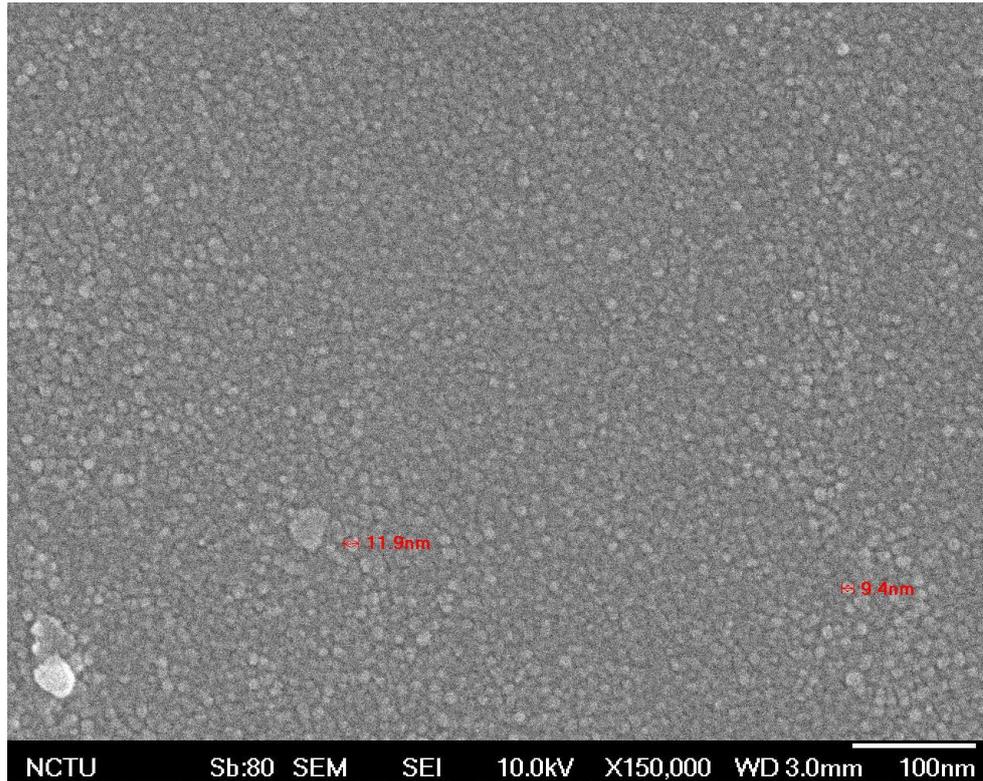


圖4-6-c銀奈米粒子在N.O.167上層相 SEM圖片
N.O.167 ATPS: PEG 4000(20%) K_2HPO_4 (8%) DI water(72%)

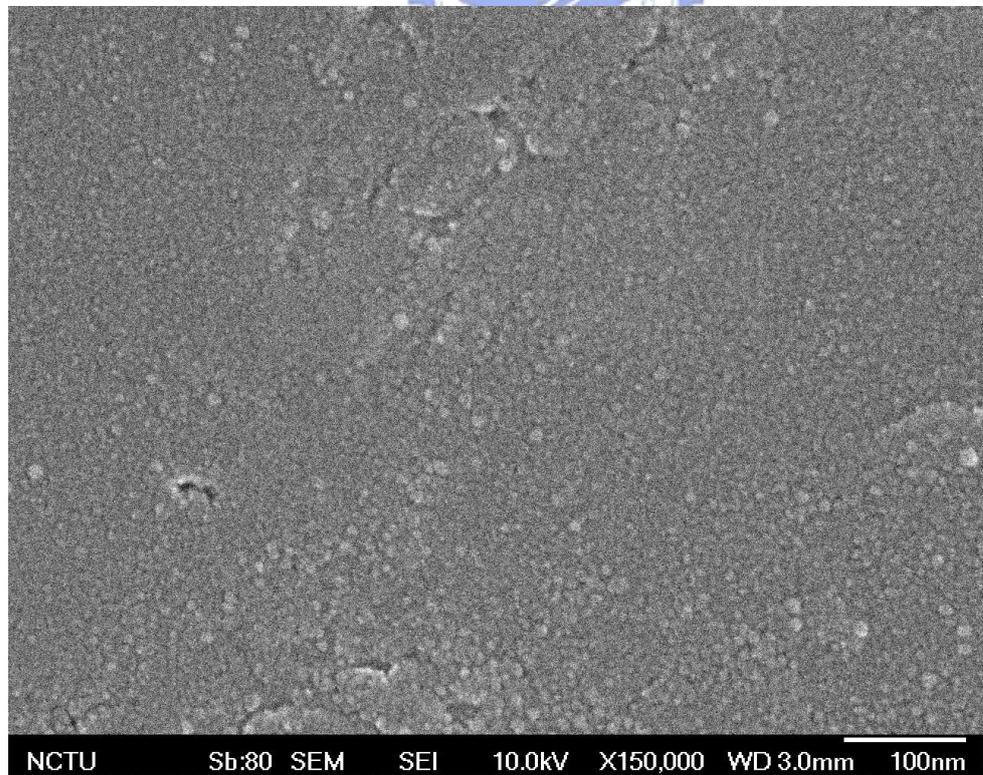


圖4-6-d銀奈米粒子在N.O.167下層相 SEM圖片
N.O.167 ATPS: PEG 4000(20%) K_2HPO_4 (8%) DI water(72%)

