

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030004

參展科別 化學

作品名稱 以奈米錫奈米鈦增益小分子團水製備及促進藥物傳輸效能探討

得獎獎項 大會獎 二等獎
巴西MOSTRATEC正選代表

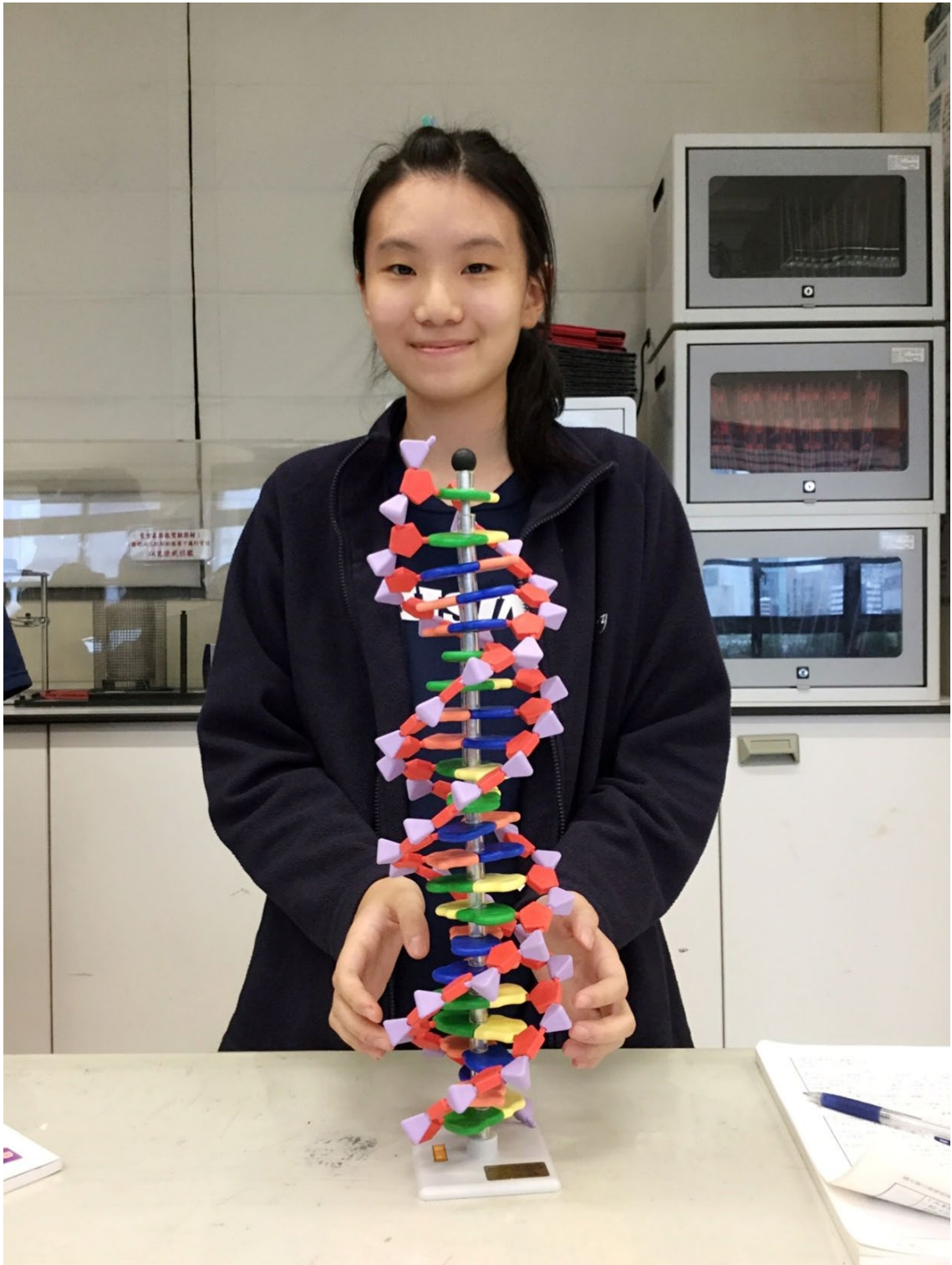
就讀學校 臺北市私立復興實驗高級中學

指導教師 馬瑪宣

作者姓名 盛爾葳

關鍵詞 小分子團水、奈米錫、奈米鈦

作者簡介



摘要

小分子團水(water cluster)的製備及應用一直是科學界的挑戰。本實驗利用熱蒸鍍法，加熱金屬塊材成原子蒸氣，在氬氣環境配合液態氮溫度下冷凝收集，成功製備了平均粒徑 10nm 金、20nm 銀、54nm 銦、71nm 錫、14nm 鎳奈米顆粒。將定量的奈米顆粒滲入去離子水中，以超聲波分散顆粒團聚，再以波長 530 奈米的綠光照射，讀取拉曼散射譜圖，判定來自小分子團水的振盪強度，探討 5 種奈米顆粒對形成小分子團水的功效。我們驚訝的發現奈米銦藉表面電漿共振(surface plasma resonance)及表面電子氧化還原功效，弱化水分子團簇成大分子團的功效為奈米金的 16 倍，奈米錫為 12 倍，也均高效於奈米銀及奈米鎳。以奈米銦及奈米錫增益小分子團水後，對將癌細胞藥物、養分帶入細胞的功效明顯提升。

Abstract

The preparation and application of small water clusters has always been a challenge for the scientific community. In this experiment, nanoparticles are created with the thermal evaporation method. Metals were heated into atomic vapor, and then condensed and collected with the help of an argon environment and liquid nitrogen temperature. The average particle size of gold is 10nm, while silver is 20nm, indium is 54nm, tin is 70nm, and nickel is 14nm nanometers. Nanoparticles are added into deionized water and irradiated with green light, so that the surface plasmon resonance of nanoparticles can be successfully excited. Next, determine the oscillation intensity from the small molecular water cluster and explore the formation of small nanoparticle pairs by reading their Raman spectrum. We were surprised to find that nano indium weaken water molecular clusters into macromolecular clusters 16 times more efficient than nano gold, while nano tin is 12 times the efficiency of nano gold. After adding nano indium and nano tin to create smaller water molecules, the effect of transporting medicine into cells is significantly improved.

壹、前言

一、研究動機

一年前，我們家安裝了標榜能夠「分解水中重金屬及毒物，保持小分子團水 747 天不還原，滋養和淨化人體提升免疫力」的水乾坤處理器。然而在查詢許多小分子團水的相關資料後，我一直很懷疑其功效，是否真的如其所述，對細胞生長有益呢？於是在與指導老師討論後，選擇透過添加不同的金屬奈米顆粒，試圖自製小分子團水，並利用論文中常見的檢測方式證明其存在，再培養細胞，希望發展出小分子團水的相關應用。

二、研究目的

1. 以熱蒸鍍法製備五種金屬奈米顆粒，並透過 X 光繞射儀掃描分析其奈米性質。
2. 自行架設簡易循環系統，能有效製備小分子團水並回收其中的奈米顆粒。
3. 以拉曼光譜及吸收光譜證明小分子團水之存在。
4. 透過細胞培養及分析其存活率，推測小分子團水可能對生物體產生的影響。

三、原理介紹

(一) 小分子團水

1. 水分子團 (water cluster)：是由鄰近水分子的不連續氫鍵所形成之水分子聚合物，此單位結構不斷劇烈變化，存在於水的各種形式中，通式為 $(\text{H}_2\text{O})_n$ ， $n=2\sim 1000$ 。近年來水分子團逐漸受到重視，因為人們意識到水分子能自發性的形成聚合物，而不是各向同性的無序物質，這或許能解釋水的許多反常性質，例如密度不完全遵守熱脹冷縮的規律等。然而至今的相關實驗仍無法證實諸多問題，多局限於理論層面，可見人類目前對水分子團所知甚少，是一尚未解決的化學問題。
2. 小分子團水的定義：不同研究對小分子團水的定義並未統一，本實驗選擇參考論文 (S. Acosta-Gutiérrez *et al.*, 2011)，以自來水的水分子團中所含之水分子數量作為標準—當通式中的 $N < 15$ 即為小分子團水。由於細胞膜上的水通道非常狹窄僅 2nm 寬，更有人將小分子團水定義為直徑 $< 2\text{nm}$ 的水分子團。然而平常飲用的自來水的水分子團平均直徑為 2.6 nm，顯然也並不符合這個標準。

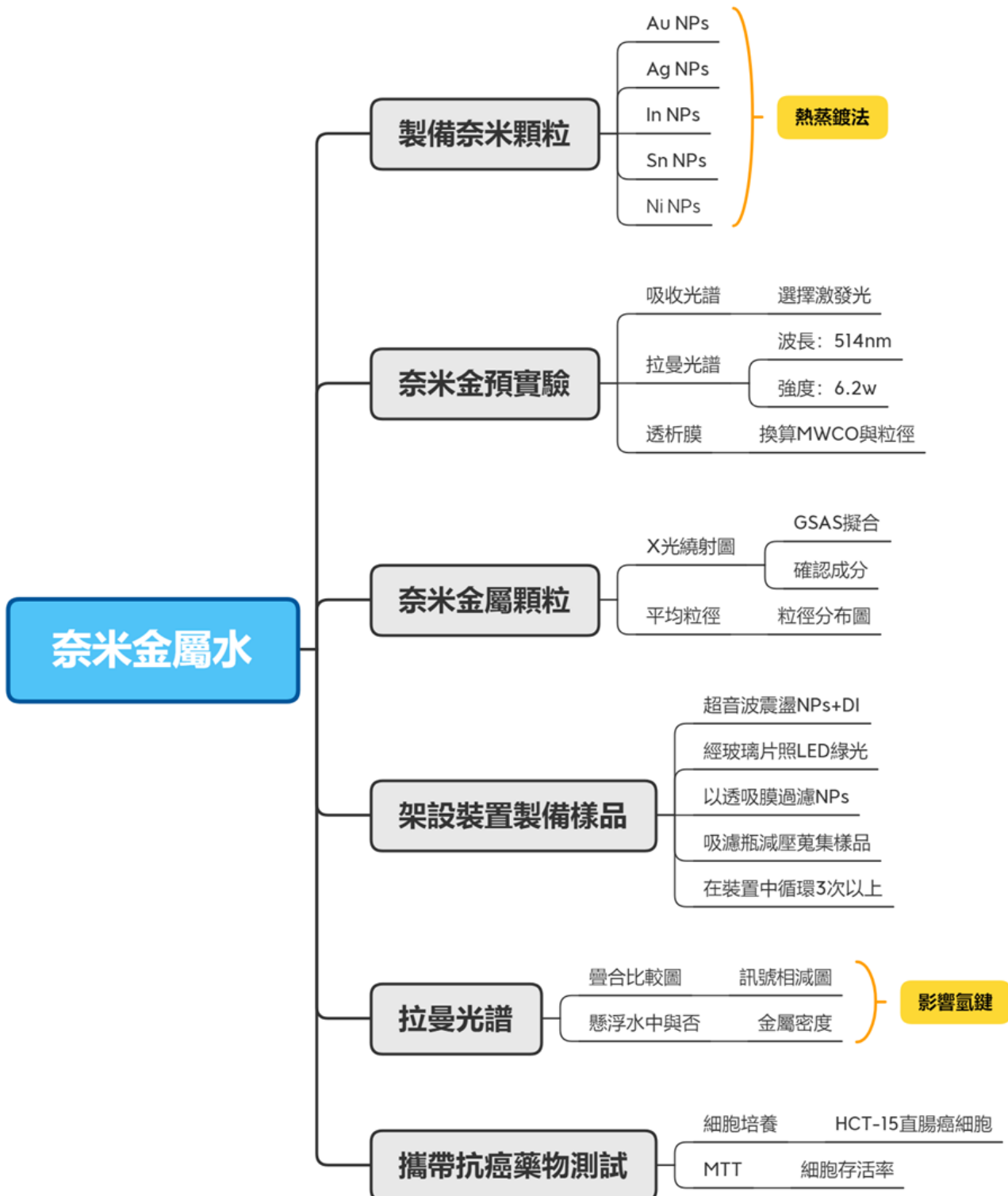
3. 檢測方式：目前使用過的方法包含 X 光繞射 (X-ray diffraction)、電介質光譜 (dielectric spectroscopy)、線性與非線性光譜 (linear and nonlinear spectroscopy)、拉曼光譜 (Raman spectroscopy) 及核磁共振波譜法 (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) 等。
4. 特徵與應用價值：幫助細胞成長與修復並供應養分、延長細胞壽命。目前科學界公認小分子團水是人體健康與長壽的泉源，其功效可反映在許多知名長壽村中。
 - ① 滲透力強：有助於生物細胞吸收養分、使細胞留住水分。
 - ② 溶解力好：代謝細胞內毒素增強免疫力、富含礦物質與微量元素 (因此為弱鹼性，PH 值 7.2 ~ 8.5)、高活性、高溶氧量。

