

中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 工程學科(二)

第一名

052414

銅銀奈米粒子形態控制與抑菌性研究

學校名稱： 新北市立樹林高級中學

作者： 高二 盧奕丞 高一 劉育廷 高二 胡珈瑄	指導老師： 黃俊昇 陳智凱
---	-----------------------------

關鍵詞： 紙錠法、尖端放電、LSPR 表面共振效應

得獎感言

從挫折到綻放:我們的國展淬鍊之旅

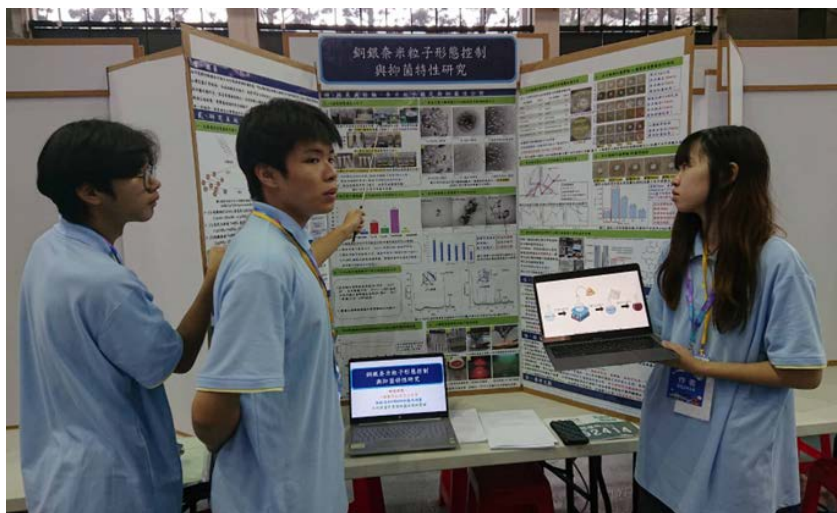
回想走過的這段科展路，起初，我們懷抱著對實驗的無限想像與熱情，隨著科展的進行體會到科學背後藏著的反覆與挫敗。市展揭曉時，得知我們能進軍國展，內心興奮難以掩藏，但隨之而來的是沈重的壓力，時間有限，我們努力在學業與科展之間取得平衡，把市展尚未完成的實驗補齊，並進一步提升抑菌效果。值得一提的是，我們所有的實驗皆在樹林高中實驗室完成，雖然設備有限，讓研究面臨更多挑戰，但也因此學會了善用資源，在一次次嘗試中找到解決方法。國展前夕，我們每天都在學校實驗室，不斷修改報告與反覆練習，在團隊的合作下，不僅讓報告內容更完整，也讓我們在面對問題時能更加沉著不怯場。

國展比賽中，讓我們最印象深刻的是和教授進行討論答辯。評審老師的問題常常出乎意料，需要馬上組織想法、用最簡單的方式把複雜的研究說清楚。雖然當下很緊張、有解釋不清楚的地方，但並沒有時間懊惱自己不充裕的準備，而是記下所有教授詢問的問題，當天晚上與師長及培訓委員共同討論並將資料準備的更完善，我們準備的方法是準備問題多面向的回答並附上文獻，隔天比賽有各科別的評審教授到場聆聽我們的研究成果，便將第一天說明不清楚的地方更完整的闡述。

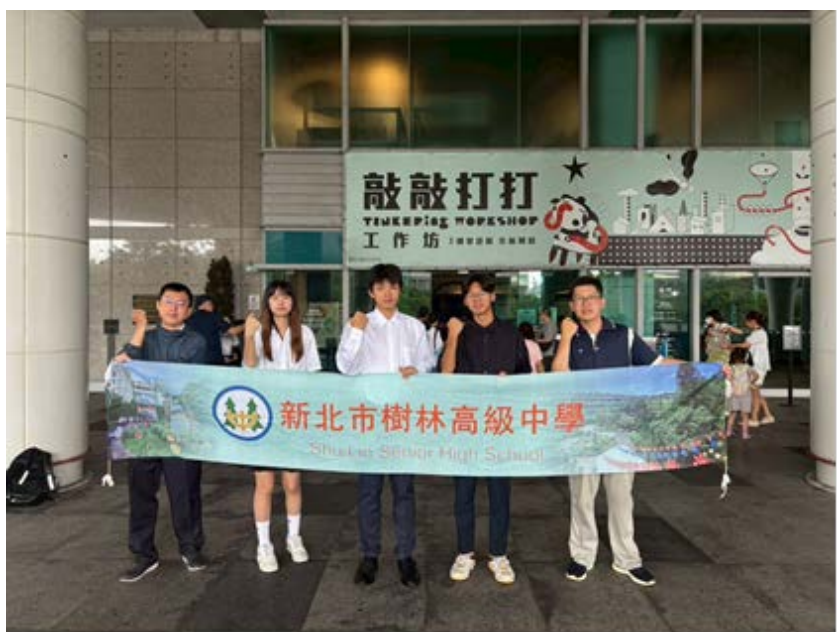
對於未來想參加科展的同學們，我們想說的是，科展就像一段探索的旅程，每一次動手實驗和思考的過程，都能激發你對科學的好奇心，讓你發現更多可能性。



團隊組員們合照，不問成果只管努力提升自己！



賽前不斷努力練習完善自我



科展團隊夥伴們

摘要

本研究探討銅銀奈米粒子的形態控制與抑菌性能。硼氫化鈉、寒天 Agar 及植物萃取液法，合成銅銀奈米粒子，TEM 分析粒徑大小和分散性，使用高效液相層析法(HPLC)檢測萃取液中的反應物質。結果顯示，銅奈米粒子在植物萃取液中穩定性較高，粒徑更小，具明顯廷得耳效應。銀奈米粒子因反應物濃度過高和穩定劑不足，容易聚集粒徑較大。奈米銅對大腸桿菌(*E. coli*)有顯著抑菌效果，而奈米銀抗菌性受粒徑影響較大。通過尖端放電，電擊處理過的奈米銀粒子，粒子數增加粒徑也明顯降低，使銀奈米粒子抑菌能力進一步提升。本研究為銅銀奈米粒子在抗菌應用領域提供了基礎，採用綠色化學製程所合成的奈米粒子，未來可透過合成條件的優化來進一步提升其性能。

壹、前言

一、研究動機

- (一) 暑假時我們觀賞了 Youtube 頻道「神奇的費因曼先生」節目，費因曼先生曾說花朵的外表有著十分雅致的美觀，而在花兒微觀的生理結構世界裡同樣地美麗，而先生在加州理工學院舉行的物理協會年會上發表題為“於微納處天地寬”(There's Plenty of Room at the Bottom) 的演講，被視為現代奈米技術領域的起源外，在物質製造上，除遵循傳統的由大縮小(Scaling down)的製作合成方式外，更為後輩科學家提示由小構築到大的可行性，並在費因曼物理講義中談到分子機械的可行性，費曼當時的發想時至今日已是晶圓製作奈米技術、量子計算等熱門研究課題。故我們想以微視分子的尺度構建有用的化學分子，於是開始蒐集文獻資料並請教師長，瞭解學習奈米粒子的相關知識。

二、文獻回顧

- (一) 《Bioresource Technology》期刊發表的論文「Synthesis and characterization of agar-based silver nanoparticles and nanocomposite film with antibacterial applications」研究以紅藻提取的瓊脂為還原劑，綠色合成銀奈米粒子(AgNPs)及其複合材料。與傳統化學方法相比，該法更環保。抗菌測試顯示瓊脂/銀奈米複合材料對細菌 *Bacillus pumilus* 的殺滅率達 99.9%，抑菌效果顯著，在食品保鮮和醫療敷料等領域具應用潛力，為天然多醣在奈米技術中的應用提供了新思路。
- (二) 「Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract」這篇研究論文發表於《NSTI-Nanotech 2011》會議論文集，主要探討了利用植物葉片萃取液作為還原劑提出了一種利用植物提取液綠色合成銅奈米顆粒(CuNPs)的方法，替代傳統有毒化學合成法。並評估其抗菌性能，通過將 CuNPs 塗覆於乳膠泡沫，證實其對大腸桿菌具有優異抗菌活性，且穩定性和抗菌效果優於化學合成物。該環保合成法為開發低成本、醫療抗菌材料開發提供了新思路。
- (三) 山櫻花(*Prunus campanulata*)台灣原生的櫻花品種，屬於植物界、被子植物門、雙子葉植物綱、薔薇目、薔薇科、櫻屬。高度可達 6 公尺，春天開花時整株無葉，滿樹垂吊著緋紅色的花朵，非常美麗壯觀。花色多為粉紅或淡紅，花期在每年 1 月下旬至 3 月，常見於中低海拔山區，是早春重要的賞花植物之一。

三、研究目的

- (一) 二種綠色製程:Agar 及植物萃取液做還原劑合成奈米粒子，並和 NaBH₄ 製程對照。
- (二) 以穿透式電子顯微鏡 TEM 觀測奈米粒子，求平均粒徑並進 行差異性分析。
- (三) 抑菌測試前置作業: 1.對照組:未經處理的奈米粒子。2.實驗組:照射 IR 或尖端放電。
- (四) 抑菌測試:紙錠法及 OD600 Ecoli 菌落生長曲線測試，評估不同變因下抑菌能力差異。

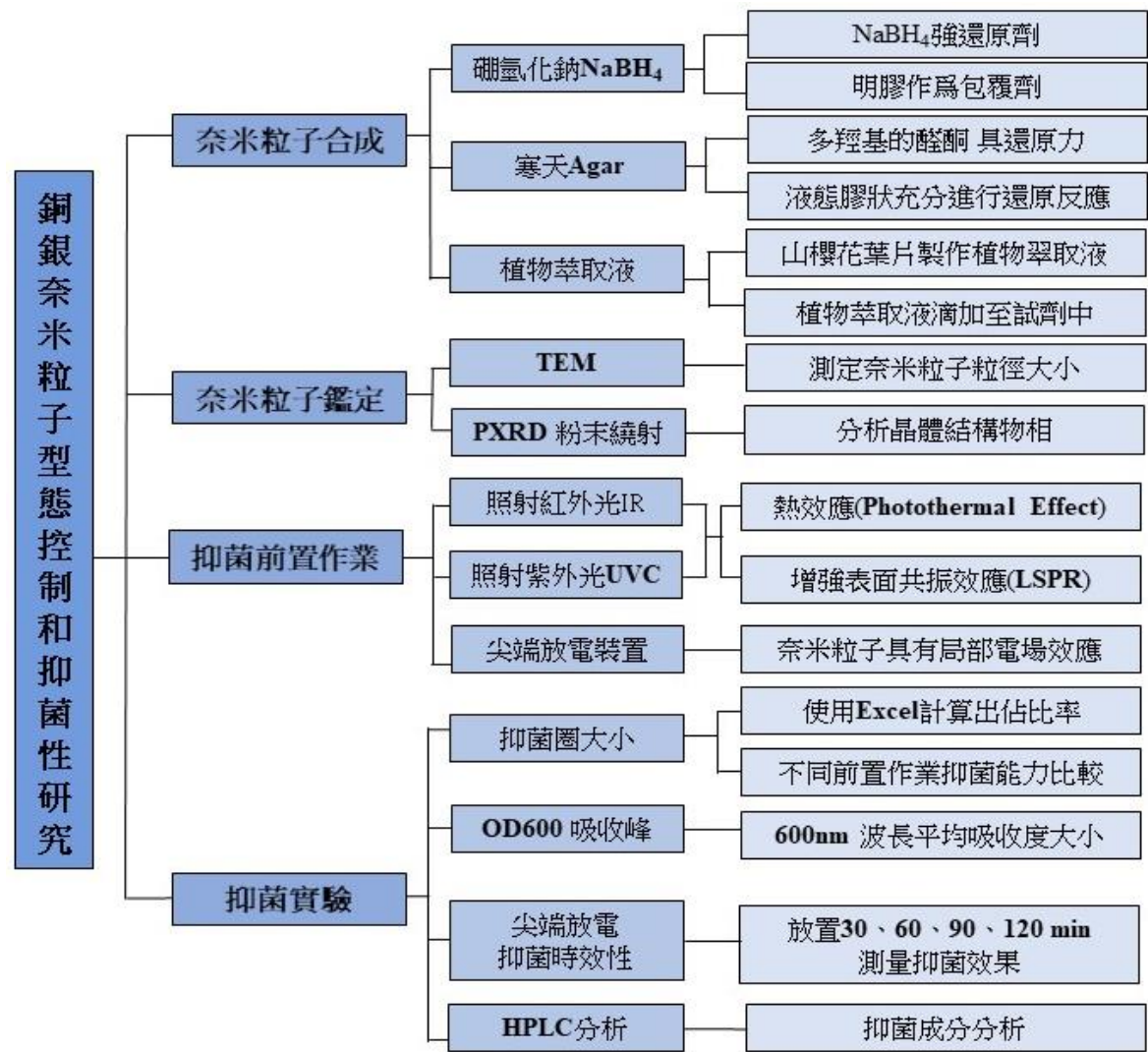


圖 1.銅銀奈米粒子形態控制與抑菌性研究流程圖(本圖片由作者親自製作)

貳、實驗設備及器材

表一、實驗器材及設備

藥品	硫酸銅 CuSO ₄ 、氫氧化鈉 NaOH、硼氫化鈉 NaBH ₄ 、聚丙烯酸 PAA、聚乙烯亞胺 PEI、檸檬酸鈉 Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O、硝酸銀 AgNO ₃ 、glycerol (C ₃ H ₈ O ₃ , ≥99.0%, Daejung)、Gelatin、硝酸銅 Cu(NO ₃) ₂ 、山櫻花
----	--

耗材 器皿	燒杯(50mL、100mL、150mL)、量筒 (50mL、100mL)、滴定管(50mL)、離心管 (1.5mL、10mL、50mL)、微量吸管(P-200、P-1000)、玻璃棒、塑膠滴管、乳膠手套、不鏽鋼藥匙、濾紙、漏斗、鋁箔紙、鑷子、溫度計、萃取瓶、滴管、刮勺、樣本瓶、三頸瓶、加熱包、滴定管、攪拌子、廣用試紙
儀器 軟體	數位放大鏡、iPhone、超音波清洗機 (40kHz)、離心機 (最大轉速 13000 rpm)、抽氣裝置、電磁攪拌器 (100~1500 rpm)、三位數電子天平、CORNING 電磁攪拌加熱器、SEM 掃描式電子顯微鏡、X-射線繞射分析儀 (XRD)、PASCO pH 儀、SPARKvue 軟體分析、C 波段短波紫外線 (UltraViolet C radiation)、直流電源供應器(DC Power Supply)



a.離心機



b.溫控儀



c.氮氣系統



d.熱風循環烘箱



e.加熱包



f.直流電源供應器



g.超音波清洗機

圖 2. 實驗器材及設備(本圖片由作者親自拍攝)

參、研究過程及方法

一、還原法製備奈米粒子(3 種製程)

(一) 化學還原法-硼氫化鈉(NaBH_4) 參考文獻 1 Khatoon(2023)製程

1.反應原理

(1)硫酸銅(CuSO_4) 與氫氧化鈉(NaOH) 作用：

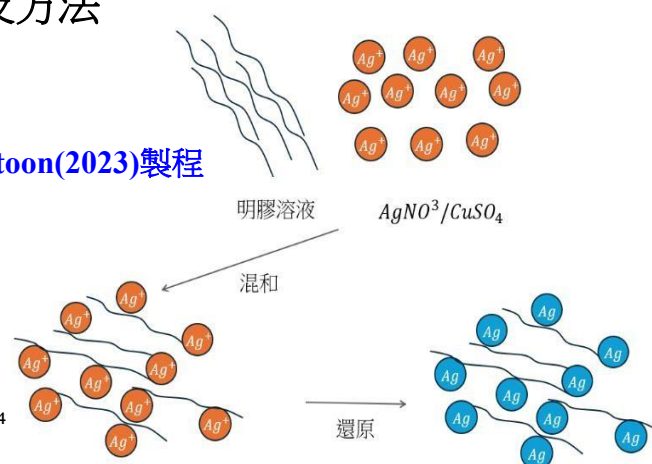


圖 3.加入明膠作為穩定包覆劑
(本圖片由作者以 powerpoint 製作)

(2) 氫氧化銅被 NaBH_4 還原形成銅奈米粒子： $2\text{Cu}(\text{OH})_2 + \text{NaBH}_4 \rightarrow 2\text{Cu} + \text{NaBO}_2 + 3\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2$

(3) NaBH_4 還原法製備銀奈米粒子： $2\text{AgNO}_3 + 2\text{NaBH}_4 \rightarrow 2\text{Ag} + 2\text{NaNO}_3 + \text{B}_2\text{H}_6$

2. 銅奈米粒子合成- NaBH_4 還原法

(1) 配置硫酸銅溶液：取 **0.016 克** 硫酸銅粉末溶於 **5 毫升** 水中，配置 **0.02 M CuSO_4 溶液**。

(2) 將硫酸銅溶液加熱至 **60°C** 。加入 **0.4g** 的明膠作為包覆劑，溶液會由藍色變為深藍。

使用 **1 M NaOH** 溶液調節溶液 **pH** 值至 **12**，持續攪拌溶液顏色變為深紫。

(3) 在磁攪拌子持續攪拌下，緩慢加入 **0.1 M NaBH_4** 溶液，反應期間顏色從深藍逐漸轉為紅褐色。反應完成後，加入氮氣(N_2)作為除氧劑以穩定生成的銅奈米粒子溶液。

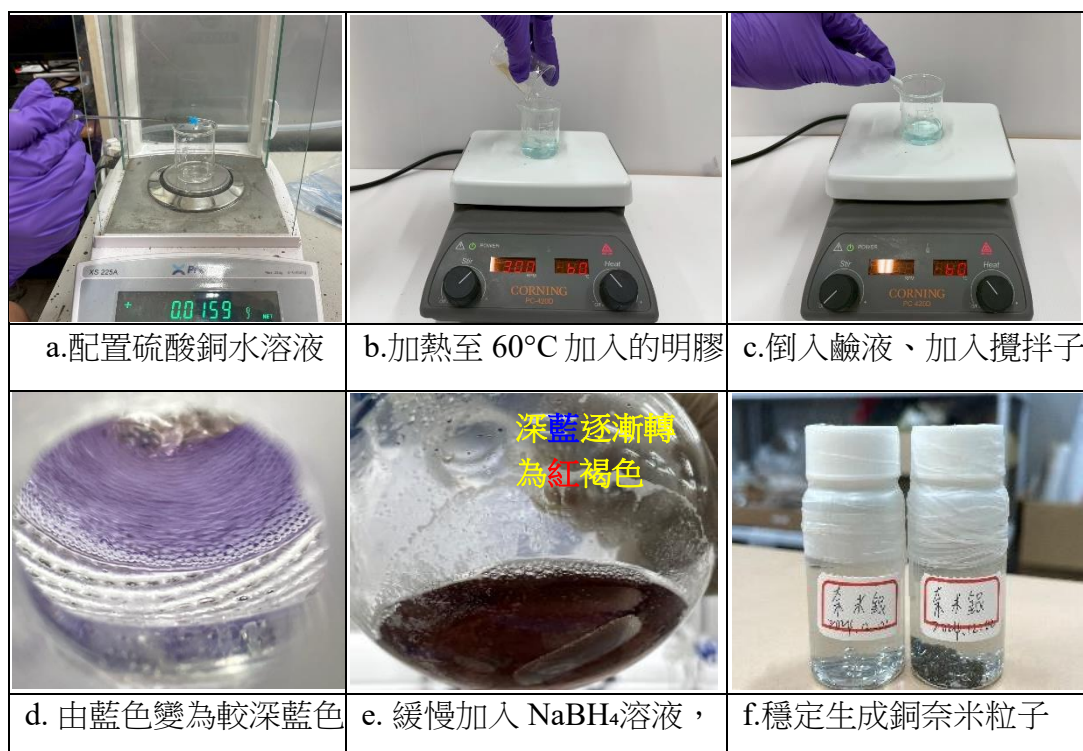


圖 4. NaBH_4 還原法合成銅奈米粒子 (本圖片由作者親自拍攝)

3. 銀奈米粒子的合成- NaBH_4 還原法

(1) 量筒量取 30ml 的 **0.002 M NaBH_4** 溶液，倒入 100 ml 燒杯，冰浴冷卻 5-10 分鐘。

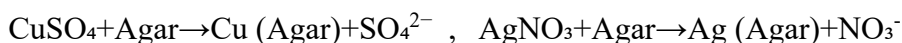
(2) 取 10 ml 的 **0.0010 M AgNO_3** 溶液，轉移至滴定管中。將滴定管中的硝酸銀溶液以每秒

1 滴的速率滴加 至硼氫化鈉溶液中，同時攪拌均勻混合，滴加完畢後立即停止搖拌。

(3) 波長 **532nm** 綠光雷射筆照射溶液，觀測變化並紀錄實驗結果。

(二) 寒天(Agar) 還原法 [參考文獻 2 Shukla\(2012\) 製程](#)

1.反應原理：將硫酸銅、硝酸銀溶液與寒天液混合，寒天為多羥基醛酮的醣類，作為還原劑



2.奈米銀銅粒子合成-Agar 還原法

(1) 取 **0.5g** 寒天溶於 **100mL** 去離子水中，加入攪拌子並於加熱板上恆溫加熱溶解。

(2) **100 mL** 寒天溶液加 **0.125 g** 硫酸銅，另一杯則加 **0.085 g** 硝酸銀，濃度皆為 **5.0 mM**。

(3) 鋁箔紙包覆單頸瓶，溫控儀設定 **60°C**，恆溫攪拌持續反應 **1hr**。

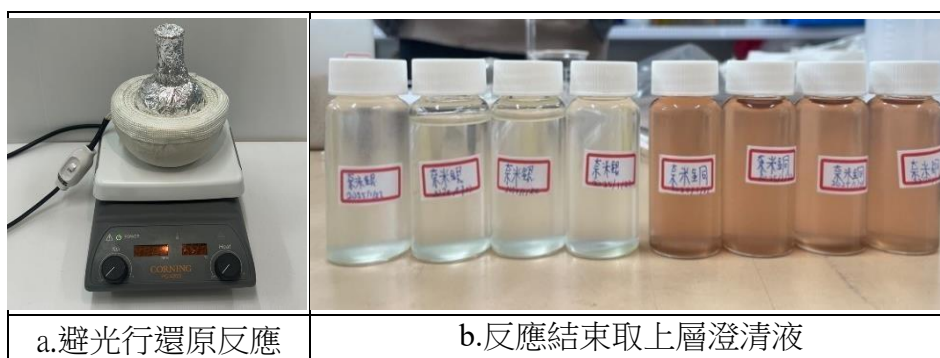


圖 5. 寒天 Agar 製備奈米粒子 (本圖片由作者親自拍攝)

(三) 山櫻花(*Prunus campanulata* Maxim) 葉片萃取液還原法製備奈米粒子

[參考文獻 3 Sharma \(2024\) 製程](#)

1.選用校內原生植物山櫻花葉片，因為其葉面角質層較薄能更好的提取出植物萃取液。

2.收集所需植物的新鮮葉子，並用去離子水徹底清洗葉子，葉子切成小塊後續使用。

3.燒杯置於加熱板上，將 **25 克**切碎的葉子加入 **100 毫升**去離子水中。溫度設定 **80°C**，攪拌 **20min**，直至溶液呈均勻綠色溶液抽氣過濾，將液收集至乾淨燒杯中即萃取液。

4.溶解試藥:取 **20mg** 硫酸銅和硝酸銀，溶於 **50 毫升**去離子水中，溶液加熱至 **60~70°C**

5.植物萃取液還原製備銀銅奈米粒子: 在硫酸銅及硝酸銀溶液中，緩慢滴加萃取液，直至溶液顏色變淺綠色，記錄植物萃取滴入的同體積並觀察溶液顏色變化。

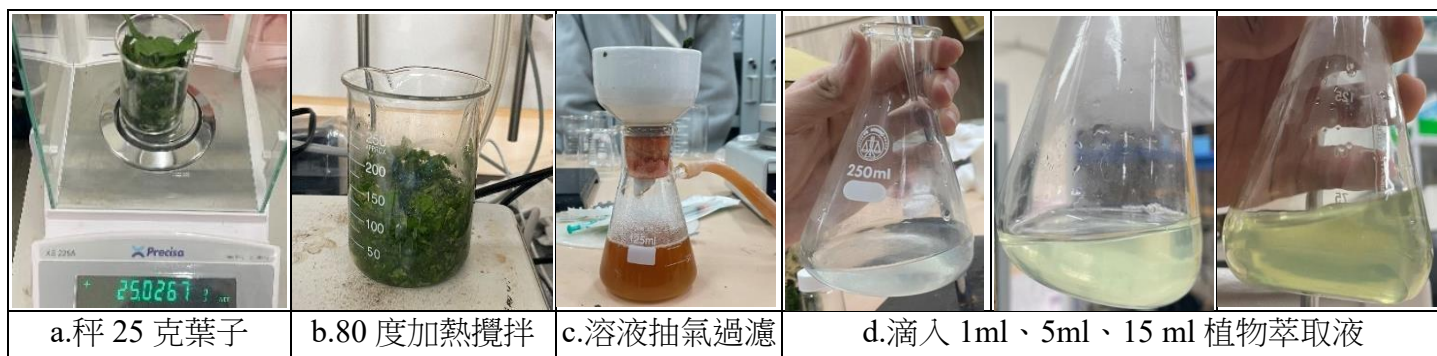


圖 6. 山櫻花萃取液製備奈米銀銅粒子步驟(本圖片由作者親自拍攝)

二、3 製程奈米粒子後處理

(一) 硼氫化鈉 NaBH_4 後處理

1. 洗滌與離心: 取奈米粒子溶液，以去離子水反覆洗滌並離心分離，**轉速 6000rpm** 離心

30min，直至溶液明顯分層：「上層透明清液與下層沉澱物」。

2. 收集與純化：下層沉澱物重新分散至水中，超聲波震盪進一步去除多餘雜質。同步驟

1 的離心條件離心 **30min**，離心後取出下層奈米銀銅粒子溶液。

(二) 寒天 Agar 後處理

1. 離心: 將寒天奈米銀銅溶液離心，轉速 **13000 rpm**、**20 min** 後，收集上層澄清液。

2. 取上層澄清液照射波長 **532nm** 綠光雷射，觀察是否具有廷得耳效應。

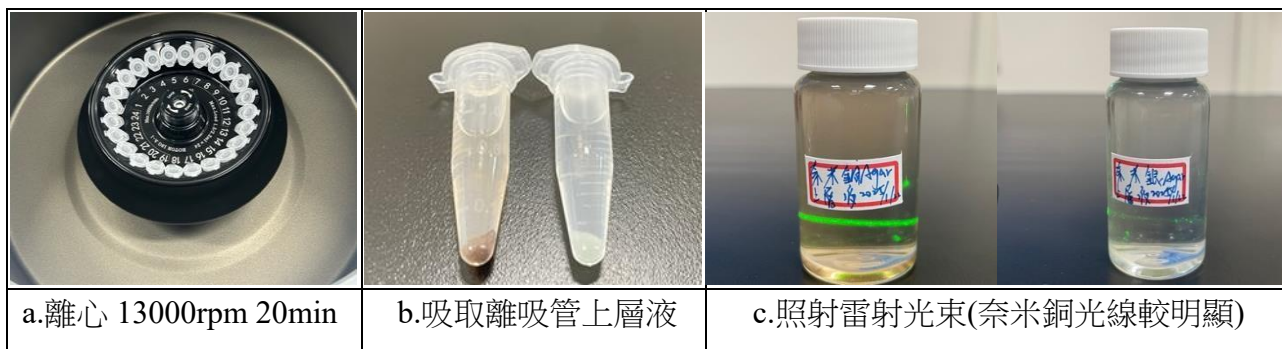


圖 7. 寒天 Agar 還原法後處理(本圖片由作者親自拍攝)

