

臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：化學

作 品 名 稱：利用奈米級二氧化鈦(TiO_2)在不同的變因下降解
膠原蛋白之研究

學校 / 作者：國立彰化高級中學
國立彰化高級中學

蕭崇哲
陳俊諺

利用奈米級二氧化鈦(TiO₂)在不同的變因下降解膠原蛋白之研究

中文摘要

本實驗使用奈米級二氧化鈦能經紫外線催化，分解空氣中的水分子產生自由基，攻擊膠原蛋白中碳與氫鍵結的部份，使膠原蛋白的分子量成功的從 300000 減少至少到 20000 以下。其次，利用紫外線波長或酸鹼值的變因之下，控制降解出來的分子量大小。利用此法可在 4 個小時內得到很好的降解效果，不僅可以節省反應所需的時間，所需的成本也比當今所使用的酵素降解法來得低。

其次，我們檢測降解完後膠原蛋白的活性，發現只要不照光超過 2 小時，膠原蛋白所剩的活性還不錯。如此一來，我們就可以利用此法快速的製造出有用的膠原蛋白了。

Abstract

In the experiment, we use the properties of TiO₂ which can be catalyzed by UV rays and breaking the molecules of H₂O and produce free radicals that can attack the bond between carbon and oxygen in collagen, degrading collagen's molecular weight from 300000 to at least below 20000. We also use different UV rays and pH to conduct the experiment, controlling the molecular weight by degradation. By using this technique, we can get good effect of degradation in 4 hours. It can not only cut back the reaction time, but also costs much lower than the way using enzyme to degrade collagen.

Furthermore, after the degradation of collagen, we also carry out the experiment to make sure whether collagen is “alive” or not. We have got the result that collagen can still work if it is not shone under UV rays more than 2 hours. In this way, we can use the technique to produce useful collagen rapidly.

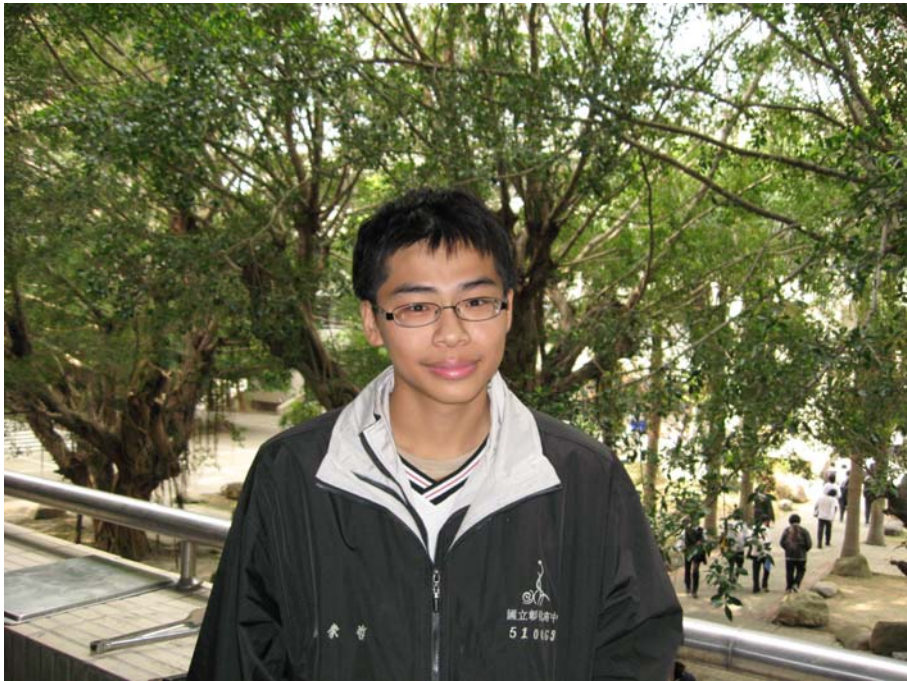
作者簡介



陳俊諺，國立彰化高中二年級，國中時和同學嘗試做了生物科展，很幸運的進到全國科展，在展覽場上看到了其他人的作品，也體認到自身對實驗還有很大的進步空間，高中時選了化學專題，除了專題課外，放學後也常留在實驗室裡探索，和同學合作了這一份科展，題目確實是很符合現在大眾文化，但在實驗中不斷受到打擊，最後採取了較簡單的方法取得數據。

對於生活中各種事物的探索是我不斷進步的源頭，興趣則是能令我更加專注的關鍵因素。

作者簡介



我是蕭崇哲，現在就讀於彰化高中二年級。是屬於樂天派的獅子座，我來自一個溫暖的家庭，從小喜歡觀察自然，對科學有濃厚的興趣。個人覺得最喜歡的書是哈利波特系列，沉迷於作者所創造的魔法世界中。而平常最喜歡做的休閒活動是打球，慢跑，及閱讀科學刊物。這次國際科展讓我有更多的時間可以讓我專心的投入科學研究，更能從事我喜歡的實驗，使我覺得受益良多。