(二) 表面電漿共振效應 (Surface plasmon resonance, SPR)：當金塊縮小成奈米顆粒大小時，它的顏色會由黃色變為酒紅色，光學性質有了很大的變化，部分波長的光音寬化會被吸收，這正是受到表面電漿共振效應的影響。

1. 原理：奈米顆粒的金屬原子間有非定域性電子，他們會均勻分布於整顆奈米顆粒，因此可將金屬原子視為由電子海中和正離子陣列所組成。電子受到光的電磁場擾動後會瞬間極化，造成分布不均而產生密度的差異。電子密度低的區域即代表有較多正離子，會因庫侖引力而吸引電子。然而若聚集過多的電子，又會因庫倫斥力導致電子互相排斥再度遠離，造成密度降低。如上所述的電子密度變化形成集體的縱向振盪。因此，當金屬吸收特定波長激發光時，非定域電子會以特定頻率在表面振盪。隨著波的建設性疊加，奈米金屬顆粒表面會產生相同頻率的振盪，這種現象就稱為「表面電漿共振」。不同種類、形狀、大小的奈米金屬顆粒，都會因表面電漿共振而產生不同於原本的顏色。
2. 實驗應用：根據參考論文，SPR 產生的熱電子能使水的氫鍵鍵結被弱化，從而水分子團變小，利於生物組織吸收。本實驗將利用光源激發奈米金屬顆粒的表面電漿共振效應，弱化水的鍵結氫鍵，以快速製造小分子水。

貳、研究過程

一、研究流程圖



二、研究設備及器材

(一) 設備

熱蒸鍍機	X 光繞射儀	拉曼光譜儀	吸收光譜儀
超音波清洗機	真空幫浦	螢光光譜儀	恆溫培養箱

(二) 器材

透明玻璃片	鋁箔紙	LED 綠光燈條	Ni 金屬原料
Au 金屬原料	Ag 金屬原料	In 金屬原料	Sn 金屬原料
DI Water	鐵架	點滴	吸濾瓶
Cellu · Sep T1 透析膜	50 微米隔板	漏斗	培養皿
RPMI powder	NaHCO ₃	Cisplatin (CDDP)	HCT 15 直腸癌細胞
NaOH	HCl	MTT reagent	DMSO

三、研究方法與步驟

(一) 熱蒸鍍法的原理與注意事項

1. 將 chamber 抽真空（可加 Ar gas）並倒入液態氮降溫：使蒸氣原子沒有足夠能量與其它金屬顆粒鍵結或與空氣產生化學反應，也有助於蒸氣分子離開金屬材料。
2. 將金屬材料加熱至熔點：讓直流電通過鎢舟，加熱其乘載的金屬。當材料達到熔點蒸發後，收集板上會凝結成一顆顆微小的粉體，此為實驗所用之奈米顆粒。

(二) X 光繞射分析晶體結構及粒徑

1. X 光繞射原理：X 光繞射 (X-ray Diffraction, XRD) 是最常用來分析固體結構的方法。X 光波長範圍大約是 0.01 到 10 nm，可發生光柵繞射。當 X 光射入晶體時，會在特定角度產生建設性的繞射峰，是研究晶體原排列的重要方法。可以利用 (式 1) 計算晶面間距，進而推算出晶格常數。其中 d 為晶面間距， θ 為繞射角， n 為繞射級數。
2. 使用儀器：本實驗使用型號為 Bruker D8-Advanced 的 X 光繞射儀，以 40kV 加速電子撞擊銅靶材，造成特徵波長分別為 $K_{\alpha 1} = 1.5406 \text{ \AA}$ 與 $K_{\alpha 2} = 1.5444 \text{ \AA}$ 兩道 X 光。

$$n\lambda = 2d\theta \quad (\text{式 1})$$

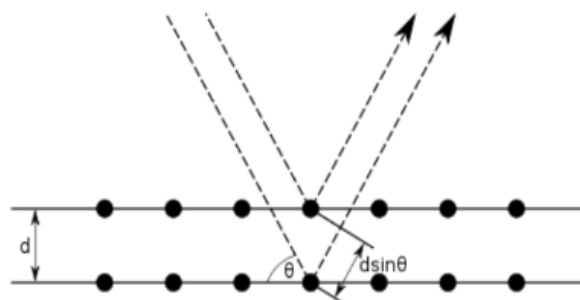
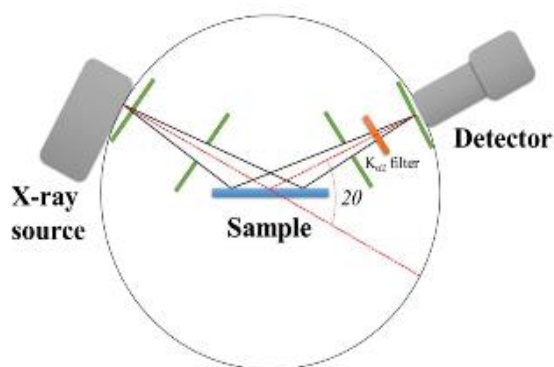


圖 1：標準 Bragg-Brentano 反射式架構

圖 2：滿足布拉格定律之 X 光示意圖

3. X 光繞射儀操作步驟：

- (1) 將做好的樣品磨成極細粉末，以一直線均勻放置於載物台上，如圖 7。
- (2) 調整 X 光以不同的角度入射樣品，如圖 8。
- (3) 入射光束射入樣品後會產生繞射峰，電腦中會輸出原始數據。

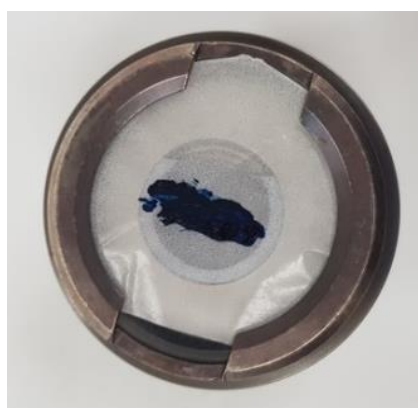


圖 3：樣品均勻放置於載物台

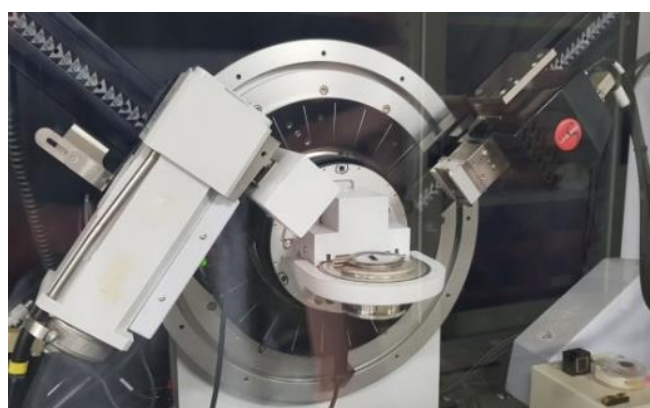


圖 4：調整 X 光入射角度

(三) 反射式拉曼光譜 (Raman Spectra)：屬於振動光譜 (Vibration Spectra) 的一種。

1. 原理：以固定波長的雷射光源激發樣品分子，當激發光與分子作用，光子可能在與其碰撞后發生能量交換，進而將一部分能量傳遞給了樣品分子（或從樣品分子獲得一部分能量）。光的頻率會因此改變，而此變化就稱為拉曼位移 (Raman shift)。由於位移的多寡不會因為雷射波長而改變，拉曼光譜可以用來了解分子鍵結與結構。
2. 使用儀器：本實驗使用 JOBIN YVON T64000 Micro-Raman Spectrophotometer，探測器使用 CCD 感光耦合元件 (Charge-coupled Device)，雷射光波長為 514.5 nm，由兩個全向光柵 (holographic grating, 1800 grooves / mm) 進行分光。

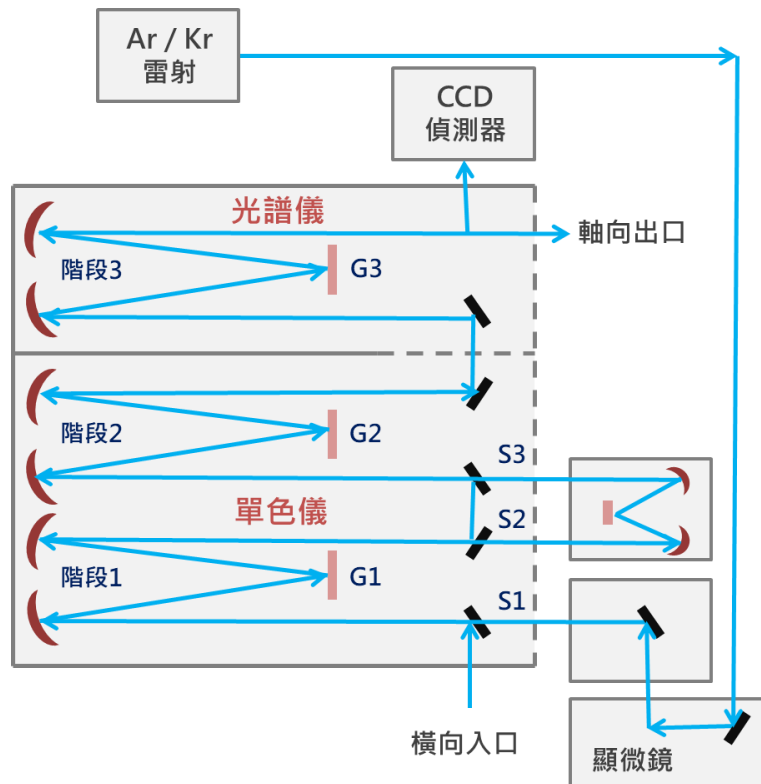


圖 5：拉曼光譜儀基本架設圖

(四) 穿透式吸收光譜：樣品的吸收度與波長或頻率的對應關係圖就是所謂的吸收光譜。

1. 簡介：吸收光譜法則是將電磁波通過待測樣品，然後測量電磁波被吸收的程度與波長或頻率的對應關係。在吸收光譜法中，通常以透光率（transmittance，符號 T）或透光百分率（percent transmission，符號 %T）與吸收度（absorbance，符號 A），來表示光被吸收的程度。
2. 使用儀器：其中光源可選擇鎢鹵燈(可見光)和氬燈(紫外光)，三段光柵根據需求做選擇，大致上可以涵蓋紅外光區到紫外光區，本實驗量測波長範圍 500 ~ 1600 nm，偵測器為光電倍增管(PMT)設置電壓 600 V。