(三) 山櫻花(*Prunus campanulata* Maxim) 萃取液製備奈米粒子後處理

1. 離心: 以 **13000 rpm** 的轉速離心 **30 min**。

2. 取出上層澄清液並收集沉澱物。

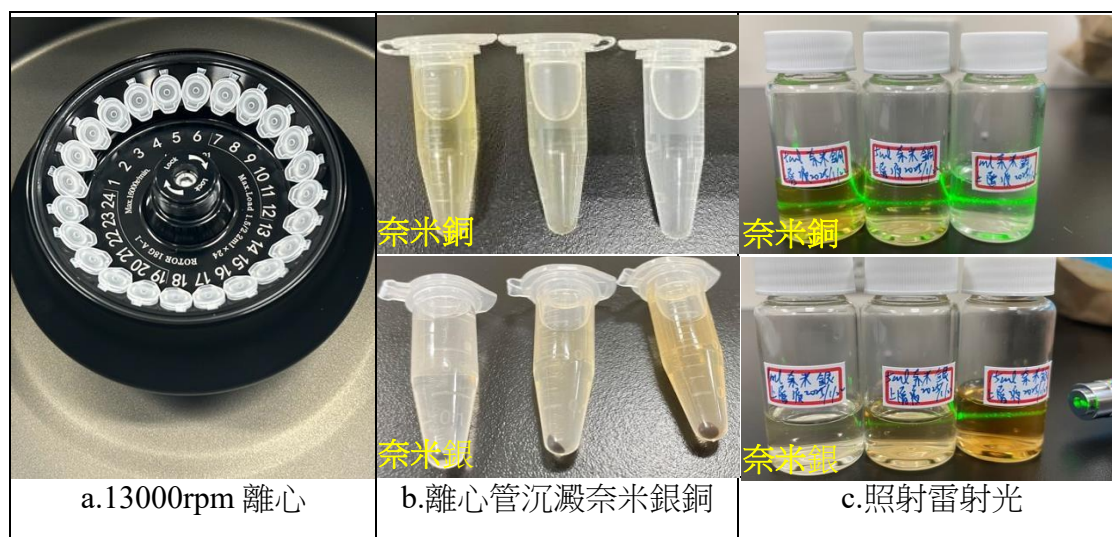


圖 8. 山櫻花萃取液還原法後處理步驟(本圖片由作者親自拍攝)

三、使用 X 射線粉末繞射分析儀(XRD) 、 穿透式電子顯微鏡(TEM)觀測奈米銀銅

(一) 上機前樣品前處理

1. **研磨:**奈米銀銅粉末以研鉢研磨成細顆粒狀，置於烘箱內溫度設定 **25°C** 風乾 **12hr**。
2. **濾塞及取樣:**確定粉末完全乾燥後，將樣品粉末通過 360 目細篩，均勻地灑入鋁載台中央並鋪平，使用不鏽鋼刮勺把粉末壓緊，移除多餘的粉末，便可得平整的試片表面。

(二) X 射線粉末繞射分析儀(XRD)觀測奈米銀銅晶體

1. 鋁載台的樣品面朝上，將樣品置於載物台的中心位置，關上繞射儀保護門。
2. 開啟電腦螢幕操作視窗 measurement server 設定操作條件，輸入掃描速度 **0.5s**，掃描角度為 **0°-50°**，開始測量按下 start 鈕。
3. 測量完畢後儲存檔案，按下 Stop 及 X-ray off，才可將保護門打開取出樣品。

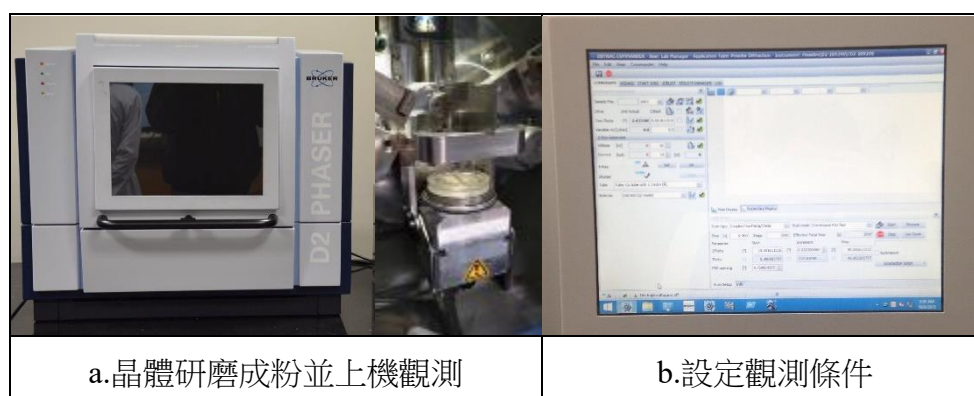


圖 9.使用 X 射線繞射分析儀(XRD)檢測樣品(本圖片由作者親自拍攝)

(四) TEM 穿透式電子顯微鏡上機流程及簡介 (檢測奈米銀銅型態與粒徑大小)

- 1.樣品製備關鍵取決於能否於銅網上均勻分散，以超音波震盪器將奈米銀銅粉末在乙醇溶劑中分散成懸浮液。
- 2.滴管吸取懸浮液滴於銅網上，待其乾燥或用濾紙吸乾後即可上機觀測樣品。

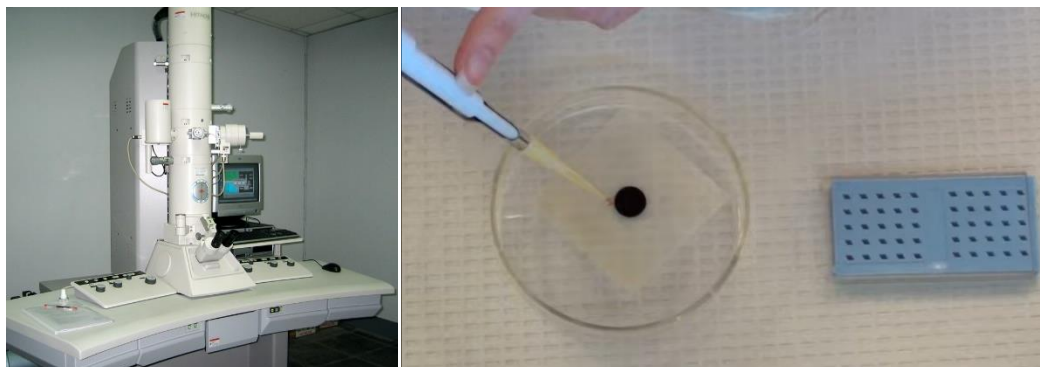


圖 10. TEM 穿透式電子顯微鏡及銅網(本照片由指導教師拍攝。)

四、抑菌實驗前置作業

(一) 實驗菌種:大腸桿菌 *Escherichia coli*(簡稱 *E. coli*)

革蘭氏陰性短桿菌，無芽孢，部分具菌毛，兼性厭氧。正常存在於大腸，為腸道正常菌群及糞便污染指標，通常無害但可能引發異位感染。

(二) 抑菌圈 (Zone of Inhibition) 簡介

1928 年 Fleming 發現青黴菌周圍無菌區現象，後發展為 Kirby-Bauer 試驗。方法：將含抗菌劑紙錠置於 M-H 培養基(塗佈標準菌液)上，藥物擴散後形成透明抑菌圈，通過對照與不含抗菌劑的對照紙錠評估抗菌效果。

(三) 序列稀釋(serial dilution)

用於解決菌液過濃導致的計數困難問題。方法：將原菌液按固定比例逐級稀釋 (等比級數)，直至可清晰計數，最後通過稀釋倍率回推原菌液濃度。

表二、序列稀釋數據

稀釋倍數	菌液體積(mL)	無菌水體積(mL)	總體積(mL)
10^0 (原液)	1	0	1
10^1	0.1	0.9	1
10^{-2}	0.1	0.9	1
10^{-3}	0.1	0.9	1
10^{-4}	0.1	0.9	1

(四) 固態培養基配置

- 1.取 LB(Luria-Bertani Broth Miller)培養基粉 **12.5g** 溶於 **500ml** 去離子水，加入 Agar 粉末 **7.5g** 攪拌均勻，可等比例放大使用量。
- 2.倒入血清瓶中，瓶栓於瓶口上旋轉 1 圈(不可完全拴緊)，置入蒸氣滅菌器中滅菌，滅菌溫度 **121°C**，滅菌時間 **60min**。
- 3.滅菌完成後取出放入水浴內降溫冷卻，倒入培養皿中 (不可超過培養皿體積的 1/3)。

五、奈米銀銅抑菌實驗

(一) 紙錠法

1. 原理及方法：將奈米銀銅上層液(實驗組)滴於紙錠上，並以滴等量酒精的空白紙錠為對照組，分別置入含 E.coli 細菌液之培養基中，恆溫培養箱溫度設定 **30°C**，**12 hr** 後取出觀察記錄。抑菌圈出現即檢樣液有抑菌能力，抑菌圈越大抑菌能力越好。

(二) 紙錠法探討 Agar 樣液對 E.coli(大腸桿菌)抑菌能力實驗

- 1.配製空白組(無菌水)、對照組(75%乙醇)、(實驗組)奈米銀銅上層溶液。
- 2.種菌:微量吸管吸取菌株加入具有 5ml LB 液試管中，低溫震盪培養箱中培養 **12hr**。
- 3.塗盤:濾紙剪成直徑通常為 **6 mm** 圓形並以蒸氣滅菌器滅菌，微量吸管吸取 **100μl** 的菌液，再以接種環塗在固態培養基上，每次塗完菌都需沾 75%酒精重複兩次滅菌，再放入 4 個紙錠，微量吸管吸取 **40μl** 的 75%乙醇、無菌水、奈米銀銅於紙錠上。
- 4.培養皿蓋上上蓋，置入 **30°C**的恆溫培養箱中，**12 hr** 後取出觀察。

(三) 以 OD600 檢測法探討樣液對 E.coli(大腸桿菌)抑菌能力

1. 實驗原理：OD 為 Optical Density 光密度簡稱，測量不同濃度菌液的吸收度來製作檢量線，用以推求未知細菌培養液的濃度，測量波長 600nm 的吸收度，來估計細菌的生長密度，OD60 值在 **0.6-0.8** 為細菌對數生長期，若大於 **3** 代表菌數達飽和，將奈米粒子溶液加入 E.coli 菌液中，OD600 數值若減少則便可推論具抑菌能力。
2. 方法:取檢樣液，注入於含 E.coli 菌液之液態培養基中，以紫外光譜儀測定波長 600nm 吸收度即 OD600 值，計算菌數的多寡，OD600 數值越小菌數剩下愈少，便判斷檢樣液抑菌能力愈強(Abs=1.0，OD600 菌數=2.5 x10⁸ cells/ml)。

3. 實驗步驟：

(1)液態培養基配製：取 LB 培養基粉 **25g** 溶於 **1L** 無菌水，攪拌均勻，倒入血清瓶中，瓶口蓋上鋁箔紙，瓶栓稍轉鬆不要太緊，置於蒸氣滅菌器中滅菌，滅菌溫度 **121°C**，滅菌時間 **30min**，滅菌完成後取出靜置冷卻後即可使用。

(2)空白(無菌水)、對照組(75%乙醇、 **penicillin**)、實驗組(奈米銀銅)，菌種均 DH5 α

A.為空白對照組檢測液：3.0ml(DH5 α) E.coli 菌液+2.0ml 無菌水均勻混合。

B.75%乙醇水溶液:3.0ml (DH5 α) E.coli 菌液+2.0ml 75%乙醇水溶液

C.奈米銀上層液:3.0ml (DH5 α) E.coli 菌液+2.0ml 奈米銀上層液

D.奈米銅上層液:3.0ml (DH5 α) E.coli 菌液+2.0ml 奈米銅上層液

E.抗生素:3.0ml (DH5 α) E.coli 菌液+2.0ml 無菌水抗生素

表三、OD600 檢測法探討檢樣液對 E.coli DH5 α (大腸桿菌)抑菌能力

	Ctrl	75% Eton	Agar Ag ⁺	Agar Cu ²⁺	抗生素 Pn
大腸桿菌 DH5 α ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml
Treat	0	2ml	2ml	2ml	2ml
無菌水	2ml	0	0	0	0
總共	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml

(1)空白組(無菌水)、對照組(75%乙醇)、(實驗組)奈米銀銅，F-G 為相同菌種 BI21

F.為空白對照組檢測液：3.0ml(BI21 E.coli 菌液+2.0ml 無菌水均勻混合。

G.75%乙醇水溶液：3.0ml (BI21) E.coli 菌液+2.0ml 75%乙醇水溶液

H.奈米銀上層液：3.0ml (BI21) E.coli 菌液+2.0ml 奈米銀上層液

I.奈米銅上層液：3.0ml (BI21 E.coli 菌液+2.0ml 奈米銅上層液

J.抗生素：3.0ml (BI21) E.coli 菌液+2.0ml 無菌水抗生素

(2)實驗三重複，培養條件(恆溫震盪培養箱)：轉速 **180 rpm**、溫度 **30°C**、培養 **12hr**。

表四、OD600 檢測法探討檢樣液對 E.coli BI21(大腸桿菌)抑菌能力

	Ctrl	75% Eton	Agar Ag ⁺	Agar Cu ²⁺	抗生素 Pn
大腸桿菌 BI21 ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml
Treat	0	2ml	2ml	2ml	2ml
無菌水	2ml	0	0	0	0
總共	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml

4.測定吸收度:

- (1) 微量吸管吸取 1 ml，置於 UV 比色槽測吸收度，excel 繪製散佈圖並疊圖分析。
- (2) 同樣本比例皆 3 重複，四時間段(0、1、2、12hr)測吸收度，2 種大腸桿菌種。

七、奈米銀銅粒子抑菌前置處理

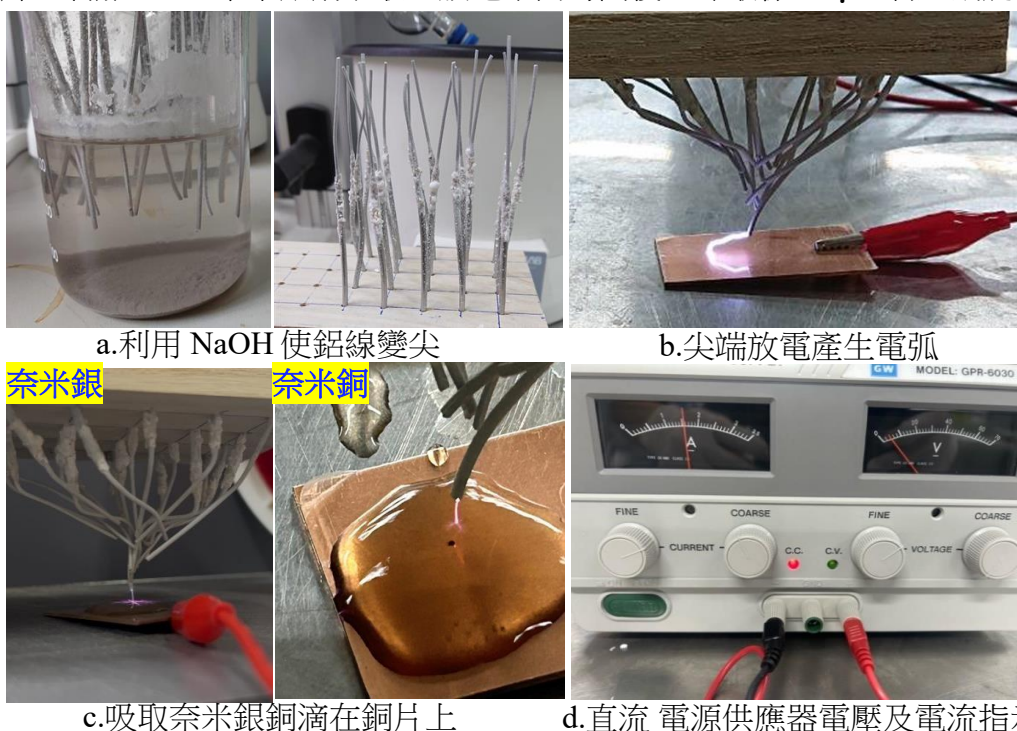
(一) 利用尖端放電施放電弧激活奈米粒子進行抗菌

1. 尖端放電(Corona Discharge)原理

高電壓下鋁線尖端因電場集中引發電氣放電，電離周圍氣體分子形成電子與離子。以銀奈米粒子溶液為例，強電場使電子吸附至銀奈米粒子，可增加其表面電荷促進釋放銀離子，與帶負電的細菌細胞壁產生靜電作用，進而穿透細胞壁進入細菌體內，並結合細菌蛋白質硫醇基(-SH)，導致蛋白質變性，抑制細菌代謝與繁殖而具抑菌效果。

2. 尖端放電裝置設計及實驗步驟

- (1) **鋁線尖端製備**: 鋁線浸入 1M NaOH 溶液，溶解使其尖端變尖，鋁線集線座繞綁的鋁線尾端以鱷魚夾連接高壓發生器，作為陰極。
- (2) **電極組裝**: 直流電源供應器陽極接高壓發生器連接線，再以雙頭鱷魚夾線連接至**薄銅片**作放電裝置的**陽極端**，電源供應器的陰極端則與發生器連接線串聯，再以雙頭鱷魚夾線連接至鋁線尾端，**鋁針尖端**為放電裝置的**陰極端**，鐵架臺三叉夾固定。
- (3) 銅片上滴加 1 mL 奈米銀銅溶液，放電不同時間後立即取樣 40 μ L 滴入紙錠中。



c. 吸取奈米銀銅滴在銅片上

d. 直流電源供應器電壓及電流指示

圖 11. 尖端放電實驗流程(本圖片由作者親自拍攝)

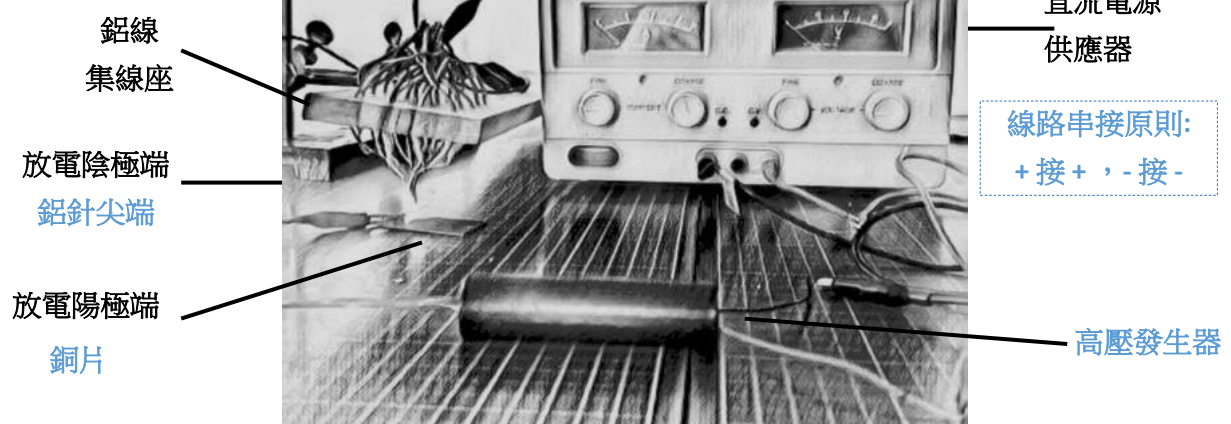


圖 12.尖端放電實驗設計圖(本圖片由作者親自製作)

(二)IR 照射前置處理

1. 紅外線 IR 照射奈米粒子抑菌原理

奈米粒子因表面電漿共振現象(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)可吸收特定波長光能轉化為熱能，即光熱效應(Photothermal Effect)。當奈米粒子因尺寸增大、聚集、或表面修飾等因素造成 LSPR 吸收峰紅移(Redshift)至近紅外區(700-900nm)時，光熱轉換效率顯著提升，產生更高的局部熱能破壞細菌細胞膜、使蛋白質變性提升抑菌能力。

2.實驗步驟:取銅銀奈米粒子溶液 3ml 置於錶玻璃，暗室中以 PHILIPS 175W 紅外線燈照射 0、5、10、15、20 min，每隔 5min 吸取 40 μ l 滴入紙錠中，依實驗五步驟測定抑菌圈。



圖 13. 奈米銀銅粒子抑菌前置處理-照射紅外線(本圖片由作者親自拍攝)

八、奈米粒子前置處理-尖端放電抑菌時效性測試

(一) 電擊 10min 靜置不同時間後，量測抑菌圈大小

1.由實驗七結果，選定尖端放電抑菌效果最好的山櫻花(*Prunus campanulata* Maxim)植物萃取液製程的奈米銀溶液，在最佳抑菌效果電擊時間 10min 後，靜置 30、60、90、120min，每隔 30min 吸取 40 μ l 滴入紙錠中。

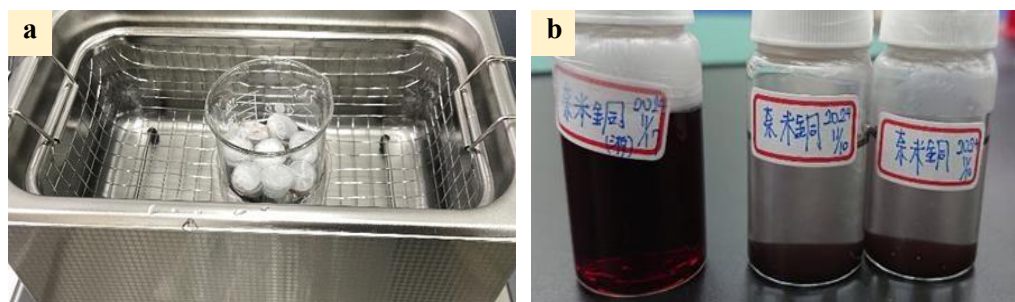
2.依實驗五步驟測定抑菌圈直徑， excel 統計抑菌圈大小並以 rigin 軟體繪製線圖。

肆、研究結果

一、還原法製備奈米粒子

(一)化學還原法-硼氫化鈉(NaBH_4)

1. a 圖左側為加入**明膠溶液**並超音波震盪後處理後的奈米銅粒子，即使靜置後 1 周也不沉降，若無加**明膠**後處理，如右圖所示，奈米銅粒子 18hr 後即自然沉降。



左瓶有加明膠溶液，不沉降！

圖 14. 銅奈米粒子有無加明膠差異圖(本圖片由作者親自拍攝)

2. 廷得耳效應觀測：波長 **532nm** 綠光雷射筆照射溶液，雷射光束穿過銀銅奈米粒子溶液後，有明顯的綠色光徑。

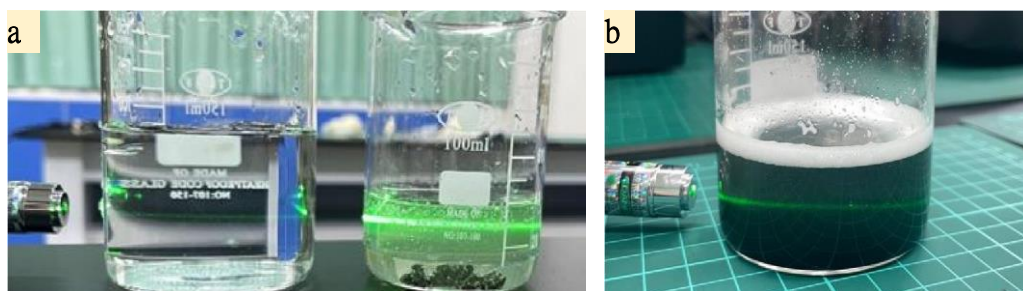


圖 15. 廷得耳效應測試(本圖片由作者親自拍攝)

(二) 寒天(Agar)還原法製備奈米顆粒

1. 轉速 **13000rpm** 離心 **30min** 發現離心管中的奈米銀沉澱下來的是白色透明固體，奈米銅則是褐色沉澱，奈米銅相較於奈米銀具有更明顯的廷得耳效應。

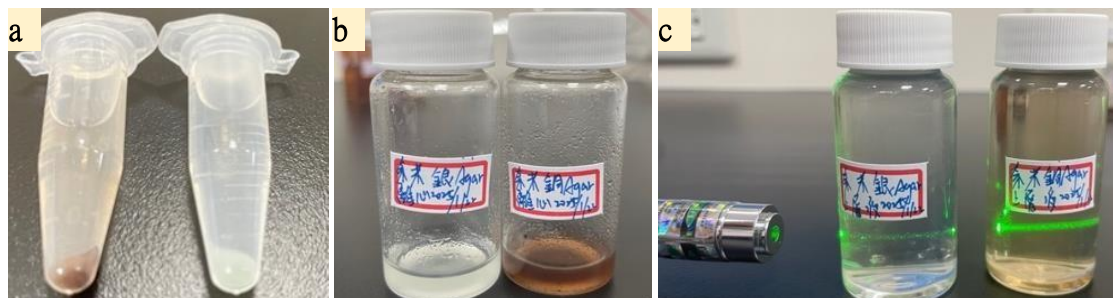


圖 16. Agar 銀銅奈米粒子離心成果照(本圖片由作者親自拍攝)

(三)使用植物萃取液製備奈米顆粒

- 1.銀奈米粒子溶液相較銅顏色深，植物萃取液滴入至透明的無色的硝酸銀和硫酸銅溶液皆為 1mL 發生顏色變化，照射雷射光隨滴加的植物萃取液越多，廷得耳效應越明顯。