壹、研究動機

一、研究動機

膠原蛋白，因為具有特別的機械性質，可以提供結締組織所需的張力與拉力強度，也可控制分子通透、參與組織修復，是一種在醫學上對於皮膚受傷的人很好的修補材料。在化妝品、製藥、化工等等都有很大的發展空間。(黃彥富、湯正明、徐善慧，2003)而現在市面上有許多利用膠原蛋白來做養顏美容的化妝品，但是膠原蛋白的分子量過大，約為 283000 道爾頓(daltons)，皮膚根本不易吸收。顯然的膠原蛋白適度的改善，使其分子量減小，將可發揮其最大效益，讓人體皮膚更好吸收。降解是一種化學反應，使大分子變成小片段，有利於分子量的減少。本研究希望透過實驗，在利用二氧化鈦催化紫外線分解空氣中的水分子產生自由基，攻擊膠原蛋白中碳與氫鍵結的部份使其降解，試著把膠原蛋白降解到可以讓人體皮膚達到易吸收的效果，本研究也希望在不同的變因下，探討膠原蛋白降解速率，找出較高的降解速率，以利膠原蛋白的降解。

二、研究目的

- 1.探討使用不同紫外線波長照射下，TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響。
- 2.探討不同 PH 值下、TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響。
- 3.探討不同溫度下，TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響。
- 4.利用電泳檢測膠原蛋白的分子量。

貳、研究過程及方法

一、實驗原理

1.光觸媒：

『從化學作用來看，光觸媒是一種半導體結晶材料，被光照射以後，材料中的電子會跳出來，並留下一個具有強大氧化能力的帶正電孔洞，這些電子與電洞在化學上稱為「電子洞對」。

當電子與空氣中的氧分子(O₂)相遇時，即生成反應性很強的超級氧分子(O₂⁻)；當電洞與空氣中的水氣(H₂O)相遇時，會透過光化學反應搶奪水中氫氧基的電子，此時，失去電子的氫氧基立刻變成不安定的氫氧自由基(OH)。一旦不安定的氫氧自由基遇到外來的、附在物體表面上的有機物時，又會藉由搶奪對方電子的方式使自己趨於穩定。如此一來，有機物即被氧化，變成水和二氧化碳，消散在空氣中。

倘若以光觸媒淨化水質，則從光化學反應中產生的氫氧自由基，也會與水中的不純物發生反應，變成水、二氧化碳或沉澱物。』(張志玲，2004)

2.膠原蛋白：

『膠原蛋白的結構(圖 2-1)類似繩索，由無數根膠原纖維束所組合而成。膠原蛋白最基本的單位為原膠原，是由三條多胜肽(polypeptides)鏈所組成的，而此三條多胜肽鏈則以平行及鏈間的氫鍵緊密地結合在一起，形成穩定的三股螺旋結構。由多個原膠原聚集成膠原分子，而平行排列的膠原分子形成束形的膠原蛋白微纖維，膠原蛋白微纖維再糾集成較大的纖維束。

由於每一條多胜肽鏈（稱爲 alpha 鏈）的組成相似，但不一定完全相同，所組成的膠原蛋白形式也不相同，有由三條完全相同的 alpha 鏈所組成的（如第二型），也有由完全不同的 alpha 鏈所組成的（如第四型）。到目前爲止，已發現的動物膠原蛋白可分成 21 種型式，依著組織的不同而有不同的膠原蛋白，其中以第一型膠原蛋白的含量最多，約占全部膠原蛋白含量的 90%，也是用途最廣的膠原蛋白。膠原蛋白的分子量約爲 283,000 道爾頓（daltons），長約 280 奈米，直徑 1.5 奈米，具有特別的機械性質，例如具有方向性的膠原蛋白纖維抗拉強度可高達 5 ~ 10 公斤/毫米平方（kg/mm²），因此提供結締組織所需的張力、拉力強度等。在生化性質方面，它可促使血小板凝集而催化血塊的形成，另外膠原蛋白的功用包括可控制分子通透、促進傷口癒合與組織修復、調控細胞與組織的生理功能等。』（黃彥富、湯正明、徐善慧，2003）

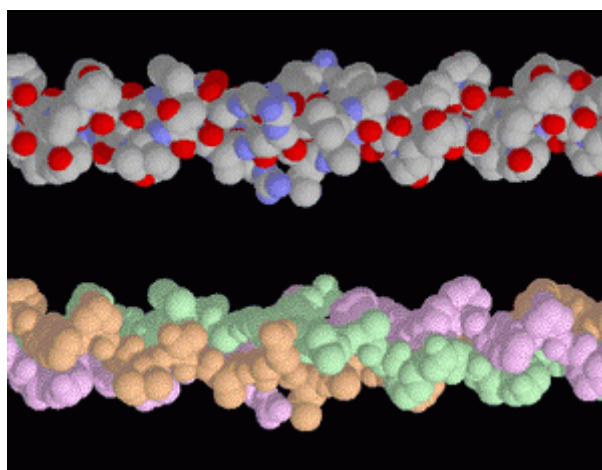


圖 2-1 膠原蛋白結構示意
（取自黃彥富、湯正明、徐善慧，2003）

二、實驗設備及藥品

1. 降解膠原蛋白：

紫外線照射儀(圖 2-2)、PH meter、超音波震盪機、離心機、量筒、燒杯、試管、蒸發皿、溫度計、膠原蛋白(感謝普立德公司贊助，見圖 2-3)、奈米級二氧化鈦、醋酸、氨水。

2. 測分子量：

電泳槽、電源供應器(圖 2-4)、丙烯醯胺、N,N-甲叉雙丙烯醯胺、氨丁三醇三(羥甲基)氨基甲烷、甘氨酸、1N 的鹽酸、10%SDS、10%過硫酸胺、甘油、2-巯基乙醇、溴酚藍指示劑溶液、四甲基乙二胺、玻璃管、鐵架、半透膜。