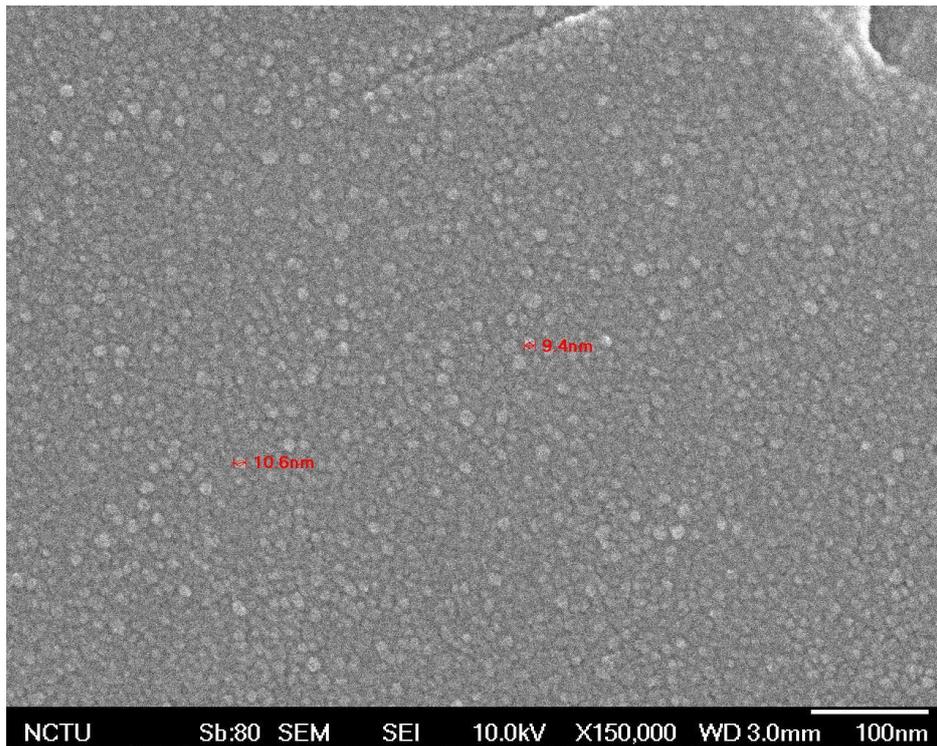


圖4-6-e銀奈米粒子在N.O.175上層相 SEM圖片
N.O.175 ATPS: PEG 4000(15%) K_2HPO_4 (10%) Urea(6%)
DI water(69%)

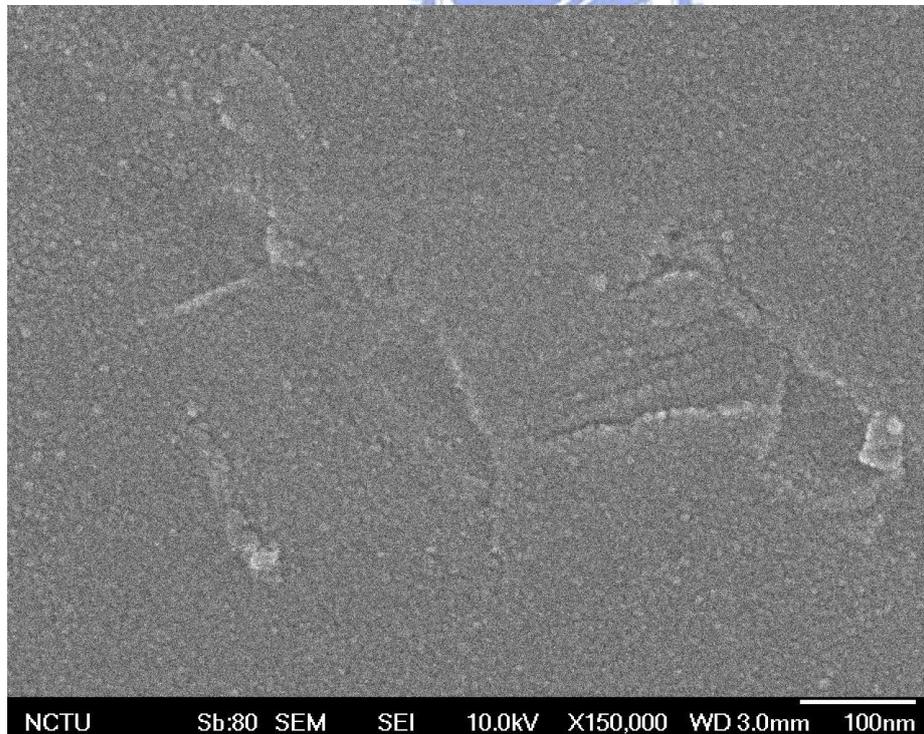


圖4-6-f銀奈米粒子在N.O.175下層相 SEM圖片
N.O.175 ATPS: PEG 4000(15%) K_2HPO_4 (10%) Urea(6%)
DI water(69%)

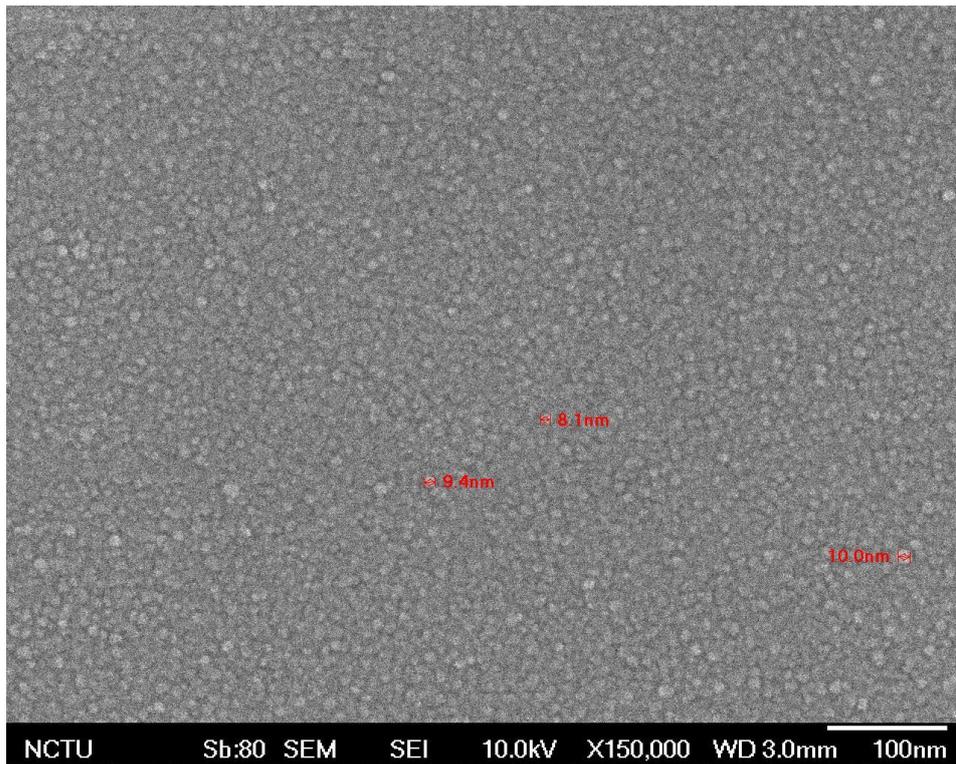


圖4-6-g銀奈米粒子在N.O.179上層相 SEM圖片

N.O.179 ATPS: PEG M.W.4 000(20%) K_2HPO_4 (12%) Urea(6%)
DI water(62%)

