

私立東海大學化學工程與材料工程研究所
碩士論文

指導教授：何志松 博士

FePt 磁性奈米粒子的製備、應用及其發展

Development, preparation, and application of
FePt magnetic nanoparticles

研究生：黃琳育 撰

中華民國 一〇一年 七月

中文摘要

近幾年來，許多奈米粒子應用於生醫方面的研究，藉由奈米粒子不同的磁性、光學及電性，用來作為標定、偵測及醫療用途上。也用化學合成法合成出不同形狀、大小及不同形式具磁性的奈米粒子。

本研究由化學還原合成法製備出油溶相 FePt 奈米粒子，並改變界面活性劑的比例參數，以操控制備出的奈米粒子尺寸及其分散度。使用硫醇族的化合物做表面修飾，將粒子轉換成水溶相，並藉由 XRD、TEM 與 VSM 進行水溶相與油溶相粒子性質分析。

將水溶相的 FePt 磁性奈米粒子，以 EDC 做接連劑，與酵素 HRP 做結合，再加入 ABTS 顯色，使用紫外線及可見光光譜儀分析其在不同 HRP 濃度下的吸收光譜，觀察吸收光譜強度隨著 HRP 濃度改變，可做為定量分析之依據。

關鍵詞: FePt 磁性奈米粒子、界面活性劑、吸收光譜

Abstract

In recent years, nanoparticles are applied in biomedical researches because of their magnetic, optical, and electrical properties. Nanoparticles are widely used for label, detection, and medical purposes. Magnetic nanoparticles of different shapes, sizes, and formations can be prepared by different chemical synthesis methods.

In this study, the hydrophobic FePt nanoparticles are prepared by chemical reduction method. The ratio of surfactants to precursors is the key parameter used to control the size and the dispersion of nanoparticles. The nanoparticles transfer from hydrophobic to hydrophilic when the thiol group is used for surface modification. The properties of nanoparticles are studied by XRD, TEM, and VSM.

The hydrophilic FePt magnetic nanoparticles are conjugated with HRP by EDC cross-linker. The absorption spectra of different concentrations of HRP are measured by the UV/visible spectrophotometer after HRP reacts with ABTS substrate. The intensity of spectrum varying with the concentration of HRP provides the availability for quantitative analysis.

Keywords: FePt magnetic nanoparticles, surfactant, absorption spectrum

目錄

中文摘要	I
Abstract	II
目錄.....	III
圖目錄	VI
表目錄	X
第一章 緒論	1
1-1 前言	1
1-2 磁性奈米粒子在生醫上的應用	2
1-2-1 生物分離.....	3
1-2-2 核磁共振造影	4
1-2-3 藥物傳遞.....	5
1-2-4 磁熱治療.....	6
1-3 合金式奈米粒子	7
1-4 核殼式奈米粒子	9
1-5 中空式奈米粒子	12
1-6 實驗動機與目的	14
第二章 文獻回顧	15
2-1 FePt 磁性奈米粒子特性介紹	15

2-2	FePt 磁性奈米粒子製備.....	16
2-3	製備具有生物功能性的 FePt 奈米粒子.....	18
第三章 FePt 磁性奈米粒子.....		21
3-1	製備油溶相 FePt 磁性奈米粒子.....	21
3-1-1	實驗設計.....	21
3-1-2	實驗藥品.....	22
3-1-3	實驗裝置.....	23
3-1-4	實驗步驟.....	24
3-2	製備水溶相 FePt 磁性奈米粒子.....	27
3-2-1	前言.....	27
3-2-2	實驗藥品.....	28
3-2-3	實驗步驟.....	29
3-3	油溶相 FePt 磁性奈米粒子分析與討論.....	31
3-3-1	油溶相 FePt 磁性奈米粒子粒徑分析.....	33
3-3-2	油溶相 FePt 磁性奈米粒子磁性質分析.....	39
3-3-3	油溶相 FePt 磁性奈米粒子晶格結構分析.....	42
3-4	水溶相 FePt 磁性奈米粒子分析與討論.....	43
3-4-1	水溶相 FePt 磁性奈米粒子粒徑分析.....	43
3-4-2	水溶相 FePt 磁性奈米粒子晶格結構分析.....	48

3-4-3	水溶相 FePt 磁性奈米粒子磁性質分析.....	49
第四章	FePt 磁性奈米粒子與 HRP 的結合與檢測.....	50
4-1	前言	50
4-1-1	辣根過氧化酶 HRP 簡介	51
4-1-2	HRP 應用簡介	52
4-1-3	protein-label 分析方法.....	53
4-2	實驗藥品	54
4-3	實驗步驟.....	55
4-4	結果與討論	57
4-4-1	HRP 的活性分析	57
4-4-2	改變與粒子結合的 HRP 濃度及分析	59
第五章	結論	66
第六章	未來工作.....	68
第七章	參考文獻.....	69

圖目錄

圖 1-2	磁性奈米粒子生醫上應用	2
圖 1-3	磁性奈米粒子的生物分離 ^[3] (A) 含有磁性奈米粒子的細胞(B) 一般的細胞 (C) 利用磁鐵來分離含有磁性奈米粒子的細胞 ..	3
圖 1-4	磁性奈米粒子應用於核磁共振造影(MRI) ^[5] (a)未使用 FeCo 磁性奈米粒子的 MRI 影像;(b)FeCo 奈米粒子在老鼠中的 MRI 影像，在大動脈(aorta)中很明顯的可以看到清楚的影像對比.....	4
圖 1-5	藥物傳遞的示意圖	5
圖 1-6	合成 FePt@Fe ₃ O ₄ 示意圖.....	9
圖 1-7	(A)單一 FePt 的磁滯曲線 (B)Fe ₃ O ₄ 的磁滯曲線 (C)FePt@Fe ₃ O ₄ 退火處理後的磁滯曲線.....	10
圖 1-8	FePt@CdS 與 CdS-FePt 奈米粒子合成示意圖.....	11
圖 1-9	利用電位差進行氧化還原反應形成不同的金空心粒子結構 圖	13
圖 1-10	化學合成出 FePt@ SiO ₂ 示意圖.....	13
圖 2-1	FePt 合金結構示意圖	15
圖 2-2	FeCl ₂ 與 Pt(acac) ₂ 合成 FePt 示意圖	17
圖 2-3	FePt 經由 Van 修飾之示意圖.....	18
圖 2-4	(A)FePt-Van 與(B)FePt-NH ₂ 擷取細菌示意圖	19

圖 2-5	FePt 表面修飾官能基的流程圖	20
圖 3-1	性質檢測流程圖	21
圖 3-2	實驗裝置圖	23
圖 3-3	製備油溶相 FePt 實驗流程圖	26
圖 3-4	經由相轉換後的 CdSe-ZnS 表面官能基示意圖	27
圖 3-5	FePt 磁性奈米粒子 (A) 相轉換前 (B) 相轉換後	30
圖 3-6	界面活性劑與前驅物比例為 10 倍(樣品 B)之 TEM 圖	34
圖 3-7	界面活性劑與前驅物比例為 5 倍(樣品 C)之 TEM 圖	35
圖 3-8	界面活性劑與前驅物比例為 1 倍(樣品 D)之 TEM 圖	36
圖 3-9	界面活性劑與前驅物比例為 0.5 倍(樣品 E)之 TEM 圖	37
圖 3-10	界面活性劑與前驅物比例為 0.25 倍(樣品 F)之 TEM 圖	38
圖 3-11	各種比例下油溶相 FePt 磁性奈米粒子的 VSM 磁滯曲線 圖	40
圖 3-12	油溶相 FePt 磁性奈米粒子製程添加 20 倍、10 倍、1 倍 界面活性劑的磁滯曲線圖	41
圖 3-13	油溶相樣品 E、FePt database 及玻璃載盤之 XRD 圖	42
圖 3-14	水溶相樣品 B 分散在 n-hexanol 之 TEM 圖	44
圖 3-15	水溶相樣品 C 分散在 n-hexanol 之 TEM 圖	45
圖 3-16	水溶相樣品 D 分散在 n-hexanol 之 TEM 圖	46

圖 3-17	水溶相樣品 E 分散在 PBS buffer 之 TEM 圖	47
圖 3-18	樣品 D 之 FePt 磁性奈米粒子經由相轉換前後之 XRD 圖	48
圖 3-19	樣品 D 之 FePt 磁性奈米粒子相轉換前後之 VSM 圖	49
圖 4-1	水溶相 FePt 經由 EDC 表面修飾示意圖	50
圖 4-2	HRP 結構式意圖	51
圖 4-3	ABTS substrate 與 HRP 顯色前後示意圖: (A) ABTS substrate (B)HRP 與 FePt 磁性奈米粒子接合後與 ABTS 之顯色圖	53
圖 4-4	HRP 活性檢測之吸收光譜圖	58
圖 4-5	ABTS 與 HRP 的反應機制	59
圖 4-6	含粒子的背景值之光譜圖	61
圖 4-7	粒子與濃度 30 mg/ml 的 HRP 顯色後在不同時間下之吸 收光譜圖	61
圖 4-8	粒子與濃度 20 mg/ml 的 HRP 顯色後在不同時間下之吸 收光譜圖	62
圖 4-9	粒子與濃度 10 mg/ml 的 HRP 顯色後在不同時間下之吸 收光譜圖	63
圖 4-10	粒子與濃度 5 mg/ml 的 HRP 顯色後在不同時間下之吸收 光譜圖	64

圖 4-11	粒子與濃度 1 mg/ml 的 HRP 顯色後在不同時間下之吸收	
光譜圖	64
圖 4-12	粒子與不同濃度的 HRP 顯色五分鐘後之吸收光譜圖 ..	65

表目錄

表 3-1	合成 FePt 磁性奈米粒子的製程參數	32
表 3-2	各種比例下油溶相的粒子尺寸大小	38
表 3-3	各種比例下的飽和磁化量及矯頑場	41
表 3-4	各種比例下水溶相的粒子尺寸大小	47
表 4-1	不同樣品的反應順序	56
表 4-2	溫度對 HRP 活性之影響	58

第一章 緒論

1-1 前言

近年來磁性奈米粒子在製程上有許多研究，包括合金式的磁性奈米粒子，如 FePt^[1]；核殼式的磁性奈米粒子，如 Au@FePt^[2]；還有中空式的磁性奈米球，如 FePt 空心球^[3]等，如圖 1-1。應用方面被廣泛運用於生醫領域上，包含了在體外做診斷用的生物分離^[4]及生物感測上，與體內診斷的核磁共振造影^[5](magnetic resonance imaging, MRI)，和利用磁性奈米粒子做載體進行藥物傳遞^[6,7,8]，及標靶式的磁熱治療^[9]。

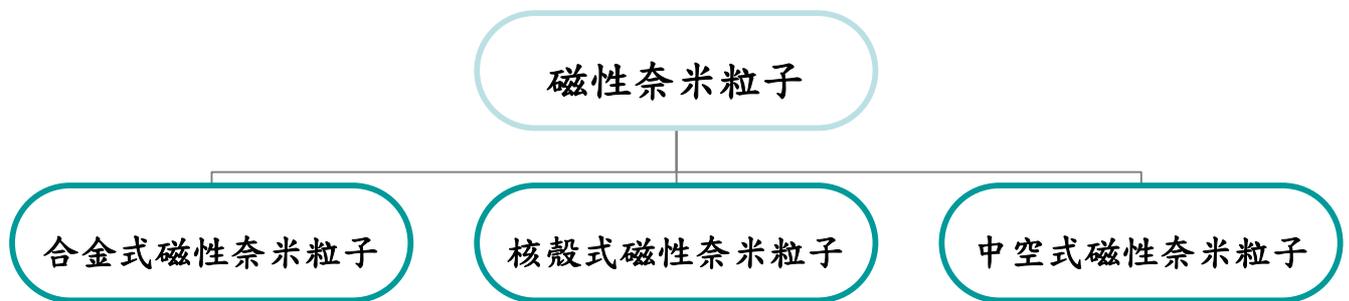


圖 1-1 磁性奈米粒子形式

1-2 磁性奈米粒子在生醫上的應用

磁性奈米粒子廣泛的應用在生醫材料上，如圖 1-2 所示。

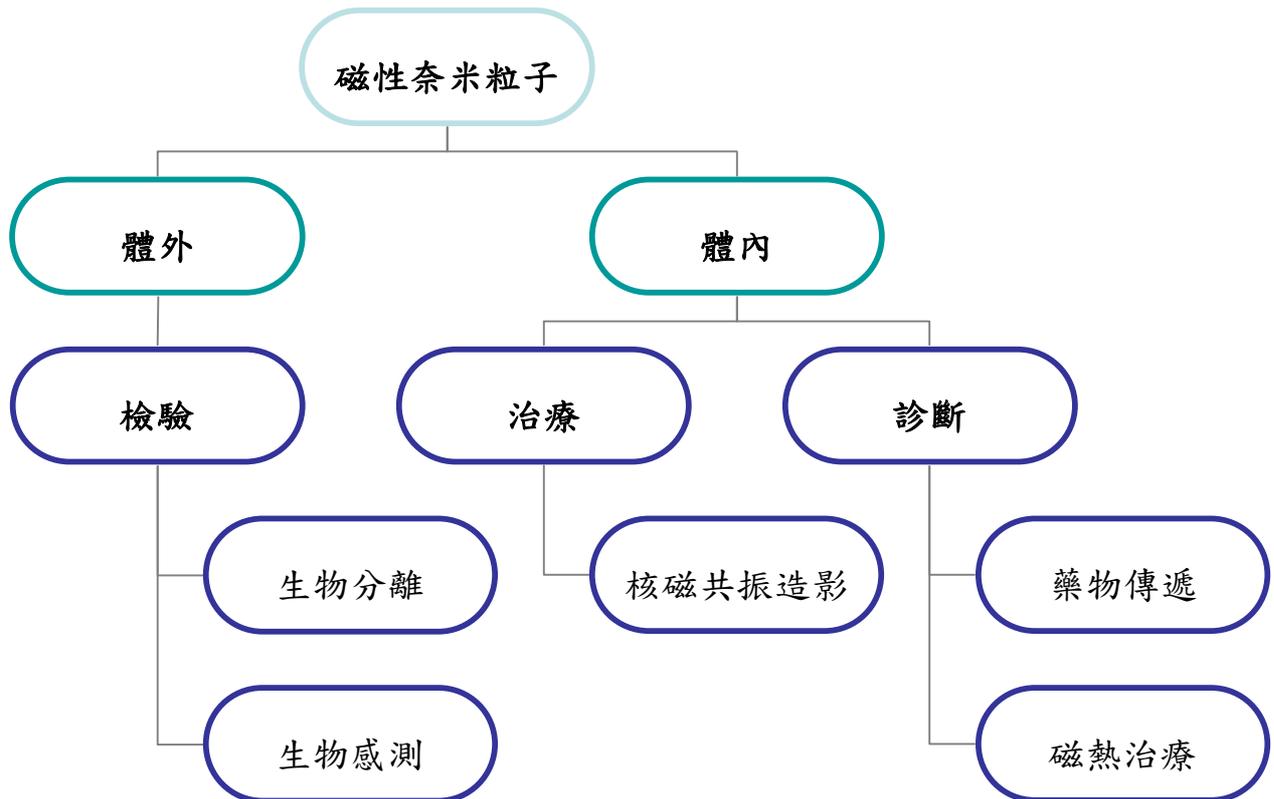


圖 1-2 磁性奈米粒子生醫上應用

1-2-1 生物分離

磁性奈米粒子藉由表面修飾後，可連接細胞、細胞或 DNA，運用磁性奈米粒子微小及具有磁性的特性，利用外加磁場來進行有效的分離，可增加生物分子分離操作方便性，如圖 1-3^[4]。

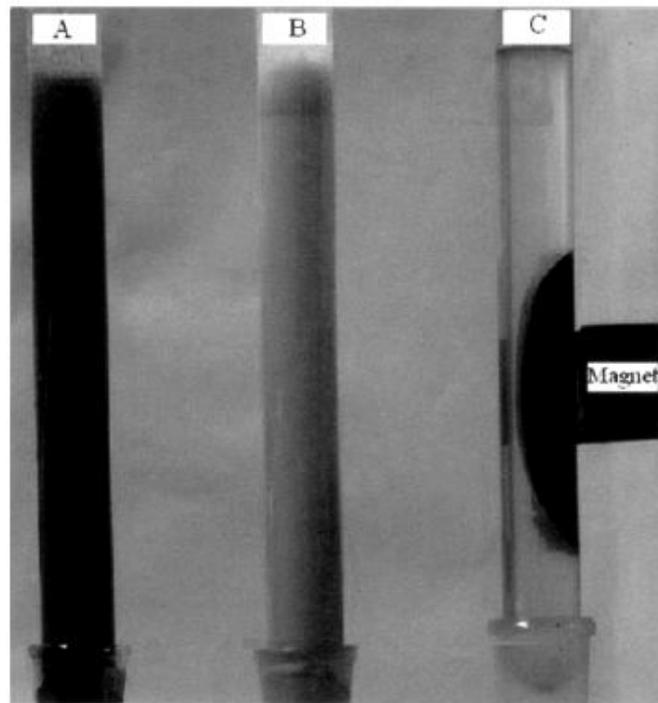


圖 1-3 磁性奈米粒子的生物分離^[4](A) 含有磁性奈米粒子的細胞(B) 一般的細胞 (C) 利用磁鐵來分離含有磁性奈米粒子的細胞

1-2-2 核磁共振造影

核磁共振造影(magnetic resonance imaging, MRI)在醫學上已經被廣泛運用於醫療腫瘤的顯影，然而運用磁性奈米粒子做標靶式的定位，更可有效的做局部清楚的顯影，如圖 1-4^[5]。

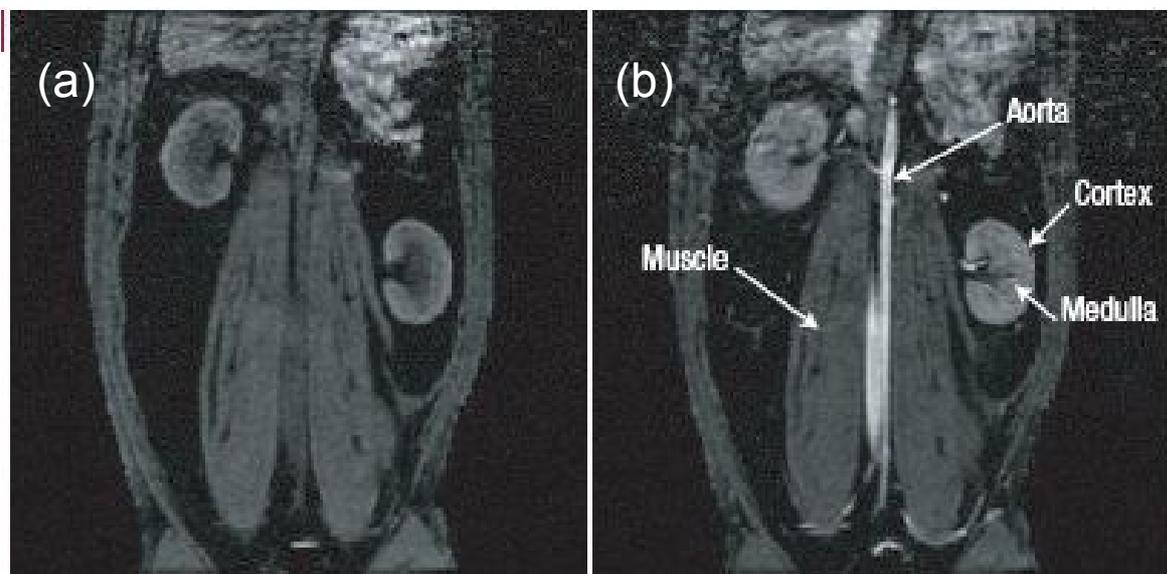


圖 1-4 磁性奈米粒子應用於核磁共振造影(MRI)^[5](a)未使用 FeCo 磁性奈米粒子的 MRI 影像；(b)FeCo 奈米粒子在老鼠中的 MRI 影像，在大動脈(aorta)中很明顯的可以看到清楚的影像對比