三、實驗步驟：

1. 使用不同紫外線波長照射下，TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響：

取 16ml 的膠原蛋白，並加入奈米級二氧化鈦 0.016g。攪拌均勻後平均倒入 8 個蒸發皿內，其中 4 個用紫外線 254nm 分別照射 1、2、3 和 4 小時；另外 4 個用紫外線 365nm 也分別照射 1、2、3 和 4 小時，利用二氧化鈦催化空氣中的水分子而產生自由基，攻擊膠原蛋白中碳和氫鍵結的部份使其降解。取出溶液後使用高速離心機離心後裝入玻璃試管內。計算並比較在不同時間照射所獲得的分子量。

2. 不同 PH 值下、TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響：

取 40ml 的膠原蛋白，並加入 0.04g 的奈米級二氧化鈦。攪拌均勻後平均倒入 20 個燒杯內，

取每 4 個為一組，將各組的 PH 值分別以醋酸或氨水調到 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5，再將其分別倒入 20 個蒸發皿中。每組用紫外線 254nm 分別照射 1、2、3 和 4 小時，利用二氧化鈦催化空氣中的水分子而產生自由基，攻擊膠原蛋白中碳和氫鍵結的部份使其降解。取出溶液後使用高速離心機離心後裝入玻璃試管內。計算並比較在不同時間照射所獲得的分子量。



圖 2-2 紫外線照射儀

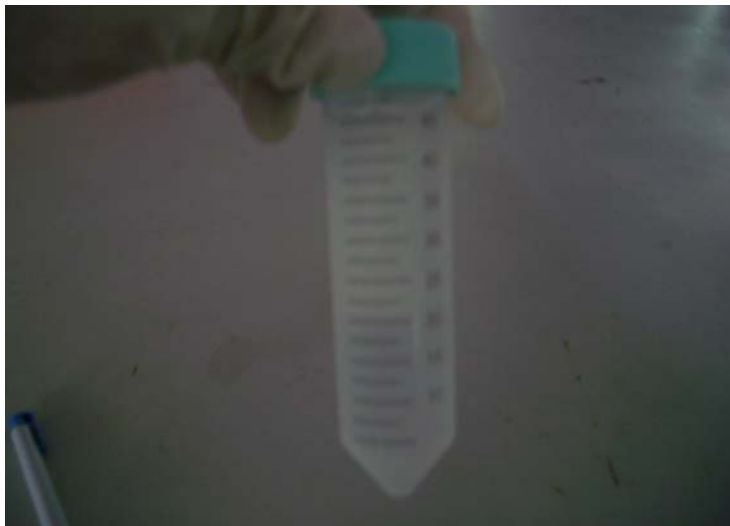


圖 2-3 大分子膠原蛋白(由普立德公司贊助)