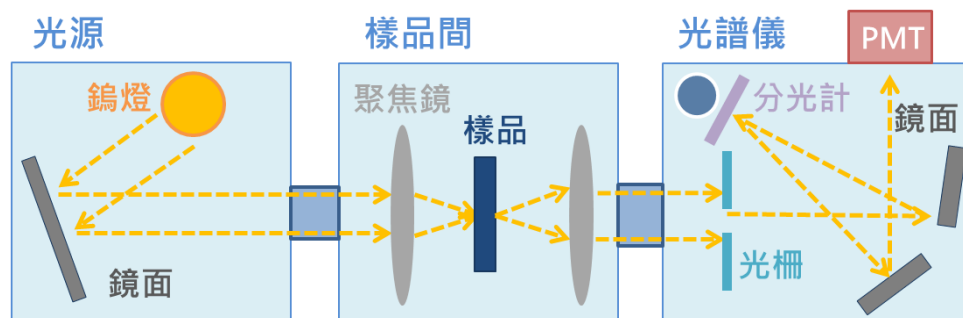


圖 6：吸收光譜儀架設圖

3. 計算樣品的吸收度 (Absorbance)：量測載體或溶劑和樣品的原始光強度 (此設備套裝軟體能自動扣除背景值)，再利用比爾定律 (Beer's law)，式，計算樣品吸收度。

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (\text{式 4})$$

(五)以 AuNT water 培養細胞 (cell culture)：是一種現代生物學技術，將真核生物或原核生物細胞培養在受控制的狀態下，使其生長。我們培養 HCT-15 直腸癌細胞於 12-well 的培養皿中，觀察使用小分子水及 DI H₂O 配置 medium、小分子水及 DI H₂O 配置藥品 CDDP (cisplatin) 經過 24、48 小時後的存活率 (MTT)，希望測試小分子水是否能更輕易進出細胞通道。

(六)細胞存活率分析 (MTT Assay)

藉由判斷試劑顏色的變化情形了解細胞的存活率與繁殖情形。MTT 試劑為一種黃色的化合物 (四唑鹽，全名 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)，經過粒線體中的琥珀酸脫氫酶(SDH)和細胞色素 C 還原後會形成紫色的甲臍 (formazan) 結晶，如圖。不容於水的甲臍結晶需以 DMSO 溶解，再利用液體的吸光度評估細胞存活率。由於甲臍結晶的生成量與活細胞 (粒線體) 數目成正比，液體顏色越深表示細胞存活率越高。

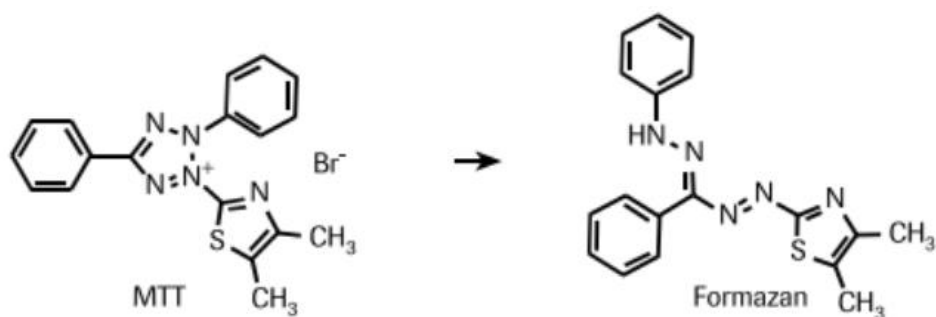


圖 7：細胞代謝產生甲臍的反應圖

參、研究結果與討論

一、以熱蒸鍍法製備奈米顆粒

本實驗利用氣相冷凝法共製備 Ni、Sn、Au、Ag、In 五種金屬之奈米顆粒。熱蒸鍍機是向中央大學奈米物理實驗室借用，金屬原料來自實驗室。根據 X 光繞射圖，其中部分原料含有少量金屬氧化物，推測應是長期存放所產生。

(1) 熱蒸鍍機操作步驟如下圖：

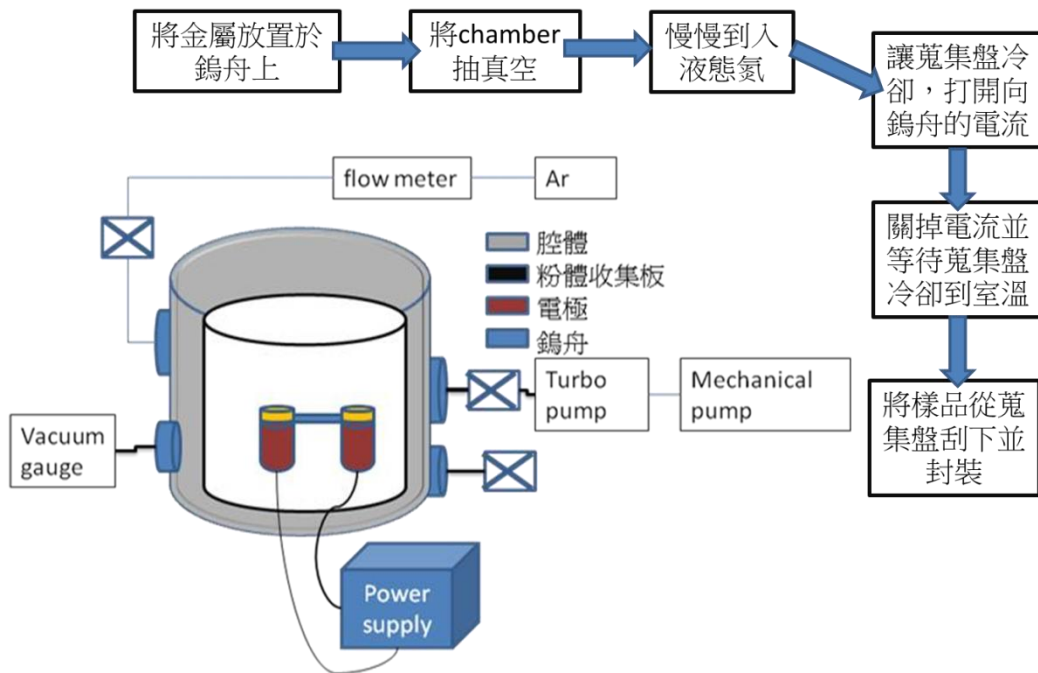


圖 8：熱蒸鍍流程圖



圖 9：清潔收集盤



圖 10：倒入液態氮



圖 11：加熱鎢舟



圖 12：奈米顆粒形成

(2) 樣品蒸鍍參數固定如下表：

Ar 壓力 (torr)	電流 (A)	Au 製備量
1	70	0.2 g

二、以金奈米顆粒作為預實驗

實驗剛開始選擇製備的金奈米顆粒是因其表面電漿共振效應最常被拿來應用。以熱蒸鍍法製備好樣品後，及將其以 X 光繞射儀掃描。而我們須確認的是：①金奈米顆粒的吸收峰值(為了知道要以哪種光源激發其表面電漿共振效應) ②量測 DI water 的拉曼光譜圖時，激發雷射的強度和波長是否影響水的氫鍵鍵結。接下來會解釋我們的實驗與發現。

1. 簡介 GSAS (General Structure Analysis system)：我們利用此結構精算軟體擬合 X 光繞射譜圖。透過此軟體，得以確認附著於玻璃上的樣品只有金奈米顆粒，並無其他分子或附帶生成的化合物。

(1) 分析重點：①繞射峰的精確位置(帶入布拉格公式計算)，②繞射峰的相對強度(與結構因子的平方成正比)，③繞射峰半高寬(與粒徑大小有關)。

(2) 實際操作介面重點簡介：

File Options Powder Xtal Graphs Results Calc Import/Export																							
expnam		exptd		genes		powpref		powplot		lstview		liveplot											
LS Controls			Phase			Histogram			Scaling			Profile			Constraints			MD Pref Orient			SH Pref Orient		
Phase: 1		Replace		title: from C:/gsas/MyWork/CIF/NaFeFe(CN)6.cif																			
Add Phase		A		a 10.204704		b 10.204704		c 10.204704		Edit Cell		Refine Cell											
				α 90.0000		β 90.0000		γ 90.0000		Cell damping													
B	name	type	ref/damp	C			fractional coordinates (z*)	Mult	D	Occupancy	E		Uiso										
1	C1	C	0 0 0	0.178729	0.000000	0.000000	24	0.7930	0.02500														
2	Fe1	FE	0 0 0	0.000000	0.000000	0.000000	4	0.7930	0.05750														
5	N1	N	0 0 0	0.281028	0.000000	0.000000	24	0.7930	0.03069														
6	O1	O	0 0 0	0.308883	0.000000	0.000000	24	0.2070	0.02500														
4	Na1	NA	0 0 0	0.250000	0.250000	0.250000	8	0.5030	0.07670														
7	O2	O	0 0 0	0.250000	0.250000	0.250000	8	0.2432	0.02941														
3	Fe2	FE	0 0 0	0.500000	0.500000	0.500000	4	1.0000	0.01635														

A. 單位晶格邊長，a=b=c

B. 樣品包含原子種類

C. 原子位置 (X 軸可擬合)

D. 原子在晶格中占的比率

E. Uiso (溫度造成的誤差)

→ 圖 13 : Phase 介面

(3) 計算平均粒徑：斯瑞爾公式 (式 6) 中，B 為峰寬，K (斯瑞爾常數) 與選擇的峰有關， λ 為 X 射線波長，L 為粒徑 (非單位晶格大小，而是很多單位晶格堆疊後的大小)， $\cos \theta$ 的角度為該峰形成的位置 (看 X 軸，計算時一律要將數據轉成弧度計算)。利用這個公式，我們可以轉換成計算樣品平均粒徑 d 的公式 (式 7)。其中 W 表示半高寬 (FWHM)，而常數 K 在此為 0.89，X 射線波長則為 1.54 奈米。

$$B(2\theta) = \frac{K\lambda}{L \cos \theta} \quad (\text{式 2})$$

$$d(2\theta) = \frac{K\lambda}{W \cos \theta} \quad (\text{式 3})$$

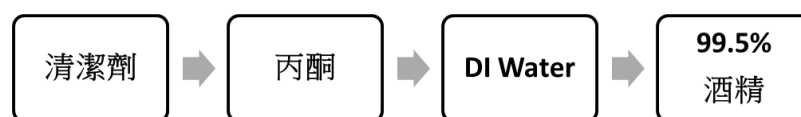
(4) 粒徑分布圖：用於了解奈米顆粒粒徑分布的機率，可由多筆數據得到樣品最可能的粒徑為何，繪圖時須將前面得到的平均粒徑帶入計算。

2. 利用穿透式吸收光譜儀測試金奈米顆粒的吸收峰值

(1) 原理：金奈米顆粒吸收波段大概位於波長 500 ~ 600 nm 之間，實驗中使用的鎢燈的光源波長範圍配合光柵可分段量測可見-紅外光區波長範圍 350~1500 nm，其中 350~800 為一段，750~1500 nm 為第二段，中間重複波段 50 nm。奈米顆粒在粒徑小到一定程度時，會因吸收光區藍位移而失去金屬光澤呈現黑色。

(2) 操作方式：

- ① 熱蒸鍍時，要先以鋁箔將透明玻璃片以鋁箔紙固定於 chamber 上方的蒐集盤上。
- ② 由於奈米顆粒會直接鍍在玻璃片上，玻璃片必須經過透徹清洗。我們將玻璃片於以下四種液體分別超音波震盪 15 分鐘，順序如下：



