

國立臺灣大學理學院化學研究所

碩士論文

Department of Chemistry

College of Science

National Taiwan University

Master Thesis



具多功能之形貌控制金奈米粒子與上轉換奈米粒子
複合材料

Multifunctional Nanocomposite of Upconversion
Nanoparticle with Different Morphology of Gold
Nanoparticles

李柏漢

Po-Han Lee

指導教授：劉如熹 博士

Advisor: Ru-Shi Liu, Ph.D.

中華民國 103 年 6 月

June, 2014

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

具多功能之形貌控制金奈米粒子與上轉換奈米粒子
複合材料

Multifunctional Nanocomposite of Upconversion Nanoparticle
with Different Morphology of Gold Nanoparticles

本論文係 李柏漢 君（學號 R01223161）在國立臺灣大學化學系
完成之碩士學位論文，於民國 102 年 5 月 14 日承下列考試委員審
查通過及口試及格，特此證明。

口試委員：

劉如惠 (簽名)
(指導教授)

陳仲強

蔡定平

蔣君敬

蔡宏昇

楊吉水

系主任、所長

(簽章)

誌謝



很高興兩年的碩士生涯可以在 MCL 這個歡樂的大家庭度過，首先要感謝的當然是劉如熹老師提供了這麼好的環境讓我們無後顧之憂地做實驗，並在這兩年細心指導且提供所有人了出國見習交流的機會，讓大家在短時間內成長了許多。再來當然是各位同甘苦共患難的實驗室夥伴們，先要感謝常常陪我思考論文方向還有討論實驗細節的玠瑋以及致凱，讓我在做實驗及寫論文方面更能抓到重點也更有效率，而其他的學長們像是大雄、博翔還有學弟宏嘉當然也提供了不少協助，當然同屆碩二的岱穎、元騏和宣宏的互相掩護(!?)及支持，也都很感謝！這些日子大家一起熬夜開會、做實驗、寫論文還有一起打球、唱歌、出遊的時光都依然歷歷在目，但兩年的時光這麼一眨眼就過去了，很開心能遇到這麼多志同道合的朋友們，希望未來的日子裡大家能繼續保持聯絡互相扶持，也祝各位的人生一帆風順。

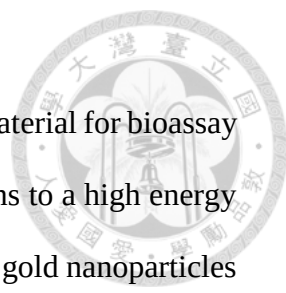
接著則是要感謝參與口試的各位口試委員，感謝基因體中心陳仲瑄主任對論文提出了許多想法與建議，中央化材的蔣孝澈教授提供了未來研究的方向，讓我能從更多的面向去思考研究的完整性，而蕭宏昇老師提供了許多資源讓我在基因體中心做生物相關的研究，也謝謝 James 學長在生物實驗上強力的支援，讓我順利地完成論文，當然也要感謝物理系蔡定平老師在理論計算方面易不容辭地提供協助。總之在這兩年內受到各界的幫助實在太多了，對於一個區區碩士班學生的我實在受寵若驚，對於各方提供的協助除了感激還是感激！

最後要感謝這 25 年來始終默默支持我的家人們，謝謝老哥一路走在我人生的前面為我開路，感謝在臺北這兩年姑姑一家人的照顧，謝謝老爸老媽總是默默地付出，省吃儉用提供最好的資源讓我無後顧之憂地在外地念完大學與研究所。雖然這幾年總是聚少離多，平常也很悶騷不常打電話回去，但還是要跟你們說謝謝，我愛你們！