四、測分子量的方法：

1. 梯度電泳法：

(1) 下膠的製備：

a. 以下為準備下膠所需的藥品及量：

蒸餾水 8.7ml、30% 丙烯醯胺 2.5ml、4X 下膠溶液 3.75ml、10% 過硫酸胺 0.15ml。

b. 插入梳子進入兩片夾著的玻璃片，然後在玻片上標示出在梳子牙下 1 c m 位置。

c. 加入 1 5 ul 的 T E M E D 至下膠溶液中避免產生氣泡並均勻攪拌。

d. 把此溶液加入玻片間，並避免產生氣泡，加入時間盡可能越快越好，以免使膠變的太濃稠。

e. 在玻片中的膠上加入 1 ml 蒸餾水。此時蒸餾水不可與膠混合。

(2) 上膠的製備

a. 所需藥品及量：

蒸餾水 4.2ml，30% 丙烯醯胺溶液 0.65ml，4X 上膠溶液 1.6ml，10% 過硫酸胺 6.7ul。

b. 避免產生氣泡地攪拌上膠。

c. 把剛才下膠覆蓋上的蒸餾水倒掉，用蒸餾水潤洗膠。

d. 在上膠溶液中加入 6.7ul TEMED。用微量吸管把上膠加入玻片頂端。

e. 小心將梳子插入玻片中，確定沒產生氣泡。

(3) 去活性

a. 準備要載入的蛋白質樣本，並使其與 4X 樣本緩衝液混合。

b. 水浴加熱蛋白質 2 分鐘以便去活性。

c. 把樣本放入離心機離心 20 秒。

(4) 載入樣本

a. 把剛才的注膠器具放入電泳槽，正負極要與電泳槽相同。

b. 在電泳槽中加入 1 X 緩衝液。

c. 把樣本放入膠中孔隙間，注意不能產生氣泡。

d. 將其他沒有用到的孔全加入 1 X 樣本緩衝液。

(5) 跑電泳

a. 把蓋子蓋上，連接電源供應器。

b. 當染色樣本跑到膠片最下端時將電源關掉。

c. 把跑膠器具拿出來，先把內部 buffer 排空至電泳槽，將兩片玻片分離，此時，膠可能黏在其中一片上，只要將其浸在 buffer 中即可分離了。

d. 這樣膠即可開始分析

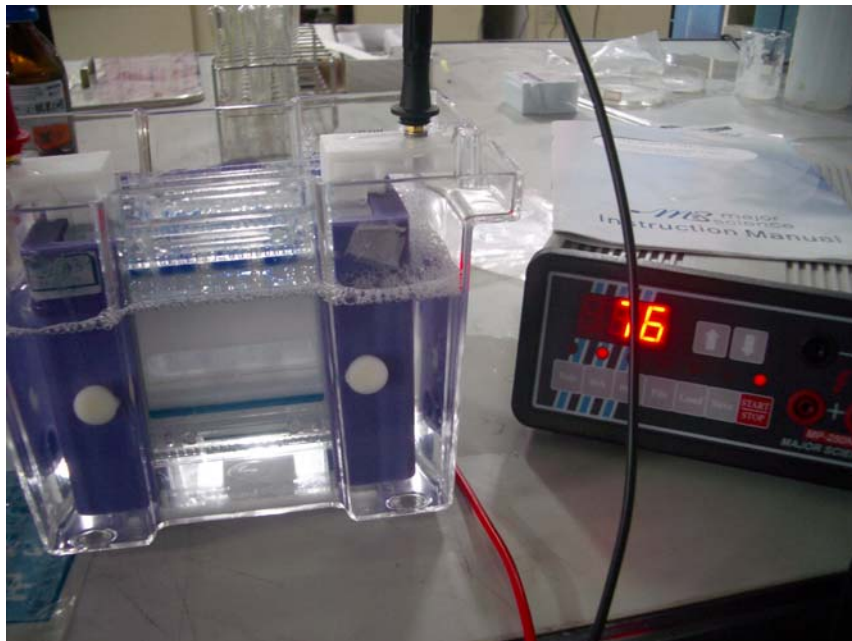


圖 2-4 電泳槽及電源供應器

此法原本是我們的首選，我們利用台鹽公司提供的顆粒狀膠原蛋白（感謝台鹽公司贊助）投入許多時間、人力，做了多次試驗，但可能是作業上的微小疏失，或製膠技巧不夠成熟等問題，以致電泳無法跑出來，因此我們最後只好放棄這個方法。

2.凝固點下降法：

利用溶液凝固點下降公式： $\Delta T = K_f \cdot m$ 求其分子量。因膠原蛋白在 32°C 以上就會變質，不適合沸點上升法。但因膠原蛋白溶液太稀薄(1mg/ml)，且其原分子量過大，使得凝固點變化量太小不易測量，因此本實驗沒有採用這個方法。

3.滲透壓：

利用凡特荷夫定律： $\pi = CRT = (n/V)RT$

其中 π 為滲透壓， n 為溶質的莫耳數， V 是體積(單位為升)， R 為常數=0.082， T 為絕對溫度。將玻璃管底部用 2cm 的橡皮管套上一層半透膜，放入中有已照過紫外光的膠原蛋白溶液中，玻璃管內再放入同濃度溶解膠原蛋白的溶液，使內外高度相同。並每天觀察氣壓、溫度及液面高差，再將其代入公式求得分子量。(圖 2-5)

五、測膠原蛋白的活性

步驟:在膠原蛋白水溶液中加入生理食鹽水，使其成為溶在等張的 0.9%食鹽水 中，成為膠原蛋白" isotonic solution"。將此膠原蛋白" isotonic solution"放在 30-32 度的烘箱 2 小時以上，若有成膠(流動性減少,甚至像果凍)便可證明其有活性存在。

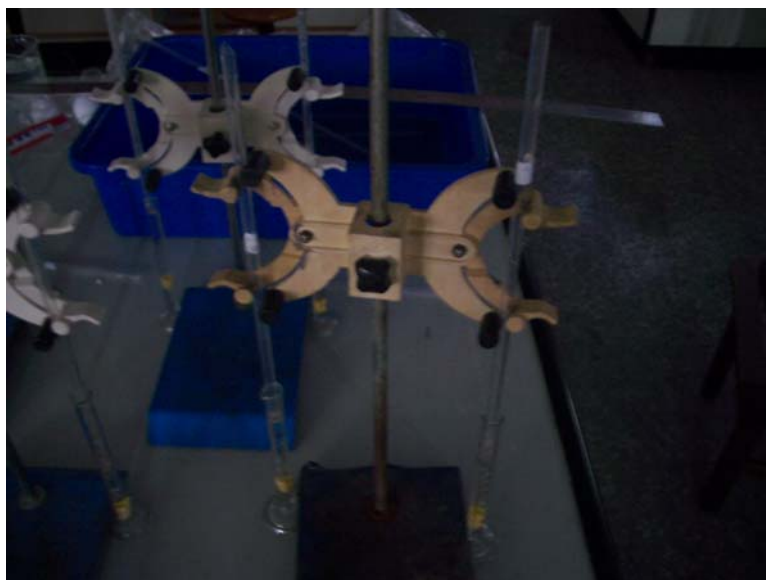


圖 2-5 自製測分子量實驗

參、研究結果及討論

一、使用不同紫外線波長照射下，TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響：

1.使用紫外線波長 254nm 照射結果如表 3-1 所示，其曲線圖則如圖 3-1 所示：在照光時數第 1 小時，膠原蛋白的分子量從 300000 急降至 25147。從第 2 個小時以後，其分子量分別降至 31434、27941、19344。

表 3-1 紫外線波長 254nm 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	1.0	0.001	10	25147
2	1016.5	296.7	0.8	0.001	10	31434
3	1016.5	296.7	0.9	0.001	10	27941
4	1016.5	296.7	1.3	0.001	10	19344