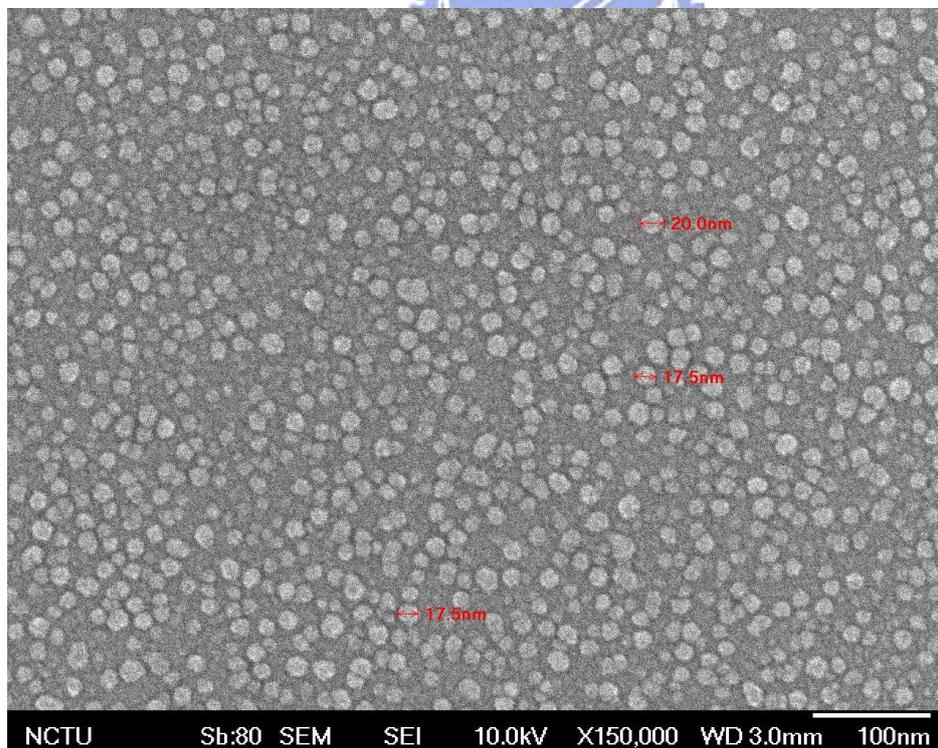


圖4-6-h銀奈米粒子在N.O.179下層相 SEM圖片

N.O.179 ATPS: PEG M.W.4 000(20%) K_2HPO_4 (12%) Urea(6%)
DI water(62%)

我們也嘗試使用 PEG 分子量 1000 的雙水相系統，奈米粒子在此系統中，所得到的 K_c 值趨近於零，無分離效果。

基於以上的實驗結果，銀奈米粒子在 PEG 6000 的雙水相系統中， K_c 值範圍約在(0.09~2.98)符合理想 K 值，而不同尺寸的銀奈米粒子在兩相中，其分佈之趨勢為大顆粒分佈在上層相，小顆粒分佈在下層相，並且使用高速離心，即可把銀奈米粒子與 PEG、鹽類等不需要的雜質分離開來，因此 PEG 6000 的雙水相系統，是最符合我們需求。

4-2 觀察不同鹽類濃度比例的雙水相系統

雙水相系統是由 PEG- K_2HPO_4 - H_2O 組成，固定 PEG 濃度，藉由改變 K_2HPO_4 的濃度，觀察銀奈米粒子在雙水相中的分佈情形。

將 PEG 8000 濃度固定為 15%， K_2HPO_4 濃度由 8% 提高到 12%，銀奈米粒子在雙水相中的分佈係數(K_c 值)會從 0.72 增加到 4.71， K_c 值記錄在表 4-7；改變 PEG 分子量，將 PEG 6000 濃度固定為 15%，鹽類濃度由 8% 提高到 12%，銀奈米粒子在雙水相中的分佈係數(K_c 值)會從 0.75 增加到 2.26， K_c 值記錄在表 4-8；改變 PEG 分子量，將 PEG 4000 濃度固定為 15%，當鹽類濃度由 8% 提高到 12%，銀奈米粒子在雙水相中的分佈係數(K_c 值)會從 0.19 增加到 1.44， K_c 值記錄在表 4-9。結果得知在 PEG- K_2HPO_4 雙水相系統中，當鹽類濃度越高， K_c 值也會隨之變大。

表4-7固定PEG 8000濃度，改變K₂HPO₄濃度，觀察Kc值變化

N.O.	PEG 8000(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Kc 值
144	15	8	0.72
145	15	10	2.08
146	15	12	4.71

表4-8固定PEG 6000濃度，改變K₂HPO₄濃度，觀察Kc值變化

N.O.	PEG 6000(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Kc 值
124	15	8	0.75
125	15	10	2.19
126	15	12	2.26

表4-9固定PEG 4000濃度，改變K₂HPO₄濃度，觀察Kc值變化

N.O.	PEG 4000(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Kc 值
164	15	8	0.19
165	15	10	0.25
166	15	12	1.44

4-3 雙水相系統中添加尿素分子(Urea)

在以往雙水相系統萃取蛋白質的實驗，可加入一些輔助劑，來增加萃取率[32; 60]，因此在實驗過程中，我們嘗試添加尿素分子(Urea)，觀察尿素所帶來的影響。我們比較無添加尿素和有添加尿素

的雙水相系統，觀察銀奈米粒子在系統中 K_c 值的大小。由圖 4-7 可發現到當雙水相系統 PEG 和 K_2HPO_4 的含量一樣，但是若系統多添加尿素，會使得 K_c 值下降，因此雙水相系統中，有無尿素添加，可以當成一種調控銀奈米粒子在雙水相中分佈的條件之一。