摘要

上轉換奈米粒子(UCNPs)為一可吸收多顆近紅外光激發光子並轉換為可見光波段光子之發光材料，此特性使其於生醫領域具高度應用潛力。目前上轉換奈米粒子相關之研究可分為直接利用其放光特性應用於生物標記，或者間接轉換釋放之光能於分子檢測及癌症治療之領域，於癌症治療領域主要為結合光敏劑進行光動力療法，利用活性氧物質以致使腫瘤癌細胞死亡。除光動力療法外，上轉換奈米粒子於光熱治療部分之研究仍具許多應用潛力。本研究所合成之多功能奈米複合材料為結合上轉換奈米粒子與不同形貌之金奈米粒子，利用金奈米粒子於特定入射光波長之具表面電漿共振之性質，並透過表面電漿共振所吸收之光能轉換為熱能，搭配具多重放光特性之上轉換奈米粒子提供光能來源以產生熱能致使細胞死亡。本研究利用厚度 3 ± 0.5 nm 之二氧化矽殼層包覆於大小為 19 ± 1.1 nm 之上轉換奈米粒子表面，並修飾胺基於以連接大小為 3.6 ± 1.11 nm 之球狀金奈米粒子(UCNP@SiO₂-AuNPs)或徑長比為 2.5 之棒狀金奈米粒子(UCNP@SiO₂-AuNRs)，探討不同形貌之金奈米粒子於此複合材料之光熱轉換效率差異。於細胞毒性測試中，本研究所合成之奈米複合材料即便於 250 µg/mL 高濃度下，對於口腔癌細胞依然具相當低之毒性，可驗證其為低毒性之奈米材料。於光熱治療實驗中，UCNP@SiO₂-AuNRs 組別相較於 UCNP@SiO₂-AuNPs 及其餘對照組，細胞死亡之數目與範圍皆明顯提升，顯示棒狀金奈米粒子具較強之光熱治療效果。本研究所製備之奈米複合材料，克服傳統金奈米粒子於生物標記之限制，並結合上轉換奈米粒子之螢光成像與金奈米粒子之光熱轉換特性，成功製備具多功能之奈米複合材料。

Abstract



Upconversion nanoparticles (UCNPs) refer to a highly potent nanomaterial for bioassay and bioimage because it can convert two or more low energy photons to a high energy photon. We demonstrate a nanocomposite consisting of UCNPs and gold nanoparticles as a multifunctional nanomaterial to apply in biomedical application. Noble metallic nanoparticles such as gold nanoparticle have a unique optical property because of the surface plasmon resonance (SPR). Furthermore NaYF₄:Yb/Er upconversion nanoparticles emit the photoluminescence from green-to-red which can provide gold nanoparticles inducing photothermal effect. We further used silica coated UCNPs to functionalize amino groups on silica shell to combine 3.5 nm gold nanoparticles (UCNP@SiO₂-AuNPs) or gold nanorods (UCNP@SiO₂-AuNRs). The size of UCNPs and UCNP@SiO₂ are define as 19 ± 1.1 nm and 26 ± 0.5 nm by HRTEM, respectively, and the silica shell is 3 ± 0.5 nm. According to the result of photoluminescence spectra, the intensity of UCNP@SiO₂-AuNRs is lower than UCNP@SiO₂-AuNPs and this confirm highly energy transfer from UCNP to gold nanorods. In vitro cytotoxicity study, this nanocomposites is nontoxicty to oral cancer cell through the MTT assay even the concentration of nanocomposites approaching 250 μ g/mL. The photothermal effect of UCNP@SiO₂-AuNRs is demonstrated by irradiating a 980 nm laser and staining with trypan blue, there is huge cell death compare to UCNP@SiO₂-AuNPs. In summary, we successfully develop nanocomposites based on UCNPs which reveal obviously photothermal effect and cell imaging to overcome non-fluorescent material like gold nanorods as nanocarriers in biological application.

目錄

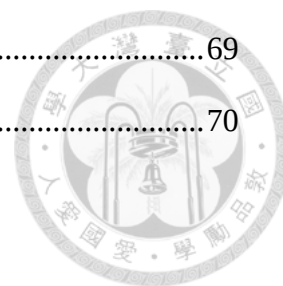


口試委員會審定書.....	錯誤! 尚未定義書籤。
誌謝.....	II
摘要.....	III
Abstract.....	IV
第一章 緒論.....	1
1.1 奈米材料之定義與特性.....	1
1.1.1 表面效應.....	3
1.1.2 小尺寸效應.....	3
1.1.2.1 磁力性質.....	3
1.1.2.2 光學性質.....	4
1.1.2.3 熱力學性質.....	4
1.1.3 量子尺寸效應.....	4
1.2 金奈米粒子之簡介.....	5
1.2.1 表面電漿共振之簡介.....	5
1.2.1.1 表面電漿傳遞(Surface plasmon propagation).....	6
1.2.1.2 侷域性表面電漿共振(Localized surface plasmon resonance).....	6
1.2.2 光熱治療(Photothermal therapy; PTT).....	8
1.3 上轉換奈米粒子之簡介.....	10
1.3.1 上轉換奈米粒子之組成.....	12
1.3.1.1 主體材料(Host).....	13
1.3.1.2 活化劑(Activator).....	14
1.3.1.3 敏化劑(Sensitizer).....	14
1.3.2 上轉換奈米粒子發光之機制.....	15
1.3.2.1 激發態吸收(Excited state absorption; ESA).....	15