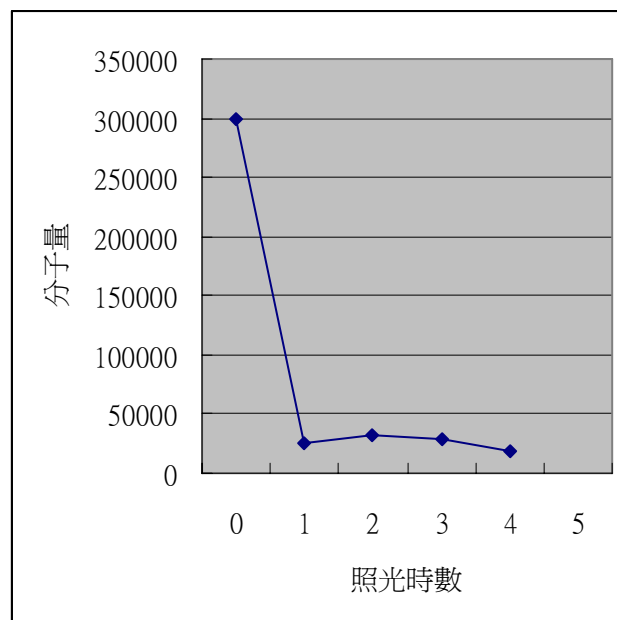


圖 3-1 紫外線波長 254nm 照射結果

2.使用紫外線波長 365nm 照射結果如表 3-2 所示，其曲線圖則如圖 3-2 所示：在照光的第 1、2 小時，分子量分別為 251469、125734。而第 3、4 小時的時候分子量為 16765、6985。由圖可見降解前 3 小時分子量呈現幾乎為均勻遞減的狀態。

表 3-2 使用紫外線波長 365nm 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	0.1	0.001	10	251469
2	1016.5	296.7	0.2	0.001	10	125734
3	1016.5	296.7	1.5	0.001	10	16765
4	1016.5	296.7	3.6	0.001	10	6985

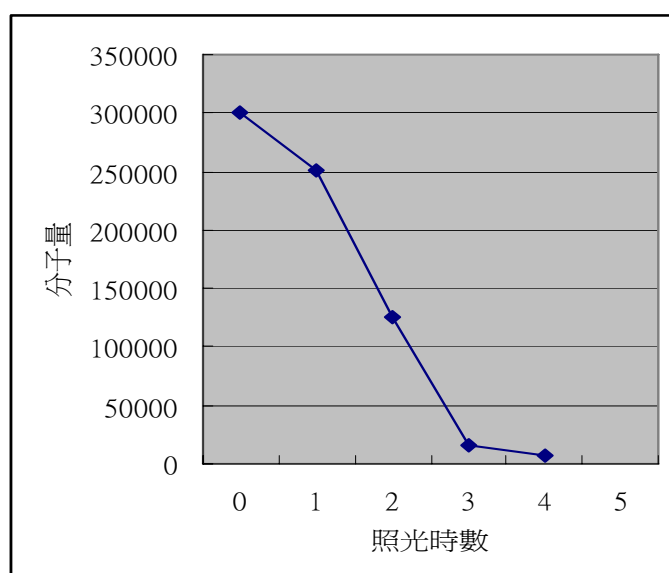


圖 3-2 使用紫外線波長 365nm 照射結果

二、不同 pH 值下、TiO₂對膠原蛋白降解速率的影響：

1.在 pH 值=4.5 照射結果如表 3-3 所示，其曲線圖則如圖 3-3 所示：

可見其在降解第 1 小時內分子量由 300000 迅速減少至 7858。而後 3 小時的分子量則呈現緩慢的遞減。

表 3-3 pH 值=4.5 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	3.2	0.001	10	7858
2	1016.5	296.7	4.0	0.001	10	6287
3	1016.5	296.7	3.8	0.001	10	6618
4	1016.5	296.7	7.1	0.001	10	3542

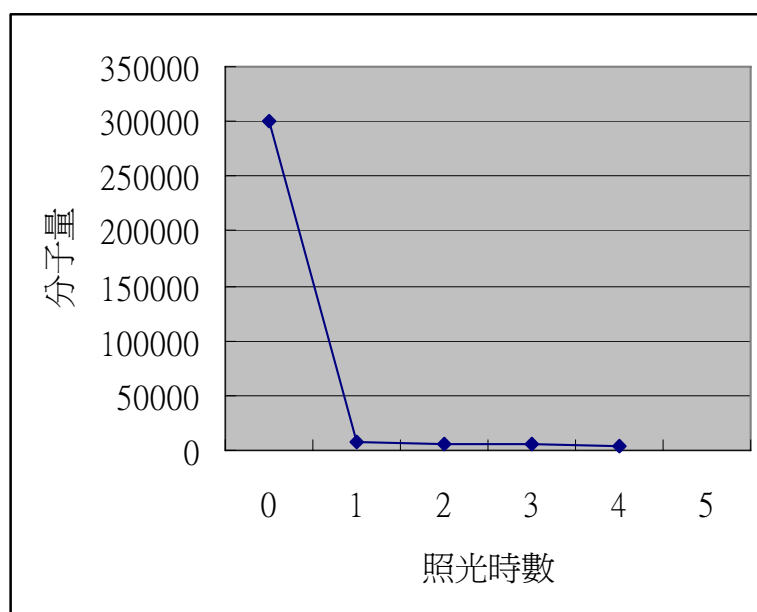


圖 3-3 pH 值=4.5 照射結果

2.在 pH 值=5.5 照射結果如表 3-4 所示，其曲線圖則如圖 3-4 所示:由圖中可知
 膠原蛋白在降解第 1 小時內分子量由 300000 迅速減少至 50294。而後 3 小時的分子量則呈
 現緩慢的遞減。