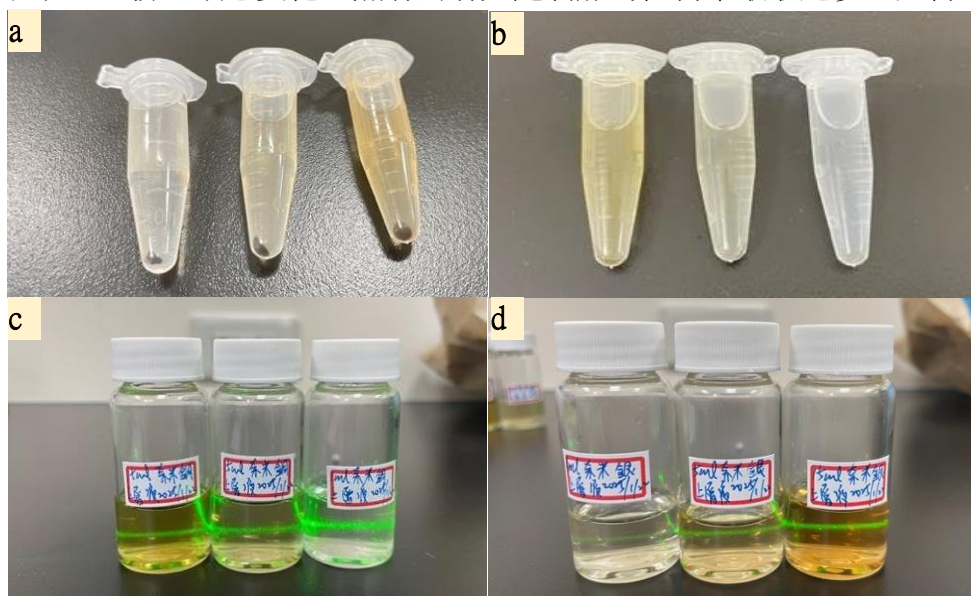
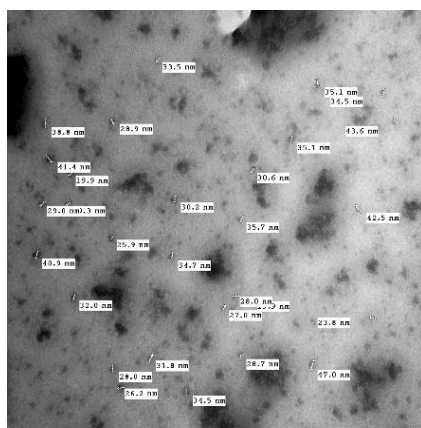


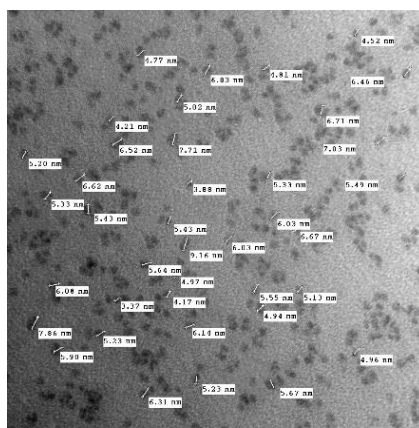
圖 17. Agar 銀銅奈米粒子離心成果照(本圖片由作者親自拍攝)

二、TEM 穿透式電子顯微鏡測量奈米粒徑數據

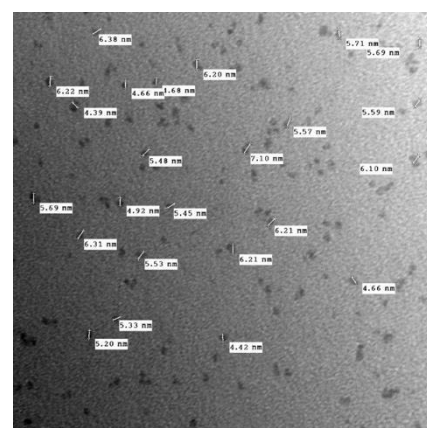
(一) 3 種製成的奈米銅以 TEM 穿透式電子顯微鏡測量粒徑大小



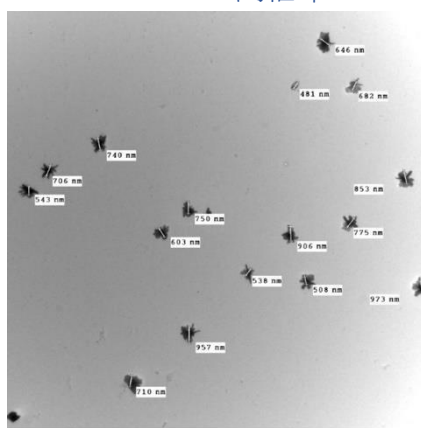
A. NaBH₄ 6 萬倍率



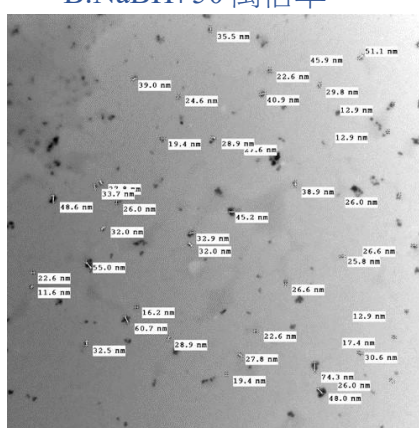
B. NaBH₄ 50 萬倍率



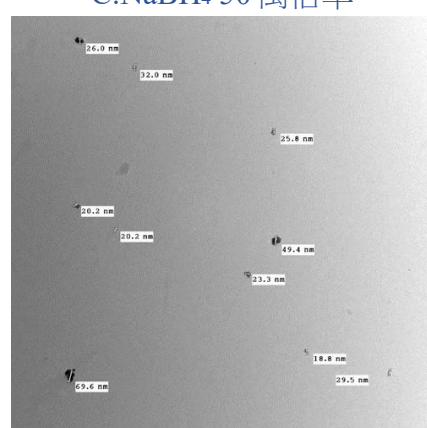
C. NaBH₄ 50 萬倍率



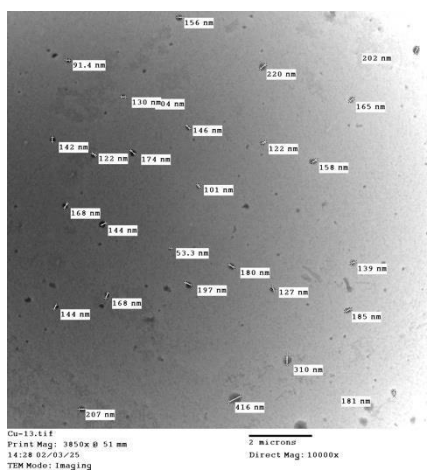
D. Agar 5000 倍率



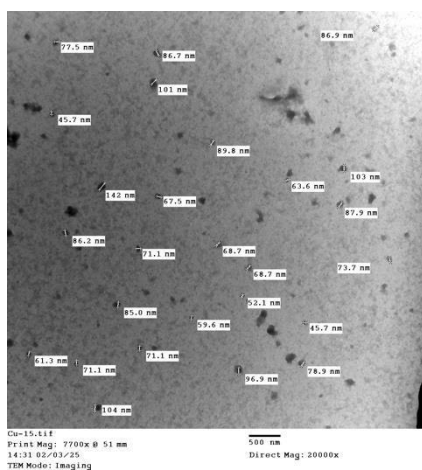
E. Agar 4 萬倍率



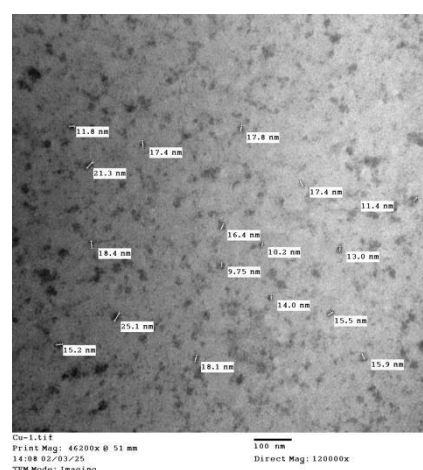
F. Agar 5 萬倍率



G.植物萃取液 1 萬倍率



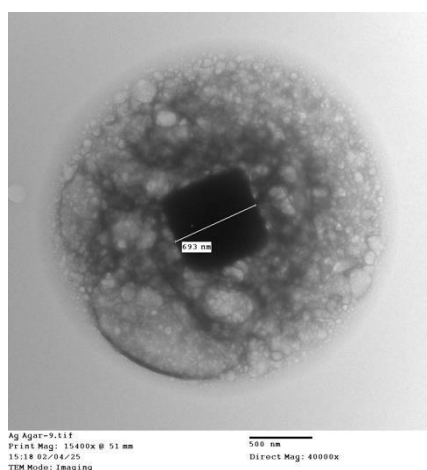
H.植物萃取液 2 萬倍率



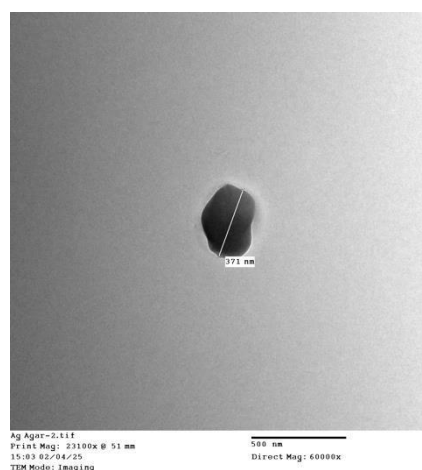
I.植物萃取液 12 萬倍

圖 18. TEM 穿透式電子顯微鏡觀測三種製程的奈米銅粒徑大小(本照片為付費送測貴儀中心取得)

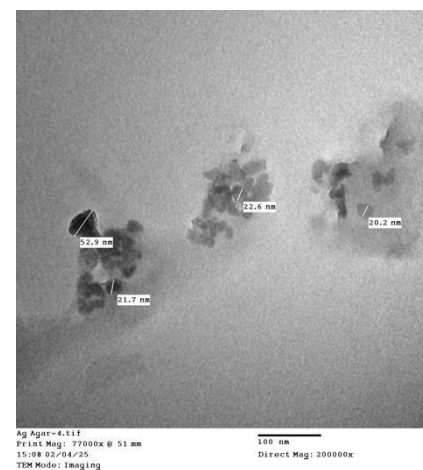
(二) 3 種製程的奈米銀以 TEM 穿透式電子顯微鏡測量粒徑大小



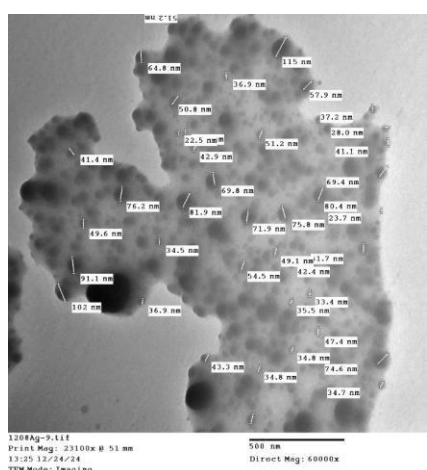
A.NaBH₄ 6 萬倍率



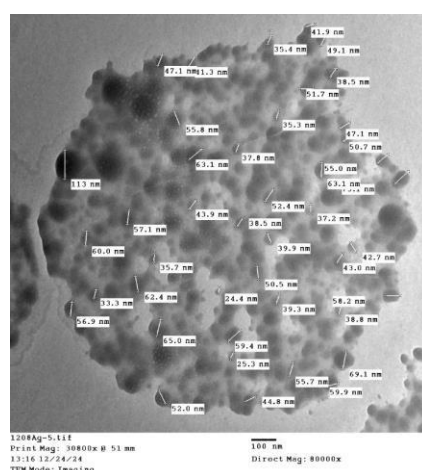
B.NaBH₄ 8 萬倍率



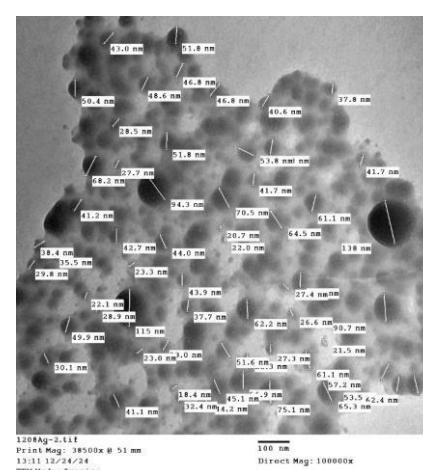
C.NaBH₄ 10 萬倍



D.Agar 4 萬倍率

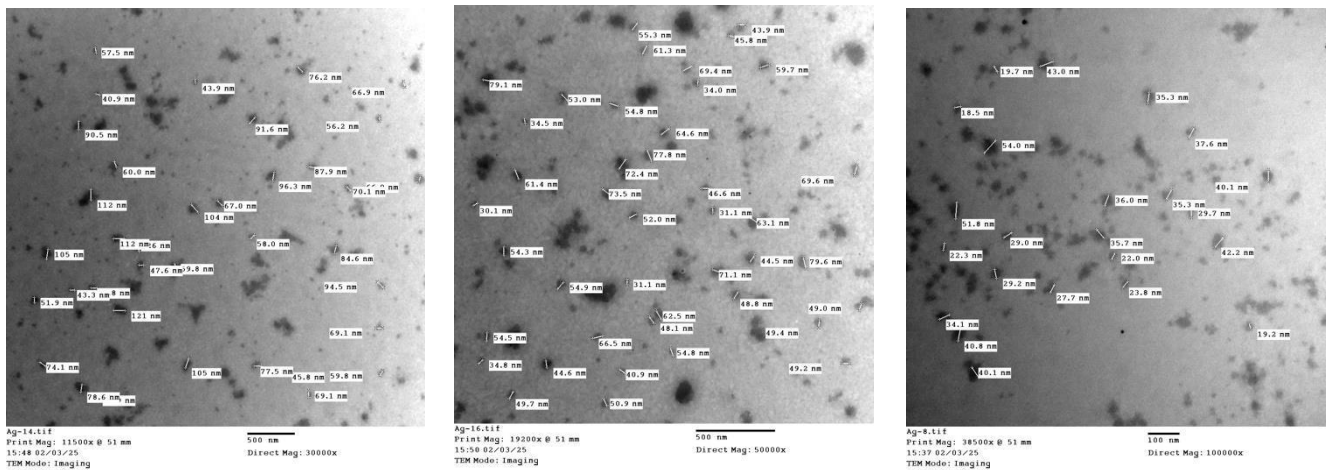


E.Agar 6 萬倍率



F.Agar 12 萬倍率

圖 19. TEM 穿透式電子顯微鏡觀測三種製程的奈米銀粒徑大小(本照片為付費送測貴儀中心取得)



G.植物萃取液 3 萬倍率

H.植物萃取液 5 萬倍率

I.植物萃取液 10 萬倍

圖 20. TEM 穿透式電子顯微鏡觀測三種製程的奈米銀粒徑大小(本照片為付費送測貴儀中心取得)

(三) 3 種製成的奈米銀銅平均粒徑大小

1.每張圖各取 15 個尺標後利用 excel 算出平均數以及標準差

表五、三種製程奈米粒子平均粒徑大小
平均值 標準差

硼氫化鈉銀	44.93448	6.626242
硼氫化鈉銅	5.441034	0.64916
Agar 銀	25.41034	4.801102
Agar 銅	12.00172	1.896858
植物萃取液銀	52.77857	9.046876
植物萃取液銅	5.428966	0.791373

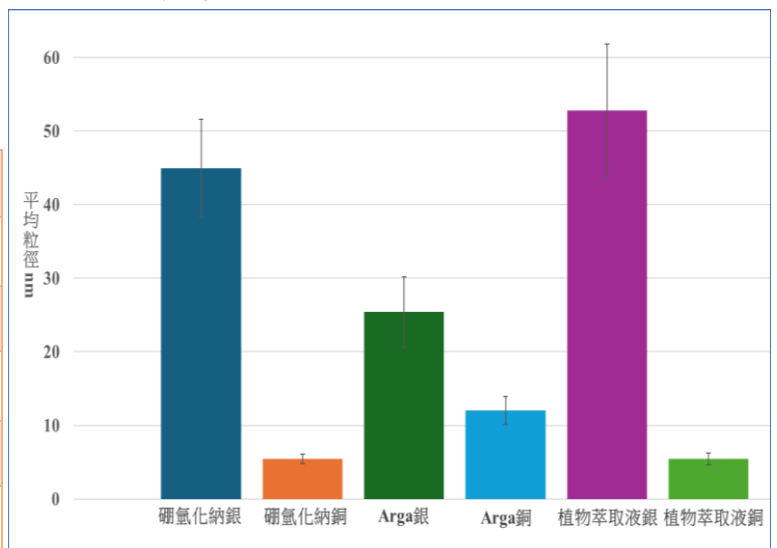


圖 21.三種製程的平均粒徑大小(本圖片由作者親自製作)

(四)結論

1.製程中銅奈米粒子粒徑皆小於銀奈米粒子，銅奈米粒子在各製程下粒徑比較：

Agar > 硼氫化鈉 > 植物萃取液，銀奈米粒子粒徑大小：植物萃取液 > 硼氫化鈉 > Agar。

2.奈米銀在寒天 Agar 還原下，明顯降低粒徑大小，在其餘兩種製成中無法控制好粒徑

大小，奈米銅粒子在植物萃取液中有明顯降低粒徑大小，硼氫化鈉為強還原劑，兩者

比較後發現，選用強還原力試劑如硼氫化鈉 NaBH_4 ，奈米粒子的粒徑未必會越小。

三、在 X ray 粉末繞射觀測下奈米銀銅晶面分析

(一)PXRD 圖譜:奈米銅符合文獻 **4Wang(2021)**，奈米銀符合文獻 **5 Kouchpeima(2017)**粉末繞射圖

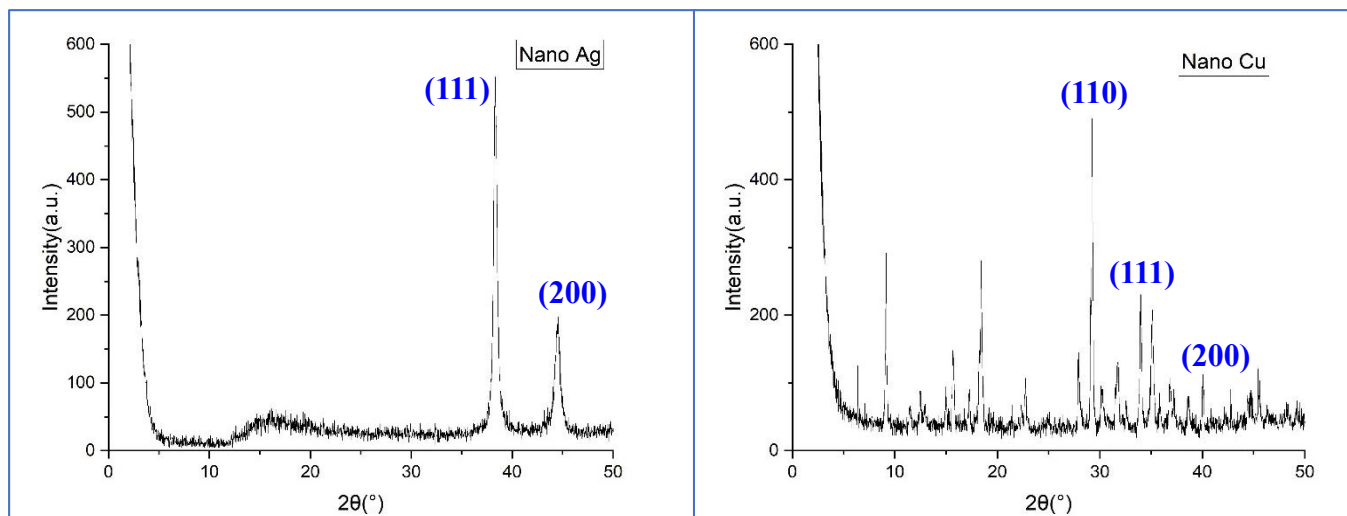


圖 22.NaBH₄還原製成奈密銀銅粒子 PXRD 圖(本圖片由作者使用 origin 親自製作)

(二)結果結論

- 1.樣品準備：將奈米銀銅的粉末，置於 **25°C**烘箱風乾 **12hr** 後，確認樣品乾燥後，經 **360** 目細篩過篩，均勻鋪平於鋁載台中央，設定掃描角度 **0-50°**。
- 2.奈米銅主要峰值在角度 2θ: **29.5°**、**34.5°**、**40°**，各別對應**(110)**、**(111)**、**(200)** 晶面，而奈米銀主要峰值在角度 2θ: **38.6°**、**44.7°**，對應**(111)**、**(200)**晶面，圖譜主要峰值強度和背景雜訊比例相差懸殊可知合成的奈米銀銅具**高純度**，符合文獻 1 及 2 期刊 PXRD 圖。

四、奈米銀銅抑菌實驗-OD600 測定吸收峰曲線

表六、大腸桿菌(DH5α)在不同處理下 OD600 值隨時間變化

菌種(DH5α)	0hr	1hr	2hr	12hr	標準差	600nm 平均吸收度
無菌水	2.07	2.02	2.42	2.34	0.31	2.21
75%酒精	1.61	1.62	1.33	1.03	0.42	1.40
Agar 銀	2.23	2.37	2.7	2.35	0.27	2.41
Agar 銅	2.66	3	2.78	2.36	0.25	2.70
抗生素	1.97	2.02	2.31	1.91	0.18	2.06

表七、大腸桿菌(BL21)在不同處理下 OD600 值隨時間變化

菌種(BL21)	0hr	1hr	2hr	12hr	標準差	600nm 平均吸收度
無菌水	1.86	1.80	1.90	1.16	0.99	1.79
75%酒精	1.86	1.75	1.51	1.22	0.31	1.58
Agar 銀	1.81	1.76	2.03	1.93	0.11	1.89
Agar 銅	2.09	2.33	2.23	2.24	0.16	2.20
抗生素	1.97	2.02	2.31	1.91	0.41	1.41

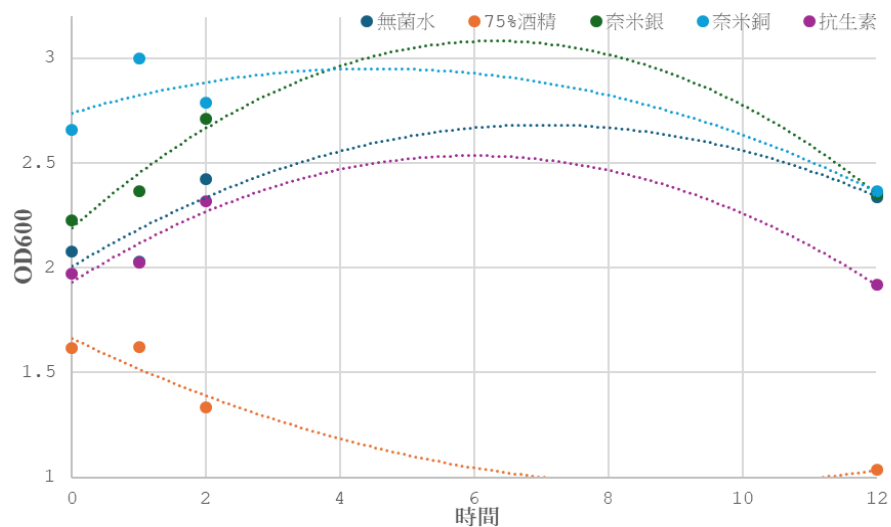


圖 23. OD600 測定吸收峰菌種(DH5α)三重複平均 X-Y 散佈圖(本圖片由作者用 EXCEL 製作)

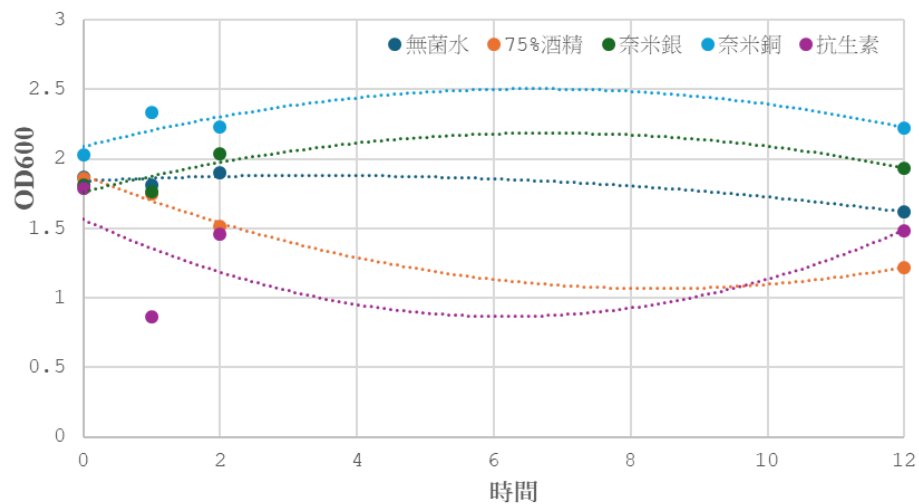
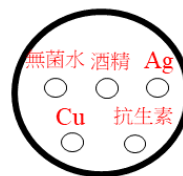


圖 24. OD600 測定吸收峰菌種(BL21)三重複平均 X-Y 散佈圖(本圖片由作者用 EXCEL 製作)

實驗結論：空白組(無菌水)、對照組(75%乙醇、抗生素 penicillin)、(實驗組)銀銅奈米粒子溶液，在四個時間點(0、1、2、12hr)測定波長 600nm 的吸收度，每個樣本進行三重複並取平均值，Excel 數值統計分析並繪製 xy 散佈圖，由上圖知 1-2hr 奈米銅進入對數生長期，數值開始上升，而到 2hr 時有微下降趨勢即具有抑菌性，代表奈米銅對於兩種不同菌種都具有抑制性效果，而奈米銀需到 6hr 時有下降趨勢，才具有抑菌性。

五、紙錠法抑菌實驗-奈米銀銅粒子溶液照射 UVC 紫外線與尖端放電



(一)純(寒天 agar)奈米銀銅溶液抑菌效果 (同一菌種皆 3 重複)

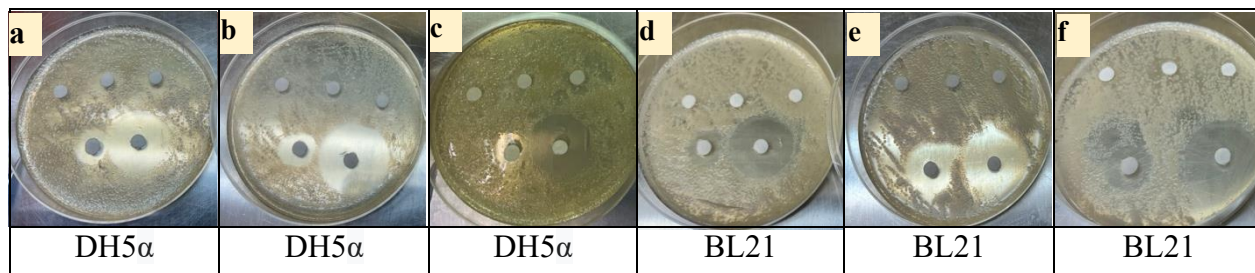


圖 25. DH5α/BL21 紙錠實驗(純寒天 Agar 奈米銀銅溶液) (本圖片由作者拍攝)