- ③ 鍍有奈米顆粒的玻璃片即可利用圖中鐵片支撐，架設於左圖中的鐵片，並置於吸收光譜儀的光源與 PMT 偵測器之間，以鎢燈為光源。



圖 14：架設玻璃片用的鐵片



圖 15：奈米金屬顆粒的鍍膜玻璃

- (3) 結果：由圖來看，在波長 500~550nm 有明顯最大吸收峰值，而樣品本身目視顏色亦發生變化。吸收光譜圖之可見光區最大吸收峰值作為最可能引發表面電漿共振之激發光源，所以我們選擇了最接近的 LED 綠光做為光源。

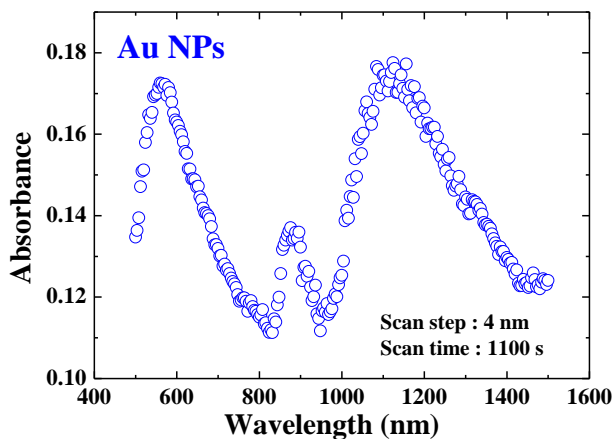


圖 16：金奈米顆粒之吸收光譜圖

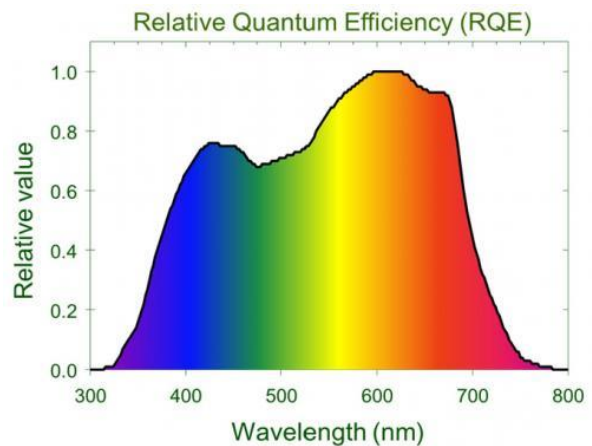


圖 17：可見光之吸收峰值

3. 測量 DI water 拉曼光譜激發雷射的強度和波長

- (1) 波長：根據論文（楊昌璇 *et al.*, 2016），在波長 514 nm 的雷射下 DI water 的拉曼光譜區較少螢光訊號的干擾，我們於是選擇了 514 nm 雷射來弱化氫鍵鍵結。
- (2) 強度：我們發現雷射光強度對 DI water 的拉曼光譜有關鍵性的影響。雷射強度降至 6.9 mW 以下時，拉曼光譜圖即不再改變。比對參考論文的 DI water 氫鍵組成分布對應拉曼光譜圖，可看出在雷射強度 6.9 mW 以上時，高氫鍵鍵結數區域貢獻變少，而低氫鍵鍵結數區域貢獻提高，表示氫鍵鍵結因雷射強度提高到一定程度後會被打斷。為了確保氫鍵組成分布不受雷射影響，本實驗使用 6.2 mW 作為拉曼光譜儀之雷射強度。

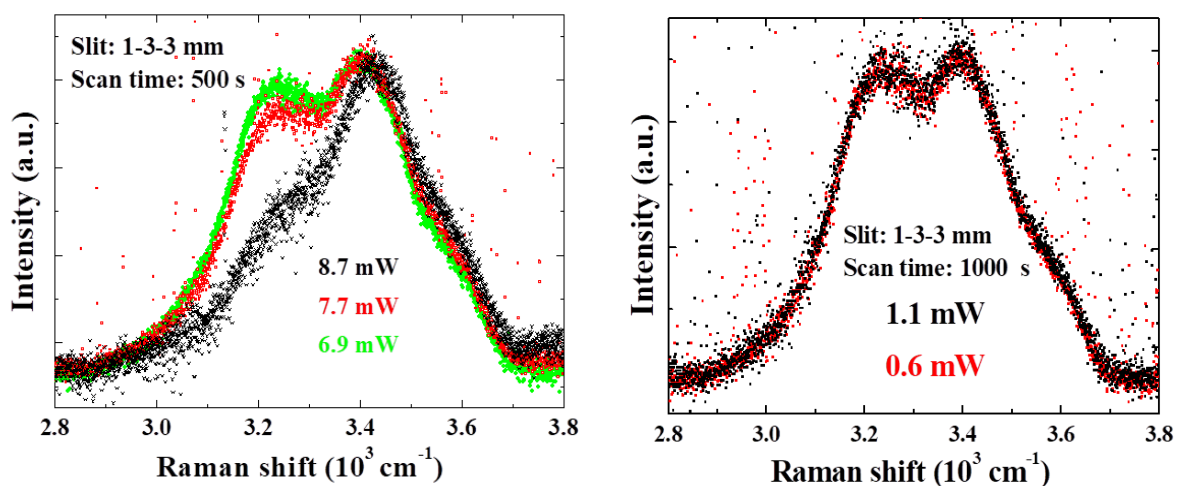


圖 18：右圖為 DI water 使用強度 6.9 mW 以上（顏色對照強度）雷射做反射式拉曼光譜比較圖
左圖為 DI water 使用強度 0.6mW (6.9 mW 以下) 雷射做反射式拉曼光譜圖

4. 測試透析膜能否過濾奈米金顆粒

- (1) 透析原理：透析是將小分子和大分子分離的一種技術。由於分子會由高濃度擴散到低濃度，將帶透析的液體置於據分子大小選擇性的透析膜中，即能進行物質交換。其中大分子將被保留在膜中，而小分子則會被移除。欲實驗本實驗利用透析膜的特性，將奈米顆粒留存在糖果狀的透析膜中，而氫鍵已弱化的去離子水則會滲出。
- (2) 透析膜型號：Cellu · Sep T1 / Nominal MWCO：3,500 (NO. 5015-46)，如圖。



圖 19：Cellu · Sep T1 透析膜



圖 20：測試奈米顆粒能否通過透析膜

- (3) 單位換算：載留分子量 (Molecular Weight Cut Off, MWCO) 是用來評估透析膜孔洞大小的單位，其定義為經 17 小時透析後能保留的 90%以上的分子量大小。不過要注意的是，「選擇的透析膜 MWCO 大小應 \leq 欲保留分子的 MW (分子量) $\div 3$ 」。於是我們參考一家美國知名奈米科技公司 NanoparTz 的網站，推估 MWCO 為 3500 的透析膜能保留多大粒徑的奈米顆粒，計算方法如下：

$Surface\ area = 4\pi r^2$
$Volume = (4/3) \pi r^3$
$Wt\ of\ one\ gnp = Vol\ (nm^3) \times 19.32\ (g/cm^3) \times 10^{-21}\ (cm^3/nm^3)$
$MW\ (kDa) = Wt\ of\ one\ gnp \times 6 \times 10^{23}$

表 1：計算奈米顆粒相關資訊的公式表

粒徑(nm)	分子量(kDa)	表面積(nm ²)	體積(nm ³)	質量(g)
1.8	35.4	10.2	3.05	5.9×10^{-20}

表 2：粒徑為 1.8 nm 的球狀金奈米顆粒計算結果

金奈米顆粒的預實驗中，製備出的奈米顆粒粒徑約為 10 nm，而根據公式

$$MW(kDa) \propto r^3 \propto d^3(nm), \text{ 其中 } r \text{ 為粒子半徑, } d \text{ 為粒徑 (粒子直徑)}$$

如此一來就能利用倍數關係得知我們的奈米金顆粒分子量約為

$$(10 \div 1.8)^3 \times 35.4 \approx 6070(kDa)$$

而透析膜的孔洞大小為 3.5 kDa，欲保留分子大小 $6070 \div 3 \approx 2023$ ，仍舊遠大於透析膜的孔洞大小，可見其應能有效透析奈米金水，除了粒徑之外的唯一變因就是金屬本身的密度了，而其他金屬奈米顆粒的分子量計算結果如表 3，除了奈米鎳的分子量較小，其餘奈米顆粒皆無法通過透析膜孔洞，能有效過濾去除。

金屬奈米顆粒	密度(g/cm ³)	粒徑(nm)	分子量(kDa)
Ag	10.5	20	26391
In	7.3	54	10216
Sn		71	23189
Ni	8.9	14	217

表 3：推算金屬奈米顆粒的分子量

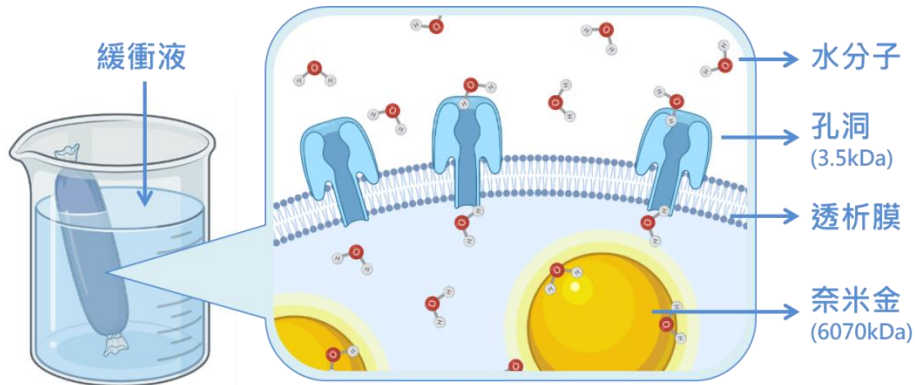


圖 21：奈米金顆粒無法通過透析膜孔洞示意圖 (Created with BioRender.com)

(4) 預實驗步驟：

- ① 將透析膜一端以細綿繩綁住後，滴入奈米金水，再將另一端也綁住並懸掛於吸濾瓶的瓶口，利用抽氣減壓加速透析。
- ② 一次過程需費時 2 天，糖果狀透析膜外是緩衝液，每 12 小時需要替換一次。
(如第 17 頁所述，此步驟也會重複三次，所以共有 6~7 天是在進行透析。)
- ③ 循環三次會測試緩衝液的拉曼光譜中是否有金奈米顆粒的跡象，以確保透析完成。

三、以 X 光繞射方法分析奈米顆粒

- 說明：大圖即為樣品的 X 光繞射譜圖，插圖則為粒徑分布圖，標示如圖。我們利用 GSAS 擬合最顯著的 1~2 個峰，估算樣品的粒徑分布範圍（也就是各種粒徑在樣品中出現的機率）。
- 繪圖方式：將數據轉成 csv 檔 (Excel 可開啟) 匯入程式 Origin 2020，但須先將角度轉換成弧度。以 Nonlinear Curve 擬合弧度最小的兩個明顯的峰(附錄，公式)，此時要輸入以斯瑞爾關係式 (附錄，公式)得到之平均粒徑，並設定相關限制 (附錄，公式)。結束擬合後開啟 Simulate Curve，用 Lognormal 方程式，即可得到粒徑分布圖。
- 其他註釋：
 - (1) 米勒指數 (hkl)：用以表示晶體中晶面的方向，每個數字用來表示一個維度。公式中，h、k、l 分別表示 x、y、z 軸的晶面走向。圖中顯耀的峰旁邊都有標註，可將繞射峰的位置(角度)帶入布拉格公式得到。
 - (2) 空間群: 用來描述單位晶格中的空間對稱性，標記形式為 A_pq_r ，正方晶系中 pqr 分別描述沿 a、a+b+c、a+b 方向上的對稱性。我們的結構即記做 $Fm\bar{3}m$ ，其中 F 表示面心晶格，m 表示鏡面反射，3 表示旋轉對稱。