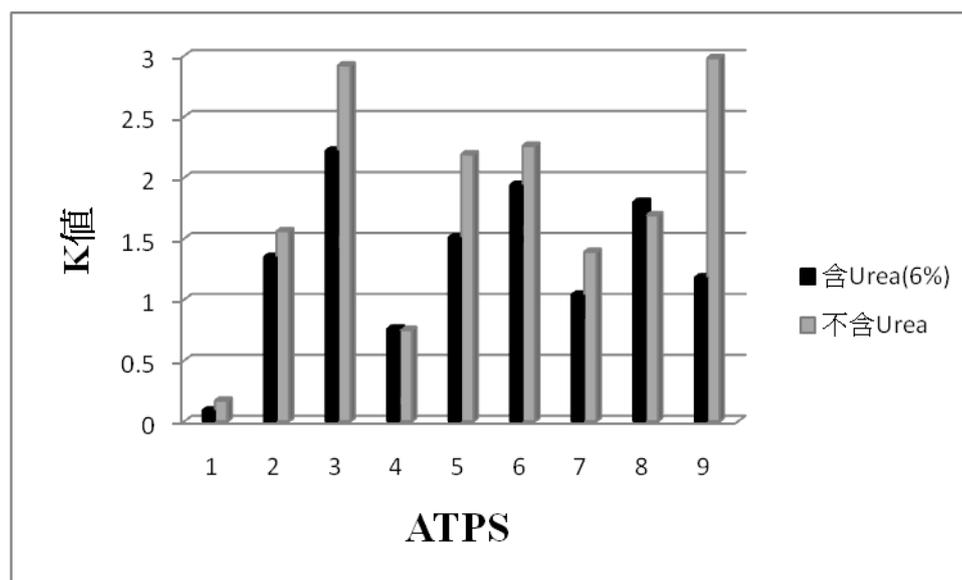


圖4-7比較有、無Urea雙水相系統中，銀奈米粒子之分佈係數。由圖中可看出有加 Urea 的雙水相系統，分佈係數會比沒加 Urea 雙水相系統低。

ATPS 1: PEG 6000(10%)+ K_2HPO_4 (8%)

ATPS 2: PEG 6000(10%)+ K_2HPO_4 (10%)

ATPS 3: PEG 6000(10%)+ K_2HPO_4 (12%)

ATPS 4: PEG 6000(15%)+ K_2HPO_4 (8%)

ATPS 5: PEG 6000(15%)+ K_2HPO_4 (10%)

ATPS 6: PEG 6000(15%)+ K_2HPO_4 (12%)

ATPS 7: PEG 6000(20%)+ K_2HPO_4 (8%)

ATPS 8: PEG 6000(20%)+ K_2HPO_4 (10%)

ATPS 9: PEG 6000(20%)+ K_2HPO_4 (12%)

接著在含有 Urea 的雙水相系統中，固定 PEG 及 Urea 濃度，改變鹽類濃度，觀察 Kc 值之變化，首先將 PEG 8000 濃度固定為 15%，Urea 濃度固定為 6%，當鹽類濃度由 8% 提高到 12%，銀奈米粒子在雙水相中的分佈係數(Kc 值)由 0.96 增加到 3.6，Kc 值記錄在表 4-10；改變 PEG 分子量，將 PEG 6000 濃度固定為 15%，Urea 濃度固定為 6%，當鹽類濃度由 8% 提高到 12%，銀奈米粒子在雙水相中的分佈係數(Kc 值)由 0.96 增加到 3.6，Kc 值記錄在表 4-11；改變 PEG 分子量，將 PEG 4000 濃度固定為 15%，Urea 濃度固定為 6%，當鹽類濃度由 8% 提高到 12%，銀奈米粒子在雙水相中的分佈係數(Kc 值)由 0.05 增加到 0.93，Kc 值記錄在表 4-12。因此由以上實驗結果可得知，在 PEG-K₂HPO₄-Urea 雙水相系統中，當鹽類濃度增加，Kc 值會變大，銀奈米粒子會更傾向分佈在上層相中。

表4-10固定PEG 8000及Urea濃度，改變K₂HPO₄濃度，觀察Kc值變化

N.O.	PEG 8000(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Urea(%)	Kc 值
154	15	8	6	0.96
155	15	10	6	2.64
156	15	12	6	3.6

表4-11固定PEG 6000及Urea濃度，改變K₂HPO₄濃度，觀察Kc值變化

N.O.	PEG 6000(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Urea(%)	Kc 值
114	15	8	6	0.76
115	15	10	6	1.51
116	15	12	6	1.94

表4-12固定PEG 4000及Urea濃度，改變K₂HPO₄濃度，觀察Kc值變化

N.O.	PEG 4000(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	Urea(%)	Kc 值
174	15	8	6	0.05
175	15	10	6	0.44
176	15	12	6	0.96

4-4 批式萃取銀奈米粒子

經過最佳化實驗之後，我們選用雙水相系統(PEG 6000 15%，K₂HPO₄ 10%)，對銀奈米粒子進行三次的批式萃取。經由 SEM 測量結果，得圖 4-8(a)-(f)，(a)是第一次萃取的上層相，平均大小為 11.5 ± 1.9 nm；(b)是第一次萃取的下層相，平均大小為 10.5 ± 1.8 nm；(c)是第二次萃取的上層相，平均大小為 13.0 ± 1.9 nm；(d)是第二次萃取的下層相，平均大小為 11.0 ± 2.1 nm；(e)是第三次萃取的上層相，平均大小為 13.1 ± 2.1 nm；(f)是第三次萃取的下層相，平均大小為 11.1 ± 2.4nm。比較(b)粒子大小為 10.5 ± 1.8 nm 和(e)粒子大小為 13.1 ± 2.1 nm，可看出原本為不均勻的銀奈米粒子，經由三次批次萃取，可依不同大小尺寸而分開。由於第二次萃取所加入的銀奈米粒子，是取自於第一次萃取的上層相溶液；第三次萃取所加入的銀奈米粒子，是取自於第二次萃取的上層相溶液，比較(b)、(d)、(f)三次萃取之下層相粒子大小，有越來越大趨勢。