(二)照射 UVC 紫外線寒天奈米銀銅溶液滅菌效果比較(同一菌種皆 3 重複)

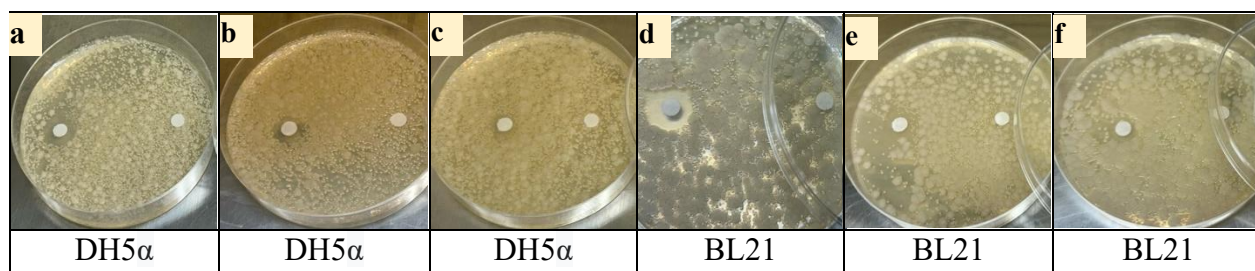
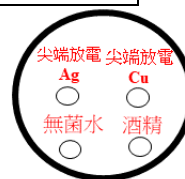


圖 26. DH5α/BL21 紙錠實驗照射(照射紫外線 UVC) (本圖片由作者拍攝)

探究發現:由於照射 UVC 紫外光，無明顯抑菌變化，於是更改成照射 IR 紅外線！



(三)尖端放電(Corona Discharge)刺激奈米粒子進行滅菌(同一菌種皆 3 重複)

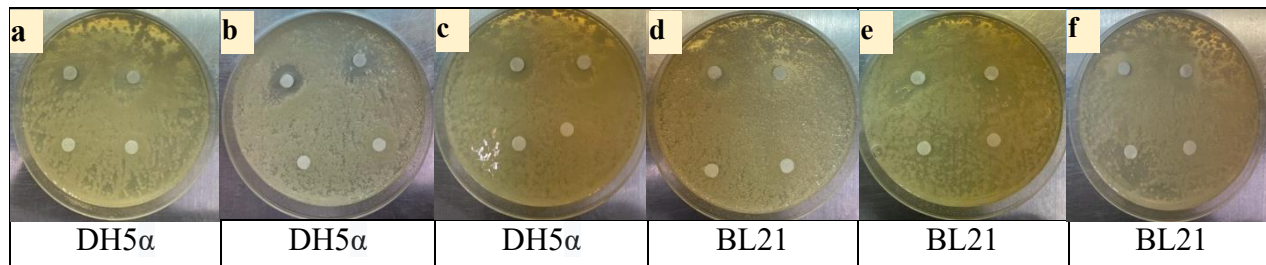


圖 27. DH5α/BL21 紙錠實驗(尖端放電 Corona Discharge) (本圖片由作者拍攝)

(四)在 E. coli 菌株 DH5α 抑菌圈面積測定

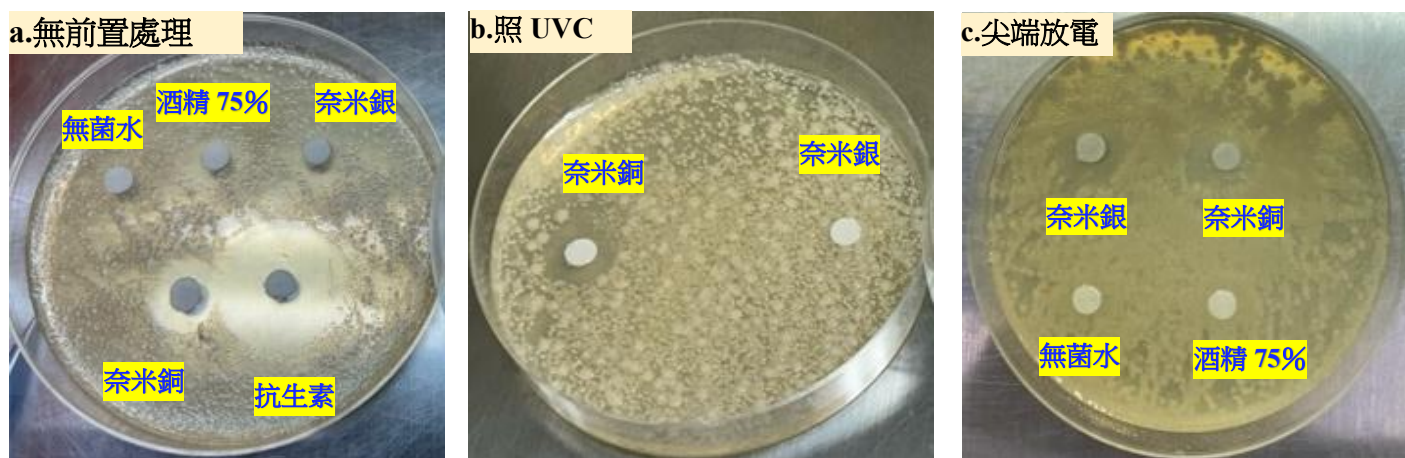


圖 28. 在 DH5α 菌株上的抑菌圈面積(本圖片由作者親自拍攝)

使用游標尺量測抑菌盤直徑大小，圓公式計算出總面積，再測量出每一種的抑菌圈直徑換算出面積，以 Excel 計算出抑菌圈佔總面積比例。

表八、DH5 α 在 LB Agar 培養基之抑菌圈面積

DH5 α 抑菌圈面積	1 面積	2 面積	3 面積	平均面積	標準差	佔比%
(1)無菌水	0	0	0	0	0	0%
(2)(penicillin)	4.387	4.462	4.501	4.45	0.04	7.84%
(3)EtOH 75%	0.464	0.463	0.467	0.46	0.02	0.82%
(4)Agar Ag	0	0	0	0	0	0%
(5)Agar Cu	1.11	1.56	1.30	1.32	0.18	2.33%
(6) UVC Ag 10min	0	0	0	0	0	0%
(7) UVC Cu 10min	0.70	1.20	1.39	1.13	0.20	1.99%
(8) UVC Ag 60min	0	0	0	0	0	0%
(9) UVC Cu 60min	0.70	1.37	1.1	1.06	0.23	1.86%
(10) (Corona Discharge) Ag 1min	1.90	1.72	1.68	1.77	0.12	3.11%
(11) (Corona Discharge) Cu 1min	1.63	1.41	1.59	1.54	0.09	2.71%

由數據可知尖端放電可使奈米銀銅的抑菌圈面積佔比提升！

(五)在 E. coli 菌株 BL21 抑菌圈面積測定

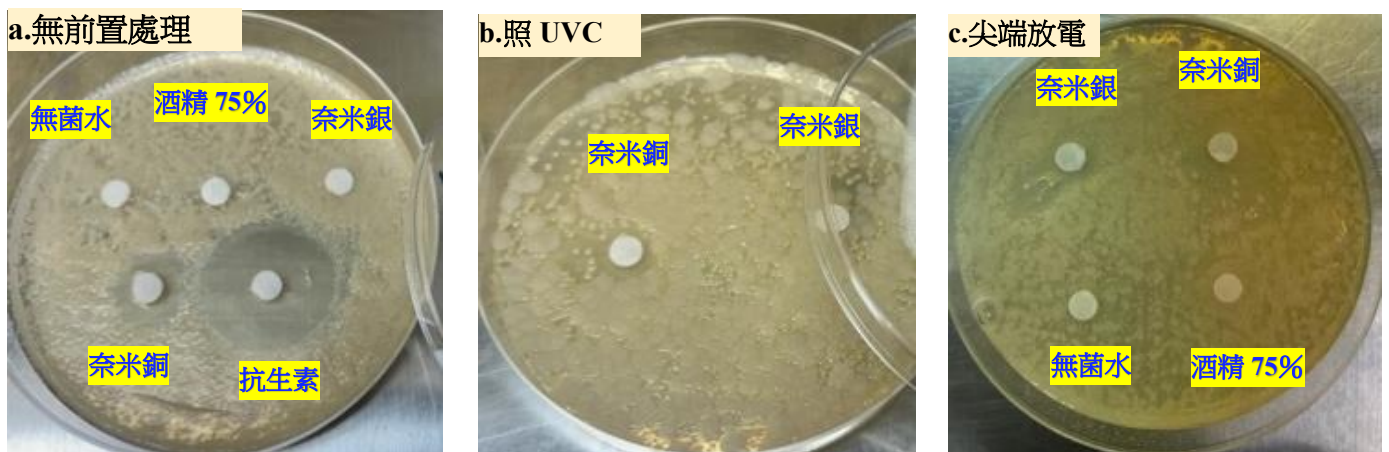


圖 29. 在 BL21 菌株上的抑菌圈面積(本圖片由作者親自拍攝)

表九、BL21 在 LB Agar 培養基之抑菌圈面積

BL21 抑菌圈面積	1 面積	2 面積	3 面積	平均面積	標準差	佔比%
(1)無菌水	0	0	0	0	0	0%
(2)(penicillin)	5.21	5.39	5.33	5.31	0.03	9.35%
(3)EtOH 75%	1.3	1.2	0.9	1.04	0.10	1.84%
(4)Agar Ag	0	0	0	0	0	0%
(5)Agar Cu	1.05	1.25	0.88	1.06	0.14	1.87%
(6) UVC Ag 10min	0	0	0	0	0	0%
(7) UVC Cu 10min	0.9	1.1	0.96	0.99	0.08	1.74%
(8) UVC Ag 60min	0	0	0	0	0	0%

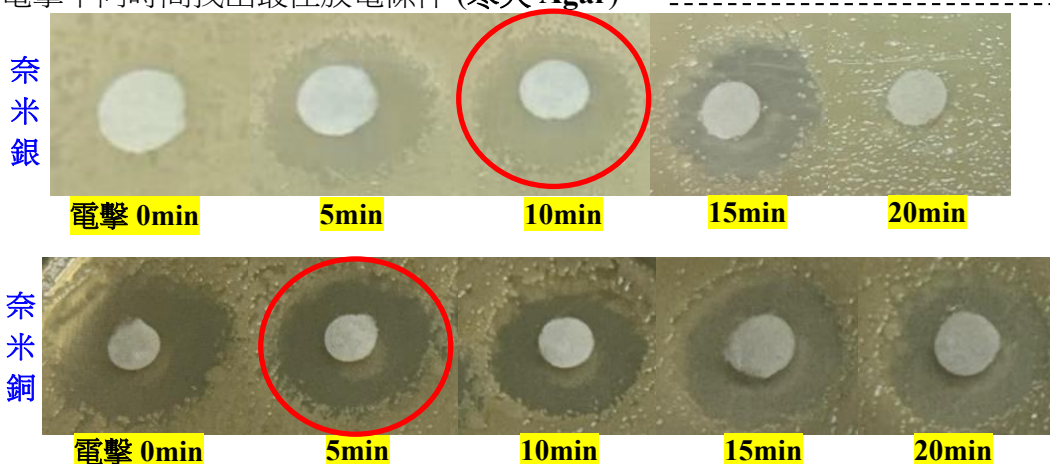
(9) UVC Cu 60min	1.1	1.2	0.85	1.05	0.10	1.85%
(10) (Corona Discharge) Ag 1min	1.7	1.9	1.63	1.74	0.10	3.07%
(11) (Corona Discharge) Cu 1min	1.46	1.43	1.59	1.49	0.08	2.63%

實驗結論：無論 DH5 α 或 BL21 兩種菌種，尖端放電處理後的奈米銀銅皆具有抑菌效果，而奈米銅本身就具有抑菌效果，奈米銅的抑菌圈面積較銀大。

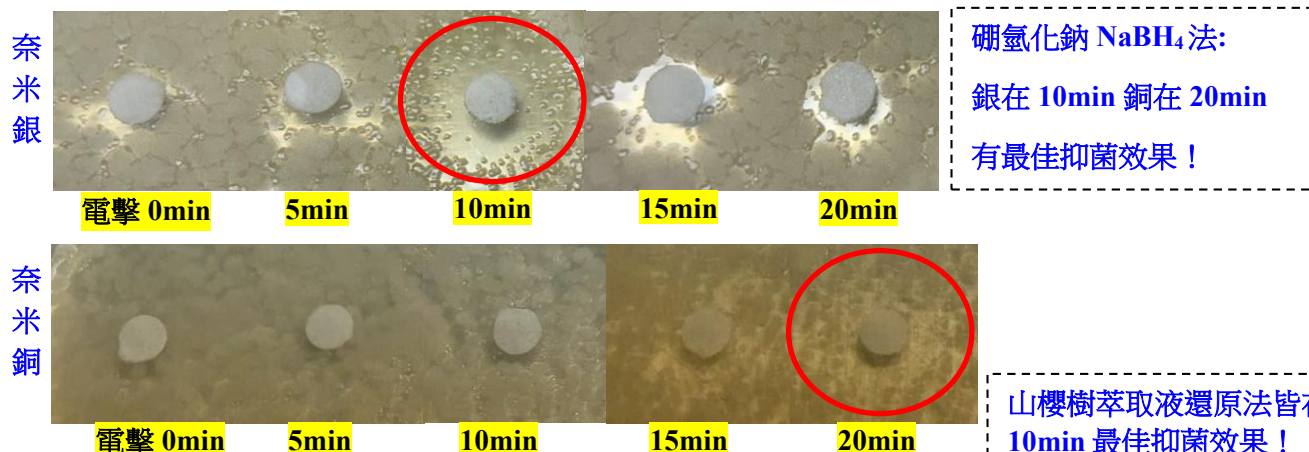
六、奈米銀銅粒子溶液各製程及前置處理法抑菌探討

(一)各製程最佳尖端放電時間尋找

1. 電擊不同時間找出最佳放電條件 (寒天 Agar)



2. 電擊不同時間找出最佳放電條件 (硼氫化鈉 NaBH₄)



3. 電擊不同時間找出最佳放電條件 (山櫻花(Prunus campanulata Maxim))

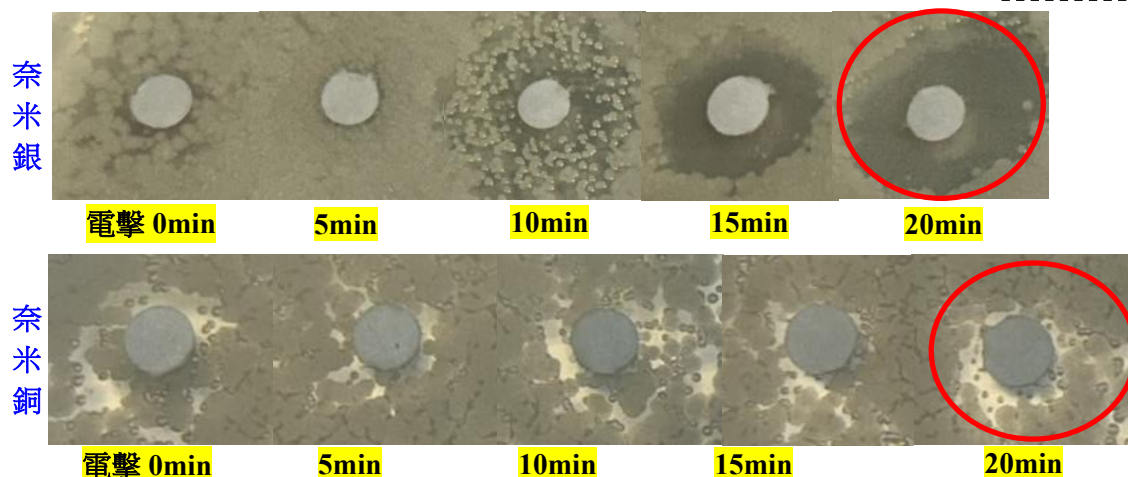
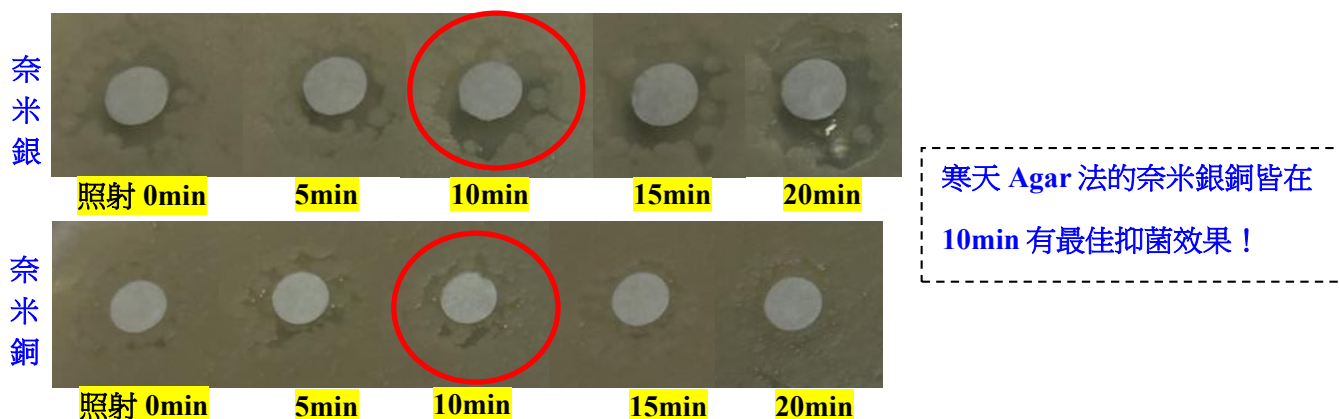


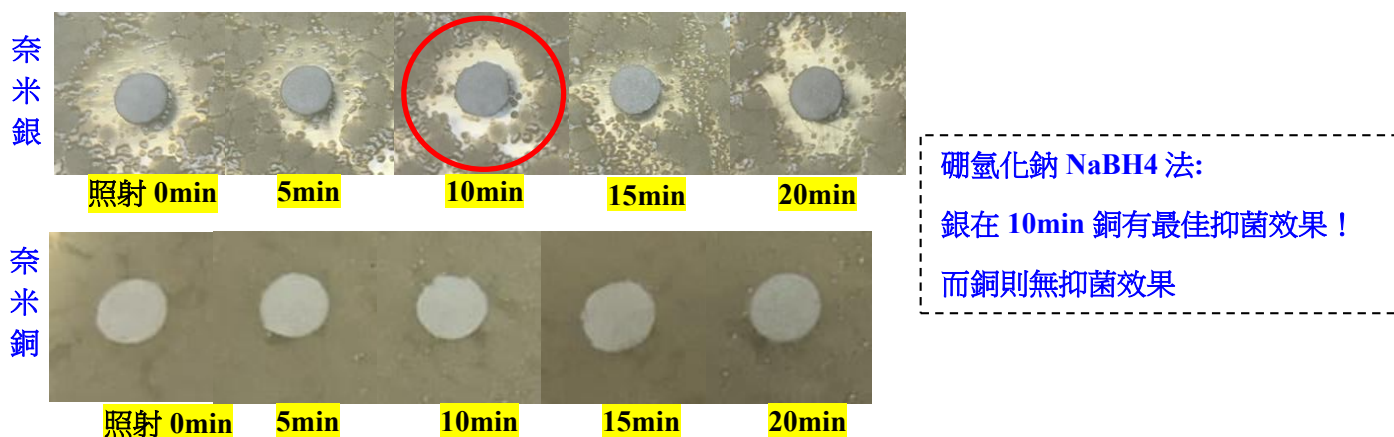
圖 30. 各製程最佳尖端放電時間尋找(本圖片由作者親自拍攝)

(二) 各製程最佳照射紅外線 IR 時間尋找

1. 照射紅外線 IR 不同時間的抑菌效果(寒天 Agar)



2. 照射紅外線 IR 不同時間的抑菌效果(硼氫化鈉 NaBH₄)



3. 照射紅外線 IR 不同時間的抑菌效果山櫻花(Prunus campanulata Maxim)

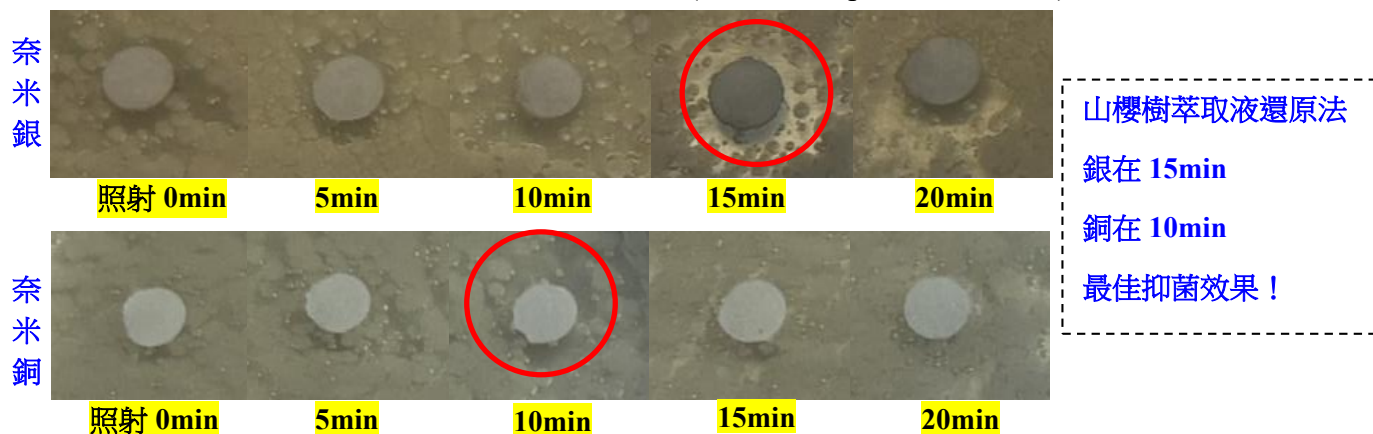


圖 31. 各製程最佳照射紅外線 IR 時間尋找(本圖片由作者親自拍攝)

(三) 3 種製程尖端放電抑菌圈數值分析

1. 尖端放電面積比較(Ag)

實驗結論:圖 32 知三種製程的抑菌圈大小:山櫻樹植物萃取液 > NaBH₄ > 寒天 Agar。

2. 尖端放電面積比較(Cu)

實驗結論: 圖 32 知三種製程的抑菌圈大小: NaBH_4 > 山櫻樹植物萃取液 > 寒天 Agar。

(四) 3 種製程照射紅外線 IR 抑菌圈數值分析

1. 照射紅外線 IR 面積比較(Ag)

實驗結論: 圖 32 知三種製程的抑菌圈大小: NaBH_4 > 山櫻樹植物萃取液 > 寒天 Agar

2. 照射紅外線 IR 面積比較(Cu)

實驗結論: 圖 32 知三種製程的抑菌圈大小: 寒天 Agar > 山櫻樹植物萃取液 > NaBH_4

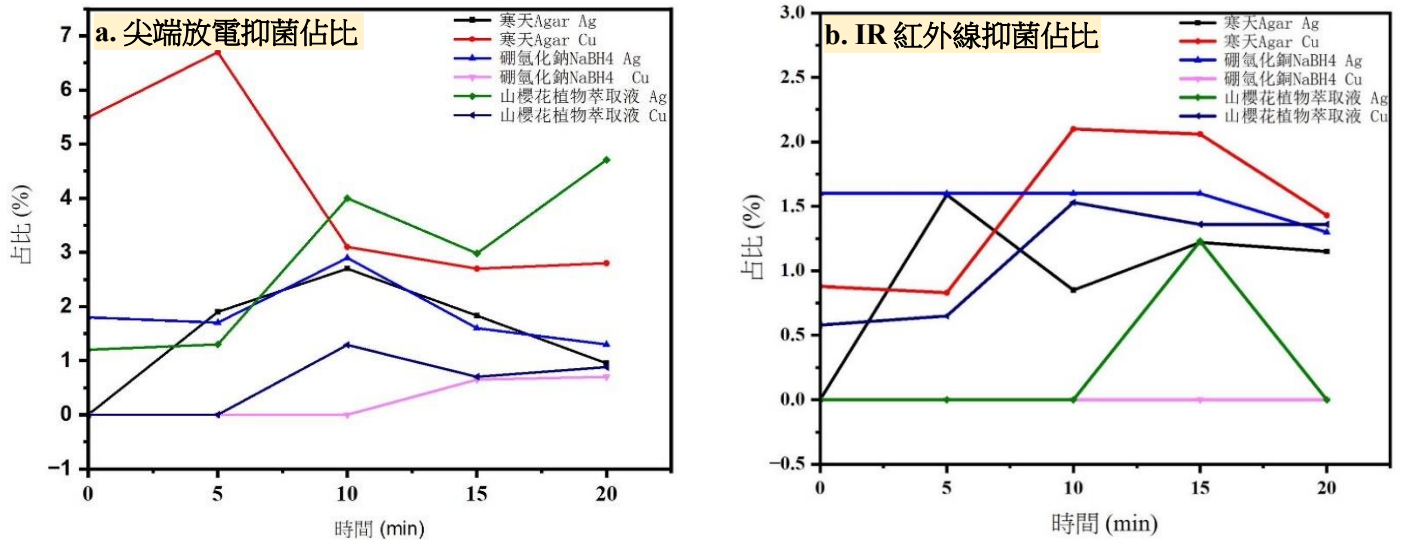


圖 32.折線圖統計分析奈米銀銅抑菌佔比(本圖片由作者以 origin 製作)

(五) 尖端放電抑菌效果持續性測試-放電後靜置不同時間的抑菌圈大小

1. 將山櫻樹植物萃取液奈米銀電擊 10 分鐘後靜置不同時間，滴入紙錠量測抑菌圈大小。

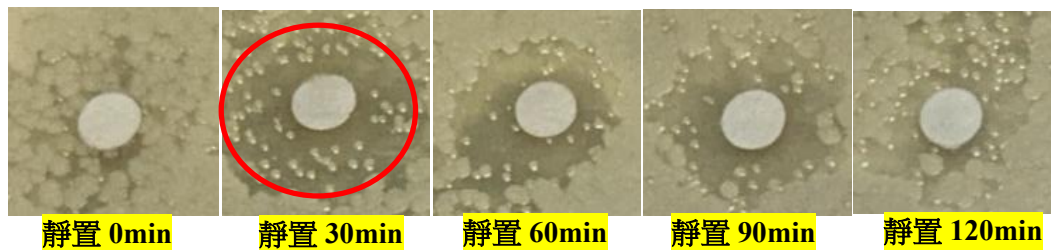


圖 33. 尖端放電抑菌效果持續性測試(本圖片由作者親自拍攝)