(一)奈米金顆粒

圖中只發現 fcc Au 的繞射峰，可確認樣品很純，沒有其他雜質。金奈米顆粒為立方晶系 (Cubic)，空間群為 $Fm\bar{3}m$ ，室溫下晶格常數 $a = 4.05 \text{ \AA}$ 。由粒徑分布圖可知平均粒徑約為 10 nm。

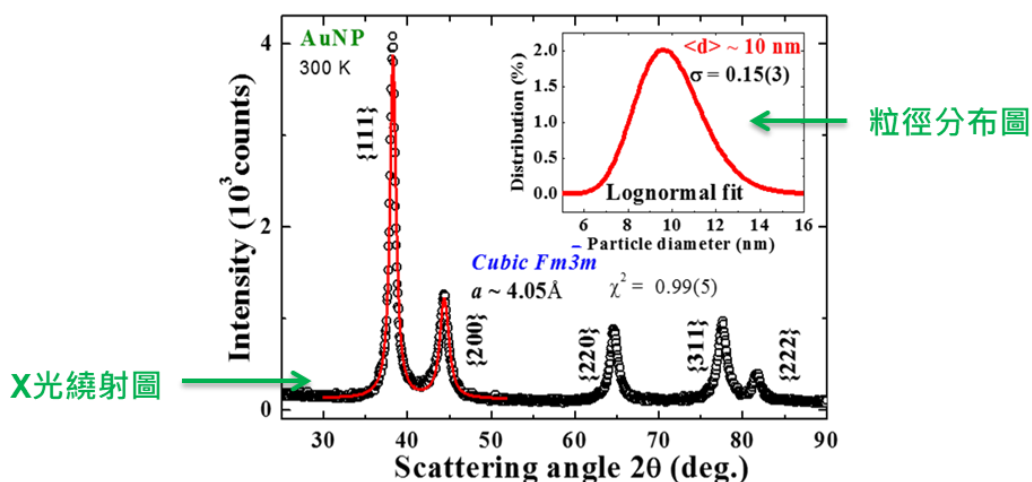


圖 22：金奈米顆粒的 X 光繞射圖與粒徑分布圖

(二) 奈米銀顆粒

銀奈米顆粒的晶體結構也是 Cubic，空間群為 $Fm\bar{3}m$ ，其室溫下晶格常數為 $a = 4.08 \text{ \AA}$ ，在 X 光繞射圖中一樣沒有發現其他雜質，平均粒徑約為 20 nm。

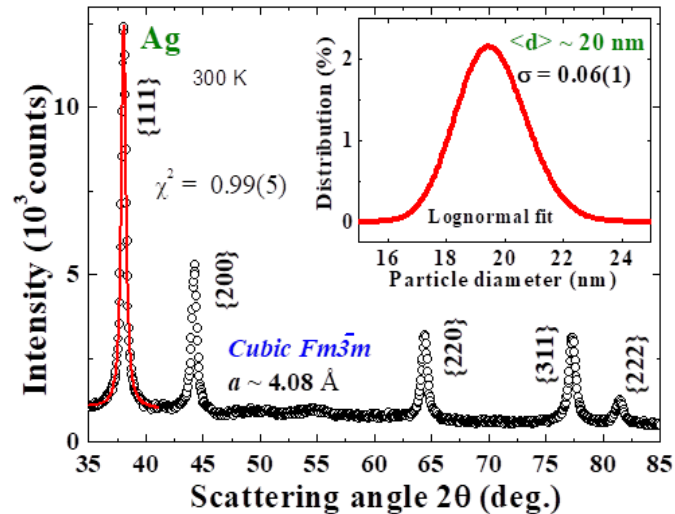


圖 23：銀奈米顆粒 X 光繞射圖與粒徑分布圖

(三) 奈米銮顆粒

銮奈米顆粒的晶體結構為正方晶系(Tetragonal)，室溫下晶格常數為 $a = b = 3.258(4) \text{ \AA}$ ， $c = 4.944(5) \text{ \AA}$ ，空間群為 $I4/nmm$ 。在 X 光繞射圖分析中，還發現了三氧化二銮的繞射峰，佔總質量 32.81%，其晶體結構為 Cubic，晶格常數為 $a = 10.123(1) \text{ \AA}$ ，空間群為 $Ia\bar{3}$ 。分別找出對應的繞射峰作粒徑分析，由兩種元素疊合的繞射峰則先擬合出分別貢獻的峰值，在對所對應的峰值作粒徑分析，銮為 54 nm，三氧化二銮為 12 nm，粒徑分布如圖。

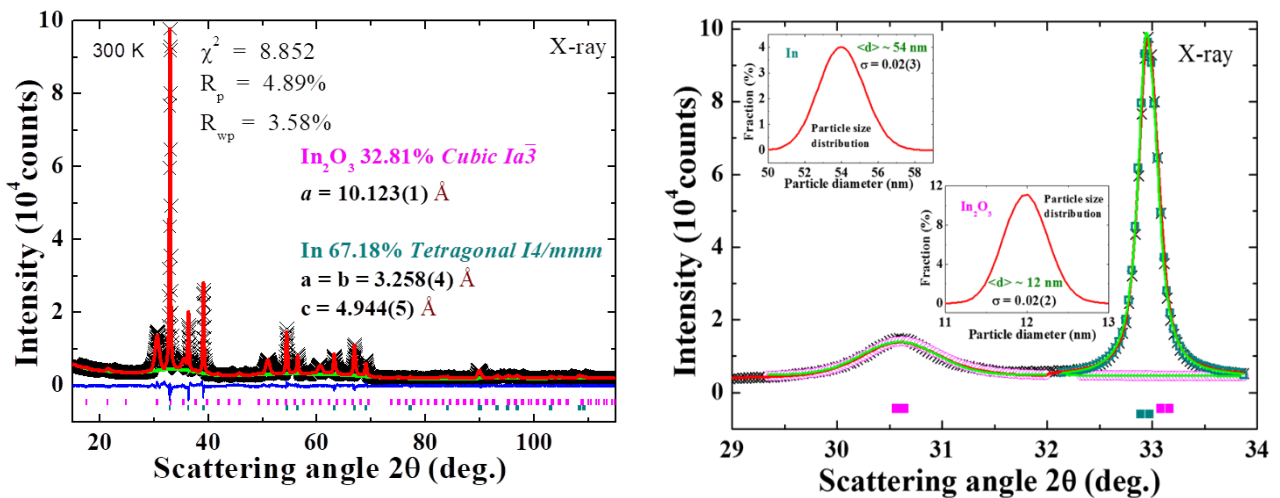


圖 24：銮奈米顆粒與三氧化二銮的 X 光繞射圖(右) 與粒徑分布圖(左)

(四) 奈米錫顆粒

錫奈米顆粒為晶體結構是 Tetragonal，室溫下晶格常數為 $a = b = 5.842(1) \text{ \AA}$ ， $c = 3.787(4) \text{ \AA}$ ，空間群為 $I41/amd$ 。在 X 光繞射圖中，亦發現少量氧化錫的繞射峰，只佔總質量 7.1%，其晶體結構也為 Tetragonal，晶格常數為 $a = b = 3.808(5) \text{ \AA}$ ， $c = 4.845(1) \text{ \AA}$ ，空間群為 $P4/nmm$ 。找出對應的繞射峰分析平均粒徑，錫為 70 nm，氧化錫為 2 nm，粒徑分布示於插圖。

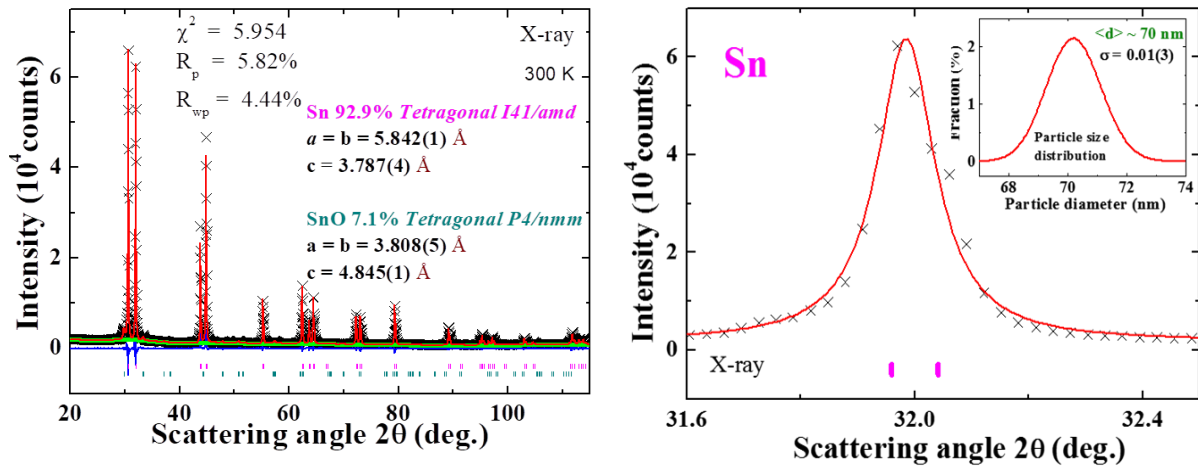


圖 25：錫奈米顆粒與氧化錫的 X 光繞射圖與粒徑分布圖

(五) 奈米鎳顆粒

鎳奈米顆粒晶體結構為 Cubic，室溫下晶格常數為 $a = 3.533(1) \text{ \AA}$ ，空間群為 $Fm\bar{3}m$ ，在 X 光繞射圖中，發現分別佔總質量 77.42%的氧化鎳和 20.62%的氫氧化鎳。其中氧化鎳的晶體結構也是 cubic，室溫下晶格常數為 $a = 4.417(9) \text{ \AA}$ ，空間群同為 $Fm\bar{3}m$ ，氫氧化鎳的晶格常數為 $a = b = 3.129(7) \text{ \AA}$ ， $c = 4.641(6) \text{ \AA}$ 。而鎳與氧化鎳則選定最高繞射峰，先擬合出分別佔有比例的峰值再分析粒徑，得鎳奈米顆粒之平均粒徑約 14 nm，氧化鎳約 3 nm，粒徑分布示於插圖。

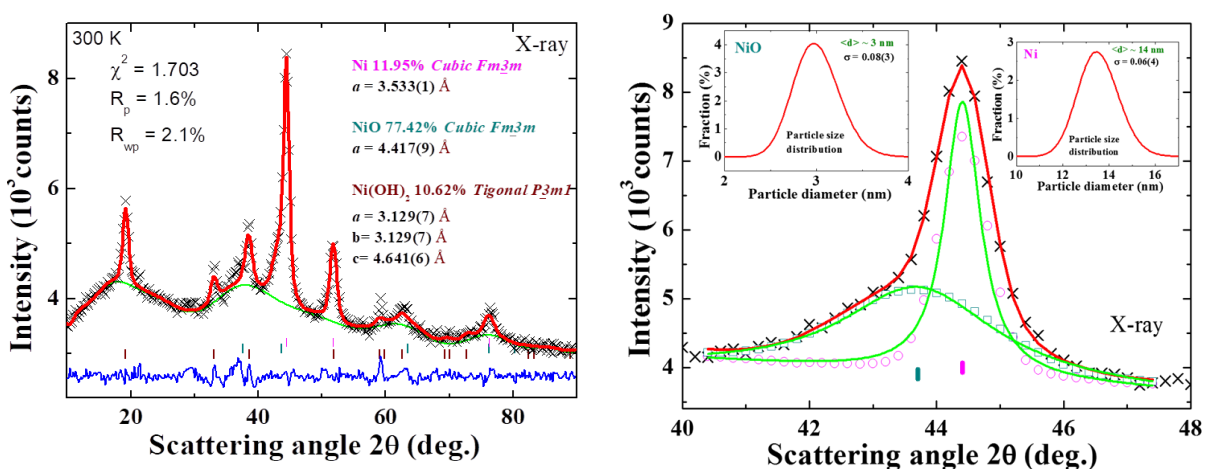


圖 26：鎳奈米顆粒的 X 光繞射圖與粒徑分布圖。

三、架設裝置自製奈米金屬水

1. 簡略步驟：整個流程約費時 8~10 天 (不包含細胞實驗)