表 3-4 pH 值=5.5 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	0.5	0.001	10	50294
2	1016.5	296.7	1.1	0.001	10	22861
3	1016.5	296.7	1.5	0.001	10	16765
4	1016.5	296.7	5.0	0.001	10	5029

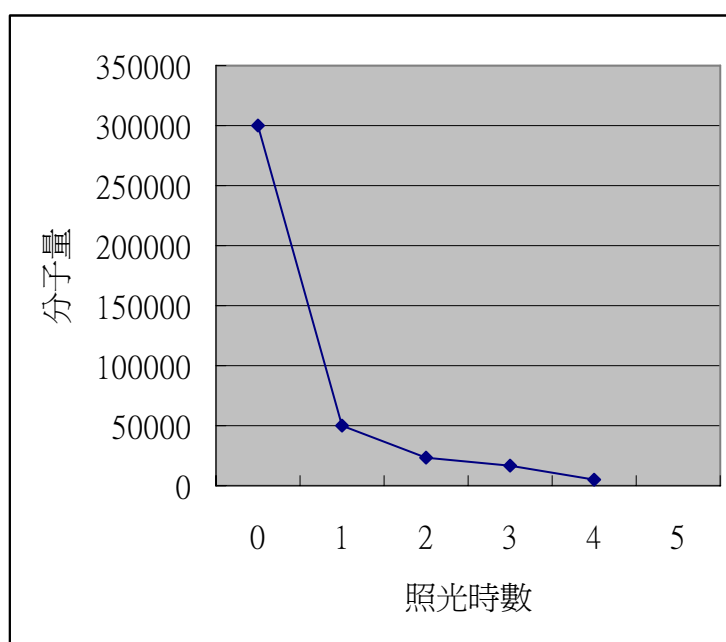


圖 3-4 pH 值=5.5 照射結果

3.pH 值=6.5 照射結果如表 3-5 所示，其曲線圖則如圖 3-5 所示：

在照光時數第 1 小時，膠原蛋白的分子量從 300000 急降至 25147。從第 2 個小時以後，其分子量分別降至 31434、27941、19344。

圖 3-5 pH 值=6.5 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	1.0	0.001	10	25147
2	1016.5	296.7	0.8	0.001	10	31434
3	1016.5	296.7	0.9	0.001	10	27941
4	1016.5	296.7	1.3	0.001	10	19344

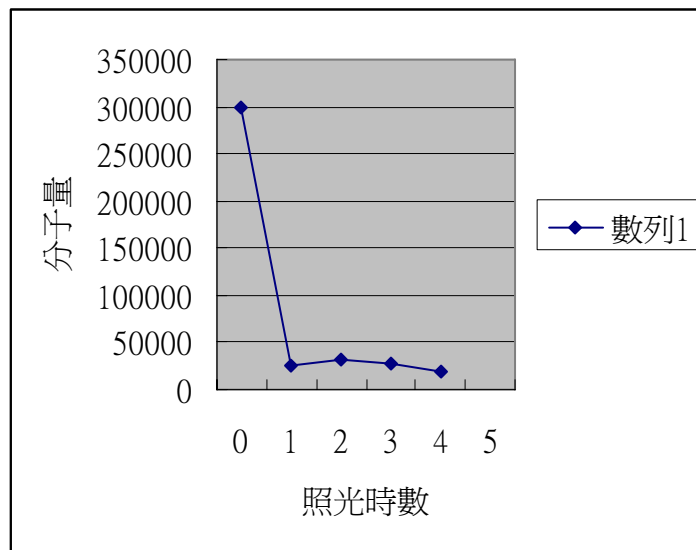


圖 3-5 pH 值=6.5 照射結果

4. pH 值=7.5 照射結果如表 3-6 所示，其曲線圖則如圖 3-6 所示：

在照光的第 1、2 小時，分子量分別為 251469、125734。而第 3、4 小時的時候分子量為 16765、11975。由圖可見降解前 3 小時分子量呈現幾乎為均勻遞減的狀態。

表 3-6 pH 值=7.5 照射結果

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	0.1	0.001	10	251469
2	1016.5	296.7	0.2	0.001	10	125734
3	1016.5	296.7	1.5	0.001	10	16765
4	1016.5	296.7	2.1	0.001	10	11975