1-2-3 藥物傳遞

將磁性奈米粒子做為載體與藥物結合，做為磁性標靶藥劑，以靜脈注射方式進入體內，利用外加磁場將帶有藥物的磁性粒子移動至病變的部分做局部的治療，以達到藥物傳遞的功能^[6]，如圖 1-5^[7]。

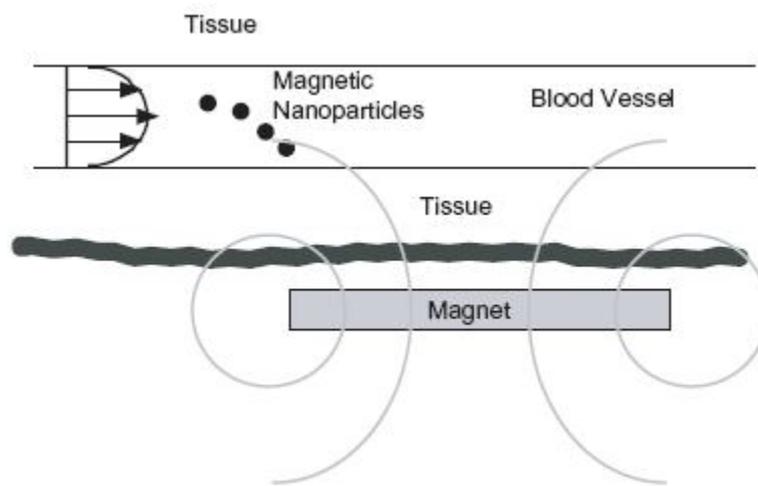


圖 1-5 藥物傳遞的示意圖^[7]

奈米藥物控制釋放系統的優點^[8]，主要能歸類如下列五點:(1)能使藥物緩慢釋放，在血中的藥物濃度可以維持一定。(2)藉由特殊的劑型設計，把好幾個劑量合併製成產品。(3)病人用藥的次數減少，可提高病人的配合用藥度。(4)由於藥物釋放濃度穩定，副作用減少。(5)可控制藥物釋放的地點、時間與藥量，可增加藥物的作用，使藥效更均勻，減少對正常組織的破壞。

1-2-4 磁熱治療

利用磁性奈米粒子特有性質而開發出新型治療方法：磁流體熱療法 (magnetic fluid hyperthermia, MFH)，此原理是利用磁性奈米粒子吸收外部電磁波能量後，使得粒子周圍環境溫度升高進而殺死腫瘤^[9]。也就是將磁性奈米粒子用外加磁場導引至腫瘤區，施予一個交流變磁場，磁性奈米粒子因吸收磁場給與的能量，使本身溫度升高，而殺死熱忍受度較低的腫瘤細胞，因而不影響正常的細胞與組織的生長，達到局部治療的效果，此磁熱療法最佳溫度通常約為 42~46°C。

1-3 合金式奈米粒子

製備合金式的奈米粒子，主要是結合兩種或多種不同元素的優點，來強化或改善材料的性質，在這方面有許多關於 FePt 磁性奈米粒子的研究，早期被運用於永久磁鐵、磁記錄元件的研究上^[10]，然而為了增加其磁性質，許多研究嘗試摻雜第三種元素，來試圖改變其序化所需溫度或磁性質，如表 1-1^[10,11,12,13,14,15]。

表 1-1 摻雜第三種元素之比較^[10,11,12,13,14,15]

第三元素	☆特色及優點 & ★缺點
Ag ^[10]	☆粒徑大小: 3.5 nm ☆矯頑場(coercivities): 大於 3.4 kOe ☆退火處理所需溫度降低 100~150 °C
Au ^[11]	☆粒徑大小: 8 nm ☆矯頑場: 6 kOe ☆ 自組裝合成的 FePtAu 奈米粒子，無需退火處理即可得到較高的矯頑場。
Cu ^[12]	☆粒徑大小: 3.5 nm

	<p>☆矯頑場: 9 kOe</p> <p>★添加 Cu 未能降低序化時所需退火處理的溫度。</p>
Co ^[13]	<p>☆對於 FePt 薄膜而言，添加少量的 Co 退火溫度在 600 °C ，平均晶粒尺寸隨著添加的 Co 越多而增加。</p> <p>☆將粒子改變為四方相，成功的縮小了磁晶異相的距離。其矯頑場為 10 kOe 。</p> <p>★增加 Co 添加的含量，則會降低 FePt 薄膜的矯頑場。</p> <p>★FeCoPt 在高溫退火處理後的矯頑場比 FePt 奈米粒子低，因為 CoPt 會形成較低的磁晶異相。</p>
Cr ^[14]	<p>★加入第三元素 Cr 反而會使矯頑場下降</p>
Pd ^[15]	<p>☆粒徑大小: 3.5 nm</p> <p>☆矯頑場: 增加超過 10kOe(退火處理溫度大於 650 °C)</p> <p>★增加添加的 Pd 含量，矯頑場則會下降。</p> <p>★FePdPt 奈米粒子在高溫退火處理後比 FePt 奈米粒子不具較高的矯頑場，由於 FePd 有較低的磁晶異相性造成的。</p>

1-4 核殼式奈米粒子

製備核殼式(core-shell)奈米粒子目的是藉由包覆不同性質的材料，達到改變粒子表面特性的變化，如導電度、生物相容性、粒子分散性、觸媒活性、磁性質及光學性質。

Kazuaki Yano^[16]等人，使用兩步驟先將FePt自組裝合成後，加入Au的前驅物合成FePt@Au的核殼式奈米粒子，具有超順磁性質，經由400°C退火處理序化後具有鐵磁性質，FePt@Au奈米粒子為疏水性，運用mercaptopundecanoic acid試劑轉為親水性，可供生物醫學上應用。

Vismadeb Mazumder^[17]等人，合成出內核為1nm的FePt包覆外層1~5nm Pd的FePt@Pd奈米粒子，藉由控制Pd的厚度，改變其磁性質。Chao Liu^[18]等人，將具有軟磁性的氧化鐵包覆在具有硬磁性的FePt奈米微粒外層，形成殼核的結構，如圖1-6。退火處理過後可有效的增加飽和磁化量，如圖1-7。

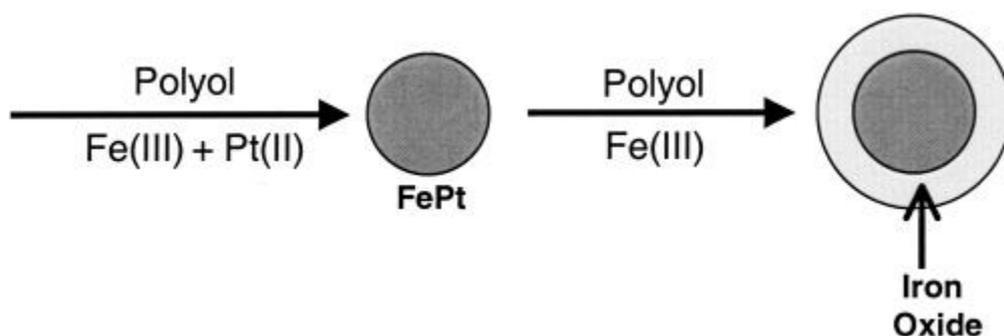


圖 1-6 合成 FePt@Fe₃O₄ 示意圖

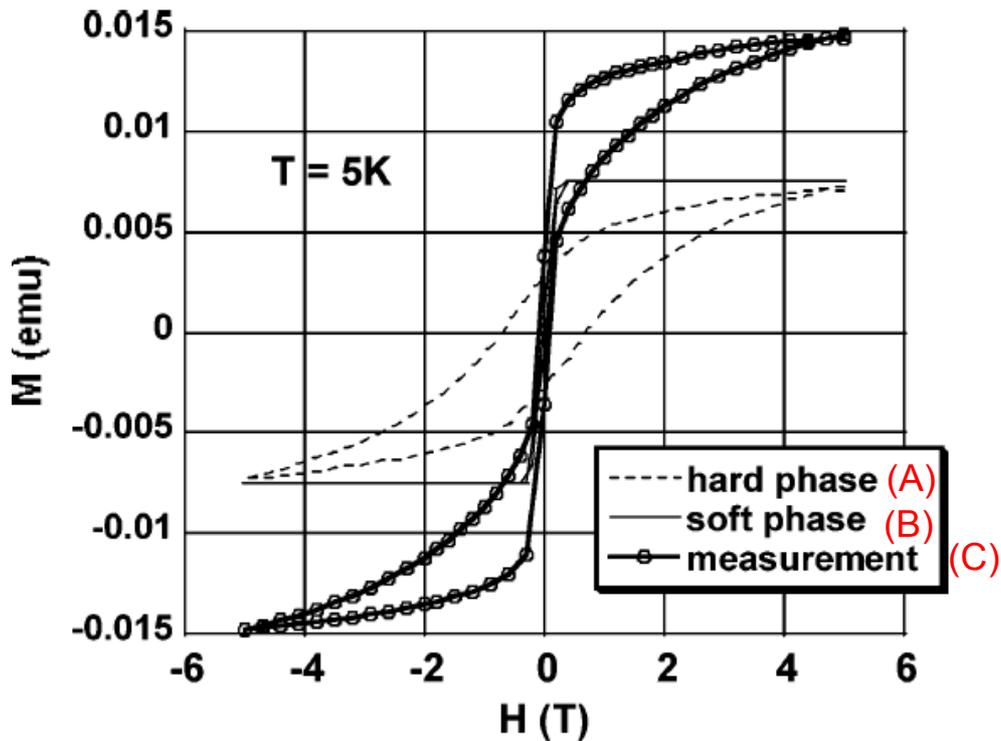


圖 1-7 (A)單一 FePt 的磁滯曲線 (B) Fe_3O_4 的磁滯曲線 (C) $\text{FePt}@Fe_3\text{O}_4$ 退火處理後的磁滯曲線

Hongwei Gu^[19]等人嘗試將FePt與S結合形成 $\text{FePt}@S$ ，再加入Cd的錯合物，合成出 $\text{FePt}@CdS$ 核殼式結構。若將加熱溫度升高至 280°C ，則會使原本包裹在FePt外層的CdS從非晶態轉變成結晶態結構，形成CdS-FePt的結構奈米粒子，如圖1-8。

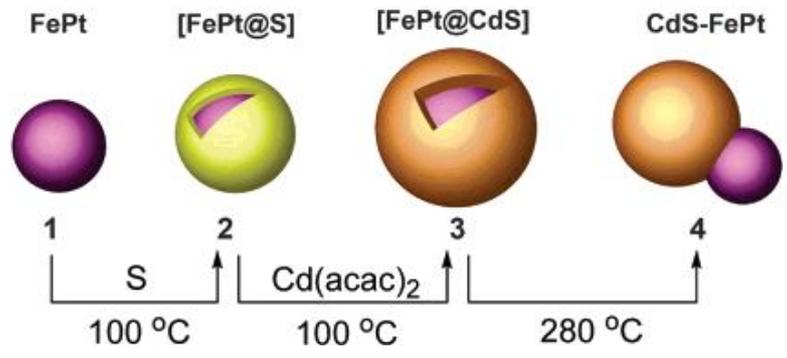


圖1-8 FePt@CdS與CdS-FePt奈米粒子合成示意圖^[19]

1-5 中空式奈米粒子

近年來一連串奈米結構型態上控制，陸續被研究製備出來，除了零維的奈米點(quantum dot)，一維的奈米線(nano-wire)、奈米棒(nano-rod)，二維的奈米板(nano-plate)之外，由於製備技術的純熟與進步，進而中空型態的奈米結構也逐漸地發展，如奈米管(nano-tube)、奈米空球(nano-hollow)。

合成中空型材料主要合成方法是以模板為基材，覆蓋上一層或數層殼層，最後再以高溫、強酸或強鹼來移去核心粒子，達成製備中空粒子。而中空式奈米粒子其優點在於內部可用來填充藥物，並控制釋放的速率。

2002 年 Xia 等人提出利用基材涉入交換反應(template-engaged replacement reaction)來生成均勻且具有高結晶性的奈米空心球，他們運用不同形狀的銀奈米粒子當基材，將銀奈米粒子均勻分散在溶液中，且緩慢地將含有金離子的溶液加入，藉由金還原半電位高於銀，使金離子接受一個電子還原成金，而銀原子提供一個電子自身氧化成銀離子。且此反應發生於奈米銀表面，逐漸的將金包覆於原先的奈米銀，而原先的奈米銀則反應成銀離子分佈在溶液中，進而獲得各種不同的中空結構，如圖 1-9^[20]。

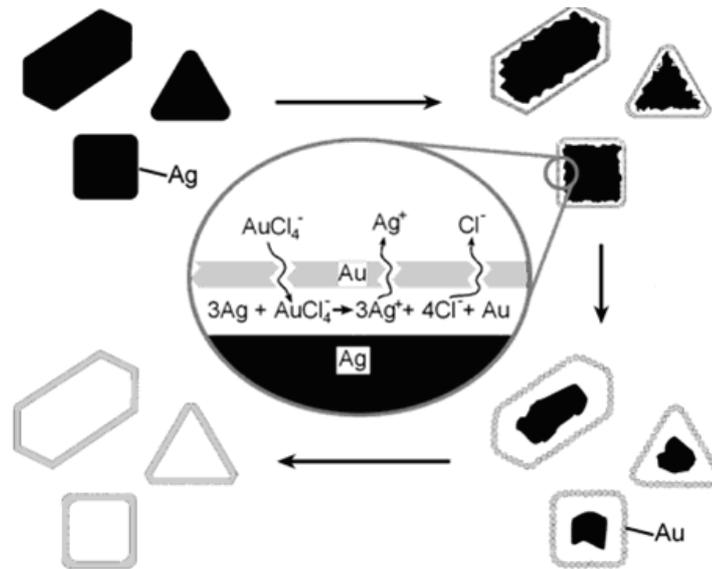


圖 1-9 利用電位差進行氧化還原反應形成不同的金空心粒子結構^[20]

Junzhong Wang^[3]等人，使用化學合成法製備出 SiO₂ 為核，FePt 為殼的奈米粒子，與 SiO₂ 為核 ZnS 為殼的奈米粒子，如圖 1-10，以及 FePt@ZnS@SiO₂ 的三層奈米粒子結構，且使用 480°C 在氮氣下退火處理，獲得空心 FePt 粒子，與 FePt@ZnS 的雙層中空奈米粒子。

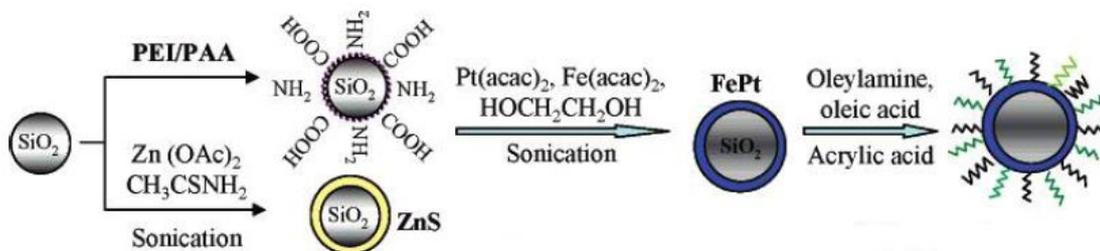


圖 1-10 化學合成出 FePt@ SiO₂ 示意圖^[3]

1-6 實驗動機與目的

近年來許多磁性奈米粒子在生醫上的研究與應用，包括使用磁性奈米粒子當載體進行檢測蛋白質，藉由氧化鐵、鐵鉑合金與鐵鈷合金具有磁性的特性，運用外加磁場操控粒子的位置，做純化與分離^[3]，亦可使用磁場將磁性粒子升溫，達到磁加熱效果，治療殺死癌細胞^[8]。

本研究將以 FePt 奈米粒子為載體，藉由表面修飾，使 FePt 磁性奈米粒子能接上蛋白質分子，再應用簡易的顯色及光學吸收儀器做定量檢測。

第二章 文獻回顧

2-1 FePt 磁性奈米粒子特性介紹

近年來 FePt 磁性奈米粒子被廣泛地研究，起初被當做永久磁鐵^[21]，進而被用於磁記錄元件上，由於其擁有高磁晶異相性(magnetocrystalline anisotropy, K_uV)，及高飽和磁化量，FePt 在未序化前因為 fcc(face-centered cubic)的晶格結構呈現軟磁性，經由高溫退火(annealing)後，轉變為序化的 fct(face-centered tetragonal)晶格結構^[22]，如圖 2-1，則轉變為鐵磁性，具有高的矯頑場(coercivity)。然而當 FePt 粒子小至奈米尺度，將呈現出超順磁(superparamagnetism)的磁性質，使得 FePt 磁性奈米粒子，在無外加磁場下，粒子間無引力，所以不會造成聚集現象，可良好地分散在溶液中，成為在生醫應用上的優點之一。

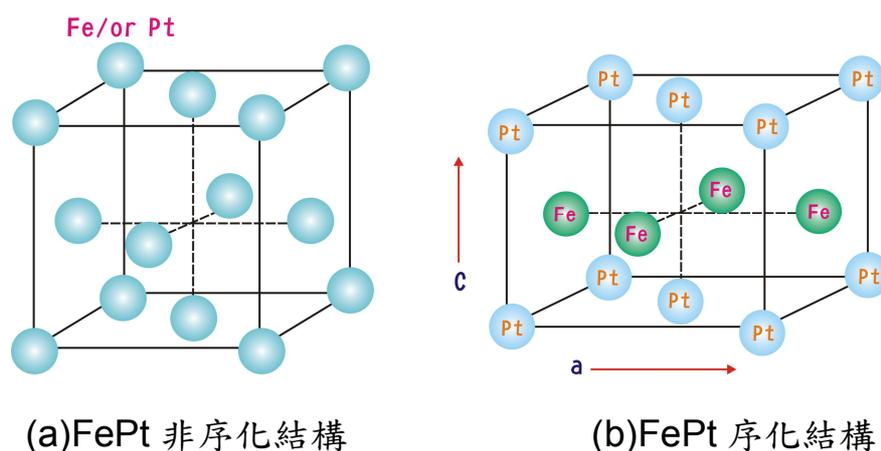


圖 2-1 FePt 合金結構示意圖^[22]