2. 實驗步驟

- (1) 秤奈米顆粒 2mg，倒入 10ml 去離子水後將奈米金屬水裝進點滴瓶並以鐵架固定。
- (2) 奈米金屬水由點滴滴入透明玻璃片組合(註 1)，並通過漏斗流入吸濾瓶收集(註 2)。
- (3) 期間以波長 530 nm LED 綠光照射，激發奈米顆粒的表面電漿共振效應。
- (4) 以生物透析膜過濾奈米金屬水中的奈米顆粒(註 3)，以利日後培養細胞。
- (5) 重複步驟 2~4 至少三次，以確保大多數奈米顆粒的表面電漿共振效應都有被激發。
- (6) 完成透析樣品立即用來培養 HCT 15 直腸癌細胞，設計攜帶化療藥物 Cisplatin 的實驗，並進行細胞活性測試。

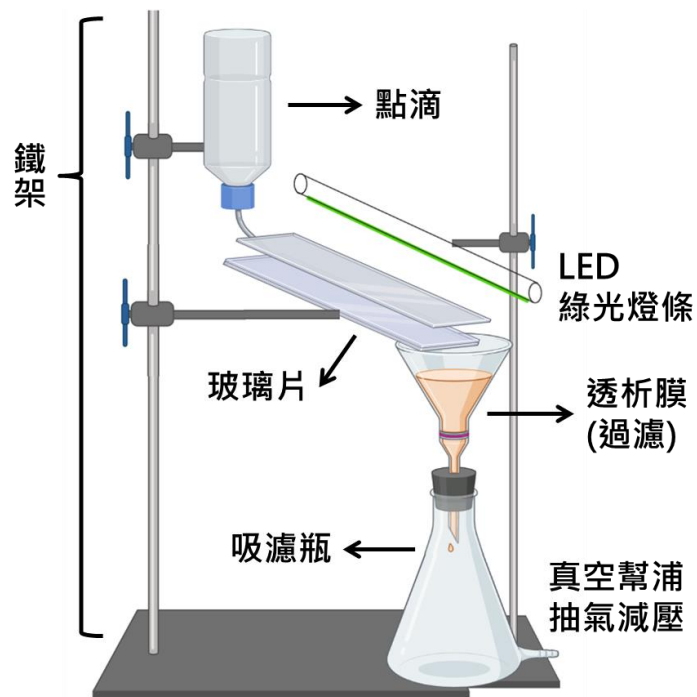


圖 27：製備奈米金屬水裝置示意圖 (Created with BioRender.com)

3. 註記說明

- (1) 透明玻璃片組合方式：使用類似製作液晶盒的方法，將兩玻璃片中間以 $50\ \mu\text{m}$ 的隔板製造間距並將兩側黏合，形成一細小通道，如下圖。

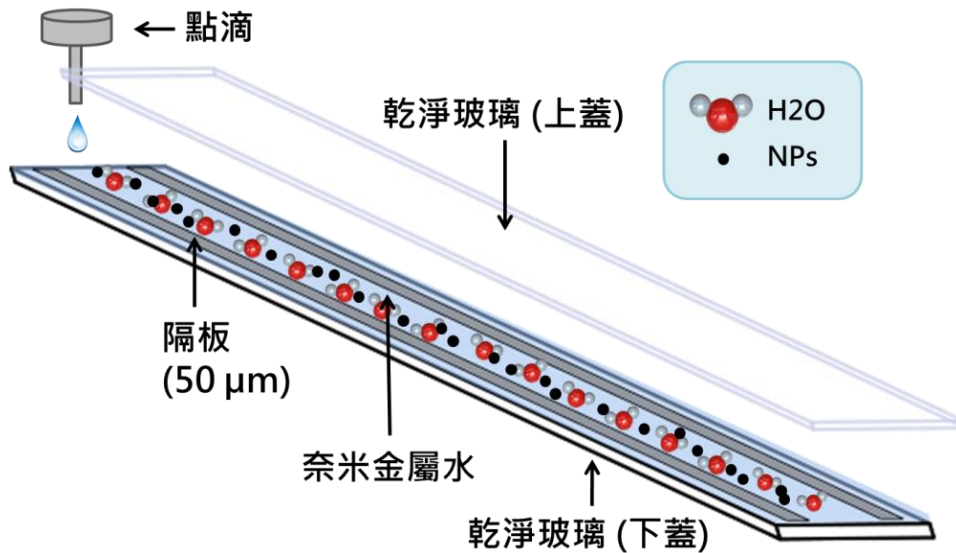


圖 28：奈米金屬水流經透明玻璃片組合

- (2) 使水流流出的動力：重力 + 抽氣減壓（以吸濾瓶連接真空幫浦吸器）產生向下的拉力，造成兩玻璃片間的細小通道發生毛細現象，加快收集速度。
- (3) 以透析膜過濾奈米顆粒：將透析膜鋪在漏斗中，奈米金屬水會在此累積，並利用抽氣減壓的方式減少過濾時間，確認液體進入吸濾瓶即可再次到入點滴，展開三次循環。

四、小分子團水的拉曼光譜

以上述裝置製成奈米金屬水後 (已過濾)，我們會立即測試其拉曼光譜。反射式拉曼光譜儀的雷射強度為 6.2 mW，波長 514 nm，聚焦於液面以下如圖，比對奈米金屬水與去離子水拉曼光譜的氫鍵組成分布是否發生變化。



圖 29：反射式拉曼光譜儀

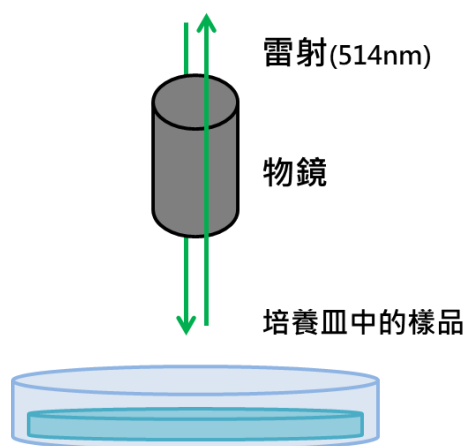


圖 30：雷射聚焦在液面下示意圖

計算時我們假設奈米顆粒均勻分布於水中，將每個奈米顆粒對應多少個水分子的比例以藍字標示於圖中，其計算方法如下：

$$\text{AgNP} : \text{H}_2\text{O} = 1 : \frac{\text{樣品分子量}}{\text{樣品質量}} \times \frac{\text{溶劑質量}}{\text{溶劑分子量}}$$

實驗中皆採用此計算方法，樣品定量 2mg，溶劑為去離子水 10 g。

(一) 金奈米顆粒

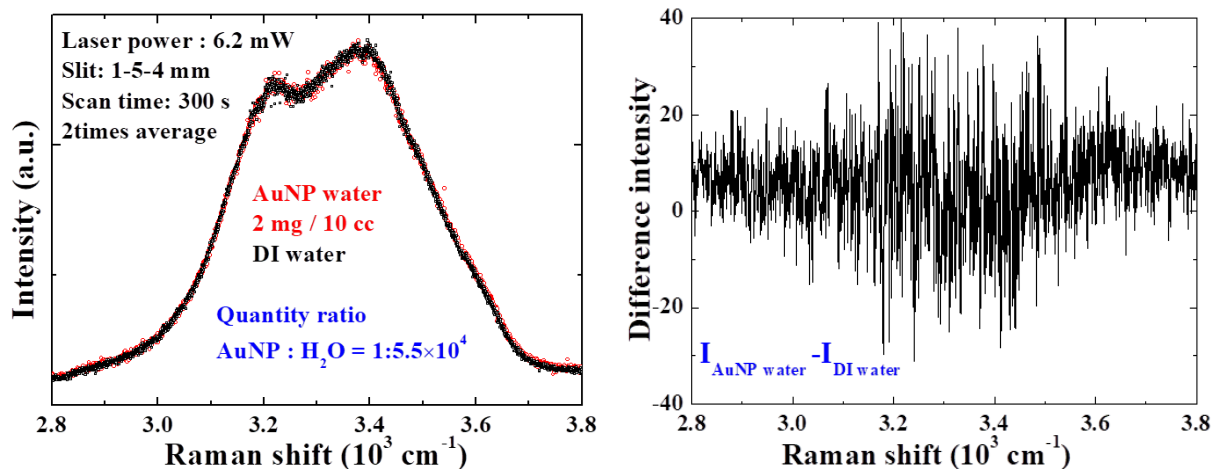


圖 31：右圖為 AuNP water 和 DI water 拉曼光譜疊合比較圖，左圖為 AuNP water 和 DI water 之拉曼光譜訊號相減圖

(二) 銀奈米顆粒

比較 AgNP water 與 DI water 之拉曼光譜圖後，發現有些微變化如圖，但不明顯。反觀金奈米顆粒幾乎未觀察到差異。而金的密度(19.32 g/cm³)比銀(10.50 g/cm³)大，這也是為甚麼我們後來嘗試使用密度更小的奈米顆粒來驗證改變氫鍵組成分布的因素是否為密度。

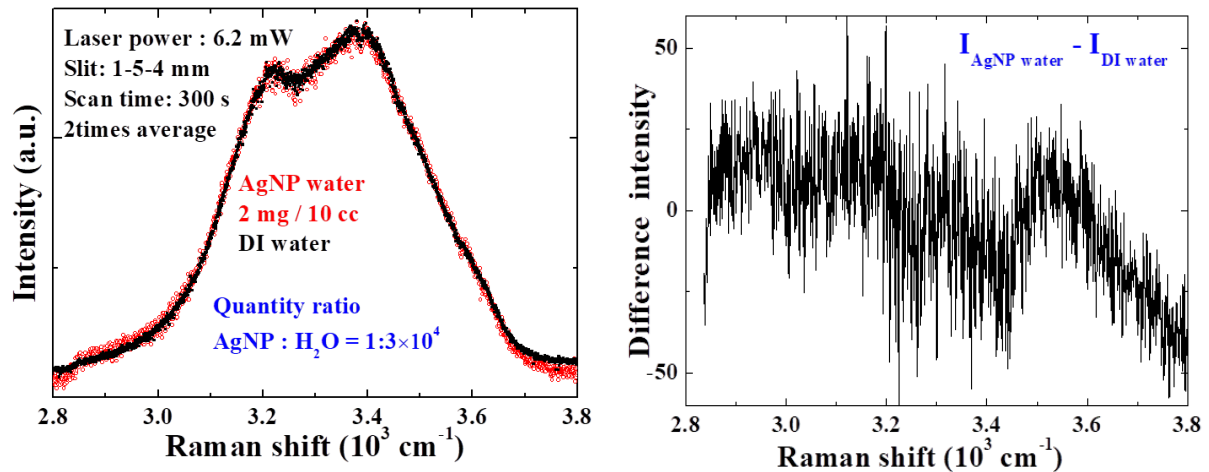


圖 32：右圖為 AuNP water 和 DI water 拉曼光譜疊合比較圖，左圖為 AuNP water 和 DI water 之拉曼光譜訊號相減圖

(三) 銻奈米顆粒

銻奈米顆粒與三氧化二銻兩者密度皆小於銀，其與去離子水的拉曼光譜圖比較可看出在 3.5 Raman shift (10³ cm⁻¹)附近有變化，高波數區貢獻提高，表示氫鍵鍵結有被弱化。