因此由 SEM 圖所觀察到銀奈米粒子尺寸的分佈，可證明此雙水相系統是可以對銀奈米粒子，進行尺寸上的分離。

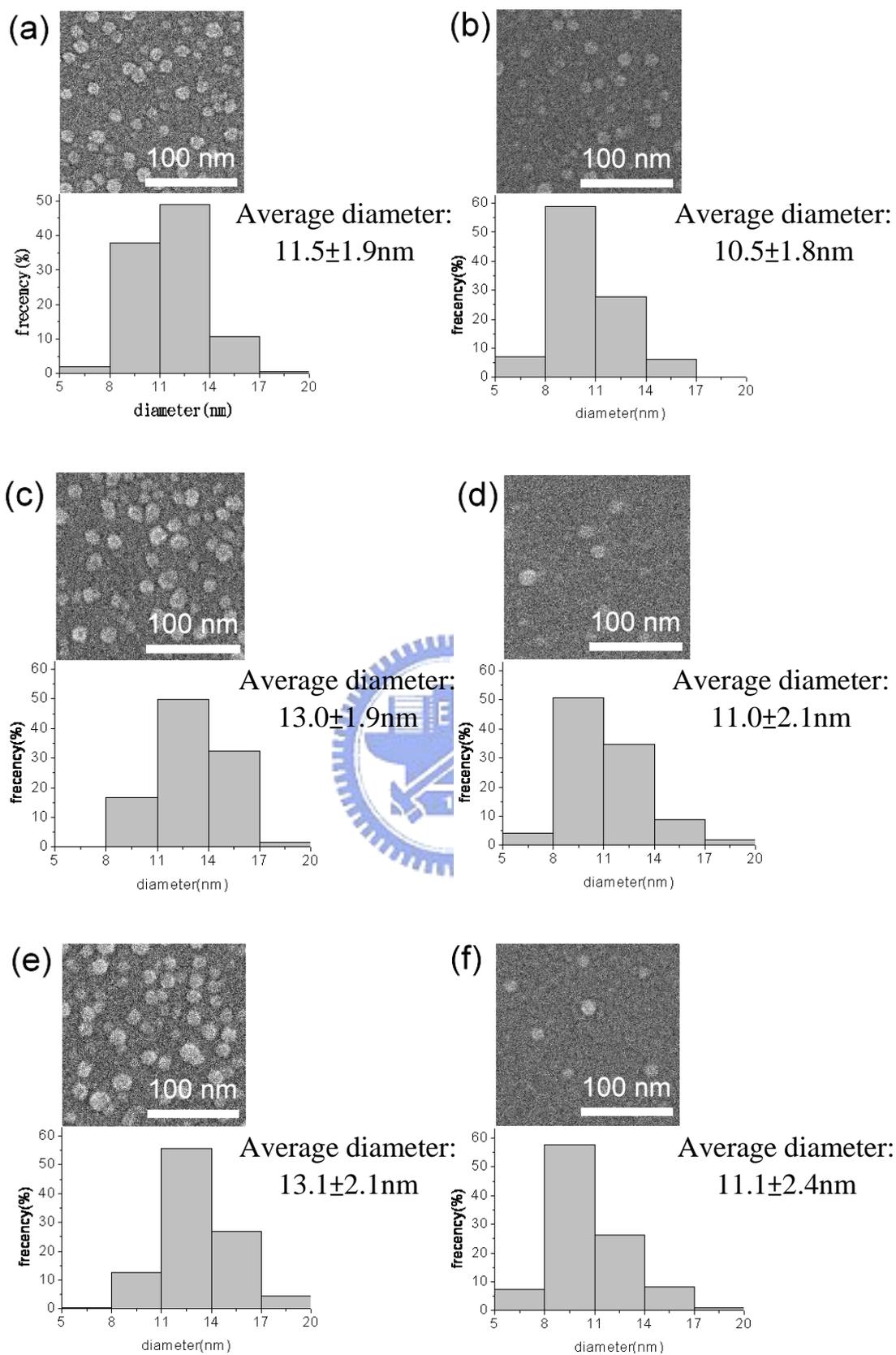


圖4-8銀奈米粒子在N.O.125雙水相系統萃取三次的SEM分佈圖
 N.O.125 ATPS: PEG 6000(15%) K_2HPO_4 (10%)

4-5 探討銀奈米粒子和雙水相系統彼此之間的作用力

1. 不同的 PEG 分子量

比較不同分子量的雙水相系統，PEG 8000、PEG 6000 和 PEG 4000，得知銀奈米粒子在兩相中的 K_c 值比為 PEG 8000>PEG 6000>PEG 4000，當雙水相系統的 PEG 分子量越高時，上層相的銀奈米粒子分佈也越多。主要原因為雙水相的上層含大量 PEG 分子，而 PEG 為長碳鏈的高分子，分子結構為圖 4-9。實驗所使用的銀奈米粒子，表面修飾含有 11 個碳的 MUA 分子，當 PEG 的分子量越高，表示其鏈長越長，則易與表面修飾 MUA 的銀奈米粒子上的碳鏈產生疏水性作用力(hydrophobic interaction)，使得銀奈米粒子在上層相的分佈也較高；當雙水相的上層相所含 PEG 比例較多，PEG 與銀奈米粒子之間疏水性作用力也越多，也會使銀奈米粒子在上層相的分佈較多。由於較大顆粒的銀奈米粒子，表面所修飾上的 MUA 也越多，導致大顆粒銀奈米粒子在上層相的分佈會比小顆粒的多，於是銀奈米粒子在雙水相的兩相中，會有不同尺寸的分佈。

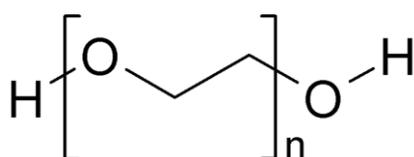


圖4-9 PEG分子結構

2. 雙水相中鹽類的濃度

當雙水相系統的鹽類濃度越濃，銀奈米粒子會傾向分佈在上層相中，主要是因為鹽析(salting-out)[61]現象。鹽類主要分佈在雙水相系

統下層相，當整體加入的鹽類濃度越高，表示下層相的離子濃度也有機會相對越濃，鹽離子會與水分子進行水合，降低銀奈米粒子在下層相的溶解度，使銀奈米粒子較容易被萃取到上層相中，Kc 值因而變大。要注意的一點，當鹽類濃度太高，會遮蔽原本銀奈米粒子表面的負電，則使銀奈米粒子彼此會有聚集現象發生，這是我們要避免的。

3. 添加尿素分子(Urea)

雙水相系統有添加尿素(Urea)，與沒有添加尿素系統相比較，有添加尿素的系統其 Kc 值較低。主要原因是尿素醯胺鍵上的氫原子，容易跟 PEG 上的氧產生氫鍵，如圖 4-10，如此一來當 PEG 和 Urea 彼此之間有氫鍵作用力產生，立體障礙變大，則 PEG 和銀奈米粒子的作用力就變弱，使得 Kc 值下降。因此我們可以藉由調控 Urea 的濃度，可控制銀奈米粒子在雙水相系統中的分佈。