2-2 FePt 磁性奈米粒子製備

早在 2000 年，Shouheng Sun 等人首次發表利用化學還原法(chemical reduction method)，將 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 熱分解，與使用還原劑還原 $\text{Pt}(\text{acac})_2$ ，*octyl ether* 做為溶劑，並藉由 *oleic acid* 與 *oleylamine* 做為保護劑以控制還原劑量，使反應能自組裝合成，使 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 在高溫下裂解，製備出大小為 3~10 nm 的 FePt 磁性奈米粒子^[23]，然而因其反應會產生氣體，較不容易控制合成的比例，且 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 高溫裂解的反應中會產生對人體有害之氣體^[1]。

而在 2003 年，Kevin E. Elkins 等人合成出 2 nm 的 FePt 磁性奈米粒子，且將製程中鐵的前驅物改為 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 取代，使整個製成為無毒性(nontoxicity)且無揮發性(nonvolatility)^[24]。Shouheng Sun 等人，也在同年發表將 FeCl_2 取代 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ，且將還原劑改用較強的 LiBEt_3H 取代，溶劑改為沸點較低的 *phenyl ether*，如圖 2-2，其組成的比例可受到良好的控制^[21]。

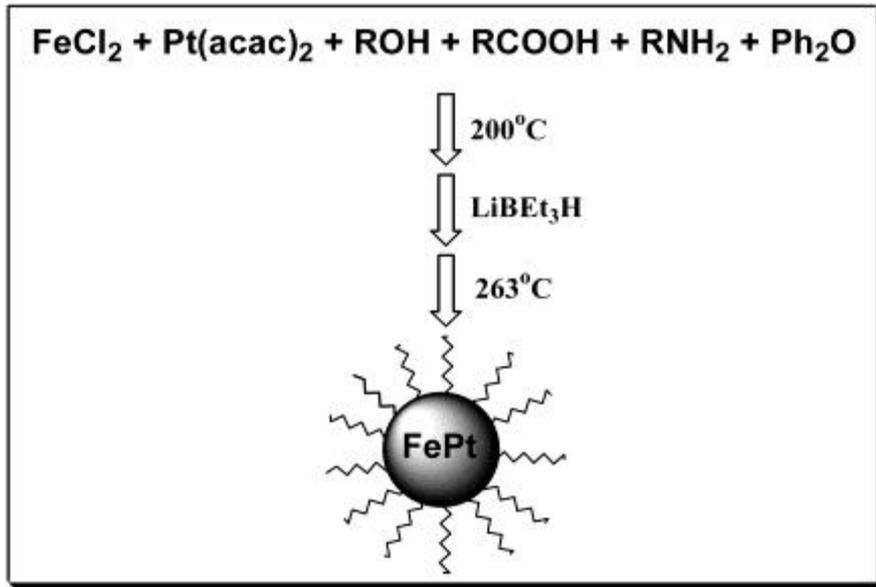


圖 2-2 FeCl_2 與 $\text{Pt}(\text{acac})_2$ 合成 FePt 示意圖^[21]

2-3 製備具有生物功能性的 FePt 奈米粒子

由於 FePt 磁性奈米粒子的化學穩定性佳，且無毒性，具有良好的生物相容性，使用化學還原法製備的 FePt 磁性奈米粒子，最小能到 2 nm，比一般磁性奈米粒子還小，其相對的比表面積增加許多。若將此 FePt 磁性奈米粒子接連生物分子，則能抓取較多分子。但在 2-2 所介紹的合成方法中，均為製備油溶相的 FePt 磁性奈米粒子，若要應用於生醫上，則需轉換為水溶相。

在 2003 年，Hongwei Gu 等人^[25]將合成好的 FePt 利用 cystamide 做表面修飾，使其一端的硫醇基(thiol, -SH)能與 FePt 形成鍵結，另一端則是親水的胺基端(-NH₂)，使粒子能夠分散在水性溶液中。另一種將 FePt 磁性奈米粒子用(vancomycin, Van)做表變修飾後，如圖 2-3，因為 Van 可利用氫鍵在低濃度下抓取革蘭氏陽性細菌(Gram-positive bacteria)，再用磁鐵做分離，單純使用胺基做修飾的粒子，則無法擷取細菌，如圖 2-4 所示。

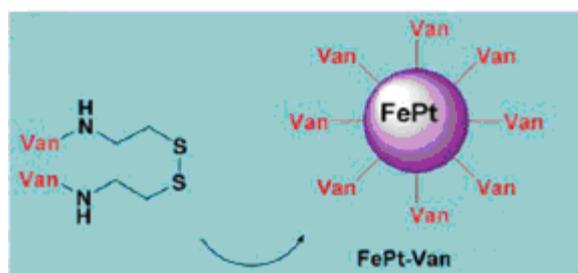


圖 2-3 FePt 經由 Van 修飾之示意圖^[25]

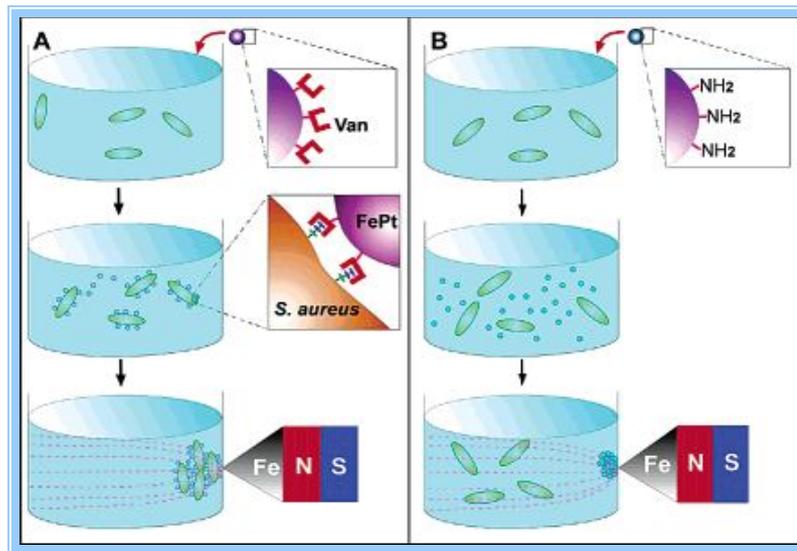


圖 2-4 (A)FePt-Van 與(B)FePt-NH₂ 擷取細菌示意圖^[25]

2005 年，Rui Hong 等人^[26]將具親水性的高分子聚乙二醇(poly ethylene glycol, PEG)和多巴胺(dopamine)修飾 FePt 的表面，進而將 FePt 的表面修飾成羧基(carboxylic group)和胺基(amino group)與生物分子接連，如圖 2-5，可長久穩定於水中，將酵素固定於 FePt-PEG 分子上，也不易失去活性。

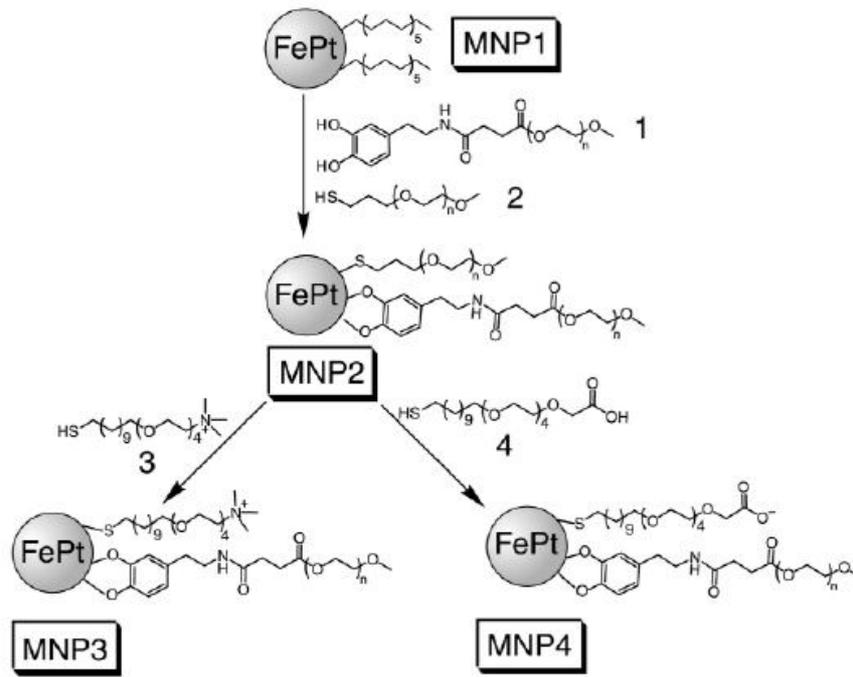


圖 2-5 FePt 表面修飾官能基的流程圖^[26]

亦可將 FePt 與其他金屬或非金屬做結合，如 1-4、1-5 所提到的核殼式，或是空心的方式，提高生物相容性，與其相關的應用。

第三章 FePt 磁性奈米粒子

3-1 製備油溶相 FePt 磁性奈米粒子

3-1-1 實驗設計

我們利用化學還原法(chemical reduction method)製備 FePt 磁性奈米粒子，其合成方法參考 K. E. Elkins^[24]等人在 2003 年所發表關於製備 FePt 磁性奈米粒子的方法。使用 Fe 和 Pt 的錯合物鹽類做為前趨物，以 octyl ether 當溶劑，藉由還原劑 1,2-hexadecandiol 進行高溫加熱，並加入油酸(oleic acid)與油胺(oleylamine)當做界面活性劑(surfactant)，使 FePt 粒子慢慢形成奈米大小，且均勻分散在溶劑中。

製備完成的 FePt 磁性奈米粒子，經由 TEM 進行粒徑分析，XRD 進行晶格結構分析，VSM 進行磁性質分析。整體性質檢測流程如圖 3-1。

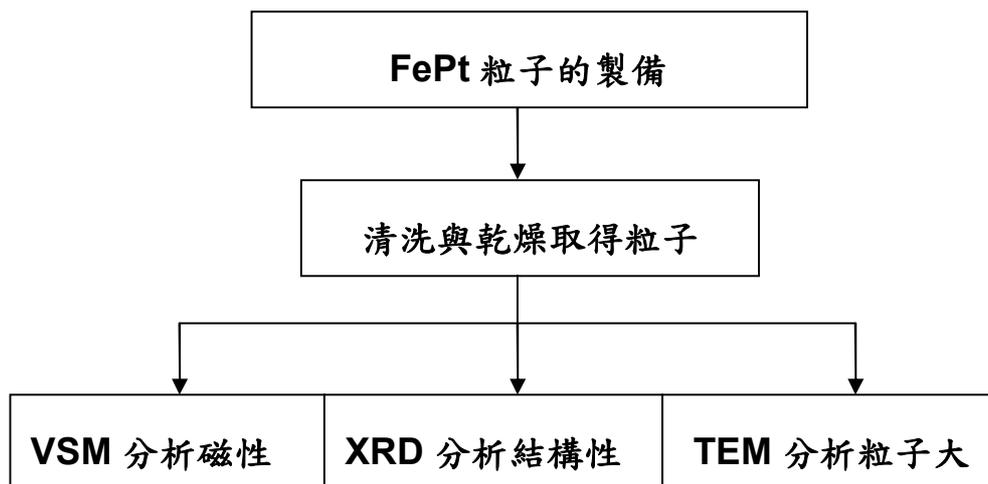


圖 3-1 性質檢測流程圖

3-1-2 實驗藥品

1. Platinum(II) acetylacetonate, $\text{Pt}(\text{acac})_2$, 98%, Acros Organics
2. Iron(III) acetylacetonate, $\text{Fe}(\text{acac})_3$, 99%, Strem Chemicals
3. 1,2-hexadecanediol, $\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_2$, 90%, Aldrich
4. Oleic acid, $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$, 99%, Showa
5. Oleylamine, $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}$, 97%, Acros Organics
6. Octyl ether, $\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}$, 99%, Aldrich
7. 矽油(silicon oil), 聯工化工
8. 乙醇(ethanol), 景明化工

3-1-3 實驗裝置

本實驗是由加熱包做為加熱源，以微電腦加熱器控制加熱溫度及升溫速率，並且運用十字磁石攪拌，使反應物均勻混合加熱，並全程在通入氫氣絕氧的環境下進行反應。

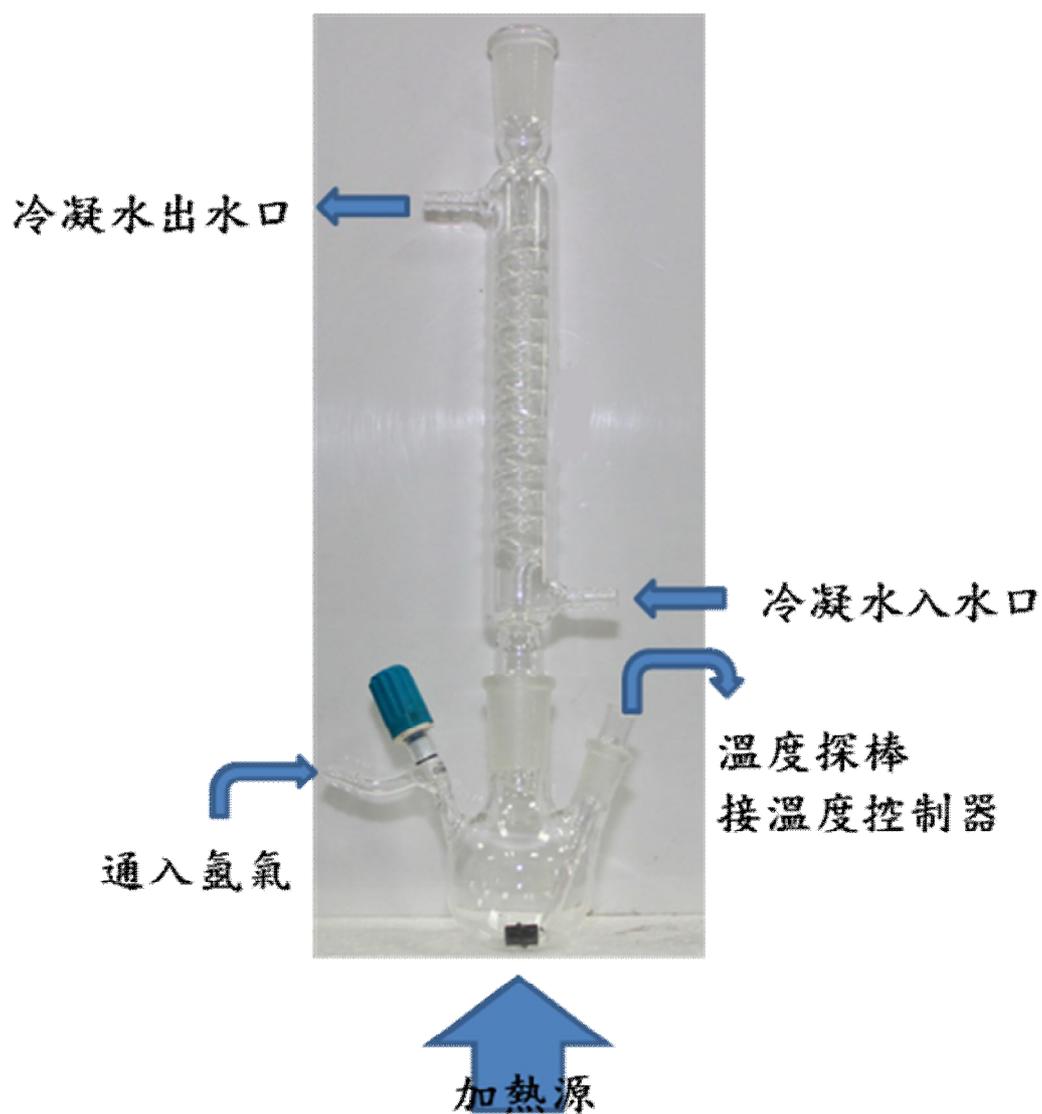


圖 3-2 實驗裝置圖

3-1-4 實驗步驟

此實驗是利用化學還原法來製備 FePt 磁性奈米粒子，固定前趨物 Fe 與 Pt 的莫爾比為 2 比 1，並改變界面活性劑的比例來製備 FePt 磁性奈米粒子。圖 3-3 為實驗流程圖。

1. 分別取 1 mmole $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 和 0.5 mmole $\text{Pt}(\text{acac})_2$ 作為前趨物，並取 4.5 mmole 的 1,2-hexadecanediol 當作還原劑，並加入 30 ml 的 octyl ether 作為反應的溶劑，並將上述藥品置入三頸圓底瓶內。
2. 將圓盤狀十字攪拌磁石放進三頸圓底瓶內，並開起攪拌裝置，再放置溫度探棒的玻璃管中，置入少許的矽油以幫助加熱時的熱傳導，更容易控制溫度。
3. 將氬氣通入圓底瓶中，作氣體交換 30 分鐘，確保反應瓶中呈現絕氧 (airless) 的封閉狀態，並套上氣球，關閉氬氣及真空閥。
4. 開啟冷卻水，並調整流量。此時亦可開始加熱，將微電腦加熱器設定升溫速率為 $5^\circ\text{C}/\text{min}$ ，加熱至 100°C 。
5. 當升溫至 100°C 時，迅速加入 1 mmole Oleic acid 和 0.5 mmole oleylamine 界面活性劑，作為 Fe 與 Pt 的保護劑，並在 100°C 下持溫 20 分鐘。
6. 再將升溫速率調整至 $7^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 295°C ，迴流反應 1 小時。升溫期間

溶液不斷的持續沸騰，可觀察溶液顏色由紅棕色轉變為黑色，即表示 FePt 磁性奈米粒子生成。

7. 關閉加熱源，使系統自然冷卻至室溫。當瓶內溶液冷卻至室溫，才可將氣球及冷卻水移除，此時整個製程即完成。
8. 加入反應完成溶液之 10 倍的乙醇進行純化，其未反應完全的雜質會溶於乙醇中，粒子會因溶劑系統的極性提高而產生沉澱。再將上層液體移除，此步驟重複三次，若上層溶液仍混濁，則需反覆純化。再將純化完全的 FePt 磁性奈米粒子，移入 80°C 烘箱中，使乙醇完全揮發，即可收集粉末狀的固體，此為油溶相的 FePt 磁性奈米粒子。