1.3.2.2	能量轉移上轉換(Energy transfer upconversion; ETU).....	16
1.3.2.3	光子雪崩(Photon avalanche; PA).....	16
1.4	文獻回顧.....	17
1.5	研究動機與目的.....	19
第二章	實驗方法與儀器原理.....	22
2.1	化學藥品.....	22
2.2	實驗步驟.....	23
2.2.1	上轉換奈米粒子之製備.....	23
2.2.2	球狀奈米金粒子之製備.....	24
2.2.3	棒狀金奈米粒子之製備.....	24
2.2.4	製備以甲殼素修飾之奈米複合材料.....	25
2.2.5	製備以二氧化矽修飾之奈米複合材料.....	26
2.2.6	細胞毒性之測試.....	26
2.2.7	光熱治療之測試.....	26
2.3	儀器原理.....	27
2.3.1	穿透式電子顯微鏡(Transmission electron microscope; TEM).....	27
2.3.2	X 光能量散布光譜(Energy Dispersive X-ray Spectrum; EDS).....	29
2.3.3	X 光粉末繞射(X-ray powder diffraction; XRD)	31
2.3.4	紫外光/可見光吸收光譜(UV/Vis absorption spectrum)	33
2.3.4.1	σ 、 π 或 n 電子之吸收.....	34
2.3.4.2	d 、 f 軌域電子之吸收	35
2.3.4.3	分子電荷轉移之吸收.....	35
2.3.5	光激發放光光譜(photoluminescence spectrum; PL).....	36
2.3.5.1	振動鬆弛(Vibration relaxation).....	37
2.3.5.2	內部轉移(Internal conversion).....	37
2.3.5.3	螢光(Fluorescence).....	37

2.3.5.4	系統跨躍(Intersystem crossing).....	38
2.3.5.5	磷光(Phosphorescence)	38
2.3.5.6	外部轉移(External conversion).....	38
2.3.6	紅外光振動光譜(Infrared spectrum; IR)	39
2.3.7	雷射掃描共軛聚焦顯微鏡(Laser scanning confocal microscopy)	40
第三章 結果與討論.....		43
3.1	上轉換奈米粒子之合成與鑑定.....	43
3.1.1	上轉換奈米粒子之 XRD 圖譜	44
3.1.2	上轉換奈米粒子之 TEM 影像	45
3.1.3	上轉換奈米粒子之 PL 光譜	46
3.2	金奈米粒子之合成與鑑定.....	47
3.2.1	球狀金奈米粒子之 UV/Vis 吸收光譜	47
3.2.2	棒狀金奈米粒子之成長機制.....	48
3.2.3	棒狀金奈米粒子之 UV/Vis 吸收光譜	49
3.2.4	棒狀金奈米粒子之 TEM 影像	51
3.3	奈米複合材料之合成與鑑定.....	51
3.3.1	以甲殼素修飾奈米複合材料之合成與鑑定.....	52
3.3.1.1	以甲殼素修飾奈米複合材料之 TEM 影像	54
3.3.1.2	以甲殼素修飾奈米複合材料之特性放光圖譜.....	55
3.3.2	以二氧化矽修飾奈米複合材料之合成與鑑定.....	57
3.3.2.1	以二氧化矽修飾奈米複合材料之 TEM 影像	58
3.3.2.2	以二氧化矽修飾奈米複合材料之 PL 光譜	61
3.4	奈米複合材料於生物應用之結果與討論.....	63
3.4.1	細胞毒性之測試.....	64
3.4.2	共軛聚焦顯微鏡之螢光成像.....	65
3.4.3	光熱治療於 Cal 27 細胞之測試	66