2. 長條圖數值分析

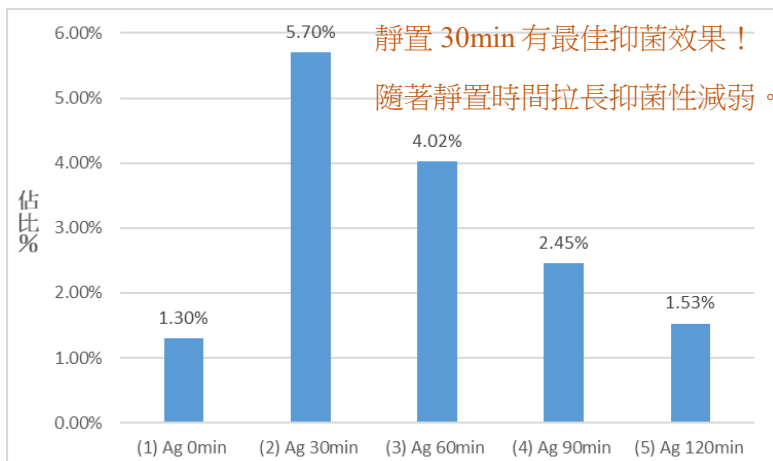


圖 34. 山櫻樹萃取液奈米銀電擊 10 分鐘後靜置不同時間的抑菌圈大小與 TEM 粒徑分析 (本圖片由作者使用 EXCEL 親自繪製)

與文獻 6 Das (2019) Table 2 數據相比

奈米銀抑菌圈:

濃度 $500\mu\text{g/ml}$ 抑菌圈佔比 5.8%

濃度 $400\mu\text{g/ml}$ 抑菌圈佔比 5.2%

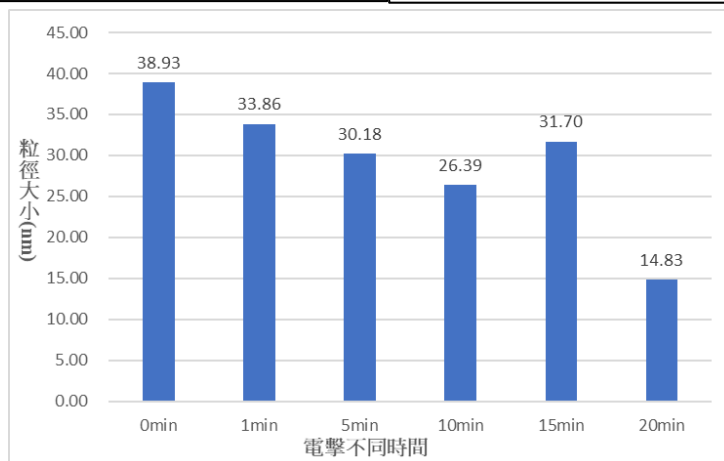
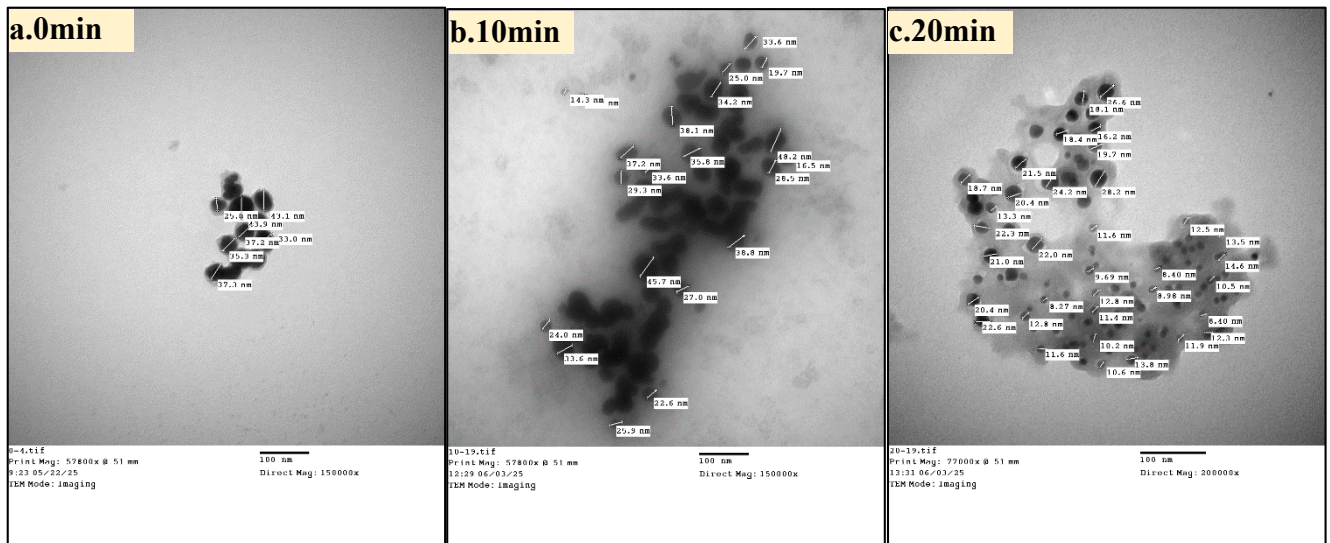
濃度 $300\mu\text{g/ml}$ 抑菌圈佔比 3.5%

本研究銀奈米粒子濃度 $250\mu\text{g/ml}$,

電擊 20min, 佔比 4.71% 大於文獻中的濃度

$300\mu\text{g/ml}$ 的 3.5%, 較文獻佳!

3. 山櫻樹植物萃取液奈米銀電擊不同時間 TEM 粒徑分析



由圖中可知尖端放電時間越長

奈米銀粒徑越小且數目越多!

符合圖 30 在 20min 時抑菌效果也最佳!!

實驗結論： 圖 35.TEM 照片及粒徑分析長條圖(本圖為付費送測貴儀中心取得並由作者親自繪製)

(1)本研究選用 E. coli 菌株 DH5 α 、BL21，並 Penicillin 為對照組。Penicillin 對兩種菌株均有明顯抑菌效果，對 DH5 α 抑菌圈面積達 7.84%，對 BL21 達 9.35%。培養基中寒天 (agar) 奈米銀對兩種菌株皆無抑菌作用，而奈米銅在兩種不同的菌種 DH5 α 、BL21 產生明顯抑菌圈，照射 UVC 紫外線燈後，奈米銀抑菌效果無明顯變化，奈米銅的抑菌圈面積與未照射紫外線光時相近，而改照射紅外線 IR 後，奈米銀抑菌效果顯著提升，奈米銅有無照射紅外線 IR 其抑菌性則無明顯差異。

(2)奈米銀與奈米銅使用尖端放電前置處理後，抑菌圈面積皆有顯著提升，在 3 種製程奈米銀在最佳放電時間 10min 時，相較於未前置處理，抑菌圈佔比提升超過 2.5%，在 3 種製程奈米銅在最佳放電時間(硼氫化鈉:5min，寒天:5min，山櫻樹:20min)，抑菌圈佔比寒天 Agar 提升 1.2%，硼氫化鈉提升 0.65% 植物萃取液提升 1.2%。在兩種不同的菌株中抑菌圈大小比序相同，皆為尖端放電>純寒天 Agar 奈米粒子溶液=UVC 紫外線燈。

(3)以 UVC 紫外線燈照射銀銅奈米粒子，無法有效提升抑菌性，照射紅外線 IR 後，奈米銀抑菌效果顯著提升，尖端放電則對奈米銀及銅抑菌性皆有顯著提升，且由 TEM 平均粒徑圖可知放電時間增加，抑菌性提升的原因是放電後奈米粒子粒徑減小及數目增加，由文獻 7 Huang(2020)及文獻 8 Bansal(2014)可知奈米粒子抑菌主因是 LSPR 區域性表面電漿共振的熱效應所致，故尖端放電可有效提升 LSPR 熱效應，且效果較照射 IR 佳。

七、高效液相層析法 HPLC 山櫻花植物葉片還原成份分析

HPLC 檢測山櫻花葉片萃取液對於奈米銀的還原性成分，下圖紅框處在滯留時間。45-84min 時，萃取液(黑)加入奈米銀後(藍)峰值強度明顯降低，即還原性成份還原銀離子後濃度降低，圖中如箭頭所示三個峰為主要還原性成分。經文獻 Poonam (2011)對比主成份為 Naringenin(橙皮素)分子量 $m/z=273.2$ ，為一種黃酮類(flavanone)，Genistein(染料木素) $m/z=271.2$ ，為異黃酮(isoflavanone)及 Sakuranetin(櫻花素) $m/z=286.2$ 為甲氧基化的黃酮類，其中櫻花素為植物防禦素(Phytoalexin)，具有抑制微生物生長潛力。

HPLC profiling of aqueous extract of the leaf of *Cerasus campanulata*

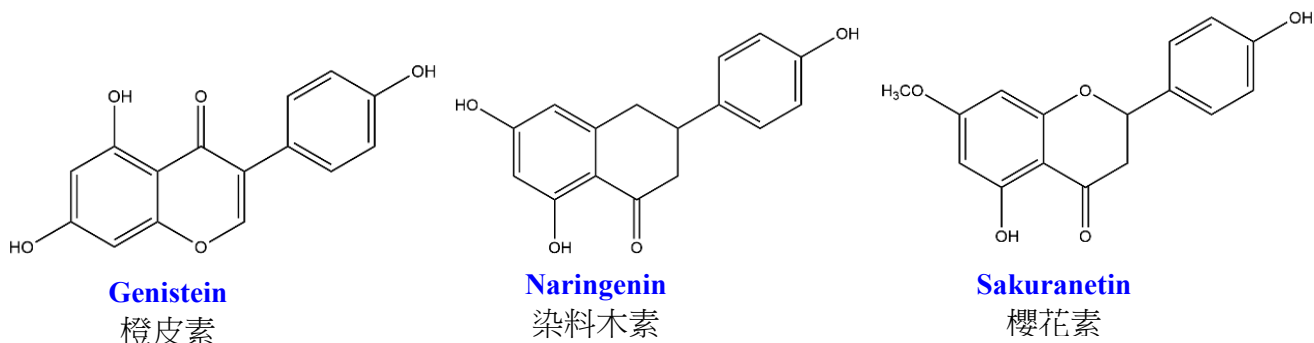
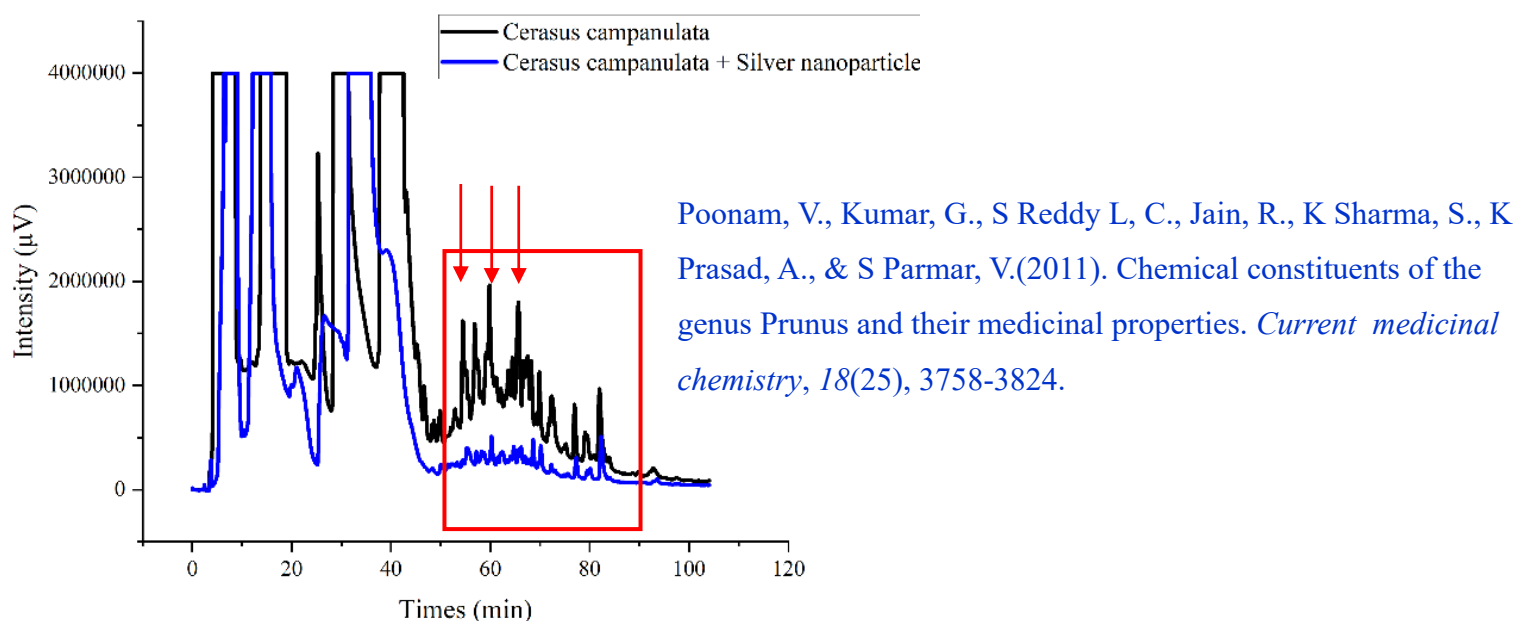
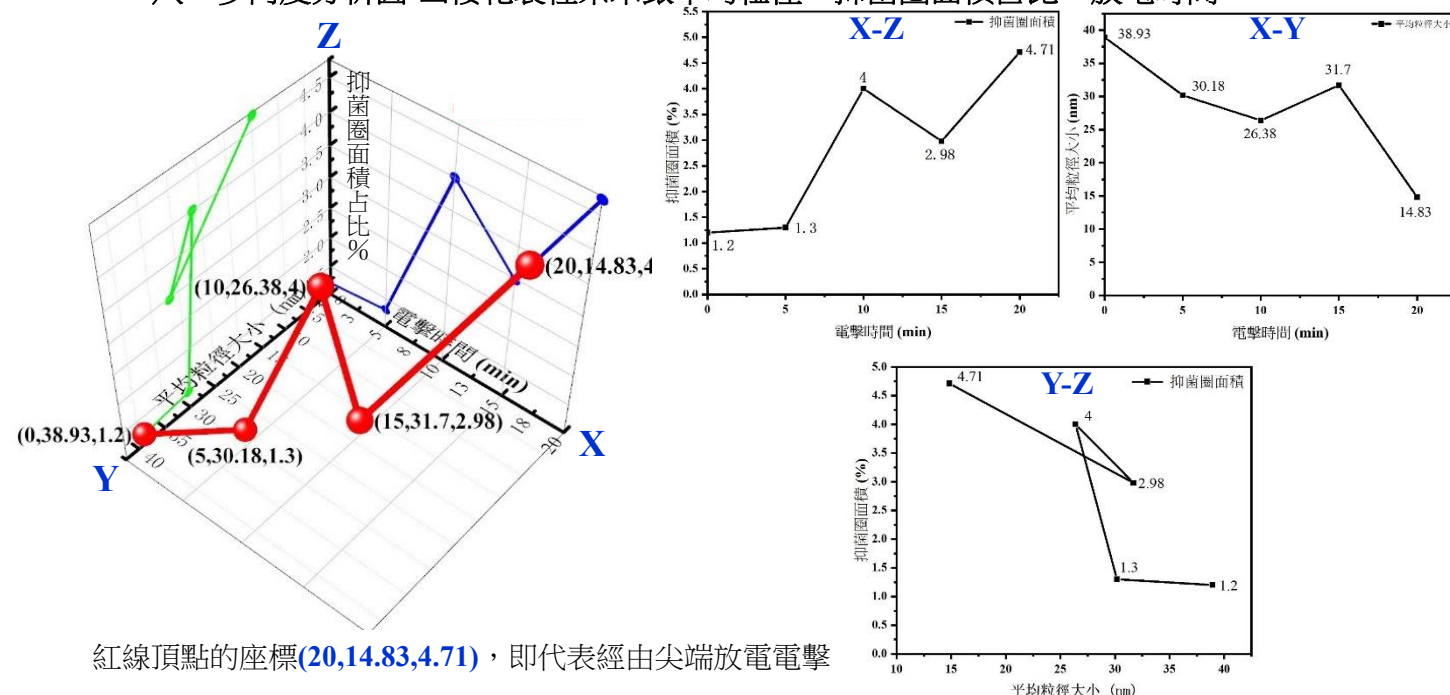


圖 36. HPLC 山櫻花植物葉片還原成份分析(本圖為付費送測貴儀中心取得並由作者親自繪製)

HPLC 層析圖以 origin 繪製，結構圖以 Chemdraw 繪製

八、多向度分析圖-山櫻花製程奈米銀平均粒徑、抑菌圈面積占比、放電時間



紅線頂點的座標(20,14.83,4.71)，即代表經由尖端放電電擊

20min 生成 14.83nm 的奈米銀粒子，抑菌面積達 4.71%。

圖 37. 多向度分析圖-含 2 維向度解析(本圖為作者以 origin 親自繪製)

由 X-Z 圖 2 維向度分析得知植物萃取製程的奈米銀本身具有抑菌能力，再經由尖端放電施打電弧至奈米銀粒子溶液中，電擊最長時間 20min 時有最明顯抑菌能力。由 X-Y 圖得知，在未電擊時奈米粒子粒徑為 38.93 nm，經過尖端放電電擊過後，奈米銀粒子隨電擊時間增長，平均粒徑明顯下降，未電擊和電擊 20min 奈米粒子粒徑相差 24.1nm。由 Y-Z 圖得知不同粒徑對於抑菌實驗的影響，在佔比最大 4.71%(抑菌效果最佳)對應奈米銀粒子粒徑最小。

伍.討論

一、本研究以綠色合成法製備奈米粒子，以校園原生山櫻花樹葉萃取液作為還原劑，還原銀銅離子，並以尖端放電的電弧用來電擊奈米銀溶液，增強奈米銀粒子間的靜電排斥力，粒子間彼此互相排斥，降低粒子凝聚的機率，將電擊不同時間的奈米銀溶液放入 TEM 穿透式電子顯微鏡底下，電擊時間越長奈米銀粒子數增加、平均粒徑降低，增加了更多銀奈米粒子與大腸桿菌表面積接觸，故尖端放電可有效提升抑菌性。

二、 NaBH_4 製備奈米銀銅: NaBH_4 作為還原劑還原銀銅離子，以 532nm 綠光雷射筆照奈米粒子溶液，可明顯觀察到廷得耳效應，並快速粗估粒徑的分散性。廷得耳效應的明顯程度與粒徑大小密切相關，粒徑小於 1 nm，光線幾乎不會被散射，大於 1000 nm，則粒子會沉澱，光線反而會被反射或吸收而不是散射，故廷得耳效應也不明顯。奈米銅因明膠的

分子結構中含有帶正電的氨基($-\text{NH}_3^+$)與帶負電的羧基($-\text{COO}^-$)，能與金屬奈米顆粒表面的電荷發生靜電作用，形成**電雙層**，產生**靜電斥力**，以及超音波震盪的分散效果，使粒子能夠**長期穩定分散而不沉降**。而未經處理的奈米銅粒子因缺乏明膠做為穩定劑，因凡德瓦力作用導致凝聚並快速沉降。奈米銀滴定若滴加速度過快奈米銀易凝聚沉降，由 TEM 知**粒徑皆大於 44.93nm**，透過改良滴加速率和試劑濃度，優化奈米銀的製程條件。

二、**寒天 Agar 製備奈米銀銅**:利用寒天 Agar 作為還原劑，由於寒天為**多羟基的醛酮**具有還原性，且為**液態膠狀**因此可和銀銅奈米粒子均勻混合，充分進行還原反應，使用三層**鋁箔紙**包覆雙頸瓶以**避光**，並於反應過程中**通氮氣**以**隔絕氧氣**，加熱包和溫控儀串接以精準控制反應溫度，避免溶液沸騰導致奈米銀銅被氧化，在避光和隔氧條件下的寒天 Agar 銀溶液為無色透明，而奈米銅無論在避光和隔氧條件皆會變成深褐色，離心 30 min 奈米銀沉澱為**白色固體**，奈米銅是**褐色**沉澱，以 TEM 穿透式電顯測量出**奈米銀**粒子有效將奈米銀粒子粒徑降低至 **25.41nm** 為三製程中粒徑最小，奈米銅則是降至 **12.00nm**。

三、**山櫻花樹(*Prunus campanulata* Maxim)萃取液製備奈米顆粒**:取用校園原生山櫻花葉片製備萃取液，因其葉片角質層較其他植物薄，萃取率較佳，以抽氣過濾法將植物萃取液雜質分離，以滴定法將萃取液滴加至硝酸銀和硫酸銅水溶液中，山櫻花葉片萃取液中主要還原性成份為**類黃酮物質**使銀銅離子還原成奈米粒子，故隨**滴液越多**，還原的銅銀奈米**粒子越多**易凝集成膠體，**廷得耳效應越明顯**。在硝酸銀和硫酸銅水溶液中皆是滴加 1ml 萃取液有初步顏色變化，後續加入 5ml 及 15ml 來比對顏色差異，滴入 15ml 的植物萃取液樣本，在 TEM 穿透式電子顯微鏡下測量發現植物萃取液對於銀奈米粒子粒徑 52.78nm 無明顯作用，而**銅奈米粒子**粒徑有顯著降低，為 **5.42nm** 是三製程中粒徑最小。

四、**TEM 穿透式電子顯微鏡粒徑分析**:銅奈米粒子各製程下粒徑大小：**Agar > NaBH₄ > 植物萃取液**，銀奈米粒子各製程下粒徑大小：**植物萃取液 > NaBH₄ > Agar**，萃取液還原銀奈米粒子平均粒徑 52.78nm，相較於 NaBH₄ 製程，欲製備**最小粒徑銅奈米粒子**應選用**山櫻花樹萃取液還原法**，欲製備**最小粒徑銀奈米粒子**應選用**寒天 Agar 還原法**。

五、**抑菌測試 OD600 與紙錠法**:將空白組(無菌水)、對照組(75%乙醇、抗生素 penicillin)、(實驗組)銀銅奈米粒子溶液，在四種時間(0、1、2、12hr)每個樣本三重複，紀錄波長 600nm 的吸收度，以 Excel 統計分析求標準差並繪製 **xy 散佈圖**並輔以**對數趨勢線**，奈米

銅在 1-2hr 進入對數生長期吸收度上升，2hr 後有下降趨勢即具有抑菌性，而奈米銀對數生長期直至 6hr，之後才具明顯下降趨勢。由紙錠法實驗結果知寒天(agar)奈米銀對兩種菌株皆無抑菌效果，奈米銅在兩種菌種 DH5 α 、BL21 下都具有抑菌圈產生，嘗試照射 UVC 紫外線燈增強奈米粒子的表面共振效應，在黑暗環境下分別照射 10min 和 60min，奈米銀抑菌效果無明顯變化，而奈米銅抑菌圈面積與未照射紫外線光相近。照射紅外線 IR，奈米銀抑菌效果顯著提升，奈米銅其抑菌性則無明顯差異。自製尖端放電裝置，將奈米粒子溶液滴加至銅片上，對其施放電弧，奈米銀從無抑菌圈明顯成長超 2.5%，而奈米銅 Agar 及植物萃取液製程可提升 1.2%，硼氫化鈉提升 0.65%。前置處理對奈米粒子抑菌性的提升:尖端放電>純寒天 Agar =UVC 紫外線燈，由圖 37 抑菌折線圖分析得知 UVC 無法有效誘發奈米粒子 LSPR 表面共振效應，尖端放電能有效提升奈米銀抑菌性且效果較照射 IR 佳，放電抑菌性提升因放電後奈米粒子平均粒徑減小及數目增加所致。

陸、結論

1. NaBH₄ 製備法:奈米銀粒徑大於 44.93 nm，奈米銅以明膠為穩定劑可長時間分散，未經處理的奈米銅因高表面/積體積比，凡德瓦力在奈米尺度的近距離內顯著增強，易產生凝聚。
2. 寒天 Agar 製備法：奈米銀粒徑降低至 25.41 nm，奈米銅粒徑降至 12.00 nm。山櫻花樹萃取液法：奈米銀粒徑為 52.78 nm，奈米銅粒徑顯著降低至 5.43 nm。
3. TEM 粒徑分析結果：銅奈米粒子粒徑大小: Agar > NaBH₄ >植物萃取液，銀奈米粒子粒徑大小:植物萃取液> NaBH₄ > Agar。
4. OD600 測定:奈米銅在 2hr 後有下降趨勢即具有抑菌性，奈米銀需到 6hr 才具下降趨勢。
5. 奈米粒子無前置處理菌株生長趨勢:寒天 Agar 奈米銀對 DH5 α 及 BL21 菌株無抑菌效果，奈米銅則對兩種菌株均產生抑菌圈有抑菌效果。
6. 抑菌效果前置作業：照射 UVC 紫外線燈對奈米銀及奈米銅的抑菌效果無顯著影響。尖端放電處理後，奈米銀抑菌圈面積成長至 2.5%以上，奈米銅亦有所成長但較奈米銀小，表示尖端放電能有效誘發奈米粒子 LSPR 表面共振效應，抑菌能力排序:尖端放電 > 純寒天 Agar 奈米粒子溶液 = UVC 紫外線燈照射。
7. 尖端放電對於奈米銀粒子影響：電擊不同時間的奈米銀，以 TEM 檢測，發現奈米銀粒子經由電擊過後粒子數明顯增加，且粒徑從無電擊的 38.93nm 電擊 20min 後降至 14.83nm，有效降低平均粒徑，抑菌圈占比從 1.2 成長至 4.71%有效提升抑菌效果。

柒、參考文獻資料

1. Khatoon, U. T., Velidandi, A., & Rao, G. V. S. N. (2023). Sodium borohydride mediated synthesis of nano-sized silver particles: Their characterization, anti-microbial and cytotoxicity studies. *Materials Chemistry and Physics*, 294, 126997.
2. Shukla, M. K., Singh, R. P., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2012). Synthesis and characterization of agar-based silver nanoparticles and nanocomposite film with antibacterial applications. *Bioresource Technology*, 107, 295–300.
3. Sharma, G., Sharma, A. R., Kurian, S., Bhavesh, R., Nam, J. S., & Lee, S.-S. (2024). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using S1 genotype of *Morus alba* leaf extract: Characterization, antimicrobial and antioxidant potential assessment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12(3), 110345.
4. Wang, P., Liu, Z., Han, C., Ma, X., Tong, Z., & Tan, B. (2021). Cu₂O/CuO heterojunction formed by thermal oxidation and decorated with Pt co-catalyst as an efficient photocathode for photoelectrochemical water splitting. *Journal of Nanoparticle Research*, 23(12), Article 268.
5. Kouchpeima, F., Mokhtari, M. J., & Kouchpeima, S. (2017). The effect of silver nanoparticles on composite shear bond strength to dentin with different adhesion protocols. *Journal of Applied Oral Science*, 25(4), 367-373.
6. Das, D., Ghosh, R., & Mandal, P. (2019). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using S1 genotype of *Morus alba* leaf extract: characterization, antimicrobial and antioxidant potential assessment. *SN Applied Sciences*, 1, 1-16.
7. Huang, C. L., Kumar, G., Sharma, G. D., & Chen, F. C. (2020). Plasmonic effects of copper nanoparticles in polymer photovoltaic devices for outdoor and indoor applications. *Applied Physics Letters*, 116(25).
8. Bansal, A., Sekhon, J. S., & Verma, S. S. (2014). Scattering efficiency and LSPR tunability of bimetallic Ag, Au, and Cu nanoparticles. *Plasmonics*, 9, 143-150.