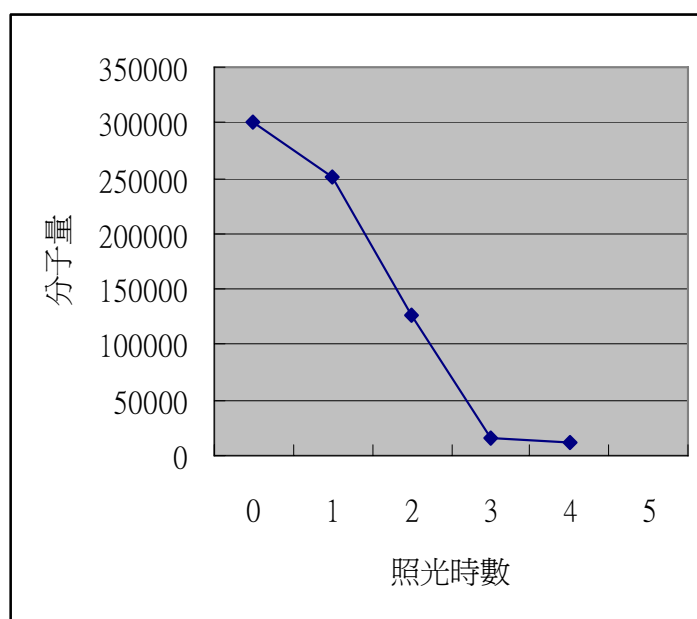


圖 3-6 pH 值=7.5 照射結果

5. pH 值=8.5 照射結果如表 3-7 所示，其曲線圖則如圖 3-7 所示：

可見其在降解第 1 小時內分子量由 300000 迅速減少至 83823。而後 3 小時的分子量則呈現緩慢的均勻遞減。

照光時數	氣壓 (百帕)	溫度 (K)	液面差 (mm)	膠原蛋白 質量(g)	溶液體積 (ml)	分子量
1	1016.5	296.7	0.3	0.001	10	83823
2	1016.5	296.7	0.4	0.001	10	62867
3	1016.5	296.7	0.6	0.001	10	41911
4	1016.5	296.7	1.1	0.001	10	22861

表 3-7 pH 值=8.5 照射結果

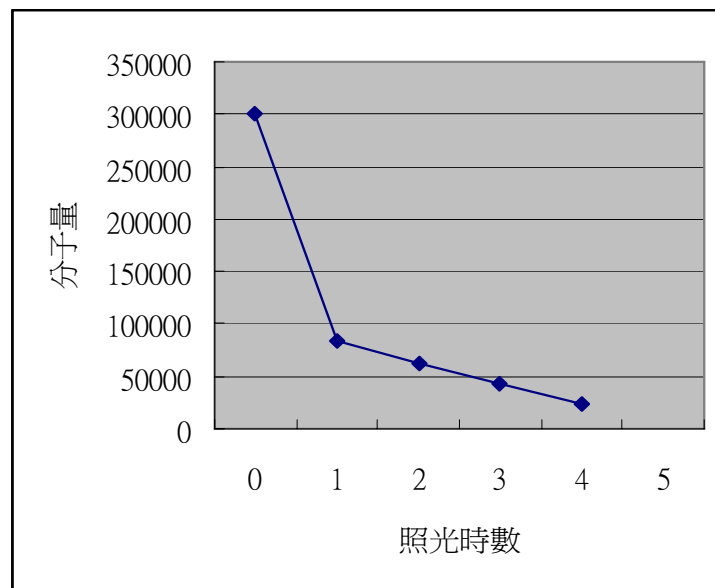


圖 3-7 pH 值=8.5 照射結果

三、活性測量

1.不同紫外線波長照射下，膠原蛋白的活性：

	0hr	1hr	2hr	3hr	4hr
254nm	○	○	○	△	△
365nm	○	○	○	○	△

2.不同 pH 值下，膠原蛋白的活性：

	0hr	1hr	2hr	3hr	4hr
pH 值=4.5	△	△	×	×	×
pH 值=5.5	△	△	△	△	×
pH 值=6.5	○	○	○	△	△
pH 值=7.5	○	○	○	△	△
pH 值=8.5	○	○	○	△	△

(○：與原本樣品成膠情況類似； △：流動性減少，無成膠； ×：成膠反應不理想)



圖 3-8 膠原蛋白" isotonic solution"

討論：

1.從不同波長的紫外線波長照射膠原蛋白的實驗顯示出，使用 254nm 照射第 1 小時內分子量遞減的數值遠超過 365nm 照射。但從第 3 個小時以後以波長 365nm 照射出來的分子量略小於波長 254nm 照射出來的分子量。