第四章 結論.....	69
參考文獻.....	70



圖目錄

圖 1-1 奈米材料之尺度範圍與製備方法示意圖。	2
圖 1-2 金屬表面電漿傳遞示意圖。	6
圖 1-3 奈米粒子之侷域性表面電漿共振示意圖。	7
圖 1-4 各種不同形貌之奈米結構電磁場強度模擬。	7
圖 1-5 不同形貌之金奈米粒子表面電漿共振峰(a)不同大小之球狀金奈米粒子、 (b)不同徑長比之棒狀金奈米粒子與(c)不同徑長比之星狀奈米粒子。	8
圖 1-6 不同形貌之金奈米粒子於細胞之光熱治療結果(a)球狀金奈米粒子、(b)棒 狀金奈米粒子、(c)星狀金奈米粒子與(d)星狀金奈米粒子放熱之理論計算 結果。	10
圖 1-7 (a)上轉換奈米粒子結構示意圖、(b)上轉換奈米粒子於細胞毒性之測試、(c) 不同活化劑之特性放光光譜與(d)調控敏化劑與活化劑之比例控制上轉 換奈米粒子之放光顏色。	12
圖 1-8 三價鑷系離子能階分布圖。	13
圖 1-9 上轉換奈米粒子之敏化劑與活化劑能量傳遞示意圖。	15
圖 1-10 上轉換奈米粒子能量傳遞機制示意圖，(a)激發態吸收(Excited state absorption; ESA)、(b) 能量轉移上轉換(Energy transfer upconversion; ETU) 與(c)光子雪崩(Photon avalanche; PA)。	16
圖 1-11 上轉換奈米粒子於生物領域應用示意圖。	17
圖 1-12 上轉換奈米粒子於(a)細胞螢光成像圖、(b)與有機螢光成像之比較、(c)線 蟲體內螢光成像圖與(d)小鼠體螢光成像圖。	18
圖 1-13 (a)上轉換奈米粒子與螢光蛋白之 LRET 示意圖、(b)上轉換奈米粒子與光 感藥物結合應用於 PDT 示意圖與(c)具雙光感藥物之上轉換奈米粒子與 其細胞存活率之圖表。	19
圖 1-14 本研究內容之示意圖。	21

圖 2-1 上轉換奈米粒子合成示意圖。	24
圖 2-2 球狀金奈米粒子合成示意圖。	25
圖 2-3 金奈米粒子晶種合成之示意圖。	25
圖 2-4 棒狀金奈米粒子合成示意圖。	24
圖 2-5 穿透式電子顯微鏡之儀器架構示意圖。	27
圖 2-6 電子與物質作用所產生之訊號。	28
圖 2-7 繞射成像與明、暗場視野示意圖。	29
圖 2-8 連續 X 光與特徵 X 光之光譜圖。	30
圖 2-9 高能電子與原子作用示意圖。	31
圖 2-10 X 光繞射示意圖。	32
圖 2-11 本研究所使用之粉末 X 光繞射儀。	33
圖 2-12 紫外光/可見光之電子躍遷圖。	34
圖 2-13 本研究所使用之紫外/可見光吸收光譜儀。	35
圖 2-14 單重態與參重態激發示意圖。	36
圖 2-15 螢光及磷光產生之示意圖。	39
圖 2-16 分子各種振動模式。	40
圖 2-17 雷射掃描共軛聚焦顯微鏡之儀器架構示意圖。	41
圖 2-18 本研究所使用儀器及其應用之示意圖。	42
圖 3-1 上轉換奈米粒子之 XRD 圖譜。	45
圖 3-2 上轉換奈米粒子之 TEM 影像。	46
圖 3-3 上轉換奈米粒子於光激發放光之圖譜。	47
圖 3-4 球狀金奈米粒子之表面電漿共振峰與上轉換奈米粒子放光之疊合圖。 .	48
圖 3-5 棒狀金奈米粒子成長示意圖。	49
圖 3-6 不同徑長比之棒狀金奈米粒子其表面電漿共振峰。	50
圖 3-7 棒狀金奈米粒子之表面電漿共振峰與上轉換奈米粒子放光之疊合圖。 .	50
圖 3-8 棒狀金奈米粒子之 TEM 影像。	51

圖 3-9 羧基化前後之甲殼素 IR 光譜。	53
圖 3-10 甲殼素修飾之奈米複合材料合成示意圖。	54
圖 3-11 以甲殼素修飾之奈米複合材料 TEM 影像。	55
圖 3-12 球狀金奈米粒子以甲殼素連接於上轉換奈米粒子之放光光譜。	56
圖 3-13 棒狀金奈米粒子以甲殼素連接於上轉換奈米粒子之放光光譜。	57
圖 3-14 二氧化矽包覆上轉換奈米粒子之流程示意圖。	58
圖 3-15 上轉換奈米粒子包覆不同厚度二氧化矽殼層之 TEM 影像.....	59
圖 3-16 胺基化之二氧化矽修飾奈米複合材料合成示意圖。	60
圖 3-17 (a)、(b)為球狀金奈米粒子分布於上轉換奈米粒子表面之 TEM 影像，(c)、 (d)為棒狀金奈米粒子分布於上轉換奈米粒子表面之 TEM 影像。	61
圖 3-18 球狀金奈米粒子以氨基化之二氧化矽殼層連接於上轉換奈米粒子之放光 光譜。	62
圖 3-19 棒狀金奈米粒子以氨基化之二氧化矽殼層連接於上轉換奈米粒子之放光 光譜。	63
圖 3-20 二氧化矽修飾之奈米複合材料於(a) Cal 27 細胞與(b) Tu 183 細胞之毒性 測試。	65
圖 3-21 共軛聚焦顯微鏡之螢光成像圖。	66
圖 3-22 光熱治療過程示意圖。	66
圖 3-23 光熱治療實驗於口腔癌細胞 Cal 27 之對照組結果。	67
圖 3-24 光熱治療實驗於口腔癌細胞 Cal 27 之結果。	68