【評語】 052414

本研究採用綠色化學製程合成奈米粒子，探討銅、銀奈米粒子之形態控制與抑菌性能，評估銅、銀奈米粒子應用於抗菌領域之成效。採用硼氫化鈉、寒天 Agar 及植物萃取液法，合成銅、銀奈米粒子，使用 TEM 分析粒徑大小與分散性，高效液相層析法 HPLC 檢測萃取液中之反應物質。於實驗步驟中採用綠色化學合成奈米粒子，其粒徑與 NaBH_4 差異不大，顯現出該萃取物之可行性，然而於奈米粒子粒徑分析中，建議可以使用紫外光-可見光光譜儀進行分析，可得知其粒徑分布與大小，會更貼近於整體溶液粒徑分布結果。於尖端放電實驗中提到奈米粒子之平均粒徑有效降低，然銀奈米粒子因反應物濃度過高和穩定劑不足，容易聚集粒徑較大。而尖端放電實驗中可使奈米粒子之平均粒徑有效降低，可提升銀奈米粒子之抑菌能力，但尖端放電實驗中所呈現方式過於粗糙，需好好考慮相對的設計及實驗呈現。另外二種綠色製程包含 Agar 及植物萃取液做還原劑合成奈米粒子，並和 NaBH_4 製程對照，如何獲得不同奈米粒子沒有在此研究中提及，研究內容與步驟具科學研究精神，研究成果豐富且具應用潛力。

作品海報

銅銀奈米粒子形態控制 與抑菌特性研究

壹、摘要

本研究探討銅銀奈米粒子的形態控制與抑菌性能。對比傳統製成硼氫化鈉與近年來新製程寒天 Agar 及獨創校園植物山櫻花葉片萃取液，合成銅銀奈米粒子，使用TEM 分析粒徑大小和分散性。結果顯示，銀奈米粒子因反應物濃度過高和穩定劑不足，容易聚集粒徑較大。奈米銅對大腸桿菌(E. coli)有顯著抑菌效果，而奈米銀抗菌性受粒徑影響較大。通過尖端放電，電擊處理過的奈米銀粒子，粒子數增加粒徑也明顯降低，並生成包覆膜，使銀奈米粒子抑菌能力能夠進一步提升。採用綠色化學製程所合成的奈米粒子，抑菌效果較傳統製成效果更佳，對於環境污染傷害也更低。

貳、研究目的

一、化學還原法製備奈米粒子

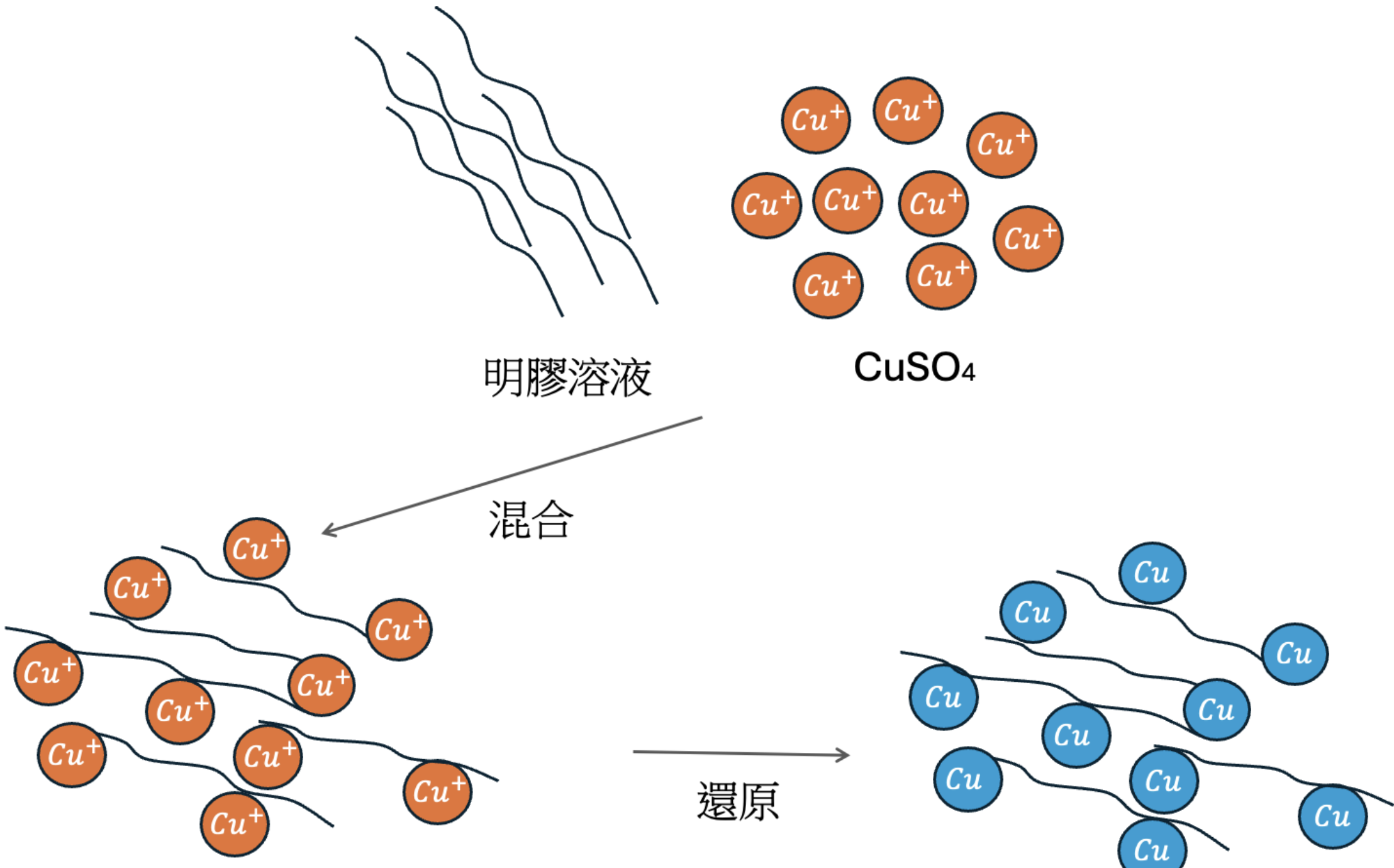


圖1.銅奈米粒子加入明膠作為穩定包覆劑
(本圖片由作者以powerpoint製作)

- (1) 硫酸銅(CuSO₄) 與氫氧化鈉(NaOH) 作用：
 $CuSO_4 + 2NaOH \rightarrow Cu(OH)_2 \downarrow + Na_2SO_4$ (藍色沉澱)
- (2) 氫氧化銅被 NaBH₄ 還原形成銅奈米粒子：
 $Cu(OH)_2 + NaBH_4 \rightarrow NaBH_2 + 2H_2O + Cu$
- (3) 硝酸銀被 NaBH₄ 還原形成銀奈米粒子：
 $2AgNO_3 + 2NaBH_4 \rightarrow 2Ag + 2NaNO_3 + B_2H_6$

三、實驗設備與器材



圖3.實驗器材及設備(a-g)(本圖片由作者親自拍攝)

參、結果與討論－合成

一、NaBH₄還原法製備奈米粒子

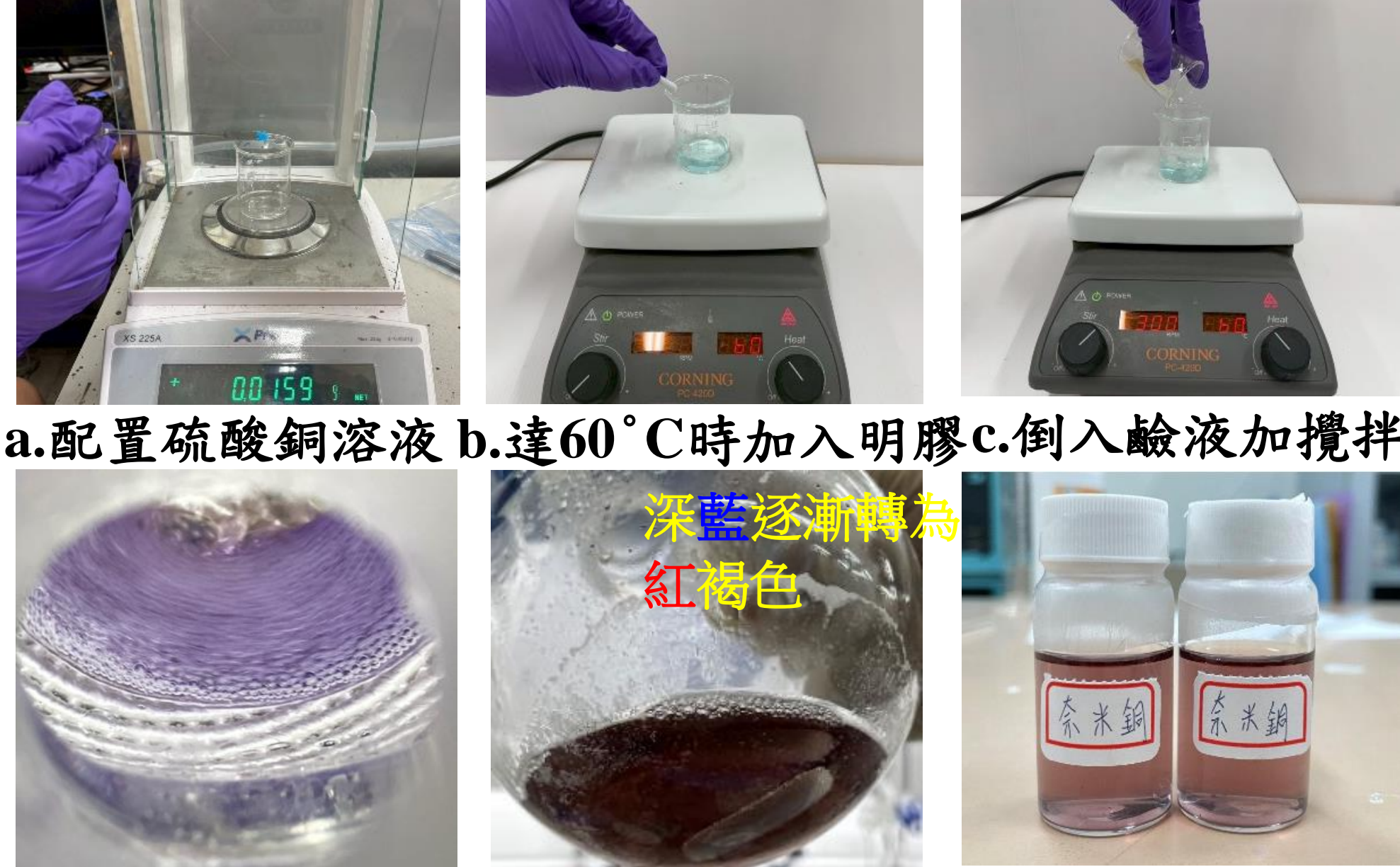


圖4. NaBH₄還原法製備奈米銅粒子(本圖片由作者親自拍攝)

二、寒天Agar還原法製備奈米粒子

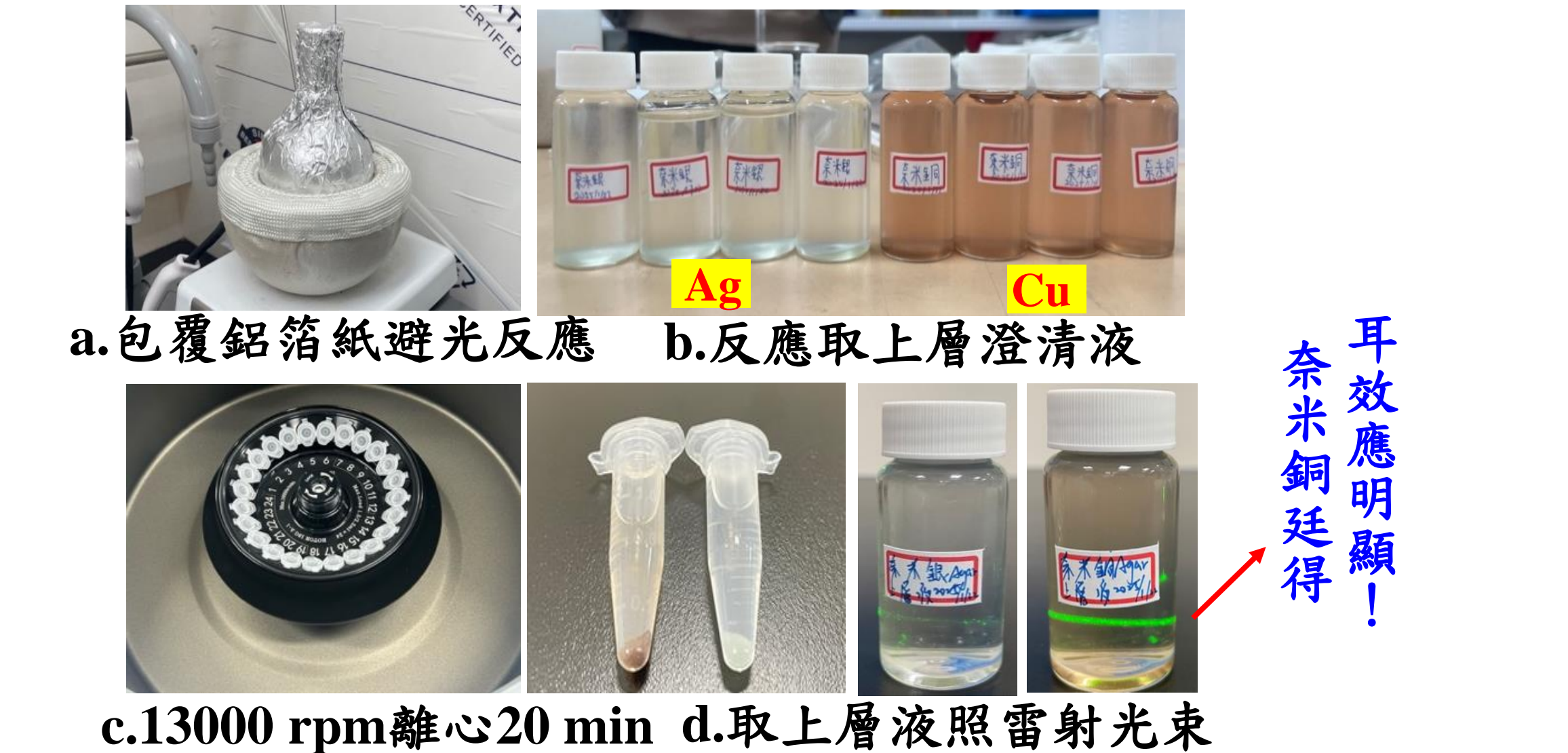


圖6.寒天Agar製備奈米顆粒步驟(a-d)(本圖片由作者親自拍攝)

二、研究架構

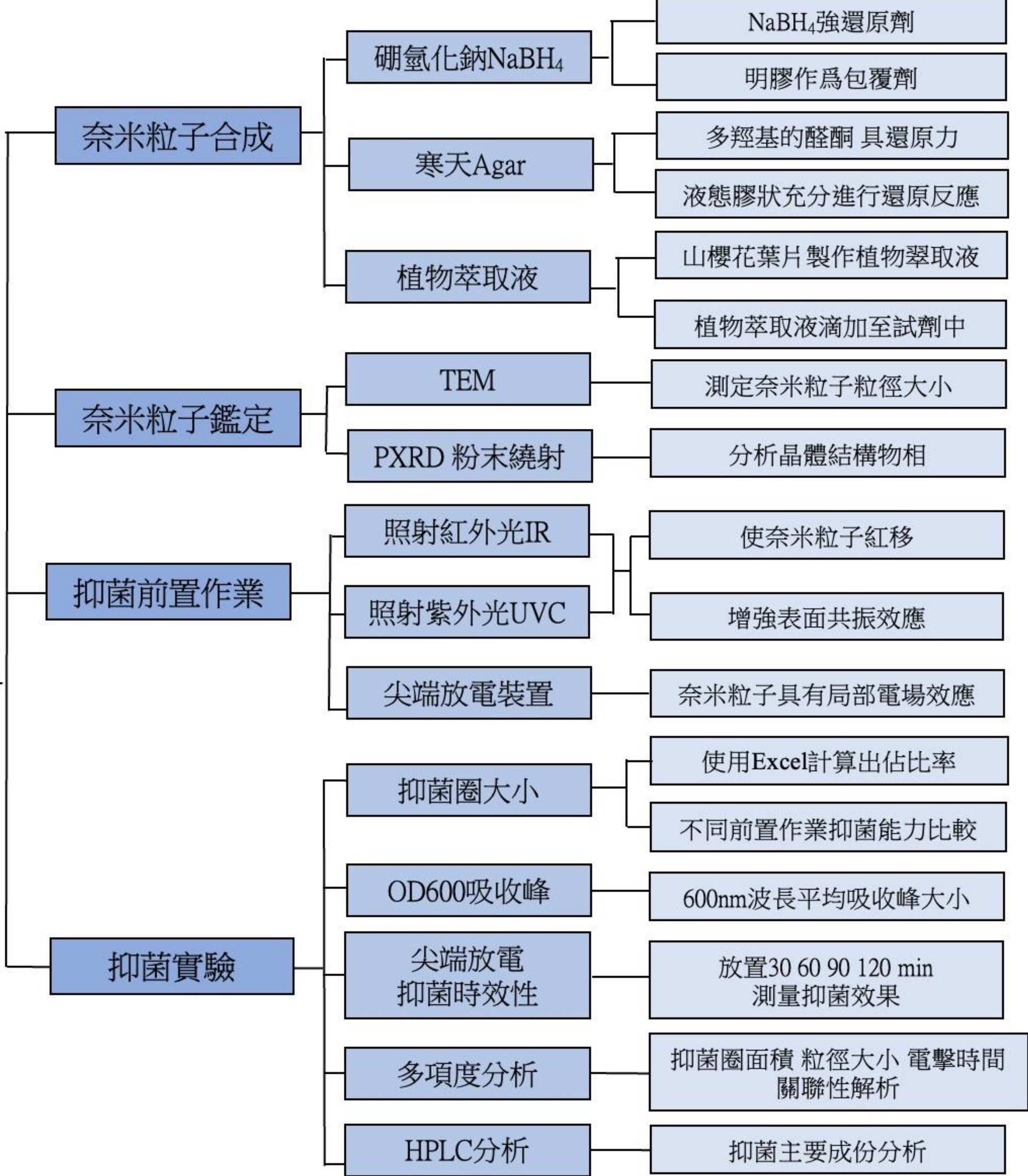


圖2.銅銀奈米粒子研究流程圖(本圖片由作者以powerpoin製作)

四、研究目的

- (一) 二種綠色製程: Agar及植物萃取液做還原劑合成奈米粒子，並和NaBH₄製程對照。
- (二) 以穿透式電子顯微鏡TEM進行奈米粒子粒徑差異比較。
- (三) 抑菌測試前置作業: 對照組: 未經處理的奈米粒子。實驗組: 照射IR照射UVC或尖端放電。
- (四) 抑菌測試: 紙錠法及OD600 Ecoli菌落生長曲線測試，評估不同變因抑菌能力差異。

三、山櫻花萃取液還原法製備奈米粒子

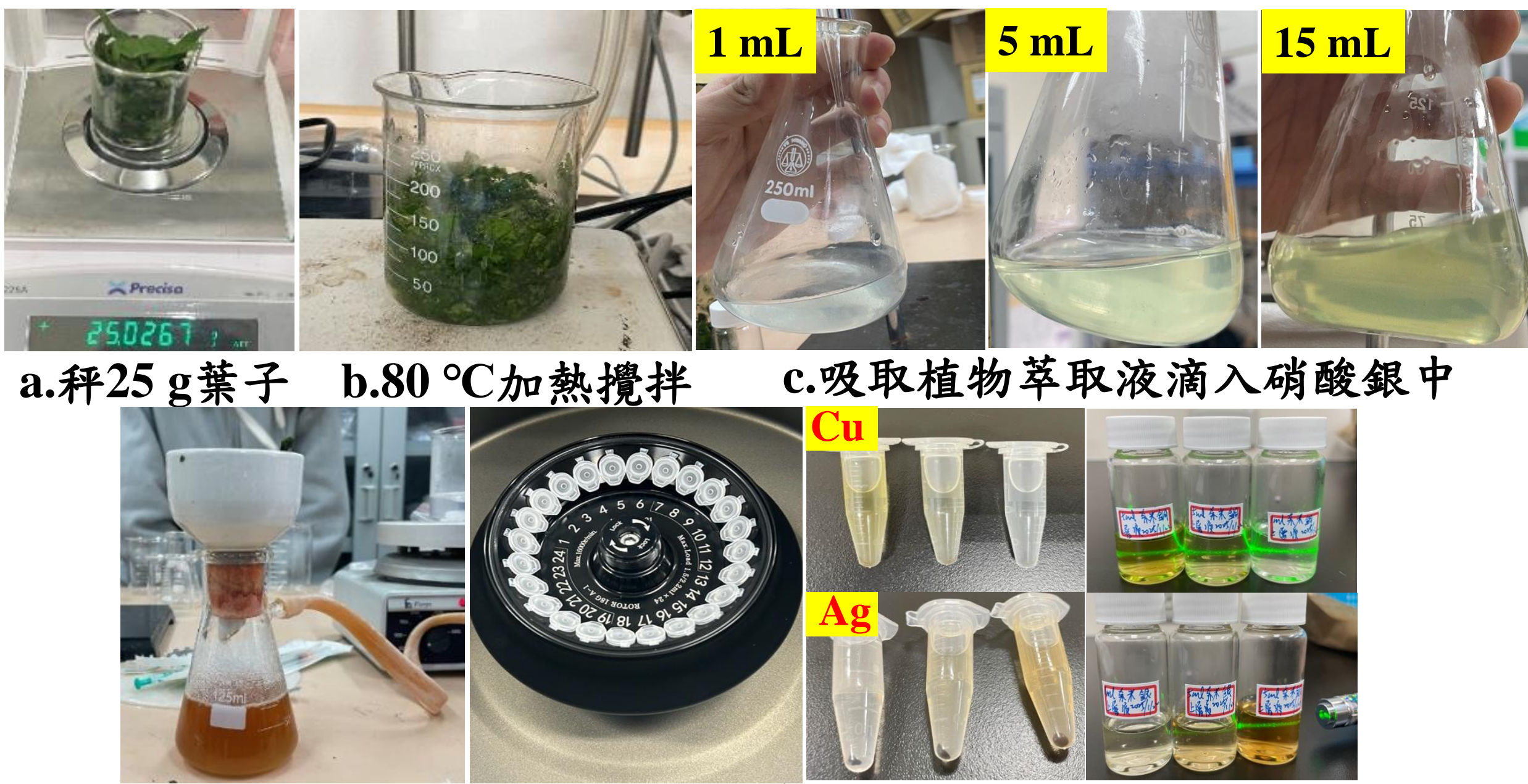


圖5.山櫻花葉萃取液製備奈米顆粒步驟(a-e)(本圖片由作者親自拍攝)

四、製備寒天Agar固態培養基

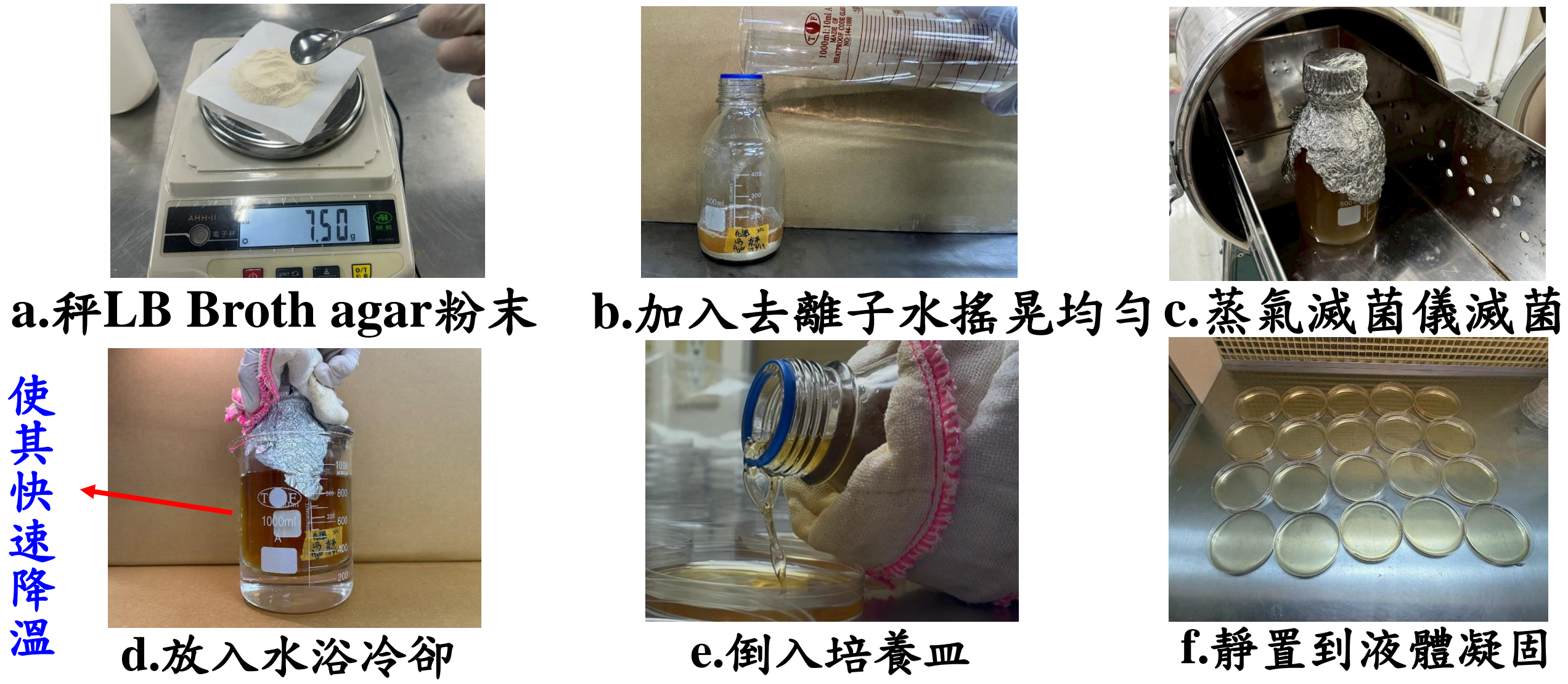
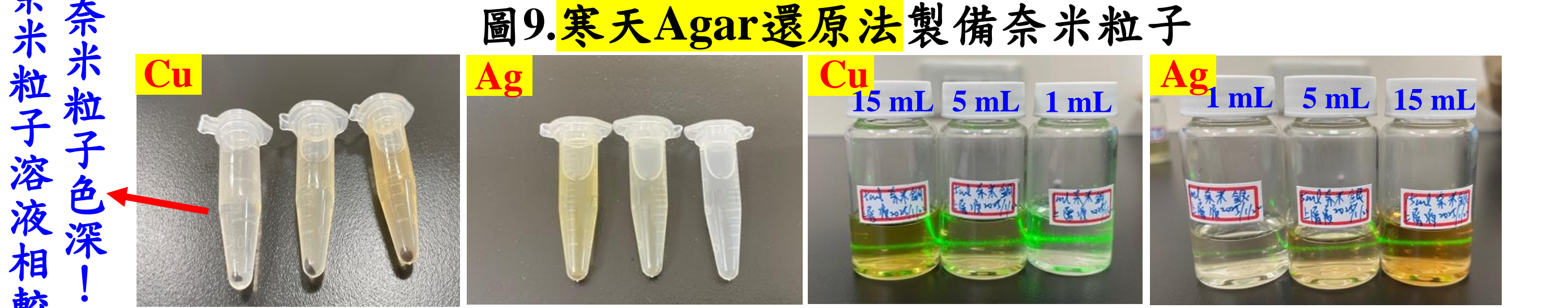
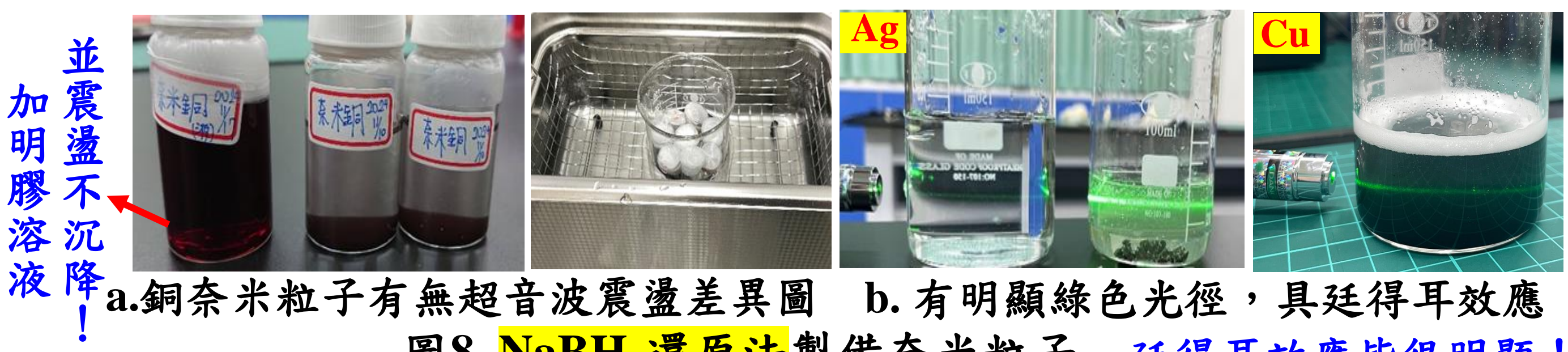