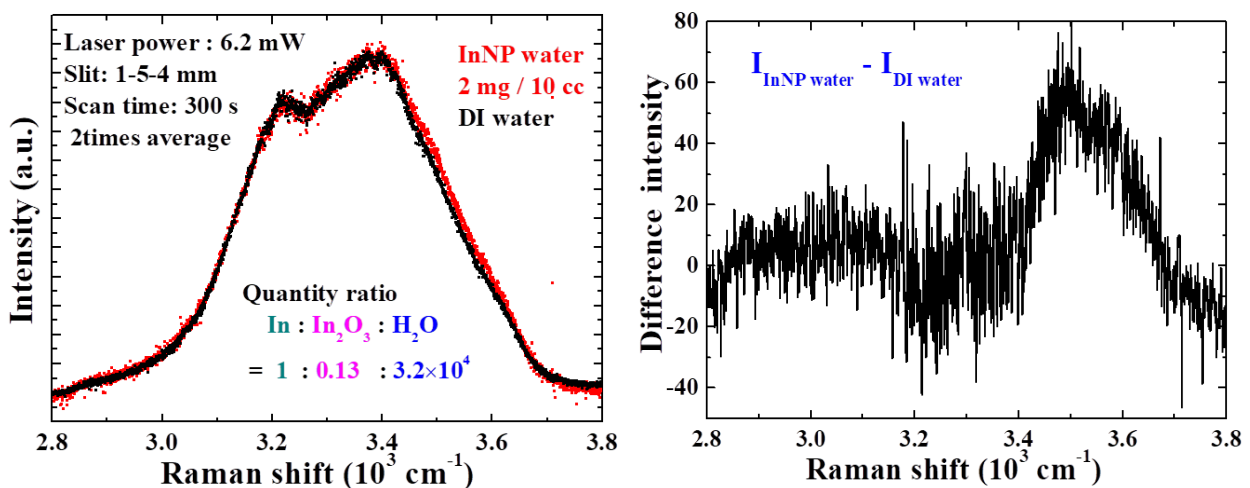


圖 33：右圖為 InNP water 和 DI water 拉曼光譜疊合比較圖，左圖為 InNP water 和 DI water 之拉曼光譜訊號相減圖

(四) 錫奈米顆粒

由於樣品中氧化錫含量很少，所以暫時不考慮。錫的密度 (0.57 g/cm^3) 小於鈾 (0.73 g/cm^3)，其與去離子水的拉曼光譜圖比較可看出在 $3.5 \text{ Raman shift } (10^3 \text{ cm}^{-1})$ 附近有相同變化，高波數區貢獻提高，表示氫鍵鍵結有被弱化，結果如圖。

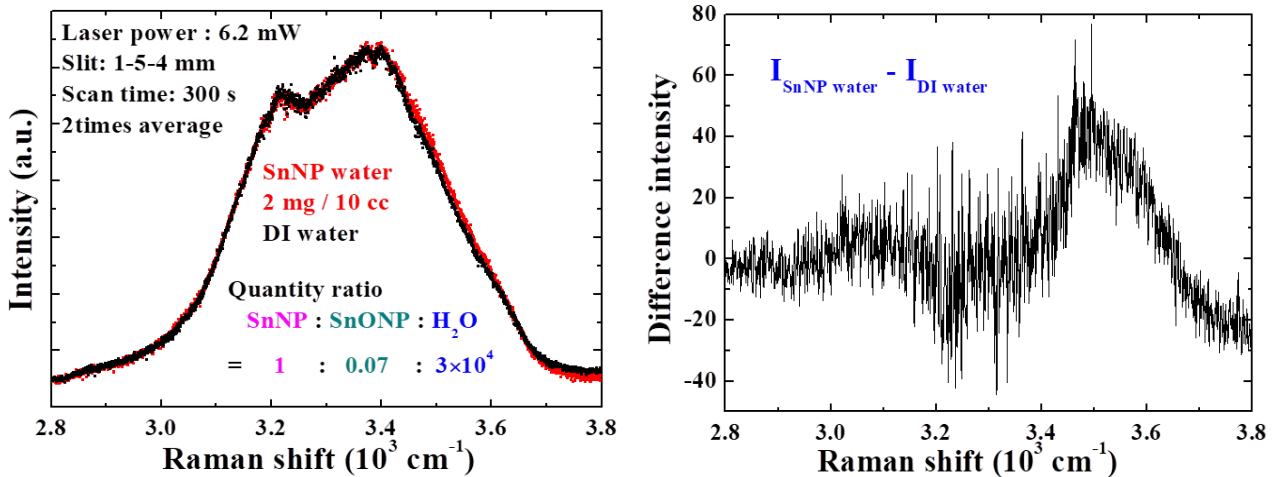


圖 34：右圖為 SnNP water 和 DI water 拉曼光譜疊合比較圖，左圖為 SnNP water 和 DI water 之拉曼光譜訊號相減圖

(五) 鎳奈米顆粒

單獨使用氫氧化鎳製作樣品，並比較其和去離子水的拉曼光譜圖發現沒有明顯差異，如圖。如圖，其與去離子水的拉曼光譜圖比較，可看出在 $3.5 \text{ Raman shift } (10^3 \text{ cm}^{-1})$ 左右亦發生變化，高波數區貢獻提高，表示氫鍵鍵結有被弱化。

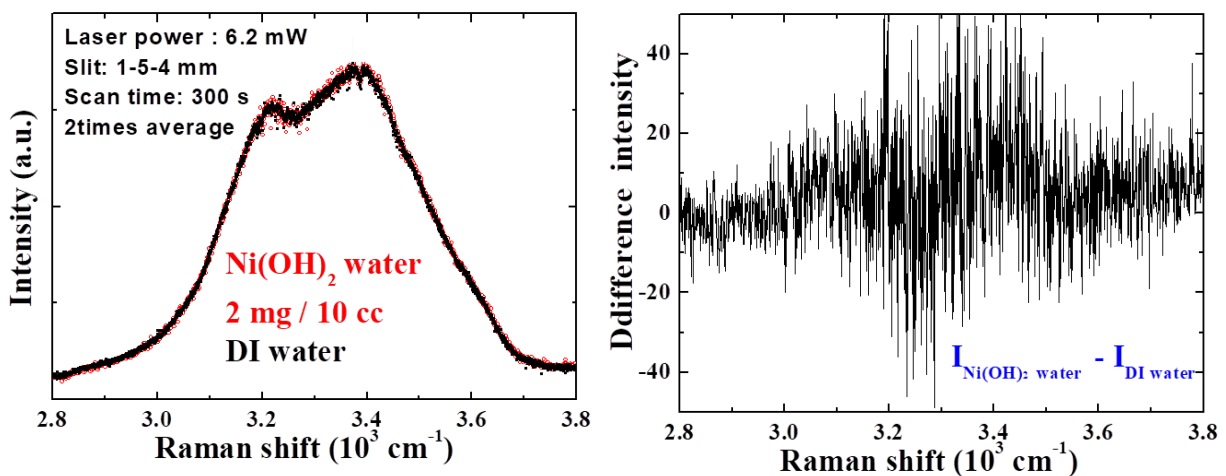


圖 35：右圖為 NiNP water 和 DI water 的拉曼光譜疊合比較圖，左圖為 NiNP water 和 DI water 之拉曼光譜訊號相減圖

五、各奈米顆粒樣品備製小分子團水效率比較

5 種奈米顆粒製備小分子團水效率比較						
顆粒	Au	Ni/NiO	Ag	Sn/SnO	In/In ₂ O ₃	聚苯乙烯 塑膠球
密度(g/cm ³)	19.29	8.81	10.47	5.71	7.28	-
平均粒徑(nm)	10	14/3	20	71/2	54/12	1000
生成小分子團水相對效率	≡1	1.2	7	16	18	<0.2

顆粒：A/B 表示 A 為核殼結構中核的元素成分，B 為殼的化學成分。
 平均粒徑：n/m 表示 n 為核平均直徑，m 為殼平均厚度。
 Au 奈米顆粒生成小分子團水效率設定為 1。

表 4：5 組奈米粒子樣品組成、粒徑、製備小分子團水效率比較。

- 10 nm 金顆粒可用在製備小分子團水，但在所製備的 5 種奈米顆粒中，其效率最低。
- 20 nm 銀顆粒備製小分子團水的效率，為 10 nm 金顆粒的 7 倍。
- 非所預期的是，71 nm 錫顆粒與 54 nm 銲顆粒的效率分別為 10 nm 金顆粒的 16 與 18 倍。
- 液態水分子間，以氫鍵結合，形成小分子團水，在於能減弱或阻斷水分子間的氫鍵。
- 粒徑從 10 到 71 nm 的金屬顆粒，都能減弱或阻斷水分子間的氫鍵結合。
- 聚苯乙烯為高分子聚合物，1 μm 聚苯乙烯顆粒，偵測出微量小分子團水。

六、表面電漿共振及奈米顆粒表面電子氧化還原功效探討增益機制

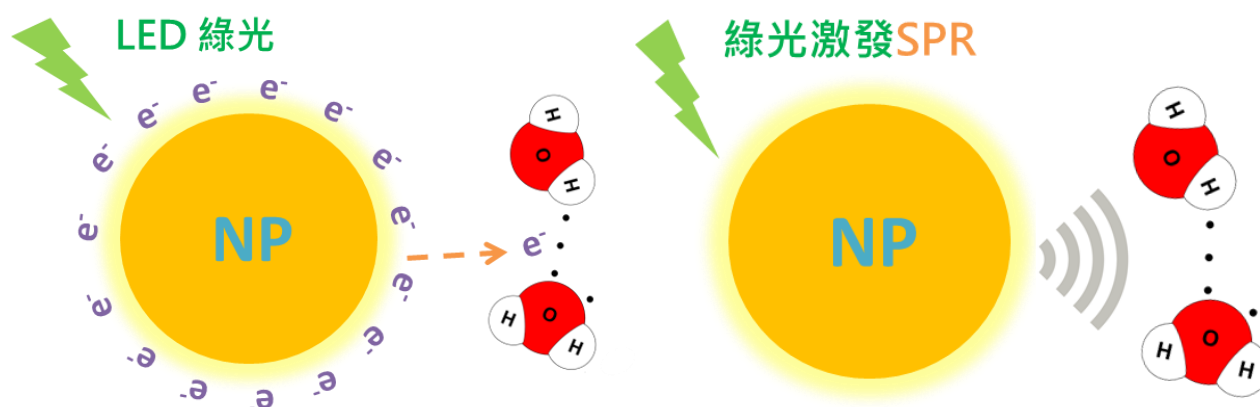


圖 36：奈米金屬顆粒形成小分子團水的機制示意圖。左圖示意奈米金屬顆粒照光釋放電子到水分子間，右圖示意奈米金屬顆粒照光引發表面電漿共振波。

1. 放置奈米金屬顆粒在水中，再以綠光照射，可以啟動兩種作用，減弱或阻斷水分子間以氫鍵結合，形成小分子團水：(1) 氧化電子轉移效應，(2) 表面電漿共振效應。
2. 氧化電子轉移效應：照光自奈米金屬顆粒表面釋放出電子，轉移到水分子間，弱化水分子間的氫鍵結合力。(圖 36 左圖)
3. 表面電漿共振效應：照射綠光，可以引發金屬奈米顆粒表面電子共振，形成表面電漿共振波(surface plasma resonance wave)，傳遞到鄰近水分子間，弱化水分子間的氫鍵結合力，甚或更強化轉移到水分子間電子弱化水分子間的氫鍵結合力。(圖 36 右圖)
4. 金屬奈米顆粒釋放出電子，發生氧化，奈米顆粒維持在丟失電子的氧化態，有助於提升小分子團水的生命期，利於應用。
5. 1 μm 聚苯乙烯，仍然可以釋放出電子，但顆粒較大，無顯著表面電漿共振效應。
6. 照射綠光引發表面電漿共振波，有助於讓釋放出的電子維持在水中較長時間，減小電子返回奈米顆粒，提升小分子團水的生命期。