表目錄

表 2-1 本研究所使用之化學藥品。	23
表 3-1 不同上轉換奈米材料之晶格結構與外貌形狀。	44
表 3-2 上轉換奈米粒子表面修飾之方法。	52

第一章 緒論



隨著科技蓬勃發展與迅速成長，於二十一世紀人類以更進步之文明科技將各領域之研究發展至前所未見之高峰。然於本世紀前，眾多文明與研究皆受限於科技之侷限，可研究之領域僅止於微米尺寸，更微小尺度之領域仍受限於當時儀器之侷限而無法觀測。經過無數科學家長時間研究與改良，科學於奈米尺度之研究將不再受限，且於本世紀，奈米尺度相關之研究將成為領導所有科技之基礎科學。且由於奈米科學受到各領域科學家之廣泛研究，於微米尺寸無法解釋之現象或無法解決之問題，於奈米尺度皆迎刃而解。

1959 年 12 月 29 日，著名物理學家同時亦為諾貝爾獎得主，費曼(Feynman)於其演講「There is Plenty of Room at the Bottom.」提出人類未來將可自由操縱單一原子之可能，且將發現其與一般特性不同。亦提出若能夠以原子或分子製造出微小之裝置，將對人類生活及科技有莫大之改善。此一預言被科學界視為奈米科技萌芽之標誌，爾後藉由顯微鏡及各種物理儀器之發明，打破受限於可見光波長僅能看到微米大小之極限，進而發現原本存在於自然中奈米尺度之物質所表現出之特殊現象。二十一世紀之今日，生物科技、資訊科技及奈米科技為本世紀科技之主流，而奈米材料為現今奈米科技領域中相當重要之一環，最早利用奈米來命名材料可追溯至 80 年代，1990 年 7 月於美國巴爾的摩舉辦國際第一屆奈米科學技術學術會議，正式將奈米材料科學畫分為材料科學之獨立分支。至今發展之奈米材料，於光學、熱學、磁學、力學及化學活性^[1-4]方面表現出特殊性質，而此些特殊性質於工業上之應用亦蓬勃發展中。^[5-8]

1.1 奈米材料之定義與特性

奈米(nanometer; nm)為一長度單位，1 奈米為十億分之一公尺，亦為千分之一微米(micrometer)，相當於 10 個氫原子並排之長度。傳統材料尺寸通常大於 0.1

微米，稱之為塊材(bulk material)，因此肉眼所能看見之物質都可稱為塊材。

奈米材料為一群原子及分子之組合，一般將其定義為尺寸於 1-100 nm 間之極小物質，製備奈米等級材料有兩途徑，如圖 1-1 所示，一種為 bottom up，另一種則為 top down。Bottom up 乃將小物質聚集成大物質之方法，例如以原子或分子為基本單位，利用溶膠-凝膠、化學氣相沈積、電解、生物模板等方法，漸漸將小物質成長至奈米尺度。top down 為利用一些有機或無機之材料以機械研磨、酸鹼處理或臭氧處理等方法將物質減小之方法，或將巨觀物質粉碎至奈米尺度。^[9]

奈米材料於空間結構上可劃分成三種不同之形式：零維(0D)奈米材料，於空間上之三維度皆為奈米尺寸，成顆粒狀，電子會被侷限於顆粒中而無法自由移動，如僅有數十原子所組成之原子團簇(cluster)，或較大之奈米粒子(nanoparticle)^[10-12]；一維 (1D) 奈米材料，三個維度中有一維度不受限於奈米尺寸，因此電子可於其上自由移動，如奈米線(nanowire)、奈米棒(nanorod)和奈米管(nanotube)^[13-15]；二維(2D)奈米材料，空間中有兩個維度不受限於奈米尺寸，呈現薄膜狀結構，電子可於平面上自由移動，如奈米薄膜(nanofilm)。^[16] 這些零維、一維及二維之奈米材料亦分別稱為量子點(quantum dot)、量子線(quantum wire)與量子井(quantum well)。