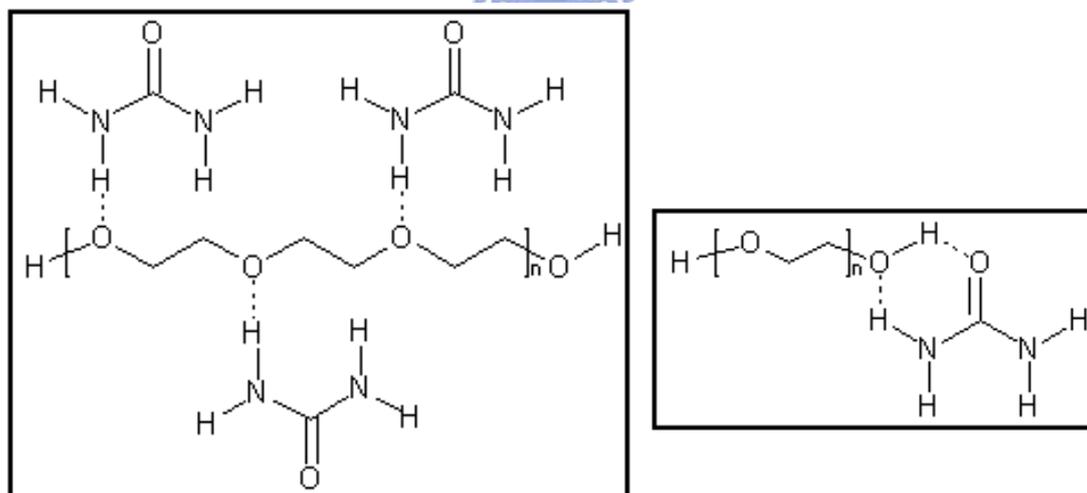


圖4-10雙水相中PEG和Urea之間的鍵結方式

在一連串的實驗中，要注意的是，銀奈米粒子在雙水相系統中

是否有聚集現象產生。當雙水相系統含高分子量 PEG 8000 時，銀奈米粒子，在此環境下容易產生聚集，則此系統就不適合拿來做分離的，以及鹽類濃度過高的雙水相系統也是不適用的；實驗也測試過奈米粒子表面修飾不夠完整(例如:表面是修飾上檸檬酸的金奈米粒子，以及表面修飾微量 MUA 的銀奈米粒子)也無法在雙水相系統中使用，因為我們雙水相系統含有頗高濃度的鹽類，在此環境下，則有可能使奈米粒子聚集。

4-6 雙水相系統分離不同表面修飾的樣品

在實驗過程中，我們還合成不同種類的奈米粒子，例如:表面修飾上檸檬酸的金奈米粒子和銀奈米粒子，以及表面修飾微量 MUA 的銀奈米粒子，以 PEG-K₂HPO₄ 的雙水相系統去分離。由於此系統是含有高濃度離子，若奈米粒子表面只是以靜電作用力修飾上檸檬酸，或者合成的奈米粒子，表面並沒有修飾上足夠多的硫醇分子，這類型的奈米粒子，在 PEG-K₂HPO₄ 的雙水相系統中，鹽離子會遮蔽奈米粒子表面的負電，降低奈米粒子彼此之間的排斥力，使奈米粒子有聚集現象產生。若奈米粒子加到雙水相系統中會聚集，則不適合使用 PEG-K₂HPO₄ 雙水相系統進行分離，由於雙水相系統兩相都要是水溶液，因此若是奈米粒子本身不易溶於水，也不適用於此系統。

接著我們還合成，表面修飾 MHA 的銀奈米粒子，MHA 分子上的硫以共價鍵鍵結在銀奈米粒子上，MHA 結構是比 MUA 含更多的碳數，其碳鏈更長，主要目的是去探討修飾上更長碳鏈的奈米粒子，在雙水相系統中 Kc 值大小，觀察並記錄銀奈米粒子在兩相中分佈的

情形，實驗結果，記錄在表 4-13，得知由 MHA 修飾的銀奈米粒子在雙水相中的 Kc 值，比由 MUA 修飾的銀奈米粒子高，是更傾向分佈在上層相中。此結果更證明了，雙水相中的 PEG 與表面有修飾有機分子的奈米粒子，彼此之間存在著疏水性作用力 (hydrophobic interaction)。

表4-13不同表面修飾銀奈米粒子在ATPS中的Kc值

	Ag-MHA	Ag-MUA
N.O. 142	19.50	1.58
N.O. 122	10.96	1.56
N.O. 162	4.03	0.23

N.O. 142 ATPS:PEG 8000(10%) + K₂HPO₄(10%) + DI water
 N.O. 122 ATPS:PEG 6000(10%)+ K₂HPO₄ (10%)+ DI water
 N.O. 162 ATPS:PEG 4000(10%) + K₂HPO₄ (10%)+ DI water

第五章 結論

在一連串的實驗過程中，我們已找到理想雙水相系統，選用的雙水相系統為高分子-鹽類(PEG- K_2HPO_4)，PEG 分子量為 6000，銀奈米粒子在此系統中會有不同尺寸上的分佈、和適當的 Kc 值(0.5~2)，並且利用高速離心即可把 PEG 和鹽類等雜質和銀奈米粒子所分離，使達到純化的效果。我們還可以藉由添加尿素分子，可調控銀奈米粒子在雙水相中的 Kc 值。最後，經最佳化實驗，我們選用 PEG 6000 (15%)， K_2HPO_4 (10%)的雙水相系統直接進行三次批式萃取，經 SEM 偵測後，觀測到原本不均勻的銀奈米粒子，會依不同尺寸而分離開來。因此使用雙水相系統簡單進行幾次批次萃取後，就可以成功分離不同大小尺寸的銀奈米粒子。

由於實驗室擁有 CPC 儀，在未來可把本研究中所找出的理想 PEG 6000 (15%)， K_2HPO_4 (10%)的雙水相系統，應用在 CPC 儀器中，藉由控制動相流速、CPC 轉速以及調整動靜相組成，將有機會可以分離更大量及分離更細微尺寸的銀奈米粒子。