七、細胞培養與細胞存活率測試

(一) 目的：Cisplatin (Cisplatinum/Platinex, CDDP) 鉑帝爾是一種含鉑金屬化合物的化療藥品，主要是阻斷 DNA 的合成，抑制腫瘤細胞生長。經由實驗處理完的小分子團水以 SnNPs H₂O 有最好氫鍵打斷效能，攜帶藥物進入細胞的能力應較佳，因此如果以 cisplatin 處理藥物，應該會有較高的死亡率。以下的 MTT 實驗，奈米金屬水以 SnNPs H₂O 做處理。

(二) 培養液調配：

1. 將實驗分為 4 組，每一組的培養液內容物如下表 4 所示：

組別	培養液成分
(1) DI H ₂ O	RPMI powder、NaHCO ₃ 、DI H ₂ O
(2) SnNPs H ₂ O	RPMI powder、NaHCO ₃ 、奈米金屬水
(3) DI H ₂ O +cisplatin	RPMI powder、NaHCO ₃ 、DI H ₂ O、cisplatin
(4) SnNPs H ₂ O+cisplatin	RPMI powder、NaHCO ₃ 、SnNPs H ₂ O、CDDP(cisplatin)

表 5：以小分子團水細胞培養實驗各組培養液

註: RPMI 培養液含有生物素、維生素 B12 和 PABA，具有大量磷酸鹽，廣泛應用於特殊造血細胞、正常白細胞、惡性白細胞、淋巴細胞、T 細胞淋巴瘤與雜交瘤細胞的培養。最適 pH 值為 7.0-7.4。

2. 調整 pH 值：使用 pH meter 測酸鹼值，將(1)配置好的試劑控制在 pH7.2~pH7.4，並使用 NaOH, HCl 調配適當到 pH 範圍內。
3. 分裝過濾：分裝入不同 tube 中並使用 filter 過濾去除細菌，最後離心 60 secs 確保試劑均勻混合。

(三) 細胞培養實驗步驟：

1. 將 HCT15 細胞數調整至 2×10^5 。
2. 在設定好的 12-well-plate 孔盤中中加入表 1 培養液及細胞放入恆溫培養箱，不同培養液之細胞活性測試(MTT ASSAY)中培養，待隔日觀察。
3. 過 24 小時，從培養箱中取出 plate，以顯微鏡觀察，再繼續培養。
4. 再隔一日，收 48 小時組，從培養箱中取出細胞盤，以顯微鏡觀察並照相，在通風櫥內抽取廢液，做存活率實驗觀察(MTT)。

(三) 存活率 (MTT) 測定：

1. 於實驗 (一) 中的 12-well-plate 抽乾上清液後，加入 MTT reagent $150 \mu\text{l}$ ，避光靜置 90 分鐘。
2. 加入 $150 \mu\text{l}$ 的 DMSO 於各個 well 中，溶解結晶。
3. 等待 well 中液體逐漸由黃轉為紫色，即送到螢光光譜儀 (fluorescent reader)，設定波長 570 nm，取得吸光度值。

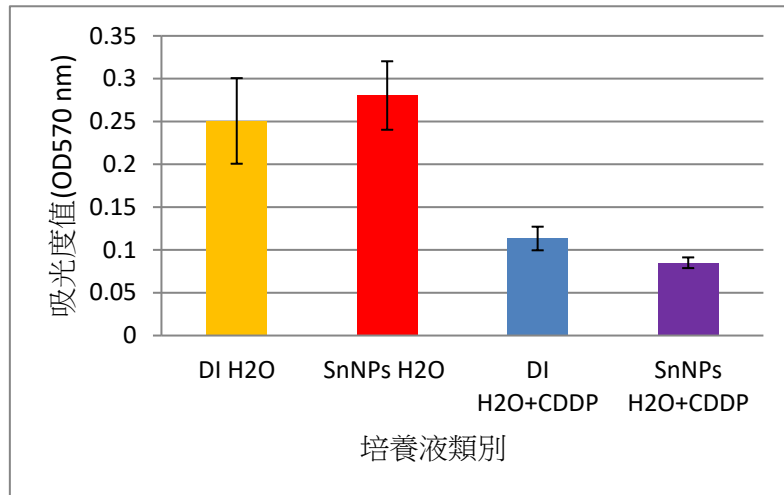


圖 37：4 種培養液的吸收度值比較

(五) 實驗結果：培養 HCT-15 直腸癌細胞時分為以下四組

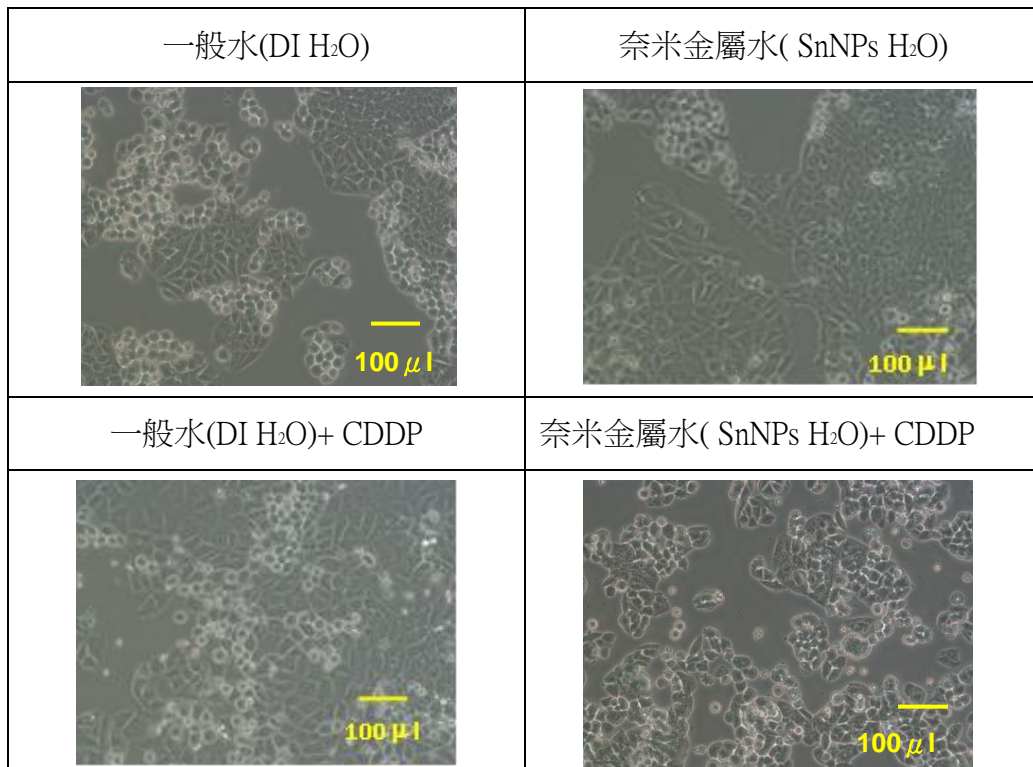


圖 38：生長於不同成分培養液之大腸癌細胞顯微鏡圖

1. MTT 實驗存活率中，比較 DI H₂O、奈米金屬水(SnNPs H₂O)兩組，後者於 570 nm 波長的吸光度較高，代表可以得知後者比前者存活率更好，約為 12%，可以得知奈米金屬水將養分帶入細胞內的效果較好。同理，DI H₂O 加癌細胞藥物 cisplatin(CDDP)、奈米金屬水(SnNPs H₂O)加癌細胞藥物 cisplatin(CDDP)兩組，以後者比前者的存活率低 23%，

得知奈米金屬水將癌細胞藥物帶入細胞內的效果較好，符合實驗預期結果。

2. 顯微相片中如果細胞圓圓聚集在一起的就是生長狀況較不好的樣貌，再來就會細胞凋亡。圖中可見(1)(3)(4)皆有細胞死亡的情形，尤其以加藥物第(4)組奈米金屬水(SnNPs H₂O)+ CDDP，細胞死亡的情形最嚴重，與 MTT Assay 的實驗結果相符合。

肆、結論與應用

一、結論

- (一) 利用熱蒸鍍法成功製備 Au、Ag、In、Sn、Ni 奈米顆粒，並根據 X 光繞射譜圖計算出其粒徑約略分別為 10、20、54、71、14 nm，而製備 Ni 奈米顆粒時生成了較多氧化鎳，其粒徑約為 3nm。
- (二) 事先以金奈米顆粒進行試驗以設計實驗，發現金奈米顆粒粒徑大小變化與顏色變化有正相關，且拉曼光譜的雷射光源強度超過 6.9 mW 後，開始對水的氫鍵組成分布產生影響，因此選擇 6.2mW 的雷射光。
- (三) 成功架設裝置，利用 LED 綠光激發奈米顆粒的表面電漿共振效應弱化水分子間氫鍵。根據樣品的拉曼光譜，密度較小的奈米顆粒加入去離子水中後能較有效影響水的氫鍵組成分布。
- (四) 根據塑膠粒子的實驗結果除了受到金屬密度影響，奈米顆粒之粒徑大小僅須於奈米尺度下即能影響水的氫鍵組成分布。
- (五) 將檢測完畢的樣品培養細胞並進行 MTT 試驗，可以得知奈米錫水(SnNPs H₂O)將養分帶入細胞內的效果較去離子水好，且將癌細胞藥物帶入細胞內的效果也較好，可見奈米金屬水在生物科技方面頗具應用價值。

二、未來展望

- (一) 利用核磁共振波譜法 (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) 檢測樣品。根據論文，檢測數值越小，代表水分子團越小，水乾坤水的檢測數據在 44-77Hz 之間。
- (二) 測量樣品的 pH 值是否為弱鹼性，其與樣品的氫鍵弱化有關。
- (三) 進行光降解實驗，以樣品溶甲基藍，照光後的氧化還反應可能影響使顏色變化。

伍、參考文獻

1. 陳姿蓉，奈米錫顆粒之超導與自旋極化間共存及互競現象，中央大學碩士論文(2008)
2. Chen HC *et al.* 2015 Quantitative evaluation on activated property-tunable bulk liquid water with reduced hydrogen bonds using deconvoluted Raman spectroscopy. Anal Chem. Jan 6;87(1):808-15. doi: 10.1021/ac5039434.
3. Chen HC *et al.* 2014 Innovative strategy with potential to increase hemodialysis efficiency and safety. Sci Rep. Mar 21;4:4425. doi: 0.1038/srep04425.
4. M. Luisa Marin *et al.*, 2008 Photochemical Strategies for the Synthesis of Gold Nanoparticles from Au(III) and Au(I) Using Photoinduced Free Radical Generation. J. Am. Chem. Soc. 130(49), pp 16572 – 16584
5. Neelakandan C. *et al.* 2011 In vitro evaluation of antioxidant and anti-inflammatory properties of genistein-modified hemodialysis membranes. Biomacromolecules 12, 2447 – 2455 .
6. Liang Peng *et al.* 2005 Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. Biointerfaces 45 108 – 111

【評語】 030004

小分子團水具有特別的物理化學性質，在本研究中，利用奈米顆粒合成小分子團水，並具有藥物傳送的特性，研究發想有趣，但背後的物理特性需要更多闡述，對研究的熱情及努力，繼續保持。