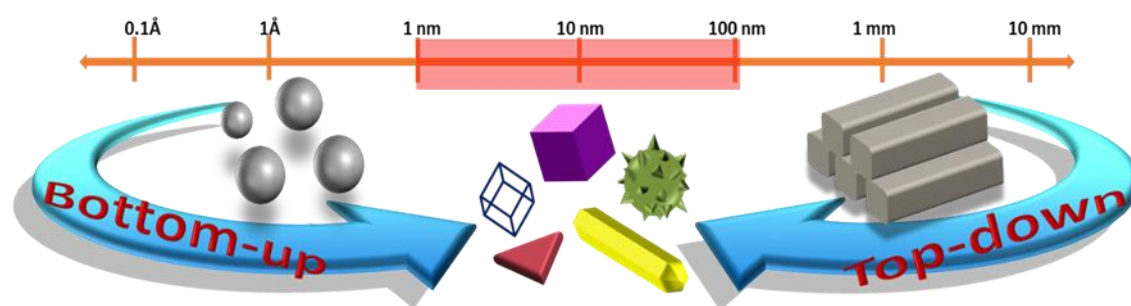


圖 1-1 奈米材料之尺度範圍與製備方法示意圖。

當材料大小趨於奈米尺度時將出現許多嶄新之特質，如部分金屬導體於奈米尺度下開始絕緣，不導電之物質奈米化後電阻大幅度降低反而成為導體，穩定性

極高之黃金其奈米粒子具有高活性可做為催化劑，許多物理及化學性質於奈米尺度下出現前所未有之性質，此些奈米材料所顯露之特性可由以下幾點介紹。



1.1.1 表面效應

物質表面原子與內部原子所接觸之環境不同，其性質亦不同。當物質尺寸結構大時，排列於表面之原子數目佔所有組成原子之比例極小，此時物質特性由內部原子決定，當物質尺寸逐漸接近原子直徑時，表面原子之數目及其作用便無法忽略，由於表面原子周圍缺少相鄰之原子，造成配位數不足易與其他原子結合而趨於穩定，此現象導致表面原子具高活性，使物質之化學性質產生極大之變化，此一性質亦使金屬奈米顆粒成為新型催化劑之潛力^[17,18]，而此些變化所引起之種種特殊效應統稱為表面效應。

1.1.2 小尺寸效應

當奈米材料與其物質波波長相當或更小時，晶體週期性之邊界條件將被破壞，導致其於光學、電磁學、熱力學等性質與其較大尺寸時不同，小尺寸效應即是指隨著顆粒尺寸變小所引起巨觀物理性質之變化。而此些特殊物性之解釋可分別由以下幾點介紹。

1.1.2.1 磁力性質

奈米材料與塊材於磁性結構具顯著差異，通常磁性材料之磁結構乃由許多磁區所構成，區間由區壁隔開，通過區壁運動實現磁化。奈米材料中，當粒徑小於一臨界值時，每一奈米粒子將呈現單磁區之結構^[19]，隨著尺寸減小，磁性材料之有序狀態發生改變，塊材尺度下之鐵磁性材料隨其粒徑減小可轉變為順磁甚至超順磁狀態。^[20,21]

1.1.2.2 光學性質

當材料縮小至奈米量級時，光吸收度將明顯增加，而金屬材料於奈米等級時其顏色大都轉變為黑色，且粒徑越小顏色越深，由此可見，金屬奈米顆粒對光之吸收度及反射率皆與塊材不同。除金屬奈米材料吸光現象之外，半導體材料之放光特性與其內部之微觀結構，特別與電子態、缺陷態和能階態結構有關。奈米材料因尺寸小，表面張力較大，顆粒內部發生變形，使平均鍵長變短，導致鍵振動頻率升高引起藍移（blue-shift），光譜上可觀察奈米半導體材料當其粒徑越小放光光譜將會逐漸藍移。^[22]

1.1.2.3 熱力學性質

固態物質於其形態為大尺寸時，熔點固定不變，然奈米化後將發現其熔點顯著降低，當粒徑小於 10 奈米時此現象將更為明顯，原因乃由於奈米材料表面原子之震幅較內部原子高出許多，受到熱擾動之影響亦較顯著，當粒徑逐漸縮小表面原子之比例逐漸增加，奈米材料之熔點則隨之降低。

1.1.3 量子尺寸效應

根據久保理論， $\delta = 4E_F/3N$ ，（ δ 為能階平均間距， E_F 為費米能級， N 為與顆粒中之電子數）。塊材金屬中電子濃度 N 相當大時，電子能譜可視為連續，當金屬顆粒尺寸減小時， N 值減少，能階間隔 δ 將隨之增大，即發生能量量子化之現象，此時分離之能階無法按連續能帶論處理，而呈現出一系列之新效應，稱為量子尺寸效應。當粒子尺寸下降至某一值時，金屬費米能階附近之電子能階由連續轉變為獨立能階之現象，以及奈米半導體顆粒存在不連續最高被佔據分子軌道和最低未被佔據之分子軌道能階，而使能隙變寬之現象^[23]，均為量子尺寸效應所造成之結果。