參考文獻

- [1] 奈米國家型科技計畫網頁: <http://nano-taiwan.sinica.edu.tw/>.
- [2] Y. Kobayashi, and A. Tomita, "Preparation of aqueous gold colloid by vapor deposition method". *J. Colloid Interface Sci.* 185 (1997) 285-286.
- [3] M.S. Yeh, Y.S. Yang, Y.P. Lee, H.F. Lee, Y.H. Yeh, and C.S. Yeh, "Formation and characteristics of Cu colloids from CuO powder by laser irradiation in 2-propanol". *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 6851-6857.
- [4] A. Fojtik, and A. Henglein, "Laser ablation of films and suspended particles in a solvent - formation of cluster and colloid solutions". *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* 97 (1993) 252-254.
- [5] N. Murayama, N. Izu, W. Shin, and I. Matsubara, "Preparation of SnO₂ nanosized powder by precipitation method with nano-mixing of carbon powder". *J. Ceram. Soc. Jpn.* 113 (2005) 330-332.
- [6] M.L. Wu, D.H. Chen, and T.C. Huang, "Synthesis of Au/Pd bimetallic nanoparticles in reverse micelles". *Langmuir* 17 (2001) 3877-3883.
- [7] I. Lisiecki, and M.P. Pileni, "Synthesis of copper metallic clusters using reverse micelles as microreactors". *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 3887-3896.
- [8] A. Henglein, "Physicochemical properties of small metal particles in solution - microelectrode reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition". *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 5457-5471.
- [9] M.T. Reetz, and W. Helbig, "Size-selective synthesis of nanostructured transition-metal clusters". *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 7401-7402.

- [10] A. Ahmad, S. Senapati, M.I. Khan, R. Kumar, R. Ramani, V. Srinivas, and M. Sastry, "Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species". *Nanotechnology* 14 (2003) 824-828.
- [11] 川合知二原, "奈米技術入門", 全華科技圖書, 2003.
- [12] G.T. Wei, F.K. Liu, and C.R.C. Wang, "Shape separation of nanometer gold particles by size-exclusion chromatography". *Anal. Chem.* 71 (1999) 2085-2091.
- [13] G.T. Wei, and F.K. Liu, "Separation of nanometer gold particles by size exclusion chromatography". *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 253-260.
- [14] T. Siebrands, M. Giersig, P. Mulvaney, and C.H. Fischer, "Steric exclusion chromatography of nanometer-sized gold particles". *Langmuir* 9 (1993) 2297-2300.
- [15] J.P. Novak, C. Nickerson, S.G. Franzen, and D.L. Feldheim, "Purification of molecularly bridged metal nanoparticle arrays by centrifugation and size exclusion chromatography". *Anal. Chem.* 73 (2001) 5758-5761.
- [16] J.P. Wilcoxon, J.E. Martin, and P. Provencio, "Size distributions of gold nanoclusters studied by liquid chromatography". *Langmuir* 16 (2000) 9912-9920.
- [17] J.P. Wilcoxon, J.E. Martin, and P. Provencio, "Optical properties of gold and silver nanoclusters investigated by liquid chromatography". *J. Chem. Phys.* 115 (2001) 998-1008.
- [18] M.M.F. Choi, A.D. Douglas, and R.W. Murray, "Ion-pair chromatographic separation of water-soluble gold monolayer-protected clusters". *Anal. Chem.* 78 (2006) 2779-2785.
- [19] J. Stahlberg, "Retention models for ions in chromatography". *J.*

Chromatogr. A 855 (1999) 3-55.

- [20] F. Carpino, M. Zborowski, and P.S. Williams, "Quadrupole magnetic field-flow fractionation: A novel technique for the characterization of magnetic nanoparticles". *J. Magn. Magn. Mater.* 311 (2007) 383-387.
- [21] A.H. Latham, R.S. Freitas, P. Schiffer, and M.E. Williams, "Capillary magnetic field flow fractionation and analysis of magnetic nanoparticles". *Anal. Chem.* 77 (2005) 5055-5062.
- [22] S. Tadjiki, S. Assemi, C.E. Deering, J.M. Veranth, and J.D. Miller, "Detection, separation, and quantification of unlabeled silica nanoparticles in biological media using sedimentation field-flow fractionation". *J. Nanopart. Res.* 11 (2009) 981-988.
- [23] D.Y. Kang, M.J. Kim, S.T. Kim, K.S. Oh, S.H. Yuk, and S.H. Lee, "Size characterization of drug-loaded polymeric core/shell nanoparticles using asymmetrical flow field-flow fractionation". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 (2008) 2183-2188.
- [24] S. Dubascoux, F. Von Der Kammer, I. Le Hecho, M.P. Gautier, and G. Lespes, "Optimisation of asymmetrical flow field flow fractionation for environmental nanoparticles separation". *J. Chromatogr. A* 1206 (2008) 160-165.
- [25] X.Y. Xu, K.K. Caswell, E. Tucker, S. Kabisatpathy, K.L. Brodhacker, and W.A. Scrivens, "Size and shape separation of gold nanoparticles with preparative gel electrophoresis". *J. Chromatogr. A* 1167 (2007) 35-41.
- [26] M. Hanauer, S. Pierrat, I. Zins, A. Lotz, and C. Sonnichsen, "Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size-and shape". *Nano Lett.* 7 (2007) 2881-2885.
- [27] D. Zanchet, C.M. Micheel, W.J. Parak, D. Gerion, S.C. Williams, and A.P. Alivisatos, "Electrophoretic and structural studies of DNA-directed Au nanoparticle groupings". *J. Phys. Chem. B* 106

(2002) 11758-11763.

- [28] P. Serwer, S.A. Khan, and G.A. Griess, "Nondenaturing gel-electrophoresis of biological nanoparticles - viruses". *J. Chromatogr. A* 698 (1995) 251-261.
- [29] S.F. Sweeney, G.H. Woehrle, and J.E. Hutchison, "Rapid purification and size separation of gold nanoparticles via diafiltration". *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 3190-3197.
- [30] G. Tishchenko, K. Luetzow, J. Schauer, W. Albrecht, and M. Bleha, "Purification of polymer nanoparticles by diafiltration with polysulfone/hydrophilic polymer blend membranes". *Sep. Purif. Technol.* 22-3 (2001) 403-415.
- [31] J.F. Kennedy, and J.M.S. Cabral, "Recovery Processes for Biological Materials", John Wiley & Sons Ltd, 1993.
- [32] L.H.M. da Silva, and A.J.A. Meirelles, "PEG plus potassium phosphate plus urea aqueous two-phase systems: Phase equilibrium and protein partitioning". *Journal of Chemical and Engineering Data* 46 (2001) 251-255.
- [33] P.-Å. Albertsson, "Partition of Cell Particles and Macromolecules," 3rd Ed, Wiley, 1986.
- [34] F. Tjerneld, and D. Fisher, "Separations Using Aqueous Phase Systems", Plenum, 1989.
- [35] A. Kokkoris, J.B. Blair, and J.A. Shaeiwitz, "Yeast-cell debris and protein partitioning in the poly(ethylene glycol)-poly(vinyl alcohol) biphasic system". *Biochim. Biophys. Acta* 966 (1988) 176-180.
- [36] S. Sturesson, F. Tjerneld, and G. Johansson, "Partition of macromolecules and cell particles in aqueous 2-phase systems based on hydroxypropyl starch and poly(ethylene glycol)". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 26 (1990) 281-295.