圖7.固態培養基製作步驟(a-f)(本圖片由作者親自拍攝)

肆、結果與討論 - 奈米粒子鑑定與抑菌性分析

一、3種製程製備奈米粒子



- 圖8：加明膠液並超音波震盪的奈米銅粒子靜置1周不沉降。
圖9：奈米銅相較於奈米銀具有更明顯的廷得耳效應。
圖10：滴加的植物萃取液越多，廷得耳效應越明顯。

圖8-10(圖片為作者親自拍攝)

二、穿透式電子顯微鏡(TEM)檢測奈米銀銅粒徑大小

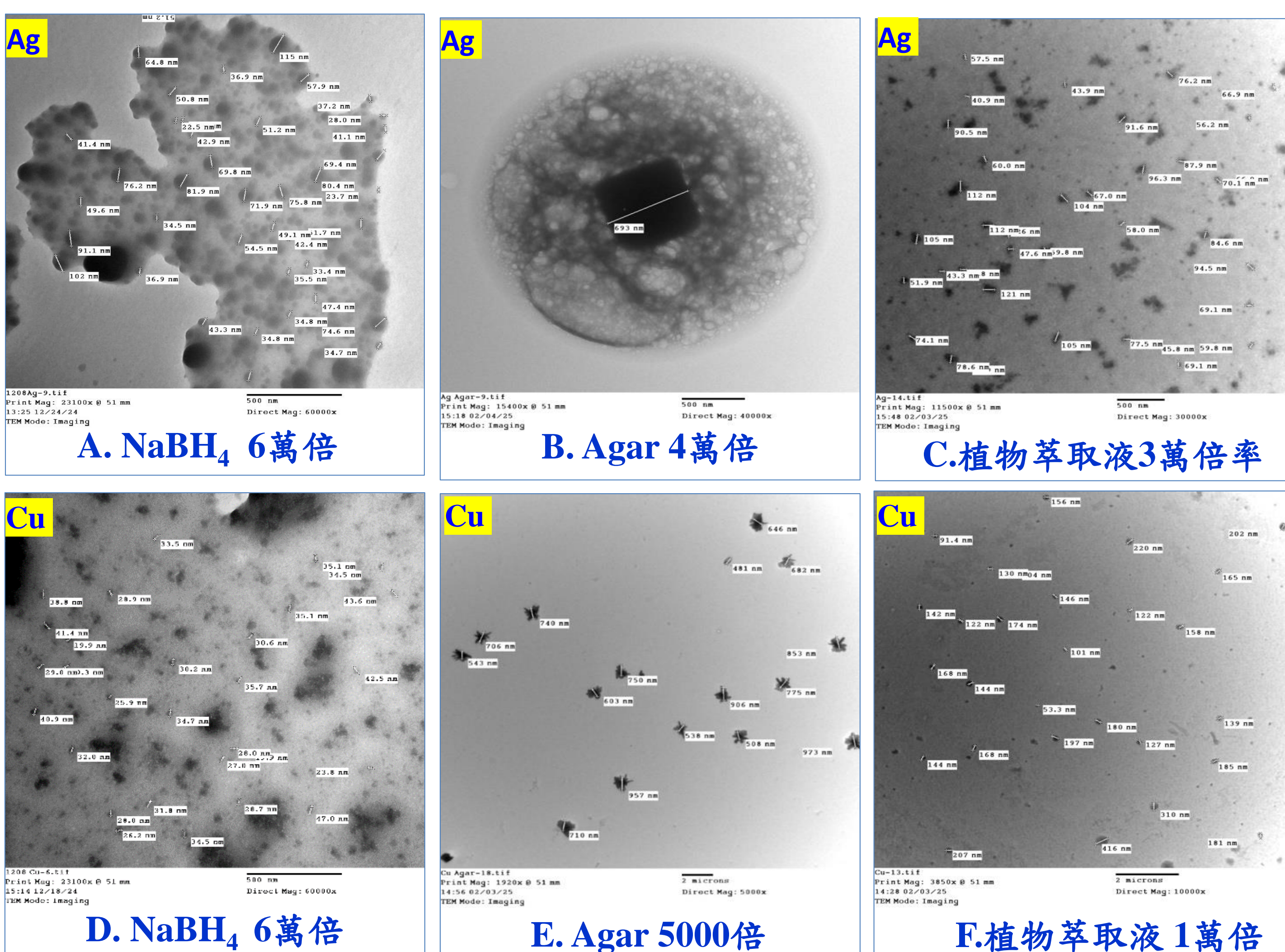


圖11.TEM穿透式電子顯微鏡觀測三種製程的粒徑大小(奈米銀銅)
(本照片為付費送測貴儀中心取得)

三、穿透式電子顯微鏡(TEM)檢測奈米銀銅粒徑大小

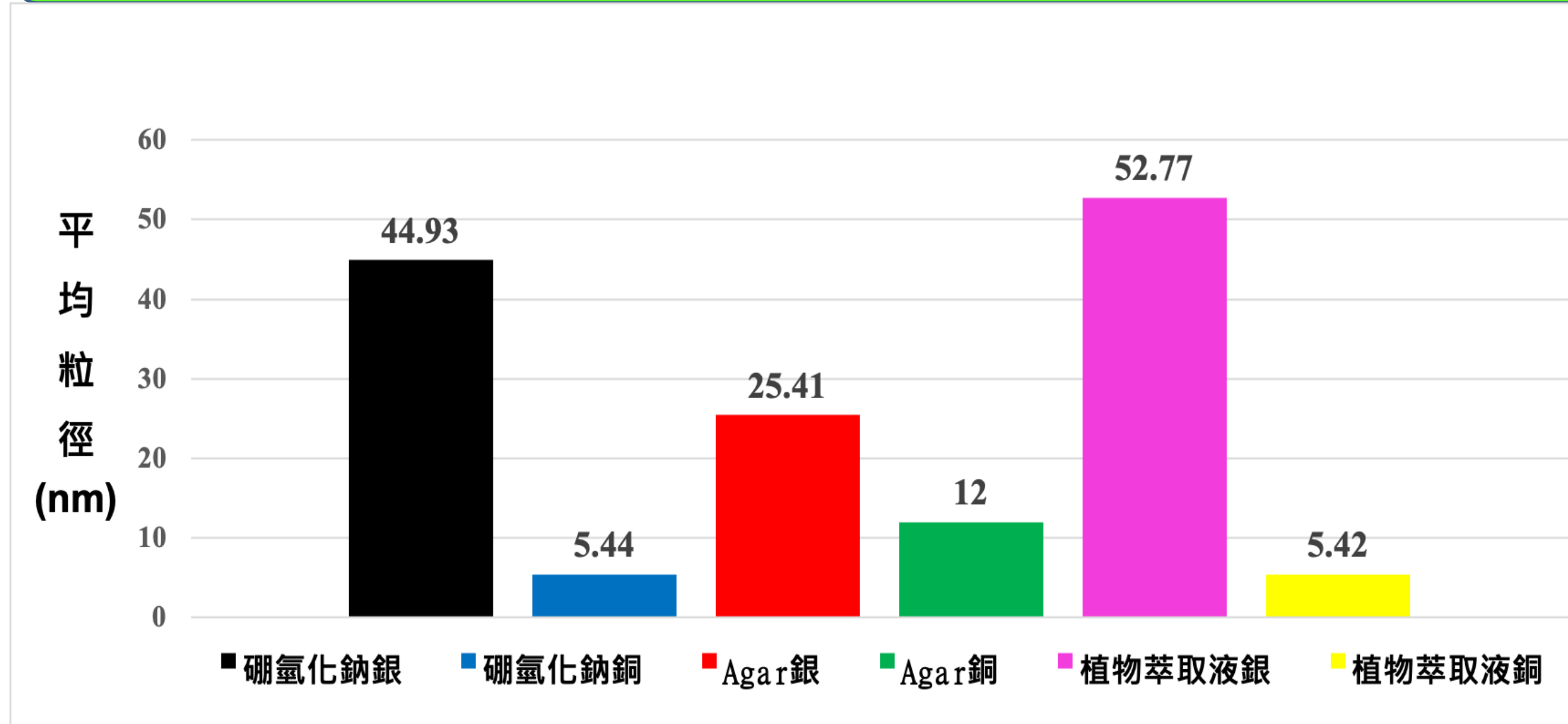
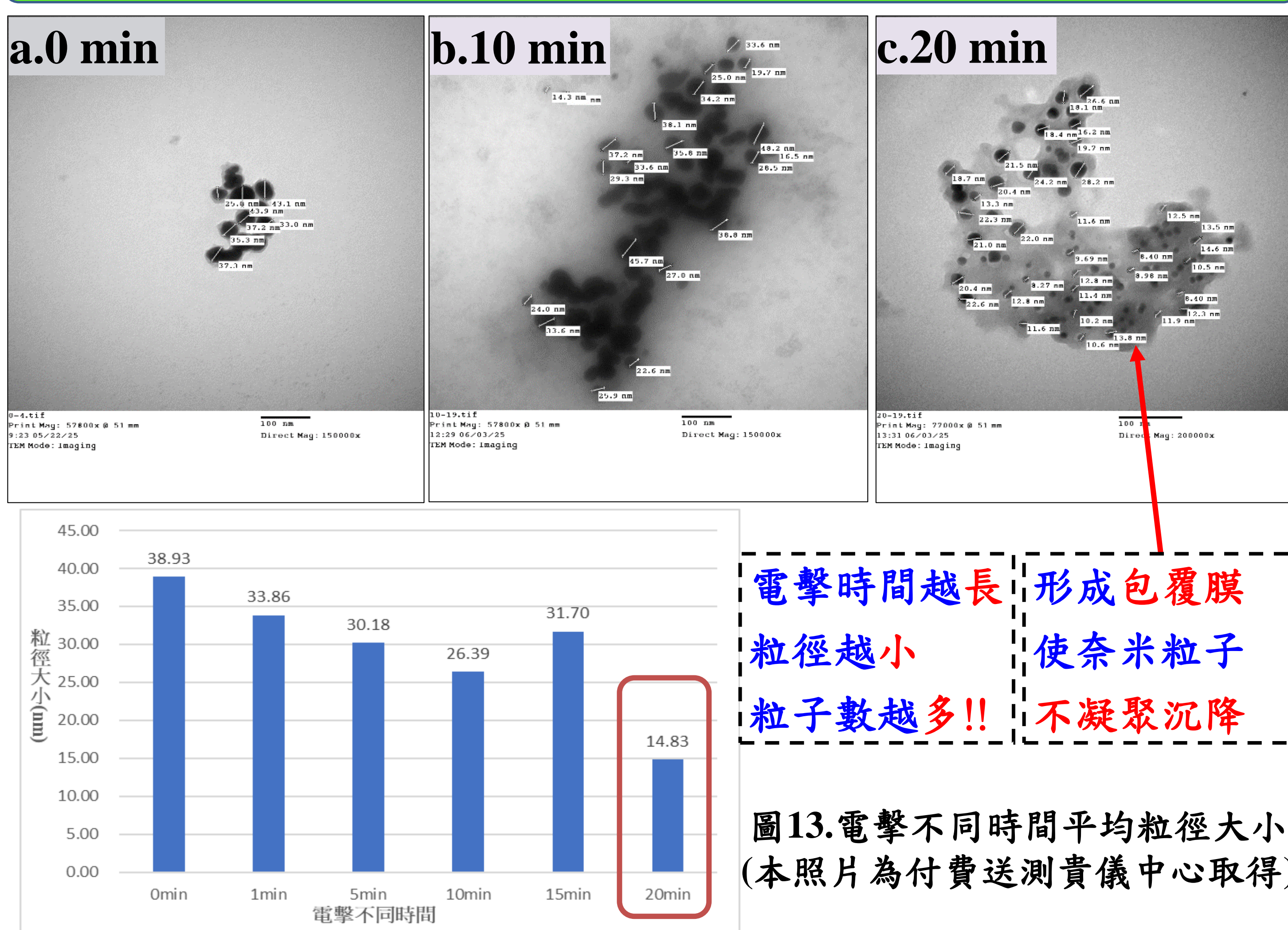


圖12.三種製程奈米例子平均粒徑分析(本圖作者使用Excel繪製)

- 小結:1.銅奈米粒子粒徑大小：Agar>硼氫化鈉>植物萃取液。
2.銀奈米粒子的粒徑大小：植物萃取液>硼氫化鈉>Agar。
3. NaBH_4 硼氫化鈉為強還原劑，實驗結果可知還原力越強，奈米粒子的粒徑未必會越小。

四、奈米銀電擊不同時間TEM粒徑分析



五、X ray粉末繞射觀測下奈米銀銅晶面分析

- 1.奈米銅主要峰值在角度 2θ : 29.5° 、 34.5° 、 40° ，各別對應(110)、(111)、(200)晶面，而奈米銀主要峰值在角度 2θ : 38.6° 、 44.7° ，對應(111)、(200)晶面。

- 2.圖譜主要峰值強度和背景雜訊比例極大。

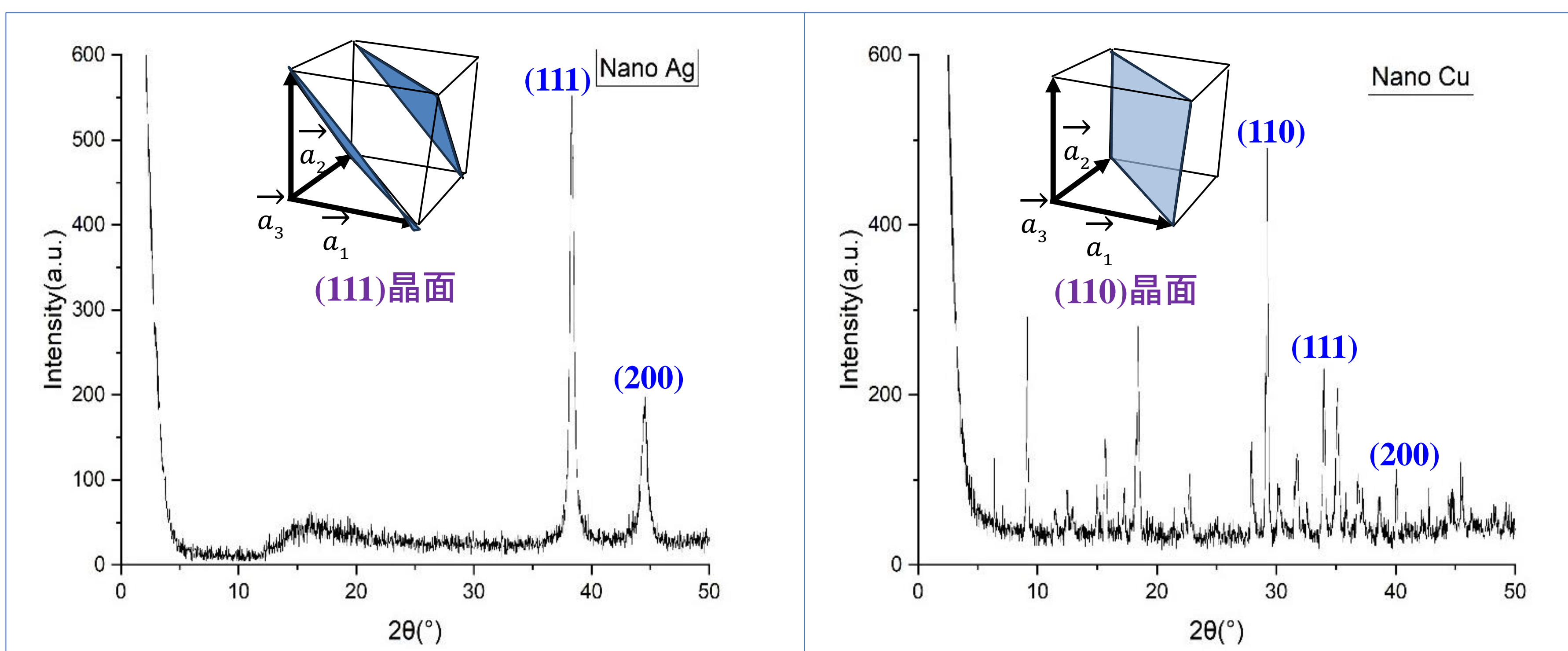
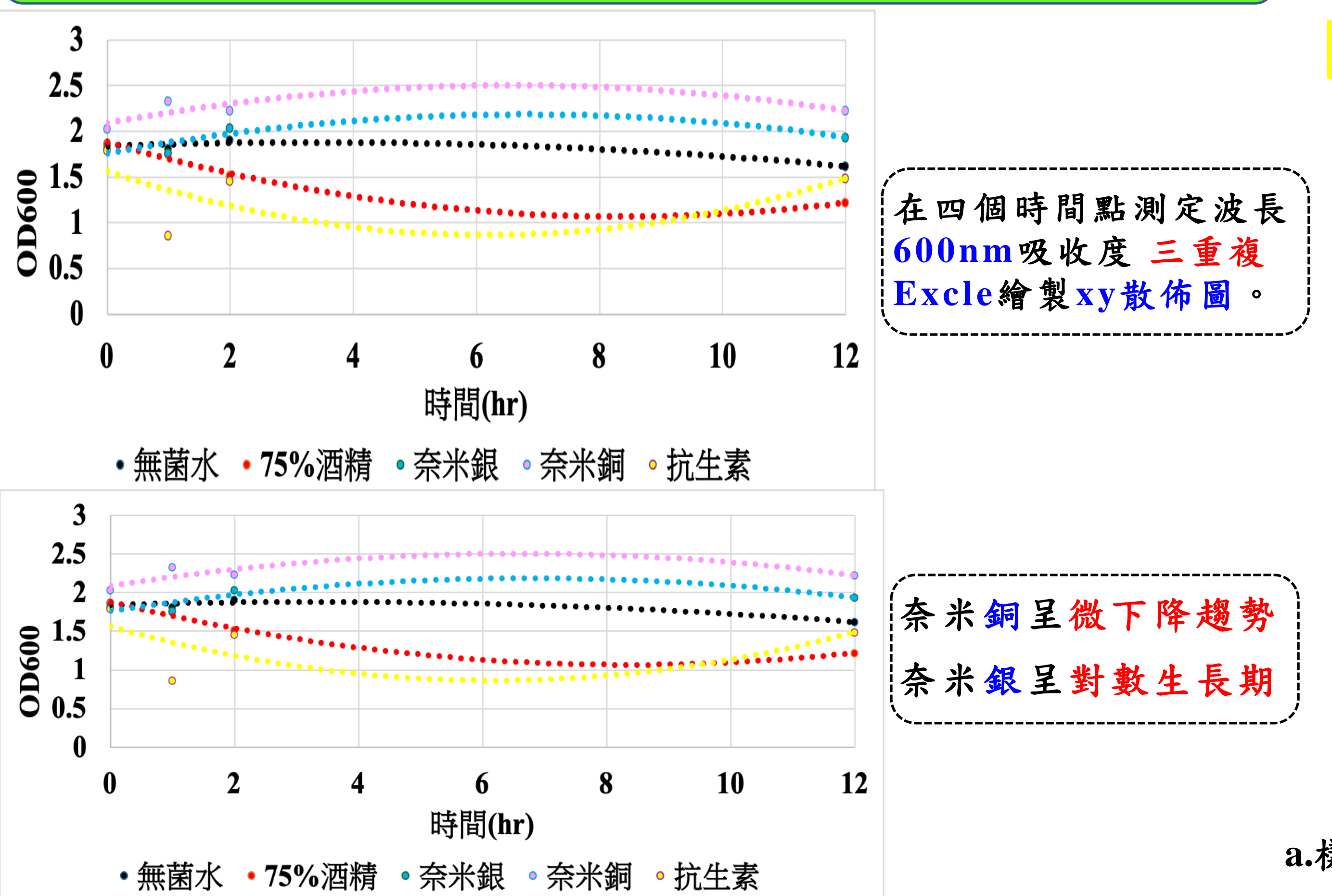
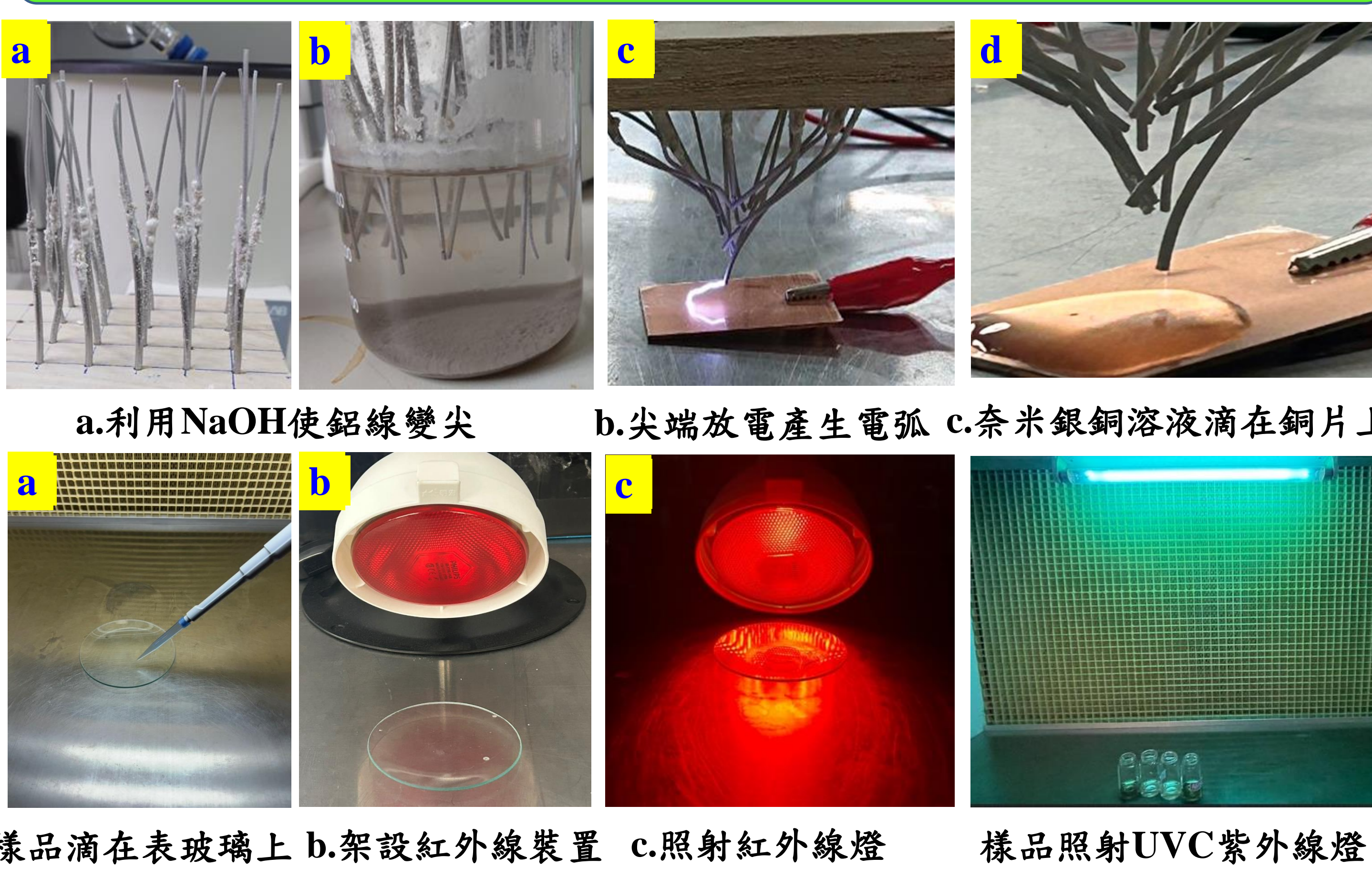