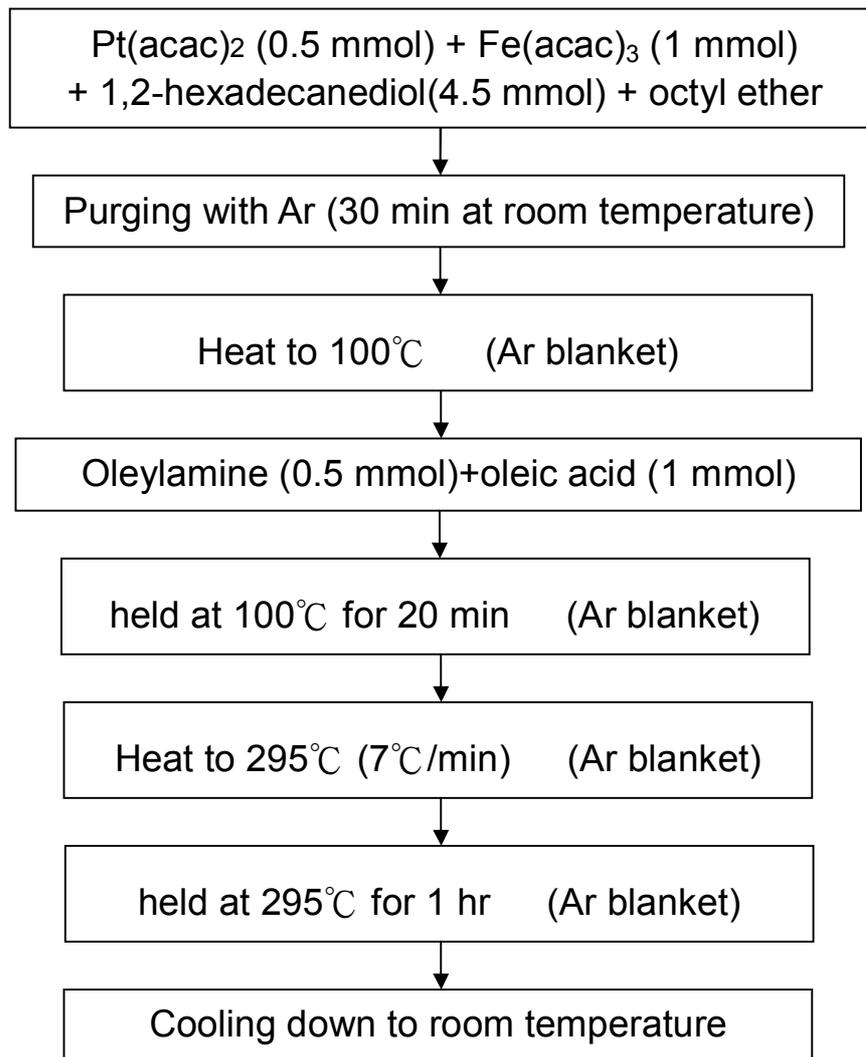


圖 3-3 製備油溶相 FePt 實驗流程圖

3-2 製備水溶相 FePt 磁性奈米粒子

3-2-1 前言

運用相轉換(phase transfer)的方式，將所製備的油溶相粒子經由表面官能基的替換，對奈米粒子作表面修飾後，使其呈現親水的性質，奈米粒子即能分散至水溶液中，得到水溶相的奈米粒子。

此實驗參考在 1998 年，Warren C. W. Chan 等人^[27]所發表在 Sciences 期刊中的文獻，提到運用 mercaptoacetic acid 轉相試劑進行 CdSe-ZnS 粒子的表面修飾，藉由此試劑一端的硫醇基(-SH)與 ZnS 表面形成鍵結，另一端則為親水性的羧基(-COOH)，如圖 3-4 所示，使得相轉換過後的 CdSe-ZnS 得以分散在水溶液中。

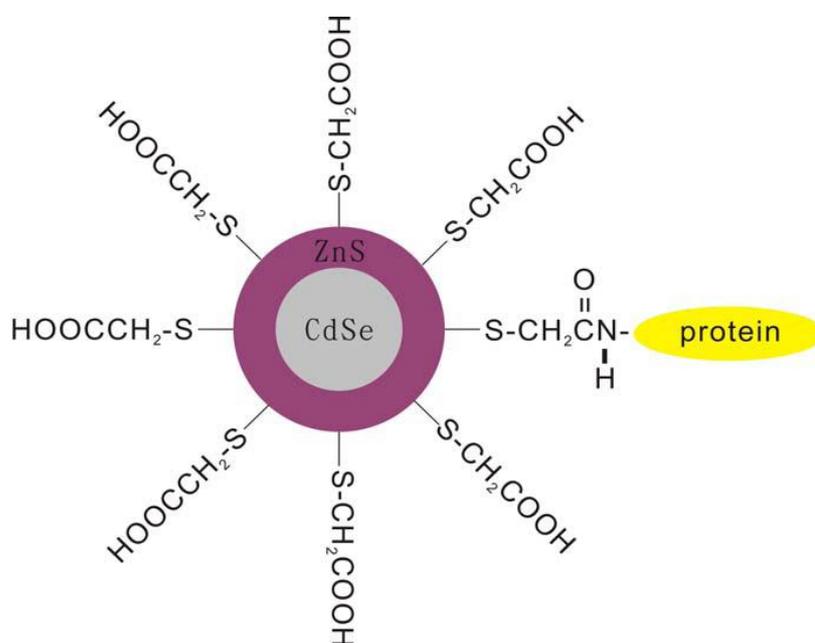


圖 3-4 經由相轉換後的 CdSe-ZnS 表面官能基示意圖^[27]

3-2-2 實驗藥品

1. Mercaptoacetic acid (Thioglycolic acid), $C_2H_4O_2S$, 98%, Fluka
2. Chloroform, $CHCl_3$, Riedel-deHaën
3. 乙醇(ethanol), 景明化工

3-2-3 實驗步驟

本實驗利用相轉換方式將製備好的油溶相 FePt 磁性奈米粒子，做表面修飾，轉換成水溶相 FePt 磁性奈米粒子。其實驗步驟如下：

1. 將油溶相 FePt 磁性奈米粒子溶於氯仿(chloroform, CHCl_3)中，以濃度 1 mg/ml 配置完成後，使用超音波震盪器使 FePt 磁性奈米粒子均勻分散在溶液中。
2. 加入濃度 1 M 的相轉換試劑 mercaptoacetic acid，放入磁石攪拌，使反應在劇烈攪拌中進行，反應時間為兩小時以上。
3. 反應完成後，使用強力磁鐵吸引 FePt 磁性奈米粒子使其沉降至瓶子底部，此時為轉相反應完成，表示粒子表面官能基確實被親水性的分子所取代，完成 ligand exchange 的程序，如圖 3-5。
4. 將上層的氯仿移出，加入去離子水純化轉相過後的 FePt 磁性奈米粒子，可觀察黑色 FePt 奈米粒子會懸浮於去離子水中。
5. 利用離心或是強力磁鐵將粒子進行純化的步驟，放入烘箱烘乾，即可得水溶相 FePt 磁性奈米粒子。

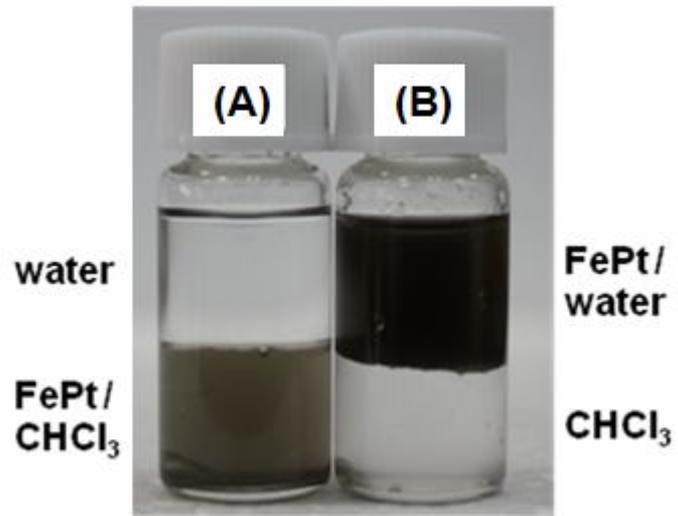


圖 3-5 FePt 磁性奈米粒子 (A)相轉換前 (B)相轉換後

3-3 油溶相 FePt 磁性奈米粒子分析與討論

希望藉由改變製程的條件，製備出不同大小的粒子，以利於往後生醫應用上可具備對專一細胞，例如癌細胞的專一選擇性。Vikas Nandwana 等人^[28]，運用改變製程時的升溫速率及前驅物的比例，有效的控制製備出的 FePt 磁性奈米粒子的粒徑大小，也製備出如方形，橢圓等不同形狀的粒子。

而我們試著調整製程中加入不同界面活性劑的量，如表 3-1，探討其性質及轉相前後的差異。A、B、C 分別是加入 20、10、5 倍的界面活性劑(油酸、油胺)量反應；D 為起始一般的製程用量，為油酸(oleic acid)的量與 Fe 前驅物用量莫耳數相同，油胺(oleylamine)的用量與 Pt 前驅物的莫耳數相同；E、F 則是減少其界面活性劑的用量為一般的 0.5 及 0.25 倍。

表 3-1 合成 FePt 磁性奈米粒子的製程參數

樣品 代碼	Fe(acac) ₃ (mmole)	Pt(acac) ₂ (mmole)	1,2-hexadecanediol (mmole)	Oleic acid (mmole)	Oleylamine (mmole)	Temp (°C)	Time (hr)
A	1.0	0.5	4.5	20	10	295	1
B	1.0	0.5	4.5	10	5	295	1
C	1.0	0.5	4.5	5	2.5	295	1
D	1.0	0.5	4.5	1	0.5	295	1
E	1.0	0.5	4.5	0.5	0.25	295	1
F	1.0	0.5	4.5	0.25	0.125	295	1

3-3-1 油溶相 FePt 磁性奈米粒子粒徑分析

將製備完成的油溶相 FePt 磁性奈米粒子以濃度 1 mg/ml 分散在氯仿的溶劑中，取 10 μ l 滴在銅網上，並抽氣在真空狀態下將溶劑揮發，利用 TEM 觀察 FePt 磁性奈米粒子的粒徑分佈。圖 3-6、3-7，為將界面活性劑加量添加 10 倍(樣品 B)與 5 倍(樣品 C)的 TEM 圖，從圖 3-6、3-7，可觀察到粒子分佈均勻且分散，粒徑為 3.18 ± 0.48 nm、 2.22 ± 0.33 nm。從圖 3-8，可觀察到一般界面活性劑的量(樣品 D)下，所製備的 FePt 磁性奈米粒子粒徑大小為 1.92 ± 0.45 nm。圖 3-9、3-10，為將製程中的界面活性劑添加量減少至一般的 0.5 倍(樣品 E)與 0.25 倍(樣品 F)，可觀察到圖 3-9 有些粒子較為聚集但大多為分散，推測為製備樣品時在溶劑裡分散不夠均勻所致，圖 3-10 即呈現均勻分散且粒徑大小較為平均，此兩組的粒徑分別為 2.72 ± 0.73 nm 及 2.22 ± 0.33 nm。

由以上量測的五組數據來看，雖然添加不同量的界面活性劑，但在粒徑的大小上並未觀察到有明顯差異，並無法合成出單一尺寸較大的 FePt 磁性奈米粒子，推測反應為自組裝的合成機構進行，粒徑大小固定在 2~3 nm。