- [37] A.L. Nguyen, S. Grothe, and J.H.T. Luong, "Applications of pullulan in aqueous 2-phase systems for enzyme-production, purification and utilization". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 (1988) 341-346.
- [38] J.N. Baskir, T.A. Hatton, and U.W. Suter, "Thermodynamics of the partitioning of biomaterials in 2-phase aqueous polymer systems - comparison of lattice model to experimental-data". *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 2111-2122.
- [39] M.B. Perrau, I. Iliopoulos, and R. Audebert, "Phase-separation of poly-electrolyte nonionic polymer systems in aqueous-solution - effects of salt and charge-density". *Polymer* 30 (1989) 2112-2117.
- [40] L. Piculell, S. Nilsson, L. Falck, and F. Tjerneld, "Phase-separation in aqueous mixtures of similarly charged polyelectrolytes". *Polymer Communications* 32 (1991) 158-160.
- [41] J. Vernau, and M.R. Kula, "Extraction of proteins from biological raw-material using aqueous polyethylene glycol-citrate phase systems". *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12 (1990) 397-404.
- [42] D.E. Brooks, K.A. Sharp, and D. Fisher, "In: partitioning in aqueous two-phase systems: Theory, methods, uses, and applications to biotechnology", Academic Press, 1985.
- [43] J.M. Harris, "Poly(Ethylene Glycol) Chemistry : biotechnical and biomedical applications", Plenum Press, 1992.
- [44] F. Tjerneld, S. Berner, A. Cajarville, and G. Johansson, "New Aqueous 2-Phase System Based on Hydroxypropyl Starch Useful in Enzyme-Purification". *Enzyme Microb. Technol.* 8 (1986) 417-423.
- [45] Y.T. Wu, Z.Q. Zhu, D.Q. Lin, and M.A. Li, "Modeling of liquid-liquid equilibrium of polyethylene glycol salt aqueous two-phase systems - the effect of partial dissociation of the salt". *Fluid Phase Equilib.* 154 (1999) 109-122.

- [46] D. Forciniti, C.K. Hall, and M.R. Kula, "Protein partitioning at the isoelectric point - influence of polymer molecular-weight and concentration and protein size". *Biotechnol. Bioeng.* 38 (1991) 986-994.
- [47] D. Forciniti, C.K. Hall, and M.R. Kula, "Influence of polymer molecular-weight and temperature on phase-composition in aqueous 2-phase systems". *Fluid Phase Equilib.* 61 (1991) 243-262.
- [48] J.N. Baskir, T.A. Hatton, and U.W. Suter, "Protein partitioning in 2-phase aqueous polymer systems". *Biotechnol. Bioeng.* 34 (1989) 541-558.
- [49] P.P. Madeira, J.A. Teixeirab, E.A. Macedo, L.M. Mikheeva, and B.Y. Zaslavsky, "Correlations between distribution coefficients of various biomolecules in different polymer/polymer aqueous two-phase systems". *Fluid Phase Equilib.* 267 (2008) 150-157.
- [50] B.Y. Zaslavsky, L.M. Miheeva, and S.V. Rogozhin, "Relative hydrophobicity of surfaces of erythrocytes from different species as measured by partition in aqueous 2-polymer phase systems". *Biochim. Biophys. Acta* 588 (1979) 89-101.
- [51] B.Y. Zaslavsky, N.M. Mestechkina, L.M. Miheeva, and S.V. Rogozhin, "Measurement of relative hydrophobicity of amino-acid side-chains by partition in an aqueous 2-phase polymeric system - hydrophobicity scale for nonpolar and ionogenic side-chains". *J. Chromatogr.* 240 (1982) 21-28.
- [52] B.Y. Zaslavsky, N.M. Mestechkina, and S.V. Rogozhin, "Characteristics of protein aqueous-medium interactions measured by partition in aqueous ficoll dextran biphasic system". *J. Chromatogr.* 260 (1983) 329-336.
- [53] M.R. Helfrich, M. El-Kouedi, M.R. Etherton, and C.D. Keating, "Partitioning and assembly of metal particles and their bioconjugates in aqueous two-phase systems". *Langmuir* 21 (2005)

8478-8486.

- [54] M.S. Long, and C.D. Keating, "Nanoparticle conjugation increases protein partitioning in aqueous two-phase systems". *Anal. Chem.* 78 (2006) 379-386.
- [55] A.P. Foucault, "Enantioseparations in counter-current chromatography and centrifugal partition chromatography". *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 365-378.
- [56] C. W. Shen, and T. Yu, "Size -fraction of silver nanoparticle using ion-pair extraction in a counter-current chromatography". *J. Chromatogr.A* in press (2009).
- [57] J.F. Smalley, K. Chalfant, S.W. Feldberg, T.M. Nahir, and E.F. Bowden, "An indirect laser-induced temperature jump determination of the surface pK(a) of 11-mercaptoundecanoic acid monolayers self-assembled on gold". *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 1676-1685.
- [58] K.J.M. Bishop, and B.A. Grzybowski, "Nanoions: Fundamental properties and analytical applications of charged nanoparticles". *Chemphyschem* 8 (2007) 2171-2176.
- [59] H.Y. Lin, C.T. Chen, and Y.C. Chen, "Detection of phosphopeptides by localized surface plasma resonance of titania-coated gold nanoparticles immobilized on glass substrates". *Anal. Chem.* 78 (2006) 6873-6878.
- [60] C. Ramsch, L.B. Kleinlanghorst, E.A. Knieps, J. Thommes, and M.R. Kula, "Aqueous two-phase systems containing urea: Influence on phase separation and stabilization of protein conformation by phase components". *Biotechnol. Progr.* 15 (1999) 493-499.
- [61] L. Copolovici, and U. Niinemets, "Salting-in and salting-out effects of ionic and neutral osmotica on limonene and linalool Henry's law constants and octanol/water partition coefficients". *Chemosphere*

69 (2007) 621-629.