圖14. NaBH_4 還原製程奈米銀銅粒子PXRD圖(本圖片由作者使用origin親自製作)

五、OD600檢測法探討檢樣液對E.coli(大腸桿菌)抑菌效果



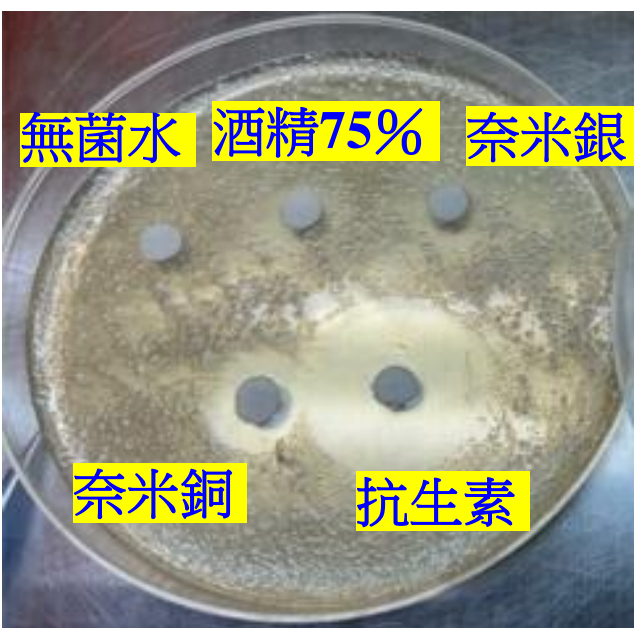
六、三種前置處理奈米粒子進行抗菌



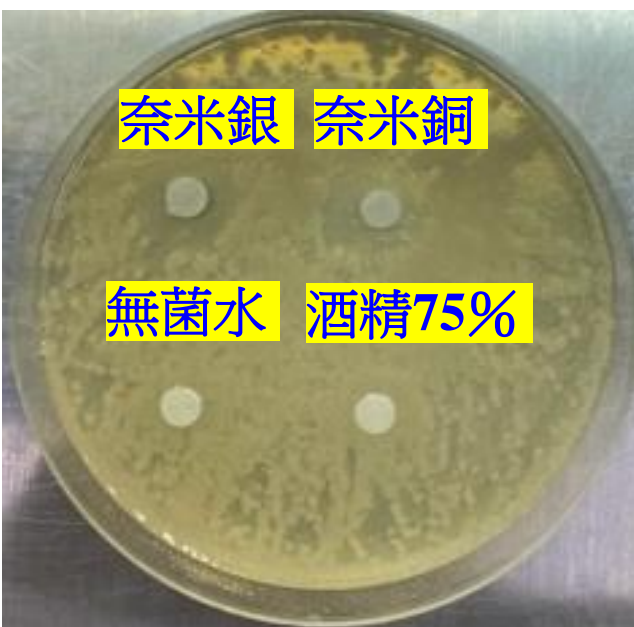
六、奈米銀銅抑菌實驗-紙錠法抑菌圈面積分析

表二、DH5α在LB Agar培養基之抑菌圈面積分析

DH5 抑菌面積	面積佔比	BL21 抑菌面積	面積佔比
(1)無菌水	0%	(1)無菌水	0%
(2)Agar Ag	0%	(2)Agar Ag	0%
(3)Agar Cu	2.33%	(3)Agar Cu	1.87%
(4)UVC Ag 60min	0%	(4)UVC Ag 60min	0%
(5)UVC Cu 60min	1.86%	(5)UVC Cu 60min	1.85%
(6) (Corona Discharge) Ag 1min	3.11%	(6) (Corona Discharge) Ag 1min	3.07%
(7) (Corona Discharge) Cu 1min	2.71%	(7) (Corona Discharge) Cu 1min	2.63%



a.奈米粒子無前置處理



b.尖端放電

兩菌株中的抑菌面積大小比序為：
尖端放電處理 > 未處理奈米粒子=照射UVC
尖端放電能有效提升奈米粒子的抑菌性。

圖17. DH5α與BL21菌株上的抑菌圈面積(本圖片由作者親自拍攝)

八、奈米銀銅抑菌大小比序折線圖和多項度分析

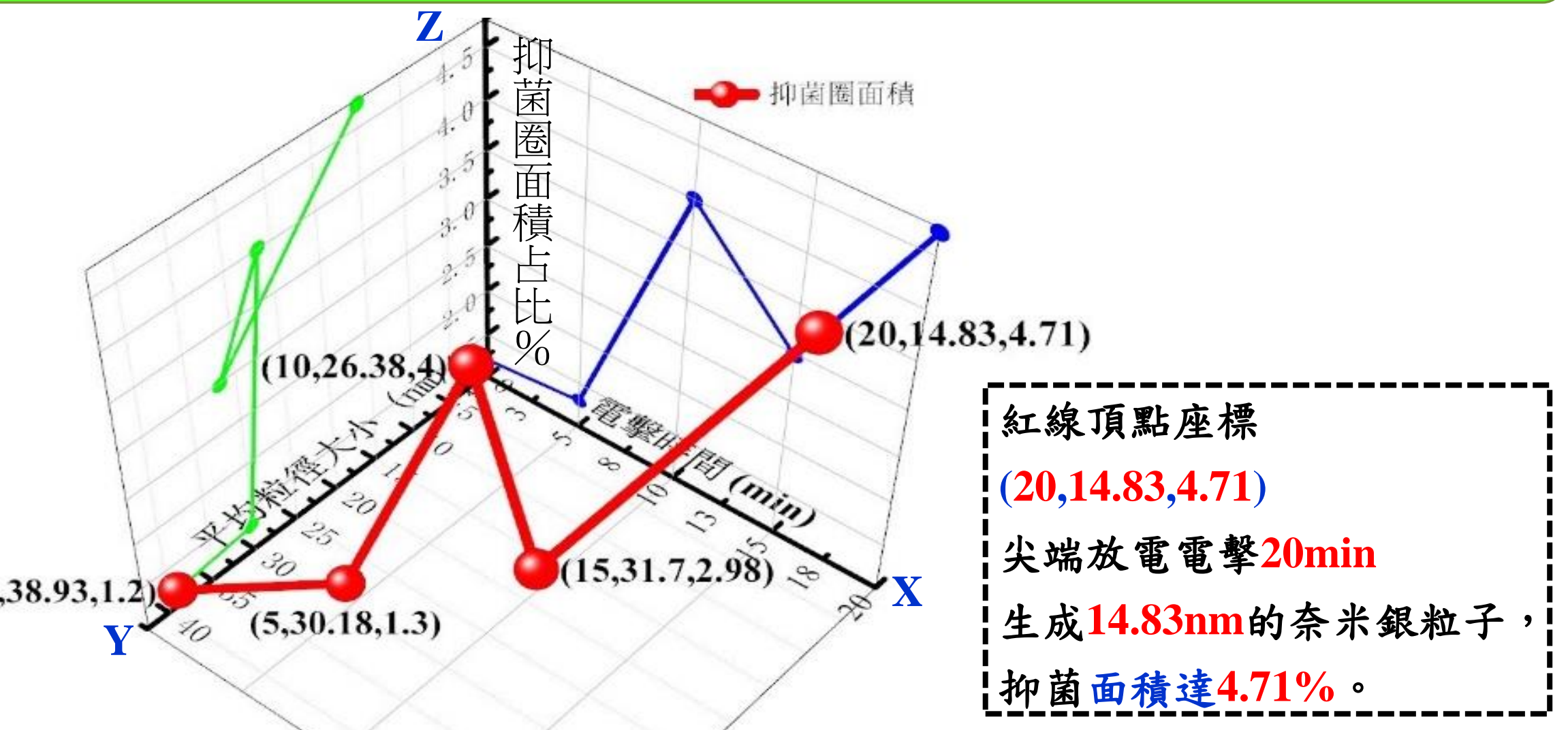
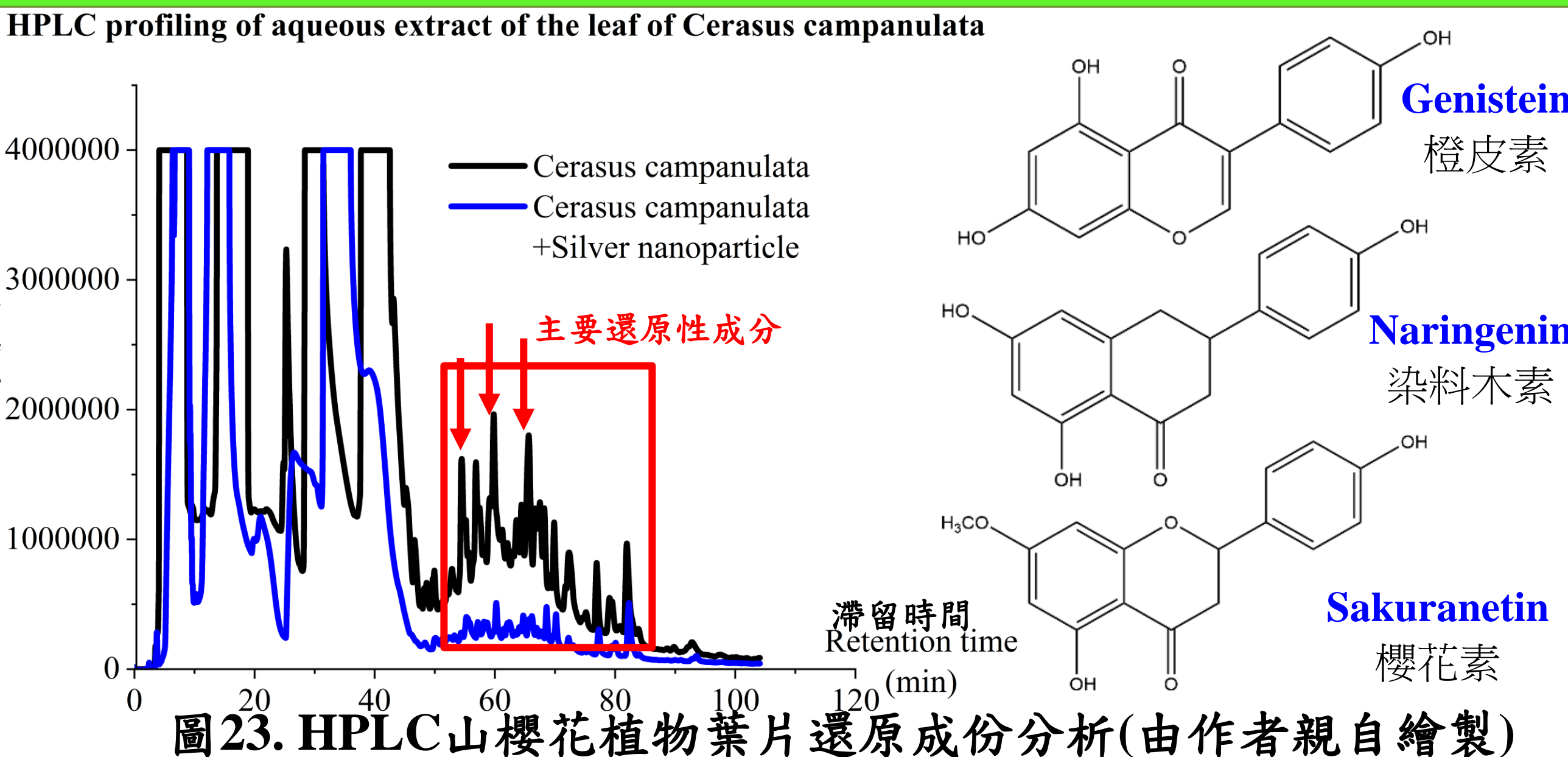
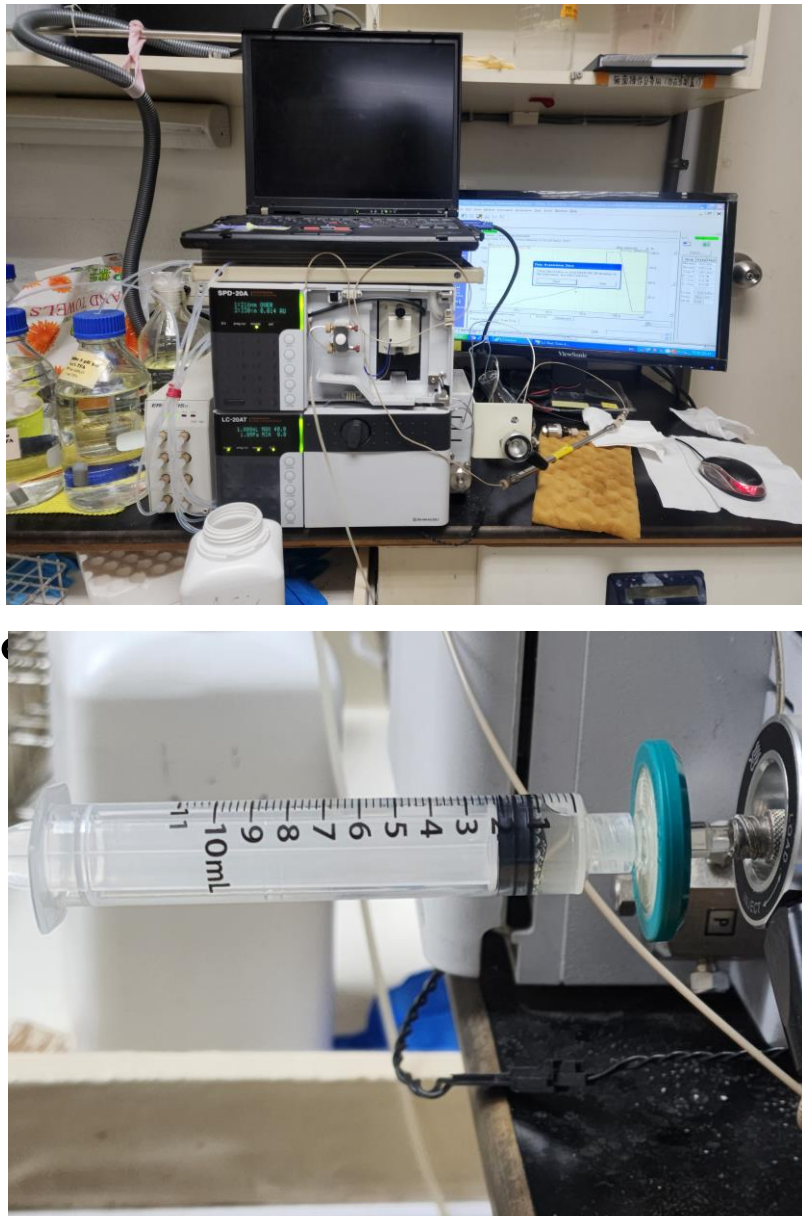


圖19.多向度分析圖-含2維向度解析(本圖為作者使用origin製作)

十、高效液相層析法HPLC山櫻花植物葉片還原成份分析

HPLC檢測山櫻花葉片萃取液對奈米銀的還原性成分。
45-84min，萃取液(黑)加入奈米銀後(藍)峰值強度明顯降低，還原性成份還原銀離子後濃度降低
櫻花素為植物防禦素
具有抑制微生物生長潛力。

圖22. HPLC儀器(本圖片由作者拍攝)



七、奈米銀銅抑菌實驗-三種製程電擊最佳化時間

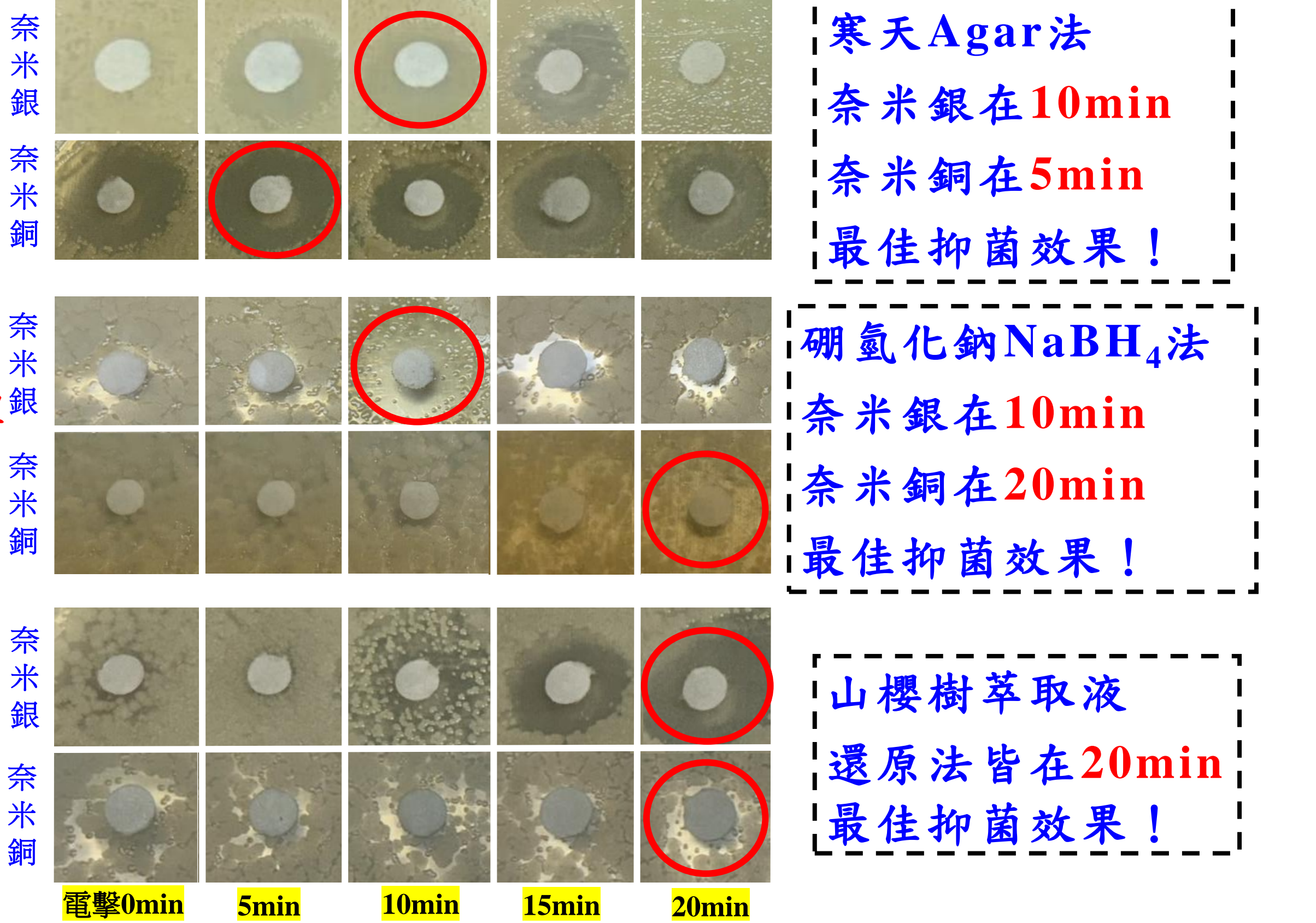


圖18. 三種製程尖端放電的抑菌圈面積大小(本圖片由作者親自拍攝)

九、奈米銀銅抑菌實驗-抑菌時效性

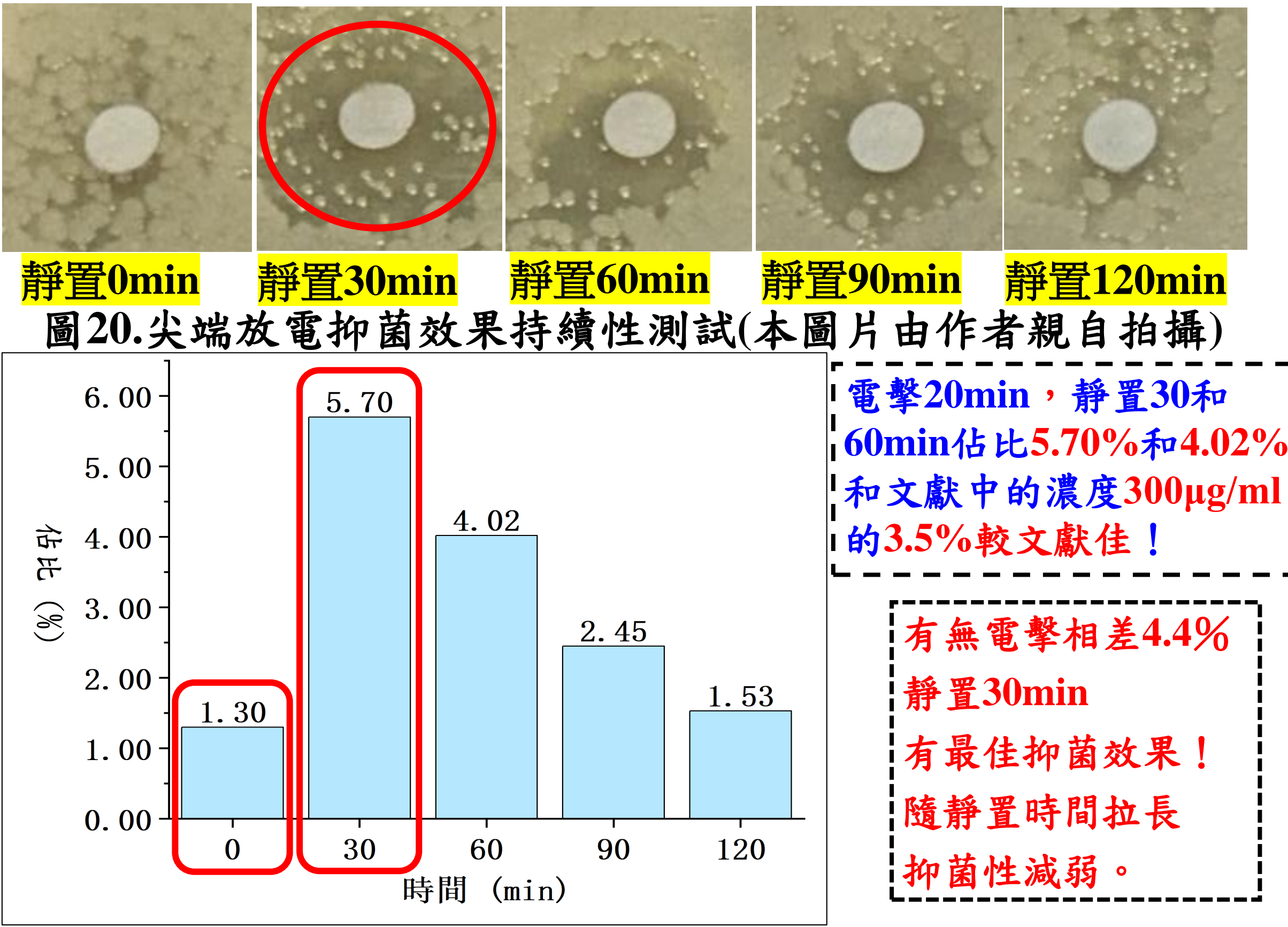


圖20.尖端放電抑菌效果持續性測試(本圖片由作者親自拍攝)

圖21. 菌株上的抑菌圈面積(本圖為作者使用origin製作)

伍、討 論

- (一)NaBH₄還原製備奈米粒子，超音波震盪的後處理，在明膠穩定劑包覆奈米粒子的電雙層結構因靜電斥力作用，可使奈米粒子長期穩定分散而不沉降。AgNO_{3(aq)}滴入NaBH_{4(aq)}速率越快導致奈米銀迅速沉降凝聚粒徑越大。
- (二)Agar分子結構中有大量羥基具有還原性，長鏈多醣結構能夠包裹奈米顆粒，有效進行還原反應。以鋁箔包裹避光隔氧，並以溫控儀定溫加熱防止沸騰生成氧化銀或銅。銀奈米溶液為無色，奈米銅溶液則呈深褐色，離心後奈米銀為白色沉澱，奈米銅則為褐色沉澱。TEM可知奈米銀粒徑有效降至25.41nm，奈米銅降至12.00nm。
- (三)使用校園原生植物山櫻花(Prunus campanulata Maxim)葉片萃取液還原法製備奈米粒子製作植物萃取液，其葉片角質層較薄利於萃取。由TEM測試可知加入15ml萃取液，對銀奈米粒子粒徑無顯著影響(52.78nm)，但能顯著降低銅奈米粒子粒徑至5.43nm。
- (四)OD600可知奈米銅在1-2小時抑菌活性略降，奈米銀則進入對數生長期後活性上升。UVC紫外光照射奈米銅銀1060min無明顯差異，。照射紅外線 IR，奈米銀抑菌時間增長，奈米銅其抑菌性則無明顯差異。透過尖端放電裝置奈米銀無抑菌圈明顯成長超2.5%，奈米銅Agar及植物萃取液製程可提升1.2%和4.4% NaBH₄提升0.65%。
- (五)各奈米粒子前處理法抑菌效果:尖端放電> 照射IR>無前處理≈UVC，尖端放電能有效加強奈米銀的抑菌活性。

陸、結 論

1. NaBH₄還原法：奈米銀粒徑大於44.93 nm，奈米銅使用明膠穩定劑作用可長時間分散，而未經處理的奈米銅因高表面積體積比，庫倫靜電力在奈米尺度的近距離內顯著增強，易產生凝聚現象。
2. 寒天Agar製備法:奈米銀銅粒徑分別降至25.41 nm和12.00 nm。
山櫻花植物萃取液法:奈米銀銅粒徑分別降至 52.78 nm和5.43 nm。
3. TEM 粒徑分析銅奈米粒子粒徑大小：Agar > NaBH₄ > 植物萃取液，銀則為：植物萃取液 > NaBH₄ > Agar。
4. OD600測定：奈米銅在1~2小時內有微下降趨勢，加入奈米銀則菌落呈現對數生長期，數值開始上升。
5. 菌株生長趨勢：寒天Agar奈米銀對DH5α及BL21菌株無抑菌效果，奈米銅則對兩種菌株均產生抑菌圈。
- 6.尖端放電對於奈米銀粒子影響：以TEM檢測發現奈米銀粒子經由電擊過後粒子數明顯增加，且粒徑從無電擊的38.93nm電擊20min後降至14.83nm，有效降低平均粒徑，抑菌圈占比從1.2%成長至4.71%能有效提升抑菌效果。

柒、參考文獻

1.Das, D., Ghosh, R., & Mandal, P. (2019). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using S1 genotype of Morus alba leaf extract: characterization, antimicrobial and antioxidant potential assessment. *SN Applied Sciences*, 1, 1-16.

2.Huang, C. L., Kumar, G., Sharma, G. D., & Chen, F. C. (2020). Plasmonic effects of copper nanoparticles in polymer photovoltaic devices for outdoor and indoor applications. *Applied Physics Letters*, 116(25).

3.Bansal, A., Sekhon, J. S., & Verma, S. S. (2014). Scattering efficiency and LSPR tunability of bimetallic Ag, Au, and Cu nanoparticles. *Plasmonics*, 9, 143-150.