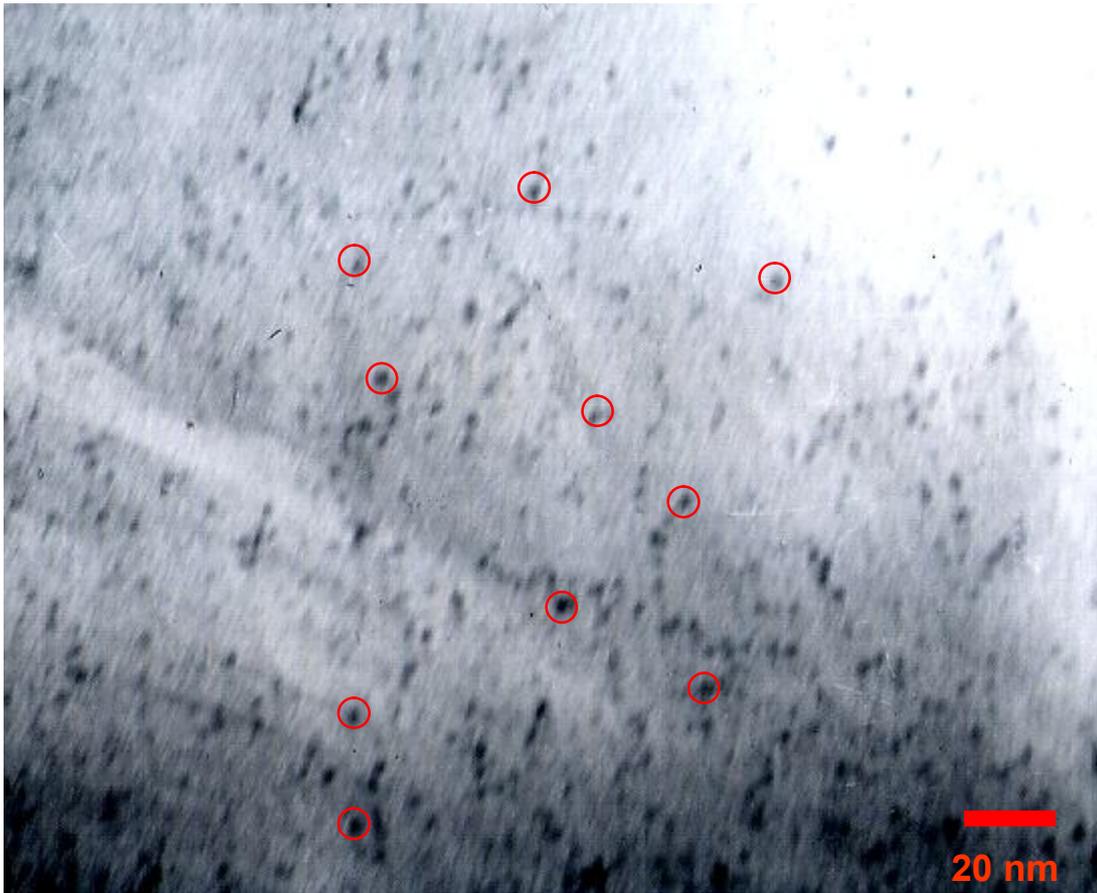


圖 3-6 界面活性劑與前驅物比例為 10 倍(樣品 B)之 TEM 圖

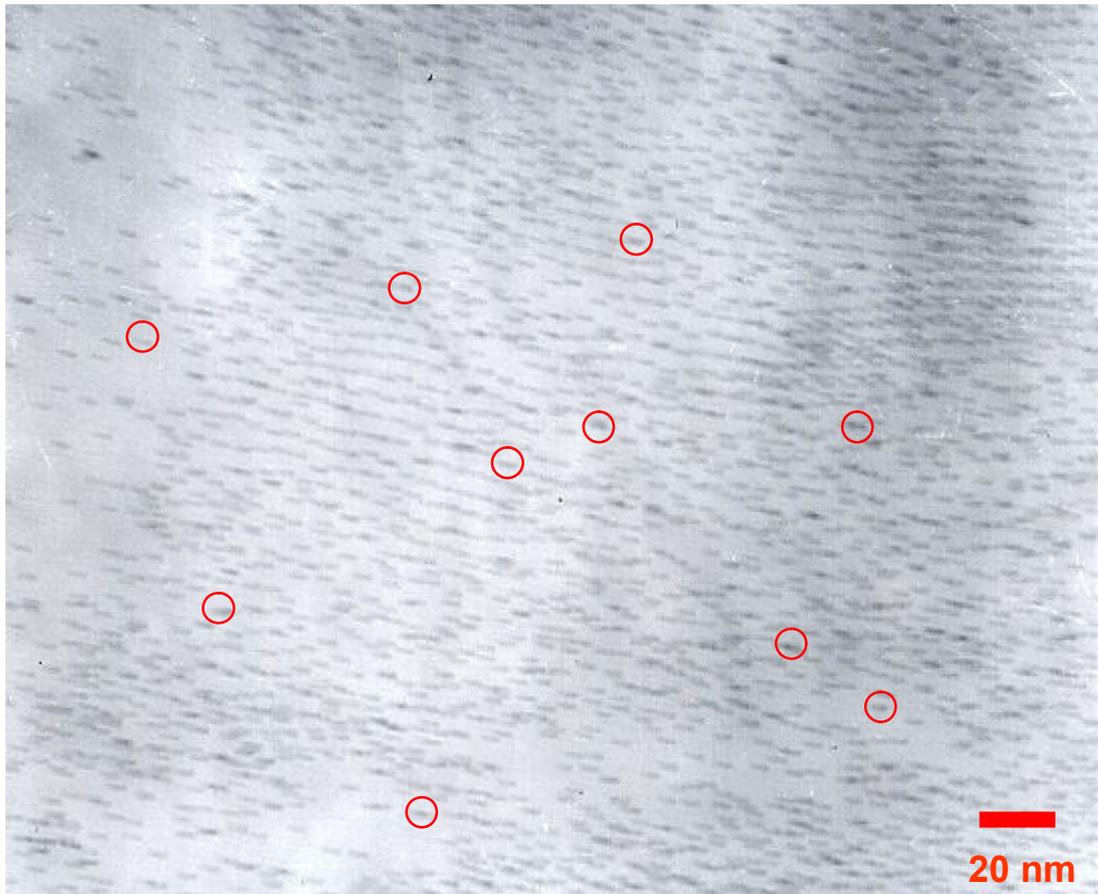


圖 3-7 界面活性劑與前驅物比例為 5 倍(樣品 C)之 TEM 圖

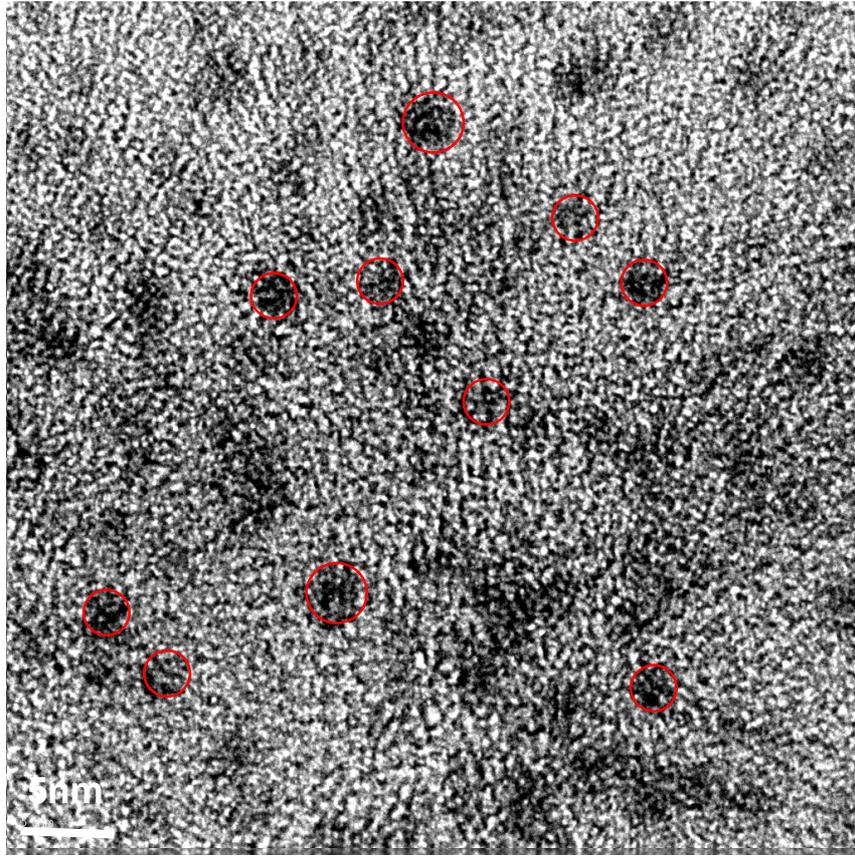


圖 3-8 界面活性劑與前驅物比例為 1 倍(樣品 D)之 TEM 圖

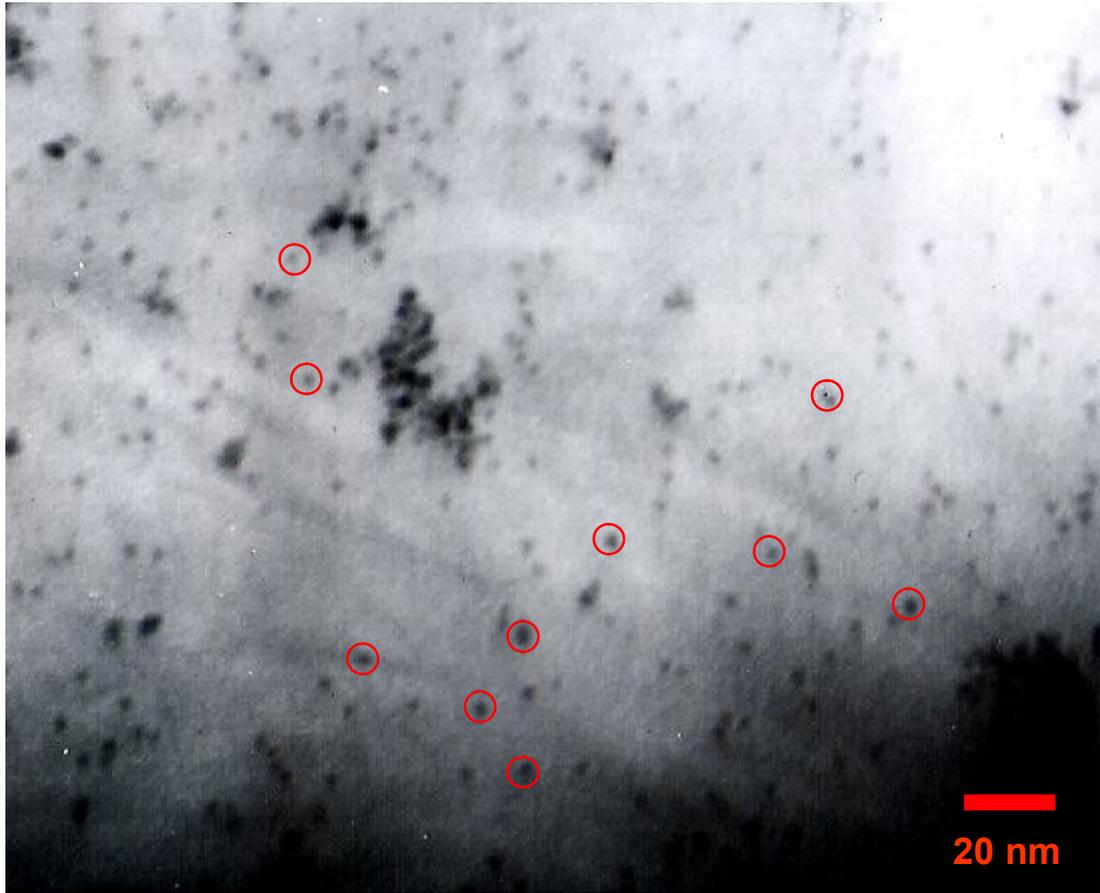


圖 3-9 界面活性劑與前驅物比例為 0.5 倍(樣品 E)之 TEM 圖



圖 3-10 界面活性劑與前驅物比例為 0.25 倍(樣品 F)之 TEM 圖

表 3-2 各種比例下油溶相的粒子尺寸大小

樣品代碼	A	B	C	D	E	F
粒徑大小 (nm)	X	3.18 ± 0.48	2.22 ± 0.33	1.92 ± 0.45	2.72 ± 0.73	2.22 ± 0.33

※ X 表示油溶相的樣品 A 其 TEM 圖無法明確的觀測到粒子

3-3-2 油溶相 FePt 磁性奈米粒子磁性質分析

我們利用 VSM (vibrating sample magnetometer) 來量測 A~F 等樣品之 FePt 奈米粒子的磁性質。在室溫下，外加磁場為 -20 kOe 至 20 kOe，如圖 3-11，其飽和磁化量及矯頑場如表 3-3 所示。圖 3-12 則是樣品 A、B、D 的放大磁滯曲線圖。

可觀察到除了界面活性劑添加量為 1 倍(樣品 D)的圖形接近超順磁現象外，其他樣品皆呈現軟磁性的磁滯曲線。而依飽和磁化量(magnetization)來看，雖然無法看出其變化的趨勢，但若將界面活性劑添加量增加至 20 倍(樣品 A)與 10 倍(樣品 B)時，可看出其飽和磁化量比添加一倍(樣品 D)的低，A、B、D 的飽和磁化量分別為 1.40 emu/g、1.15 emu/g、2.20 emu/g。而界面活性劑添加量減少為二分之一時(樣品 E)，其擁有最大的飽和磁化量 10.78 emu/g。

由矯頑場來看，當界面活性劑添加量減少至 0.25 倍(樣品 F)時，具有最大的矯頑場 380.86 Oe。所測得的矯頑場與原先添加一倍界面活性量(樣品 D)比較，改變界面活性的添加量，無論是增加或是減少其界面活性劑的添加量，皆會提高其矯頑場的數值，推測此現象，可能是因為原先的樣品為超順磁，改變添加量之後，均呈現軟磁性所致。

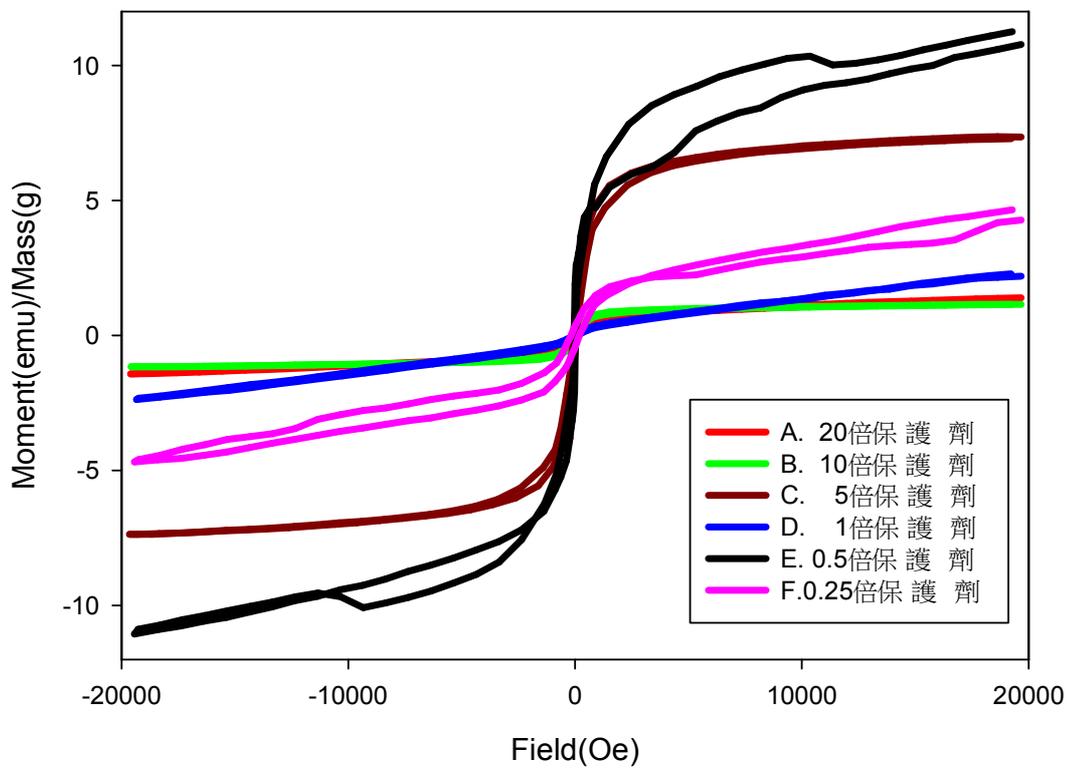


圖 3-11 各種比例下油溶相 FePt 磁性奈米粒子的 VSM 磁滯曲線圖

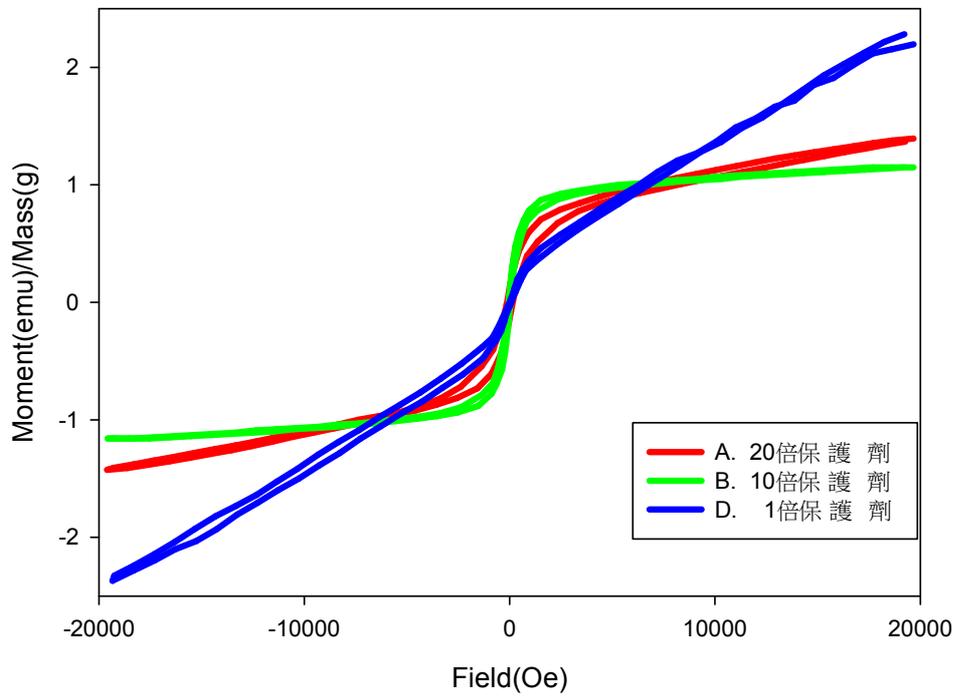


圖 3-12 油溶相 FePt 磁性奈米粒子製程添加 20 倍、10 倍、1 倍界面活性劑的磁滯曲線圖

表 3-3 各種比例下的飽和磁化量及矯頑場

樣品代碼	A	B	C	D	E	F
飽和磁化量 (emu/g)	1.40	1.15	7.35	2.20	10.78	4.27
矯頑場 (Oe)	253.72	104.11	203.76	57.45	71.73	380.86

3-3-3 油溶相 FePt 磁性奈米粒子晶格結構分析

我們藉由 XRD 對 FePt 磁性奈米粒子做晶格結構的分析，如圖 3-13。

再扣除玻璃載盤的訊號後，與 FePt 的 database 比對後，在 40.5° 時有一個 FePt(111) 的主要繞射峰出現。因為樣品未經過退火處理，所以呈現未序化的狀態，其 XRD 的訊號呈現只出最強(40.5°) 的結構訊號。

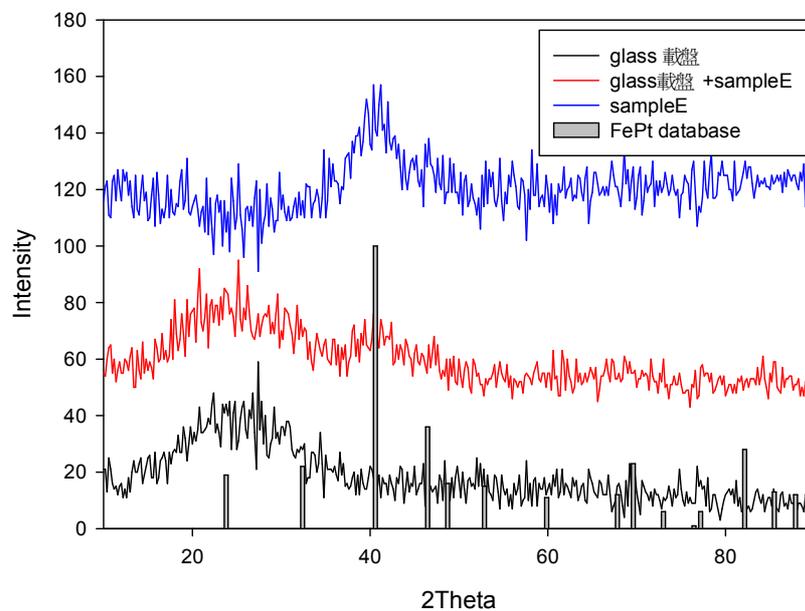


圖 3-13 油溶相樣品 E、FePt database 及玻璃載盤之 XRD 圖

3-4 水溶相 FePt 磁性奈米粒子分析與討論

3-4-1 水溶相 FePt 磁性奈米粒子粒徑分析

經過相轉換後，將水溶相的 FePt 磁性奈米粒子分散在 n-hexanol 或 PBS buffer 中，觀察到樣品在粒徑大小上並沒有很大的改變，仍維持在 2~3nm，如圖 3-14、3-15、3-16、3-17。從圖可發現其有些呈現聚集的現象，並無法如同油溶相粒子在氯仿中分散的如此均勻，但仍可辨別出粒徑的大小。