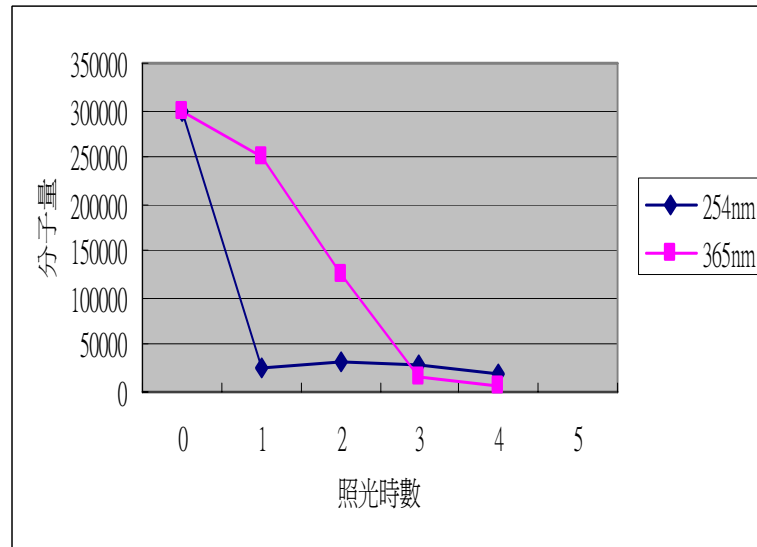


圖 3-9 不同紫外線波長照射結果

2.由在不同 pH 值下測得的膠原蛋白分子量得知，pH 值越小，膠原蛋白的降解速率越好。所以可知如果把膠原蛋白放在弱酸性的環境下進行降解，可以獲得最小的分子量。

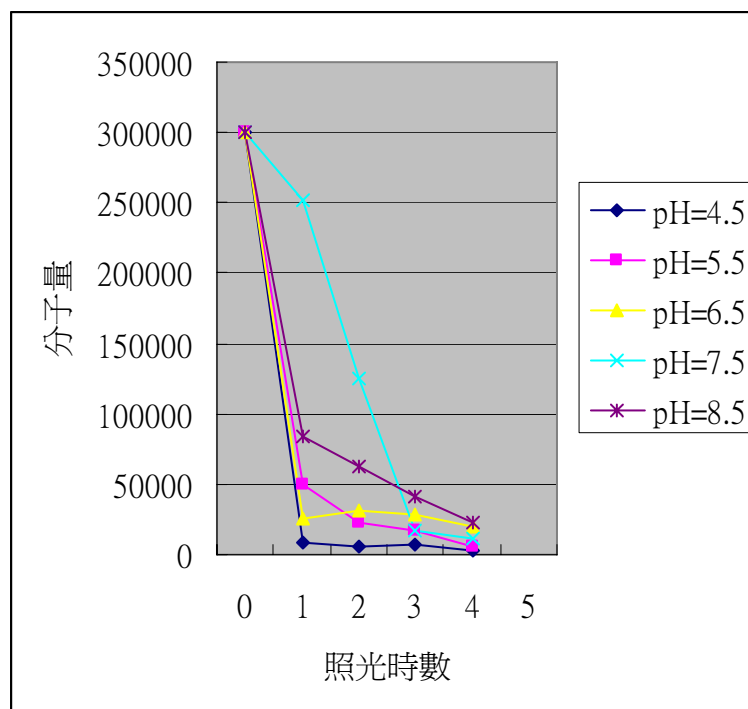


圖 3-10 不同 pH 值下照射結果

- 3.由以上的實驗可以得知，膠原蛋白降解時，以第 1 個小時的降解速率最為明顯，但接下來的 3 小時降解速率不明顯，可視其降解效果已達一個極限。
- 4.由以上的實驗得知，使用奈米級二氧化鈦與紫外光照射膠原蛋白，可使其分子量從 300000 變成最小的 3542，有利於皮膚吸收。由此可知在控制不同紫外線波長、不同 pH 值及照射時間下，利用本實驗的方法可取得不同範圍的分子量。
- 5.由以上的實驗可以得知，照射後 1 至 2 小時內，大致上活性還可以接受，但過了 3 至 4 小時後，活性普遍不佳。而在酸性環境降解的膠原蛋白，雖然是降解效果最好、可以把分子量降到最低，但是從活性實驗卻顯示出膠原蛋白的活性幾乎不存在；但是酸性環境會影響成膠反應，這部份可以在做深入的探討。
- 6.與現行的酵素生產法比較：
目前製備膠原蛋白的方式多為酵素生產法，但其萃取產物純度不高，容易引起發炎反應，且其在萃取過程中相對成本較高。反觀使用二氧化鈦在常溫下分解空氣中的水分子產生自由基，攻擊膠原蛋白中碳與氫鍵結的部份。我們只需控制其不同紫外線波長或所處環境下不同的酸鹼值，在 4 個小時內就可以將其分子量降解至 3500 左右。利用此法可以在短時間內將膠原蛋白的分子量降解，而且也節省了萃取時所需的成本。

肆、結論及應用

本實驗利用奈米級二氧化鈦照射紫外光對膠原蛋白進行降解，可以使膠原蛋白從原本的分子量 300000 降解至 3000 至 4000，更有利於其透過皮膚，達到吸收的主要目的，希望可以將膠原蛋白的利用性達到最大。

未來展望：

本實驗藉由降解，確實使膠原蛋白的分子量成功的下降不少，使人體皮膚更易吸收。不過自由基在進行降解的時候，很有可能使膠原蛋白的活性消失。在將來的相關實驗中，希望可以針對膠原蛋白降解後所剩餘的活性進行探討，使膠原蛋白的利用價值更高，除了使皮膚更輕易吸收外，還能發揮膠原蛋白其原本的功效。

伍、參考文獻

- 黃彥富、湯正明、徐善慧（2003）。揭開膠原蛋白的神秘面紗。科學發展，362，44-47。
- 謝曉雲（無日期）。膠原蛋白還給你 20 歲？。2007 年 3 月 9 日取自：
<http://www.books.com.tw/magazine/item/chealth1120.htm>。
- 張志玲（2004）。原來光觸媒是這麼回事。科學發展，373，38-43。
- 薛勝雄、張乃文。溶液的狀態與性質。建弘出版社，一版。45-46、55-56。

評語

利用奈米 TiO_2 經紫外照射，來降膠原蛋白，是一很實用的研究。可惜，在分子量的測定上，用非常”粗糙”的古典”滲透壓”測定法，說服力不夠！應該可以用更精確，反而另外在一開始的一個小時的反應機制，沒有精準的抓到！！