1.2 金奈米粒子之簡介



膠體金(colloidal gold)發展歷史可追溯至西元四世紀，被用作為羅馬萊氏杯(Lycurgus cup)之顏料，目前萊氏杯為大英博物館館藏之一。除了上述羅馬酒杯外，中世紀教堂之彩繪玻璃(stained glass)亦是利用玻璃中添加不同金屬而產生不同色彩。於十七世紀，製作彩繪玻璃之工匠便知道添加金粉於玻璃中可產生紅寶石色之效果。十九世紀英國科學家法拉第(Michael Faraday)利用氯化金還原出含奈米金之溶液，發現玻璃器皿中溶液竟呈現紅寶石色，完全不同於金塊之顏色，拜今日科技之所賜我們了解其主因為金顆粒於奈米尺度時具有表面電漿共振效應(surface plasmon resonance effect; SPR)，而使綠光被奈米金粒子所吸收，最後造成綠色光強度減弱，相較之下，其他波長之光與奈米金粒子甚少作用而直接透射，最後所呈現色彩即為紅寶石色。

1.2.1 表面電漿共振之簡介

表面電漿之研究已具許久之歷史，奈米科技蔚為風潮之今日，許多材料於奈米尺度下之結構與特性具許多嶄新發現，表面電漿之性質於奈米尺度下亦顯現出不同以往之現象，因此表面電漿之研究乃為了解奈米尺度下光學性質之重要基石。

電漿(plasma)一詞源於敘述氣體離子化之現象，而討論金屬物質時，其內部之自由電子亦可視為一帶電之流體，因此可將其視為一種電漿之形式。二十世紀初，Wood^[24]首先發現電磁波於刻有光柵之金屬表面產生異常繞射之現象，隨後許多物理學家便對於電磁波與金屬介面之交互作用深感興趣，並先後提出理論與實驗證明此一特殊之現象乃因電磁波沿金屬表面傳播，入射電磁波與金屬表面電漿耦合共振所導致之結果^[25]，此即為金屬表面電漿(surface plasmon)研究之開端，從此之後表面電漿之主要性質便逐漸被進一步探討，從物理學、化學、材料科學、生醫科學等，於許多不同領域中受到高度重視。

金屬表面電漿共振可分為介電物質與金屬介面之表面電漿傳遞及侷域性表

面電漿共振兩種，以下將簡單介紹兩種共振模式之形態。



1.2.1.1 表面電漿傳遞(Surface plasmon propagation)

若考慮一電磁波由介電物質入射至金屬中時，由於金屬表面與介電物質接觸介面之能量不連續，垂直於此介面之電磁波分量將造成自由電子於介面處累積產生極化現象，若此些極化之電子再受到平行於此介面之電磁波分量驅動，造成被極化之電子產生周期性之震盪，即為金屬表面電漿傳遞效應，如圖 1-2，表面電漿共振所產生之電磁波亦有特定之共振頻率與色散關係。

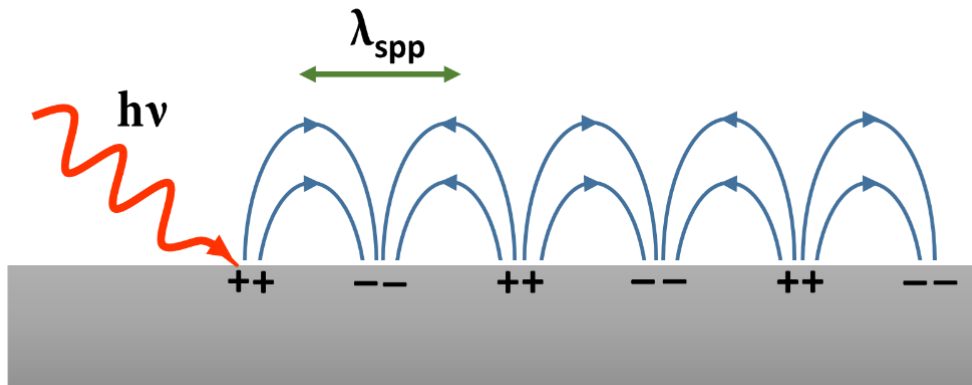


圖 1-2 金屬表面電漿傳遞示意圖。

1.2.1.2 侷域性表面電漿共振(Localized surface plasmon resonance)