也嘗試使用去離子水作為溶劑，製作 TEM 樣品觀測粒徑的大小。但去離子水無法有效地分散粒子，所以無法做為水溶相粒子粒徑分析的溶劑。

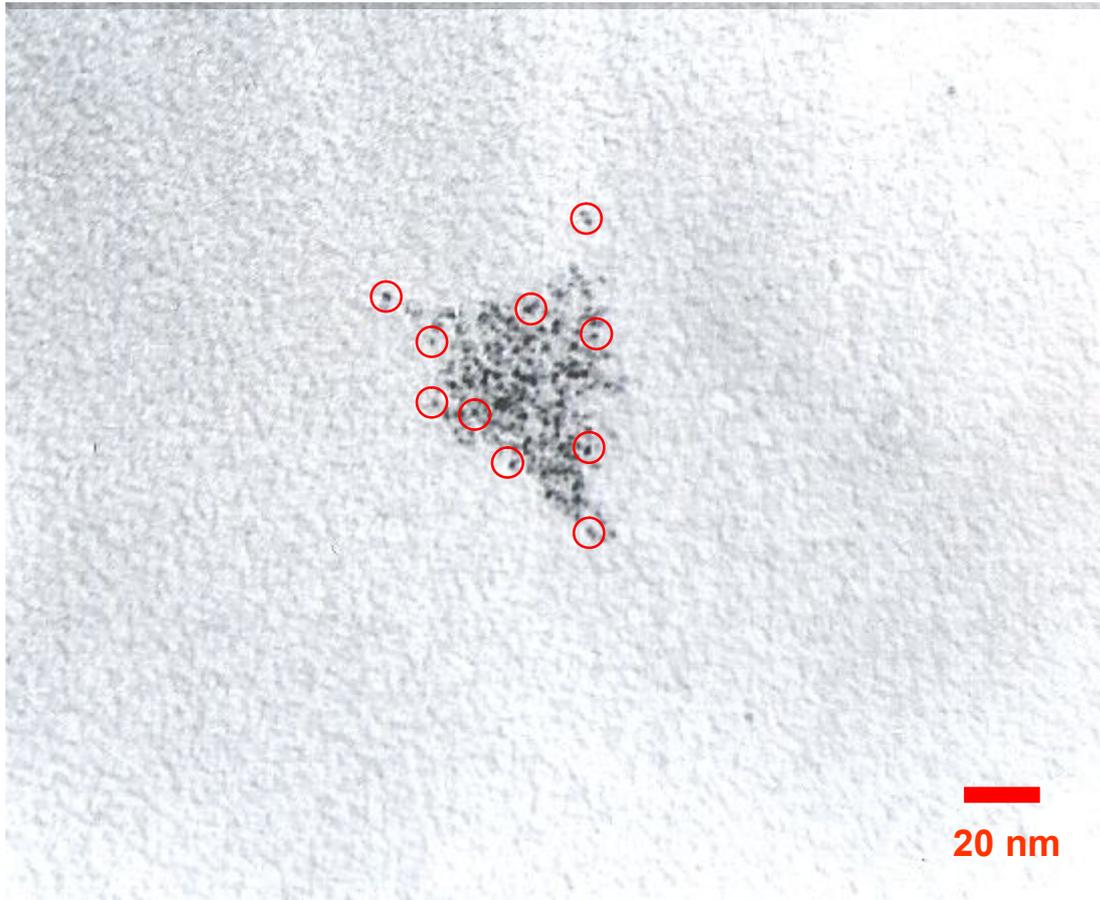


圖 3-14 水溶相樣品 B 分散在 n-hexanol 之 TEM 圖

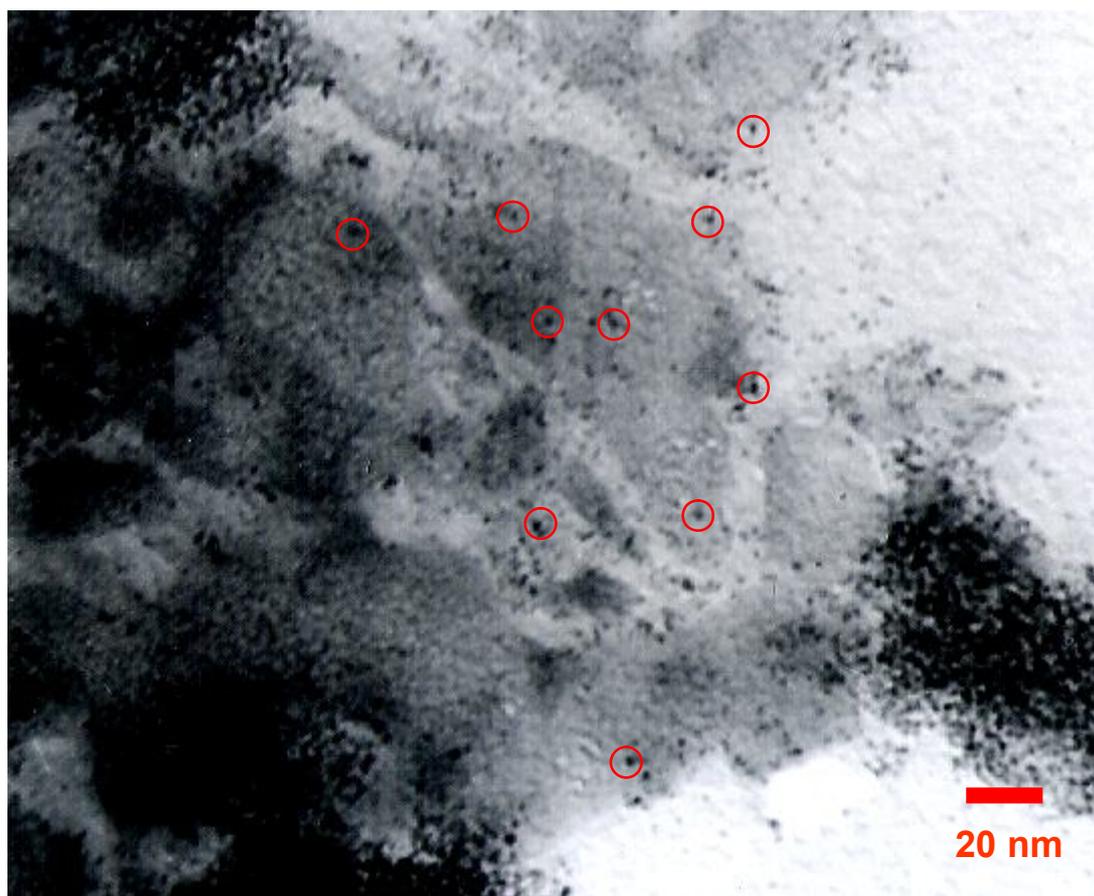


圖 3-15 水溶相樣品 C 分散在 n-hexanol 之 TEM 圖

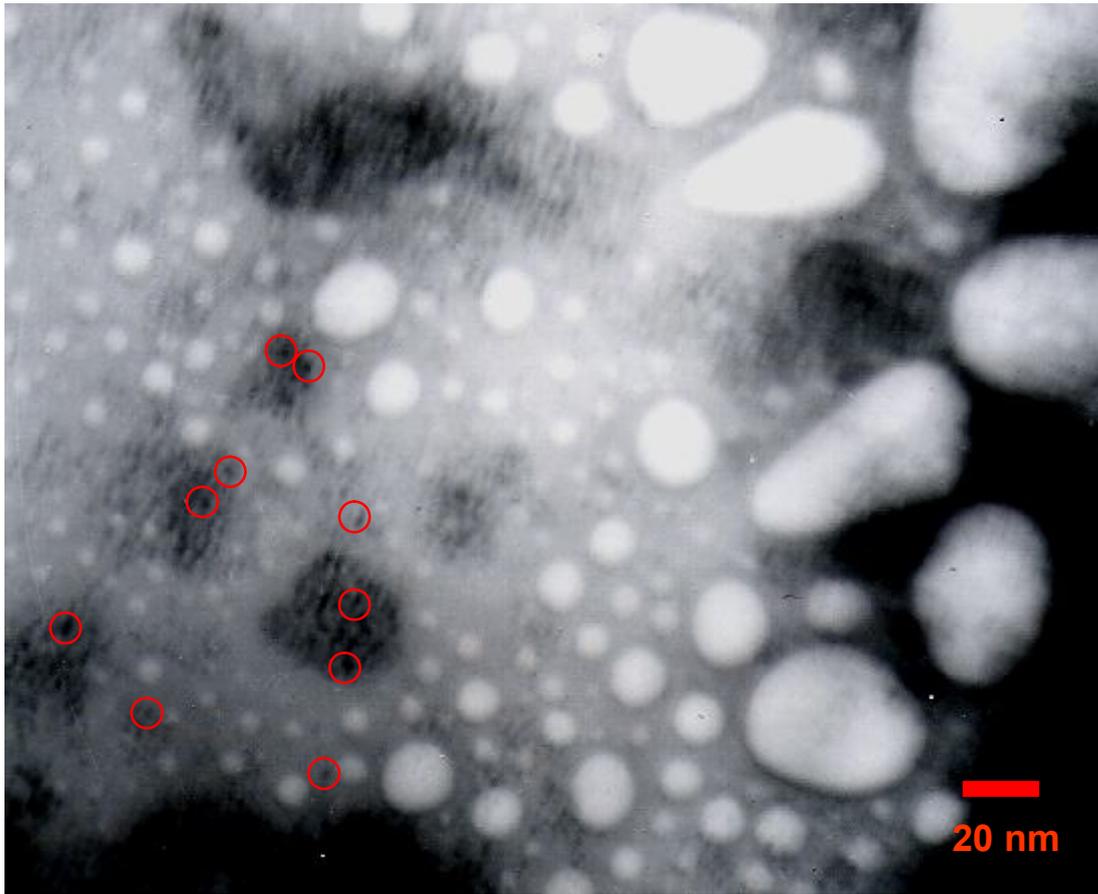


圖 3-16 水溶相樣品 D 分散在 n-hexanol 之 TEM 圖

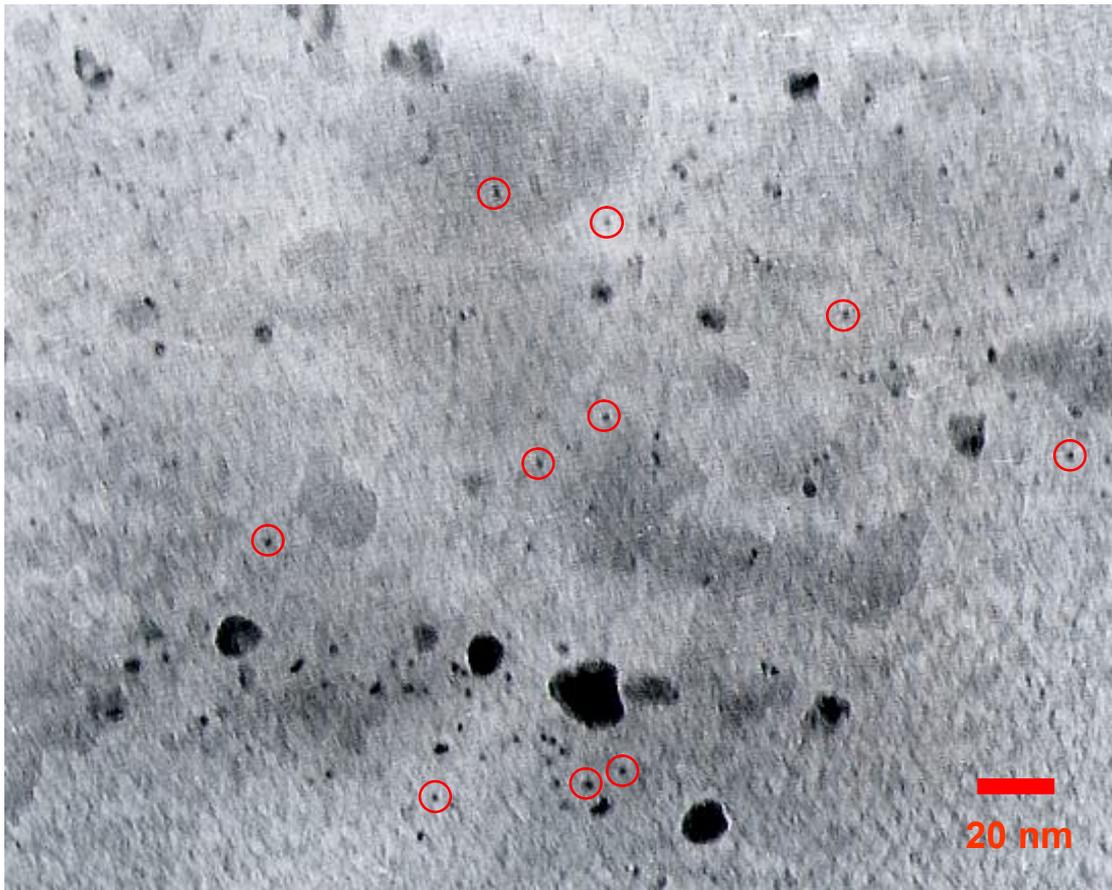


圖 3-17 水溶相樣品 E 分散在 PBS buffer 之 TEM 圖

表 3-4 各種比例下水溶相的粒子尺寸大小

樣品代碼	A	B	C	D	E	F
粒徑大小(nm)	X	1.94±0.28	2.08±0.27	2.46±0.48	1.82±0.36	X

※ X 表示水溶相的樣品 A 與樣品 F 其 TEM 圖無法明確的觀測到粒子

3-4-2 水溶相 FePt 磁性奈米粒子晶格結構分析

經過相轉換步驟後的 XRD 晶格結構圖，如圖 3-18，均顯示出在 40.5° 的 FePt(111) 此主要特徵峰，代表經過相轉換過後，晶體結構上並沒有改變。但訊號強弱上，相轉換過後水溶相的訊號強度明顯比相轉換前油溶相的訊號強度弱。推測是因為量測時樣品之質量未固定所致，造成質量較少之水溶相其訊號較弱。

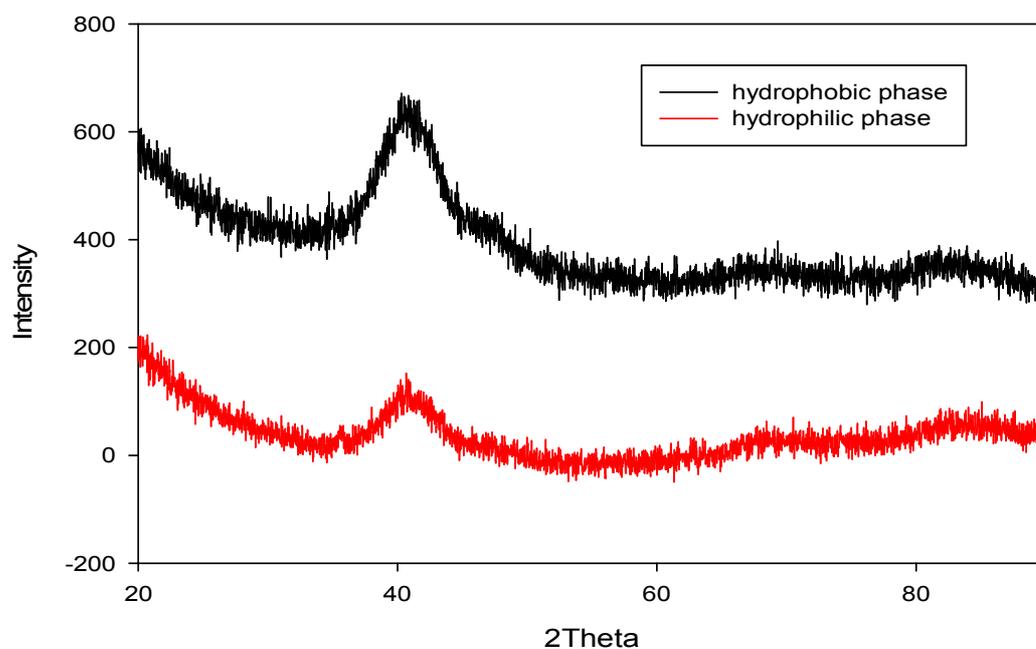


圖 3-18 樣品 D 之 FePt 磁性奈米粒子經由相轉換前後之 XRD 圖

3-4-3 水溶相 FePt 磁性奈米粒子磁性質分析

經由相轉換步驟後，利用 VSM (vibrating sample magnetometer) 量測 FePt 奈米磁性粒子的磁性質。油溶相 FePt 磁性奈米粒子的飽和磁化量為 11.74 emu/g，水溶相 FePt 磁性奈米粒子的飽和磁化量則為 2.03 emu/g，經相轉換過後，飽和磁化量明顯的降低。由矯頑場來看，油溶相 FePt 磁性奈米粒子的矯頑場為 39.49 Oe，水溶相 FePt 磁性奈米粒子的矯頑場則為 45.4 Oe，相轉換後的矯頑場比相轉換前高一些，如圖 3-19。

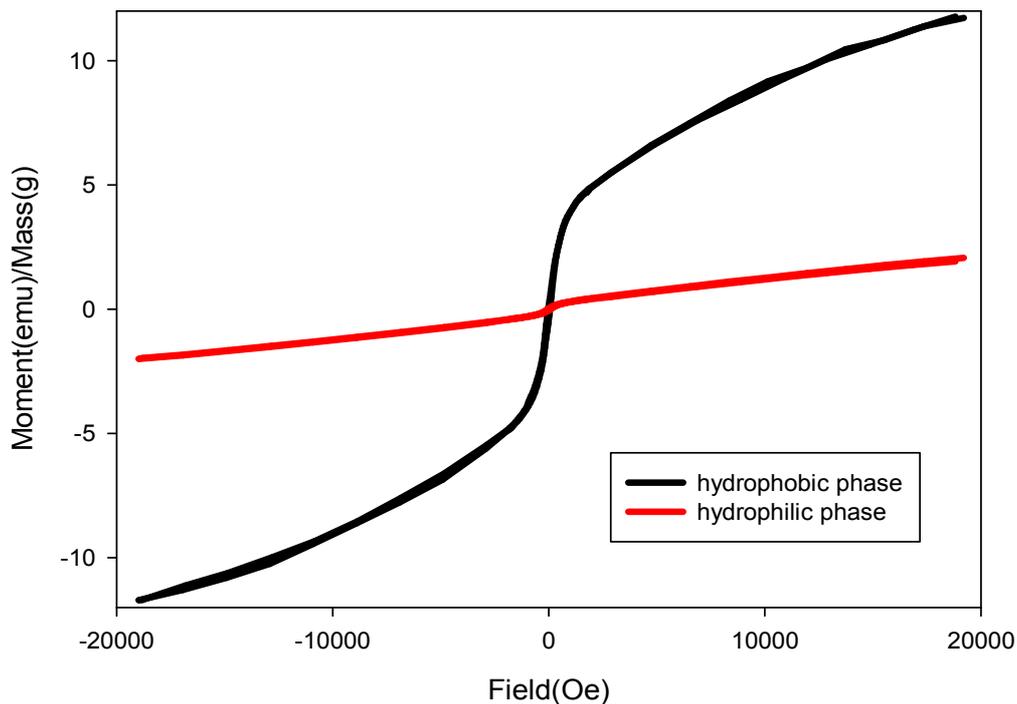


圖 3-19 樣品 D 之 FePt 磁性奈米粒子相轉換前後之 VSM 圖

第四章 FePt 磁性奈米粒子與 HRP 的結合與檢測

4-1 前言

本實驗藉由相轉換過後的 FePt 磁性奈米粒子當作載體，先將粒子分散在 PBS buffer 中，經由 EDC 作交聯劑(cross-linker)將水溶相 FePt 磁性奈米粒子表面的羧基(carboxylic group)修飾成胺基(amine group)^[29]，如圖 4-1。之後再與 HRP 作結合，最後利用與 ABTS substrate 的顯色，使用紫外光分光光度儀(UV/visible spectrophotometer)檢測其吸收峰，藉由改變 HRP 的濃度，來觀測其定量分析的效果。

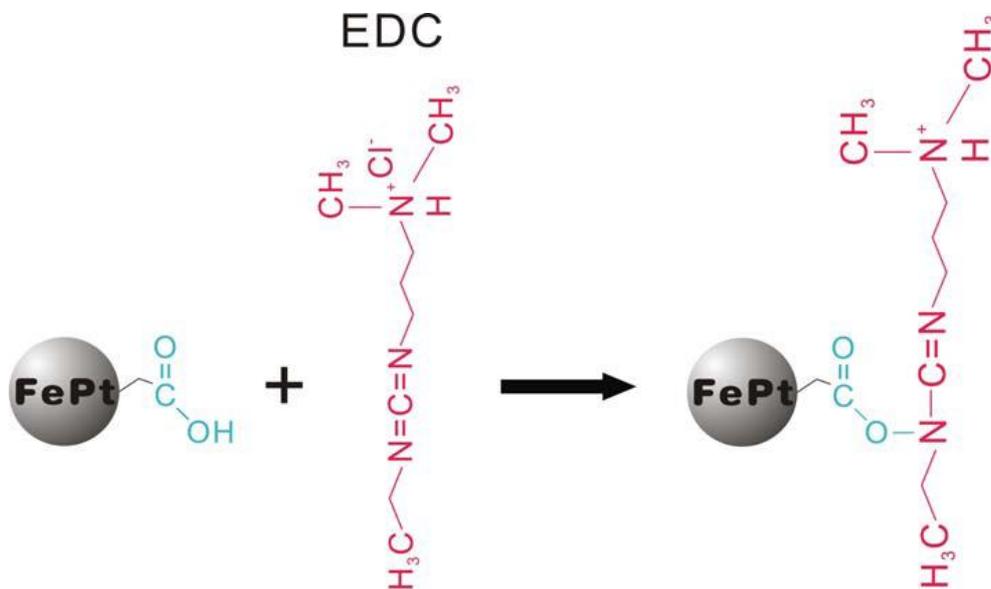


圖 4-1 水溶相 FePt 經由 EDC 表面修飾示意圖^[29]

4-1-1 辣根過氧化酶 HRP 簡介

辣根過氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)是一種血紅素蛋白質(hemoprotein)，分子量約為 44 k，其結構包含蛋白質與非蛋白質兩部分，蛋白質部分由 308 個胺基酸組成，而非蛋白質部分則含一個血基質(heme group)，具有穩定酵素結構的功能^[30]。HRP 是一種氧化還原酶，其特徵波長吸收峰在 403 nm 左右，結構如圖 4-2。^[31]

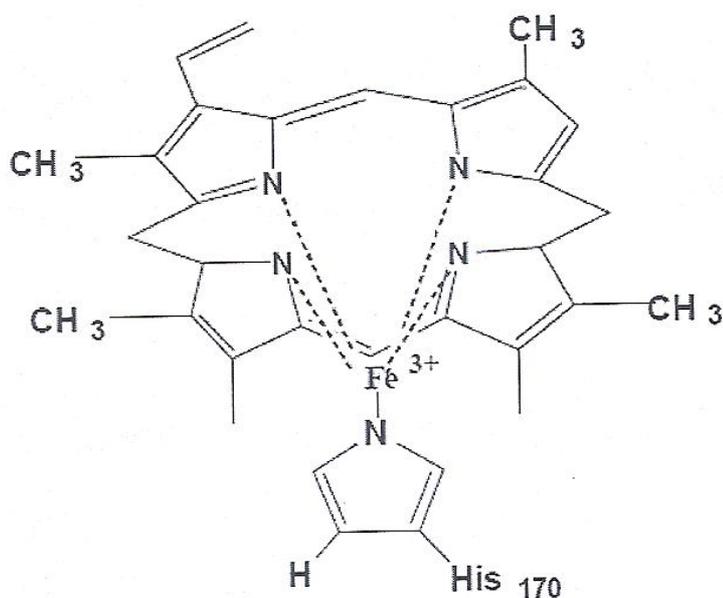


圖 4-2 HRP 結構式意圖^[33]

4-1-2 HRP 應用簡介

近年來，HRP 具有熱穩定性及催化效率高的優點，被應用於各種領域^[33]，如(1)抗體免疫檢測應用(ELISA)^[34]，(2)生物感測器應用^[35]，(3)高分子合成^[36]，(4)廢水處理等方面^[37]。本研究對於 HRP 之量測類似於生物感測器之應用。

電化學生物感測器為 HRP 最主要應用方向之一，可將 HRP 固定於載體上，並針對目標物進行催化反應，產生的電流訊息藉由載體傳遞，再經由電化學儀器測得訊號^[38]。

此研究選用 HRP 與 FePt 磁性奈米粒子結合後，再以 ABTS 試劑反應顯色，利用紫外光/可見光分光光譜儀，即可簡單迅速的完成定性與定量分析。

4-1-3 protein-label 分析方法

實驗採用 protein-label 的分析方法。選用酵素 HRP (horseradish peroxidase)與水溶相的 FePt 磁性奈米粒子做結合，若與奈米粒子結合完成，立即加入 ABTS substrate 試劑，可觀察溶液有無顏色變化。若顏色產生變化，由淡綠色(幾乎接近無色)改變成綠色，則表示結合成功，如圖 4-3 所示。除了用此方法做定性分析外，我們將粒子與不同濃度的 HRP 溶液做結合，加入 ABTS 顯色後，嘗試用紫外光分光光度儀的固定波長範圍(200 nm~400 nm)掃描，做定性的分析。

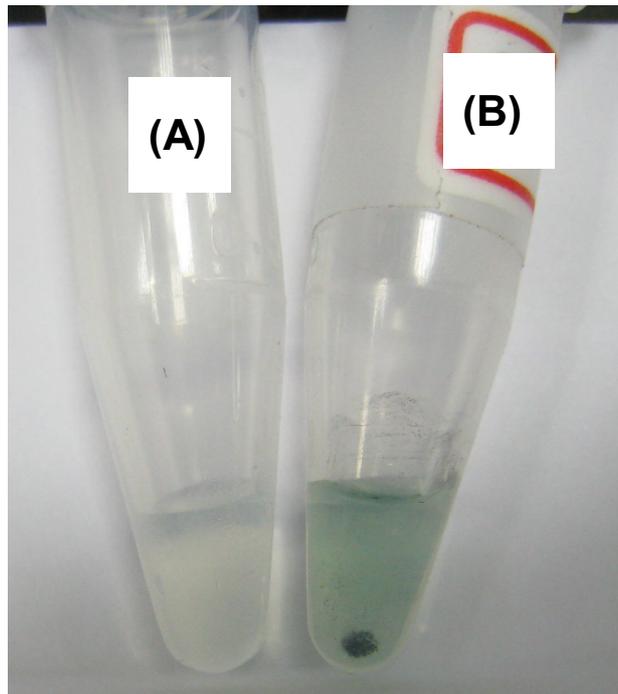


圖 4-3 ABTS substrate 與 HRP 顯色前後示意圖: (A) ABTS substrate (B)HRP 與 FePt 磁性奈米粒子接合後與 ABTS 之顯色圖

4-2 實驗藥品

1. EDC(1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride),
 $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$, Pierce
2. Horseradish peroxidase (HRP), 25k unit, Sigma
3. 1-stepTMABTS, Pierce

4-3 實驗步驟

(A) HRP 的活性測試

1. 配製濃度為 10 mg/ml 的 HRP 溶液，取出 50 μ l。
2. 加入 100 μ l 的 ABTS 試劑，靜置兩分鐘，此時溶液會變成藍綠色。
3. 將變色的樣品稀釋至 1 ml，即可做紫外光分光光譜儀檢測。

(B) 結合不同 HRP 濃度

1. 將 4 mg 的水溶相 FePt 磁性奈米粒子溶於 1 ml PBS buffer 的溶液，利用超音波震盪器，將粒子分散至 PBS buffer 中，取出 100 μ l。
2. 加入濃度為 0.5 mg/ml 的 EDC 溶液 50 μ l，在室溫下震盪反應 30 分鐘。
3. 使用每分鐘 8000 轉離心 2 min，去除上層液，再加入 100 μ l PBS buffer。
4. 重複上一步驟 2 次。
5. 加入 HRP 溶液(濃度為 30~1 mg/ml) 50 μ l，在室溫下反應 1 小時。
6. 取出離心 2 min，取出上層液，再加入 100 μ l PBS buffer。
7. 重複上一步驟 3 次。
8. 取出上層液，將下層粒子加入 100 μ l ABTS buffer。
9. 靜置 2 min，顯色即有接上，加入 900 μ l PBS buffer 稀釋之後即可做紫外光分光光譜儀之檢測。

表 4-1 不同樣品的反應順序

樣品編號	1	2	3	4	5
FePt NPs	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
EDC	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
反應時間	0.5 hr	0.5 hr	0.5 hr	0.5 hr	0.5 hr
PBS 清洗 次數	2 次	2 次	2 次	2 次	2 次
HRP 濃度	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
HRP	30 mg/ml	20 mg/ml	10 mg/ml	5 mg/ml	1 mg/ml
反應時間	1 hr	1 hr	1 hr	1 hr	1 hr
PBS 清洗 次數	3 次	3 次	3 次	3 次	3 次
ABTS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l

4-4 結果與討論

4-4-1 HRP 的活性分析

文獻^[38]指出 HRP 在 4°C 之 PBS buffer 溶液中，其活性於一天內不會有明顯衰退情形發生。而存在 25°C 及 37°C 溶液中，雖然還是有活性下降情形，但基本上酵素在靜置 12 小時之後，其衰退速率才會明顯提高。而在高溫 45°C 的條件環境下，酵素活性衰退情形之速率，如表 4-2^[38]，明顯比其餘溫度條件高出許多。因實驗時間皆在一小時內，為了操作的方便，所以我們選擇在不會明顯影響酵素活性的室溫下操作。

此檢測為了找出 ABTS 與 HRP 顯色後的吸收光譜特徵峰，我們以只有 PBS buffer 與 ABTS 混合的溶液，做為背景值(baseline)，再將製備好含有 HRP 且顯色完成的溶液放入紫外光分光光譜儀 (UV/visible spectrophotometer)，設定掃描波長在 200 nm~400 nm，如圖 4-4。可觀察在波長 385 nm~430 nm 有一個明顯的特徵峰。

本實驗室先前是將 FePt 磁性奈米粒子先經由 EDC 當交聯劑，再與 streptavidin-biotin 接連，之後才與 HRP 連結^[29,39]。因 streptavidin-biotin 為一較大的分子，當與奈米粒子連接時，會佔據奈米粒子較多的表面積，使得後來可接上的 HRP 變少，因此量測到的訊號較弱。我們這次採用 EDC 與 HRP 直接連結的方式，再以 ABTS 試劑反應顯色後，藉由紫外光分光光

譜儀分析量測的時間可在 2~5 分鐘即可完成，增加了分析的速度及便利性。

表 4-2 溫度對 HRP 活性之影響

靜置時間/溫度	4°C	25°C	37°C	45°C
5 min	0.890	0.912	0.840	0.782
4 hr	0.871	0.874	0.733	0.479
8 hr	0.826	0.808	0.650	0.371
12hr	0.798	0.679	0.621	0.352
24hr	0.861	0.504	0.279	0.161

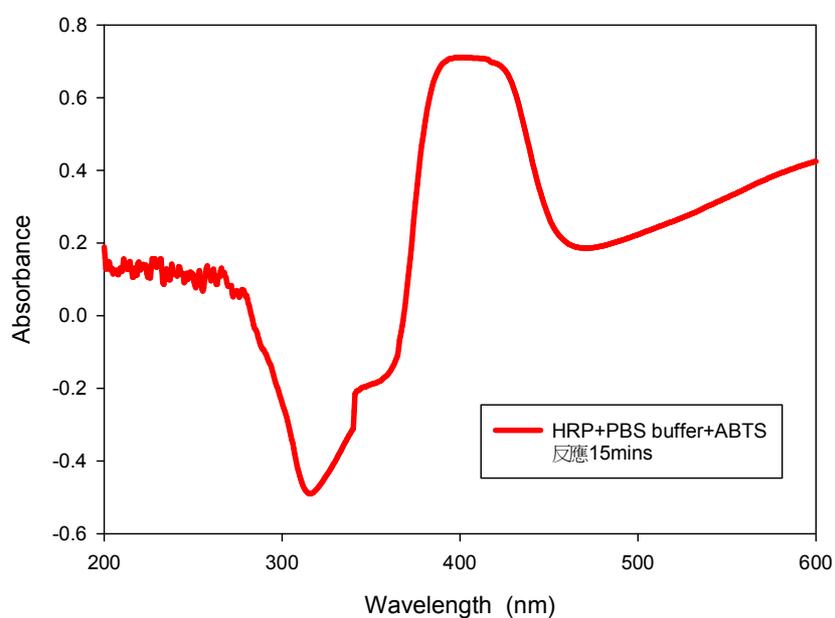


圖 4-4 HRP 活性檢測之吸收光譜圖

4-4-2 改變與粒子結合的 HRP 濃度及分析

本實驗採用檢測 HRP 活性之試劑 ABTS substrate，其反應機制如圖 4-5 所示，原為淡綠色的 ABTS，經由與 HRP 的催化反應後，產生綠色的氧化產物，HRP 的活性與濃度呈現正比的關係。當 HRP 酵素活性佳(濃度高)，則會與 ABTS 催化後反應的產物較多，吸收值較大，反之則產物較少，吸收值較小^[35]。

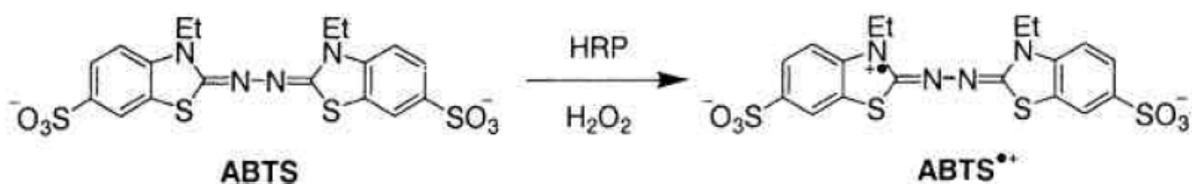


圖 4-5 ABTS 與 HRP 的反應機制^[35]

我們嘗試改變與粒子結合的 HRP 溶液濃度，再利用紫外光分光光譜儀做定量分析。圖 4-6 為未與 HRP 做結合的背景吸收光譜圖，可觀察在 350 nm 與 300 nm 有特殊的吸收峰，此兩個吸收峰沒有出現在圖 4-4 中未含粒子但具有 HRP 與 ABTS 顯色的吸收光譜圖中，所以我們推測此兩個吸收峰是水溶相 FePt 磁性奈米粒子的吸收峰。

圖 4-7、圖 4-8、圖 4-9，為水溶相 FePt 磁性奈米粒子分別與 HRP 濃

度 30 mg/ml、20 mg/ml、10 mg/ml 結合後，再和 ABTS substrate 反應顯色之後，掃描波長 200 nm~600 nm 的吸收光譜圖，可觀察到均有其上述 FePt 磁性奈米粒子的吸收峰(350 nm 與 300 nm)與 ABTS 和 HRP 反應之後的吸收峰(385 nm~430 nm)。且隨著 ABTS substrate 加入後的時間越長，吸收值逐漸降低，在室溫下此活性衰退現象比單獨的 HRP(未接上 FePt 磁性奈米粒子)衰退速度還快。由圖 4-9 可見到其反應經過 120 分鐘後，與 HRP 反應的吸收峰有明顯的減小，靜置一天後則此吸收峰完全消失。

圖 4-10 與圖 4-11 為為水溶相 FePt 磁性奈米粒子分別與 HRP 濃度 5 mg/ml、1 mg/ml 結合後，再和 ABTS substrate 反應顯色之後，掃描波長 200 nm~600 nm 的吸收光譜圖。可觀察到其吸收峰只剩 FePt 奈米粒子的吸收峰，而無 ABTS 與 HRP 反應顯色之後的吸收峰。推測當濃度降至 5 mg/ml 時，因 HRP 的濃度太低，其與粒子接合機率相對減少，造成無法量測到 ABTS 與 HRP 反應顯色之後的吸收峰。

圖 4-12 為接合不同濃度 HRP 再與 ABTS 反應顯色五分鐘之後的吸收光譜圖，可觀察到接合的 HRP 濃度越低時，其 HRP 與 ABTS 反應之後的主吸收峰(385 nm~430 nm)會隨之降低，所以可作為定量分析之依據。但當接合的 HRP 濃度降至 5 mg/ml 以下，則無法辨別。

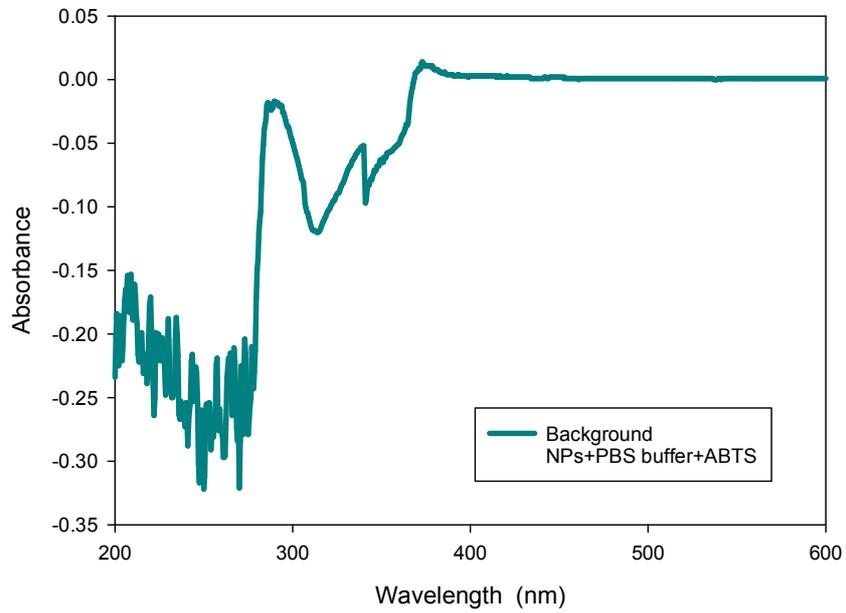


圖 4-6 含粒子的背景值之光譜圖

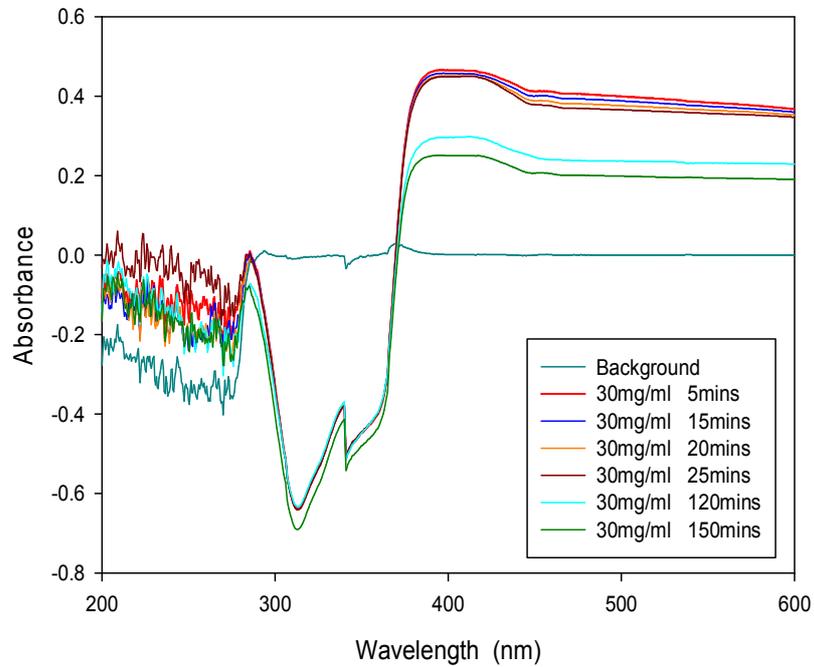


圖 4-7 粒子與濃度 30 mg/ml 的 HRP 顯色後在不同時間下之吸收光譜圖

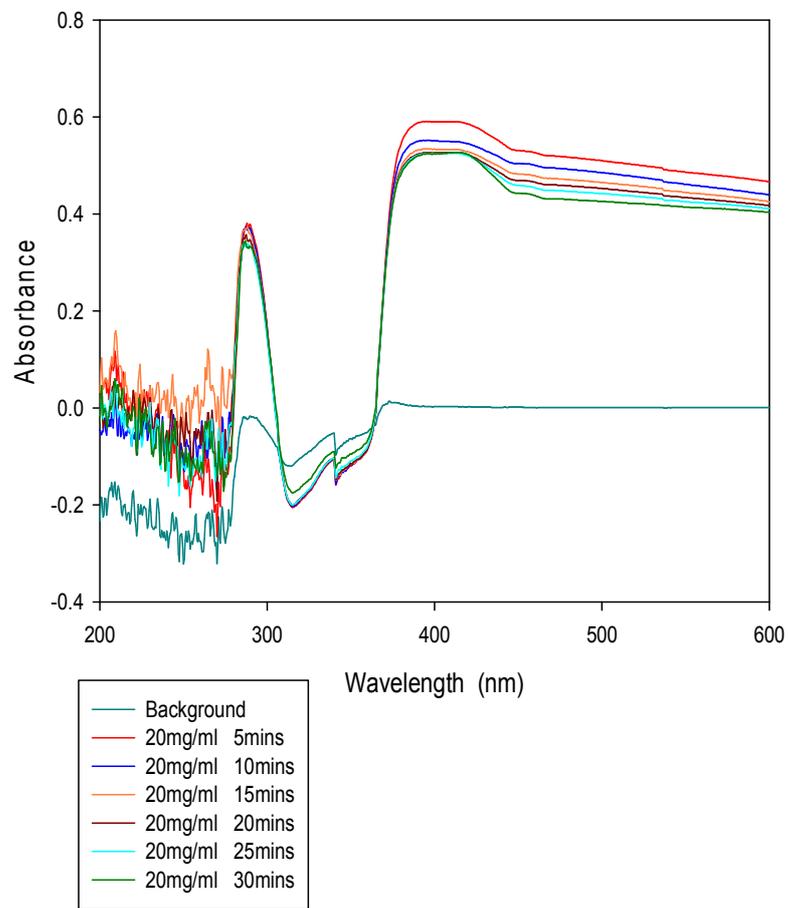


圖 4-8 粒子與濃度 20 mg/ml 的 HRP 顯色後在不同時間下之吸收光譜圖

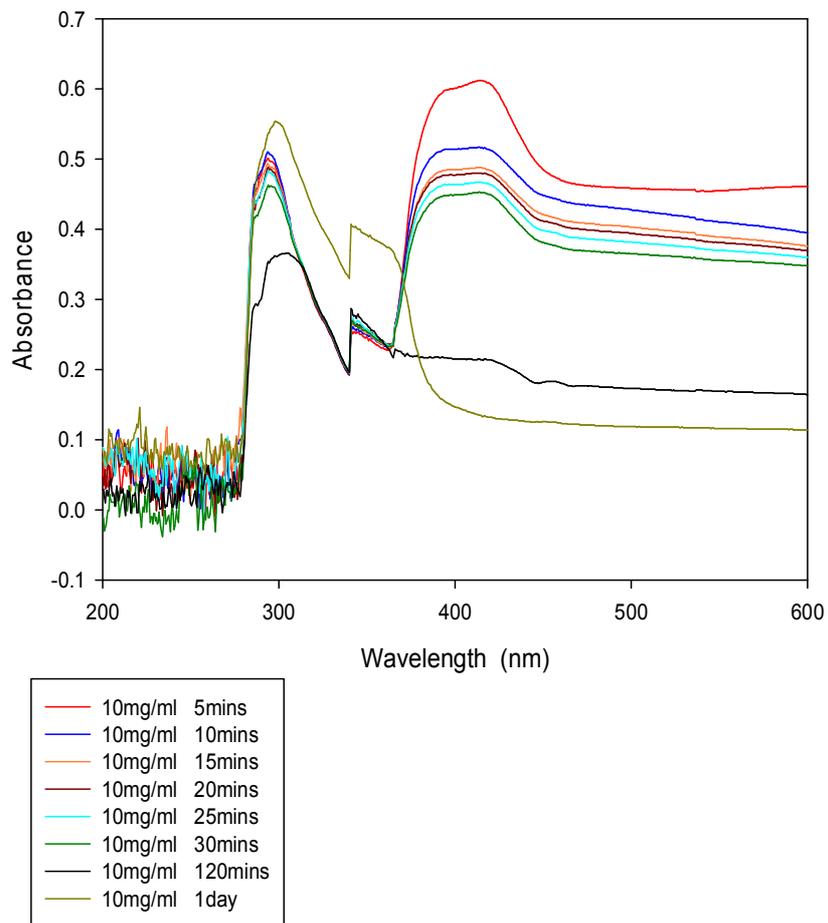


圖 4-9 粒子與濃度 10 mg/ml 的 HRP 顯色後在不同時間下之吸收光譜圖

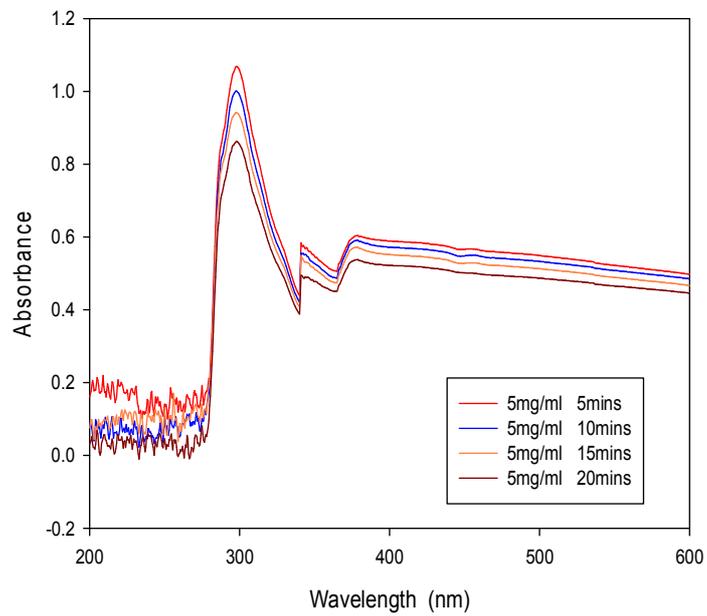


圖 4-10 粒子與濃度 5 mg/ml 的 HRP 顯色後在不同時間下之吸收光譜圖

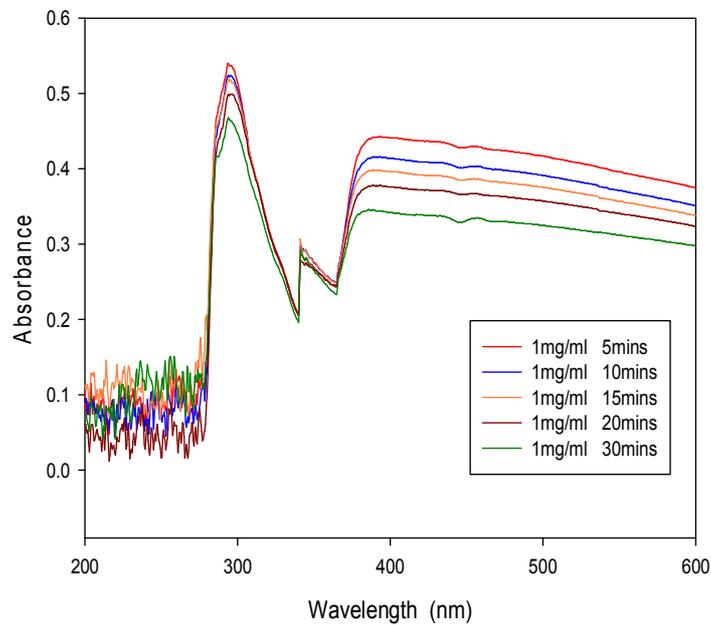


圖 4-11 粒子與濃度 1 mg/ml 的 HRP 顯色後在不同時間下之吸收光譜圖

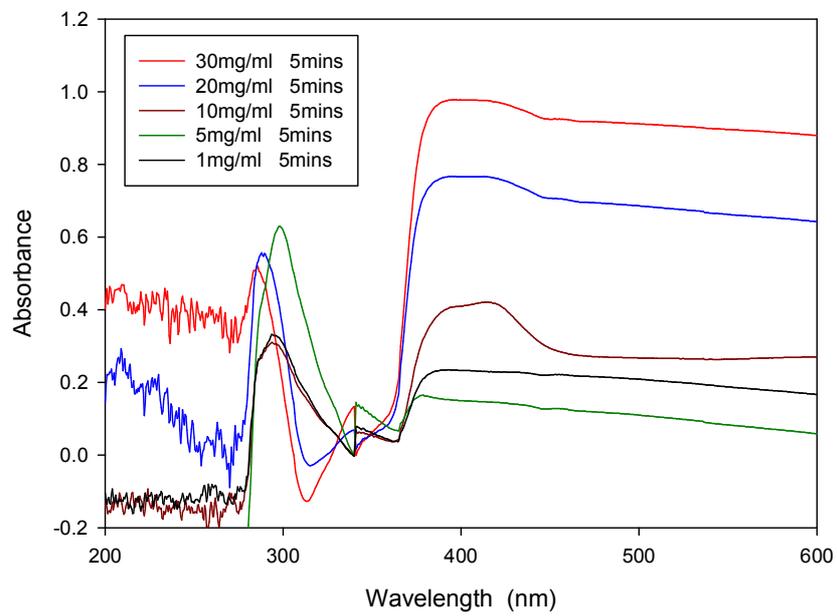


圖 4-12 粒子與不同濃度的 HRP 顯色五分鐘後之吸收光譜圖

第五章 結論

1. 我們使用化學合成法，成功的合成出油溶相的 FePt 磁性奈米粒子，粒徑大小約在 2~3 nm 之間。
2. 將界面活性劑的添加比例改變時，在粒徑上並未觀察到明顯的差異，粒子的分散度也無明顯差異。
3. 油溶相的 FePt 磁性奈米粒子，在 VSM 的分析下，可觀察到除了界面活性劑添加量為 1 倍(樣品 D)的圖形接近超順磁現象外，其他樣品皆呈現軟磁性的磁滯曲線。
4. 觀察油溶相 FePt 磁性奈米粒子的磁滯曲線，其飽和磁化量與矯頑場，皆無法看出隨著添加的界面活性劑改變，會呈現規律的變化趨勢。
 - a. 由飽和磁化量來看，界面活性劑添加量減少為二分之一時(樣品 E)，其擁有最大的飽和磁化量 10.78 emu/g。
 - b. 由矯頑場來看，界面活性劑添加量減少至 0.25 倍(樣品 F)時，具有最大的矯頑場 380.86 Oe。且無論增加或減少界面活性劑的量，皆會提高矯頑場，推論是由於其樣品為軟磁性所導致。
5. 經 XRD 的結構分析來看，油溶相與水溶相的 FePt 磁性奈米粒子，皆有出現在 40.5° 的 FePt(111) 主要繞射峰。
6. 我們使用 mercaptoacetic acid 作為轉相試劑，可將油溶相的 FePt 磁性

奈米粒子表面修飾為親水性的水溶相 FePt 磁性奈米粒子。

7. 在水溶相 FePt 磁性奈米粒子的粒徑分析中，可觀察到有些許聚集的現象，但仍能判斷出其粒徑分布在 2~3 nm 之間。
8. 轉相前後的 XRD 結構分析，在主要繞射峰並無位移的現象，皆出現在 40.5° 的位置，但轉相後繞射峰的強度有減弱的現象。
9. 相轉換後的飽和磁化量明顯的降低，但矯頑場有些許增加的現象。
10. 在 HRP 定性反應的光譜掃描下，可觀察到在波長 385 nm~430 nm 有一個明顯的特徵峰。
11. 可觀察 FePt 磁性奈米粒子的吸收峰在波長 350 nm 與 300 nm。
12. 當與粒子接合的 HRP 濃度越低時，其 HRP 與 ABTS 反應之後的主吸收峰(385 nm~430 nm)會隨之降低，所以可作為定量分析之依據。但當接合的 HRP 濃度降至 5 mg/ml 以下，則無法辨別。
13. 接在 FePt 磁性奈米粒子上的 HRP 酵素活性，會隨著反應時間越長，HRP 的活性會逐漸衰退，而吸收峰強度隨之降低。此活性衰退現象比未接上 FePt 磁性奈米粒子的 HRP 衰退速度還快。

第六章 未來工作

1. 本研究利用改變界面活性劑的比例，但無法合成出粒徑較大的粒子。未來可使用其他種類的界面活性劑來替代，或改變溶劑或起始物，嘗試合成出粒徑較大的 FePt 磁性奈米粒子。
2. 近年來對於 FePt 的研究與相關應用越來越多，卻極少數合成出中空型的 FePt 奈米粒子。未來可以改變製程，運用模板的方式，製備中空型的 FePt 奈米粒子，亦可將其表面做修飾，或嘗試將藥物放置於空心球內部。
3. 本研究使用簡易的吸收光譜分析方法，即可在短時間內做定性與定量的分析。將來若改變接合的酵素或生物分子種類，同樣可以進行定性與定量的檢測。

第七章 參考文獻

1. 何建新，「FePt 奈米微粒之製備與自組裝特性研究」，國立清華大學材料科學工程研究所碩士論文，2004。
2. 王正文，「FePt 和核殼式 FePt@Au 奈米粒子的製備及性質探討與生醫上之應用」，私立東海大學化學工程研究所碩士論文，2007。
3. J. Wang, K. P. Loh, Y. L. Zhong, M. Lin, J. Ding, and Y. L. Foo, “Bifunctional FePt Core-Shell and Hollow Spheres: Sonochemical Preparation and Self-Assembly”, Chem. Matter., 19, 2566-2572, 2007.
4. S. B. and S. W. Lee, “Applications of NiFe₂O₄ nanoparticles for a hyperthermia agent in biomedicine”, Appl. Phys. Letters, 89, 252503, 2006.
5. W. S. Seo, J. H. Lee, X. Sun, Y. Suzuki, Davidmann, Z. Liu, M. Terashima, P. C. Yang, M. V. Mcconnell, D. G. Nishimura, and H. Dai, “FeCo/graphitic-shell nanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and near-infrared agents”, Nature Materials, 2006.
6. 李昆峰、高肇鴻、陳靜誼、趙啟民、卓慧如、林玉娟、「磁性奈米粒子於生醫領域之應用」，科儀新知，第二十八卷第一期，61-69，2006。
7. Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, and J. Dobson, “Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine”, J. Phys. D, Appl. Phys, 36, R167–R181, 2003.
8. 周志謂，「神奇的奈米煉丹術」，科學發展，第 431 期，16~22，2008。
9. R.E. Rosensweig, “Heating magnetic fluid with alternating magnetic field”, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 252, 370-374, 2002.
10. S. Kang, J. W. Harrell, and D. E. Nikles, “Reduction of the fcc to L10 Ordering Temperature for Self-Assembled FePt Nanoparticles Containing Ag”, Nano Letters, 2, 1033, 2002.
11. Z. Jia, S. Kang, D. E. Nikles, and J. W. Harrell, “Synthesis of FePtAu Nanoparticles in High-Boiling-Point Solvents”, IEEE, 41, 3385, 2005.
12. Xiangcheng Sun, Shishou Kang, J. W. Harrell, and David E. Nikles,

- “Synthesis, chemical ordering, and magnetic properties of FePtCu nanoparticle films”, JAP, 93, 7337, 2003.
13. M. Chen, and D. E. Nikles, “Synthesis, Self-Assembly, and Magnetic Properties of Fe_xCoyPt_{100-x-y} Nanoparticles”, Nano Letters, 2, 211-214, 2002.
 14. C. Srivastava, G. B. Thompson, J. W. Harrell, and D. E. Nikles, “Size effect ordering in [FePt]_{100-x}Cr_x nanoparticles”, JAP, 99, 054304, 2006.
 15. S. Kang, Z. Jia, D. E. Nikles, and J. W. Harrell, “Synthesis and phase transition of self-assembled FePd and FePdPt nanoparticles”, JAP, 95, 6744, 2004.
 16. K. Yano, V. Nandwana, G. S. Chaubey, N. Poudyal, S. Kang, H. Arami, J. Griffis and J. P. Liu, “Synthesis and Characterization of Magnetic FePt/Au Core/Shell Nanoparticles” J. Phys. Chem. C, 113 (30), 13088–13091, 2009.
 17. V. Mazumder, M. Chi, K. L. and S. Sun, “Core/Shell Pd/FePt Nanoparticles as an Active and Durable Catalyst for the Oxygen Reduction Reaction”, J. Am. Chem. Soc., 132 (23), 7848–7849, 2010.
 18. C. Liu, X. Wu, T. Klemmer, N. Shukla, and D. Weller, “Reduction of Sintering during Annealing of FePt Nanoparticles Coated with Iron Oxide”, Chem. Mater., 17 (3), 620–625, 2005.
 19. H. Gu, R. Zheng, X. Zhang, and B. Xu, “Facile One-Pot Synthesis of Bifunctional Heterodimers of Nanoparticles: A Conjugate of Quantum Dot and Magnetic Nanoparticles”, J. Am. Chem. Soc., 126 (18), 5664–5665, 2004
 20. Y. Sun, Brian T. Mayers, and Y. Xia, “Template-Engaged Replacement Reaction: A One-Step Approach to the Large-Scale Synthesis of Metal Nanostructures with Hollow Interiors”, Nano Letters, 2(5), 481-485, 2002.
 21. S. Sun, S. Anders, T. Thomson, J. E. E. Baglin, M. F. Toney, H. F. Hamann, C. B. Murray, and B. D. Terris, “Controlled Synthesis and Assembly of FePt nanoparticles”, J. Phy. Chem. B, 107, 5419, 2003.
 22. S. Sun, “Recent Advances in Chemical Synthesis, Self-Assembly, and Applications of FePt Nanoparticles”, Adv. Mater., 18, 393-403,

- 2006.
23. S. Sun, C. B. Murray, D. Weller, L. Folks, and A. Moser, "Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices", *Science*, 1989-1992, 2000.
 24. K. E. Elkins, T. S. Vedantam, J. P. Liu, H. Zeng, S. Sun, Y. Ding, and Z. L. Wang, "Ultrafine FePt Nanoparticles Prepared by the Chemical Reduction Method", *Nano Letters*, 1647-1649, 2003.
 25. H. Gu, P. L. Ho, K. W. T. Tsang, C. W. Yu, and B. Xu, "Using biofunctional magnetic nanoparticles to capture Gram-negative bacteria at an ultra-low concentration", *Chemical Communications*, 1966-1967, 2003.
 26. R. Hong, N. O. Fischer, T. Emrick, and V. M. Rotello, "Surface PEGylation and Ligand Exchange Chemistry of FePt Nanoparticles for Biological Applications", *Chemical Material*, A-C, 2005.
 27. W. C. W. Chan, and S. Nie, "Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection", *Science*, 2016-2018, 1998
 28. V. Nandwana, K. E. Elkins, N. Poudyal, G. S. Chaubey, K. Yano, and J. P. Liu, "Size and Shape Control of Monodisperse FePt Nanoparticles", *J. Phys. Chem. C*, 111, 4185-4189, 2007.
 29. 陳柏樺, 「功能性 FePt 磁性奈米粒子的製備以及其在生醫的應用」, 私立東海大學化學工程研究所, 2008。
 30. C. Krishnananda and M. Shyamalava, "Structural and conformational stability of Horseradish Peroxidase: Effect of Temperature and PH", *Biochemistry*, 39,263-270, 2000.
 31. H. C. Gunilla, P. Nicholls, D. Svistunenko, I. B. Gunnar, and J. Hajdu, "Complexes of Horseradish Peroxidase with Formate, Acetate, and Carbon Monoxide", *Biochemistry*, 44, 635-642, 2005.
 32. T. H. Greg, "Bioconjugate techniques", Academic press, 1996.
 33. 賴奕成, 「固定化 HRP 於工業上廢水處理之應用」, 國立中興大學化學工程研究所碩士論文, 2001。
 34. C. P. Nicholas and S. Lewis, "Fundamentals of enzymology", Oxford

- university press, third edition, 1999.
35. J. R. Barry, C. Neil, and O. Ciara'n, "Horseradish and soybean peroxidase: comparable tools for alternative niches", Trends in Biotechnology, 24(8), 355-363, 2006.
 36. E. Casero, M. Darder, F. Pariente, and E. Lorenzo, "Peroxidase enzyme electrodes as nitric oxide biosensors", Analytic Chimica Acta, 403, 1-9, 2000.
 37. J. Hyun, J. Y. Young, and S. D. Jonathan, "Polymers from biocatalysts", Korean J. Chem. Eng., 15(4), 362-374, 1998.
 38. 周筱悳, 「探討影響 HRP 於聚苯胺電極固定化之因素」, 私立東海大學化學工程研究所, 2007。
 39. 蔣伯頡, 「利用化學還原法製備生醫應用的 FePt 奈米粒子」, 私立東海大學化學工程研究所, 2006。