考慮一遠小於入射光波長之金屬奈米粒子，當其受入射光照射後，金屬奈米粒子上之電子雲受到入射電場影響而產生極體振盪之現象，由於此一振盪行為發生於極小之奈米粒子上，表面電漿共振將侷限於此微小金屬顆粒上，無法於介面上自由傳播，因此稱為侷域性表面電漿共振，如圖 1-3。而圖 1-4 顯示各種不同形貌之金屬奈米結構之電磁場強度模擬結果，可發現侷域性表面電漿共振與結構大小及幾何形狀有關，同時亦可發現，侷域性表面電漿共振之電磁場被限制於一微小空間中時，其電磁場強度具侷域增強之現象。[26,27]

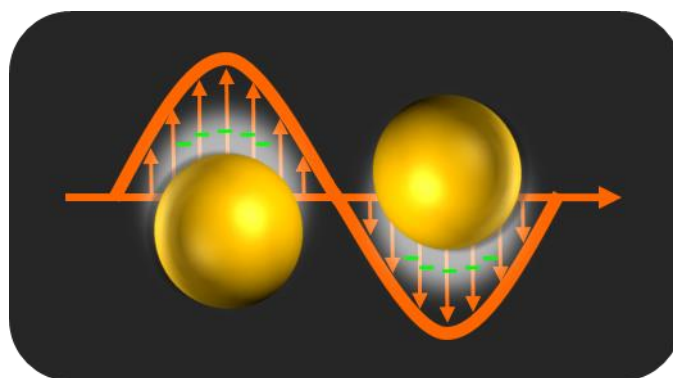


圖 1-3 奈米粒子之侷域性表面電漿共振示意圖。

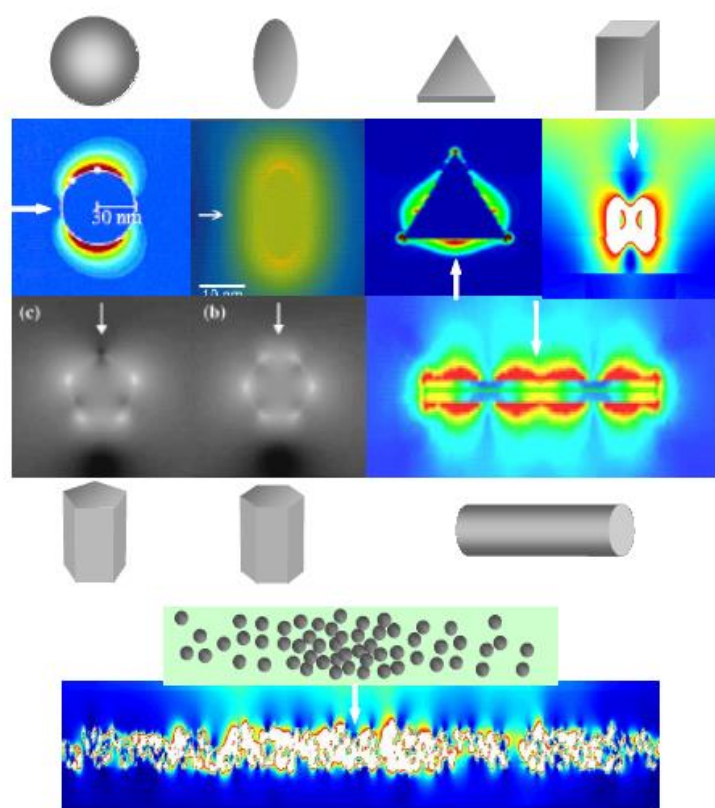


圖 1-4 各種不同形貌之奈米結構電磁場強度模擬。[26,27]

金奈米粒子具有及特殊之表面電漿共振峰，有別於其他鉛、汞、銻、鎘等金屬奈米粒子之表面電漿共振波落於紫外光區，球狀金奈米粒子之共振波長約位於 530 nm 左右，如圖 1-5(a)所示，其粒徑愈大表面電漿共振峰將愈紅位移，除粒徑大小將造成共振峰位移外，金奈米粒子之幾何形狀亦有相當顯著之影響，例如棒

狀金奈米粒子與星狀金奈米粒子，棒狀金奈米粒子具有兩道表面電漿共振峰，未於 530 nm 處為其短軸之共振峰，而隨其長度增加使其徑長比(aspect ratio)不同，長軸之共振峰亦隨之紅位移，如圖 1-5(b)。星狀奈米粒子則由於其表面分布之針狀結構長短不同，造成一寬帶之表面電漿共振峰，亦可透過調整徑長比控制其共振峰之位置，如圖 1-5 (c)。

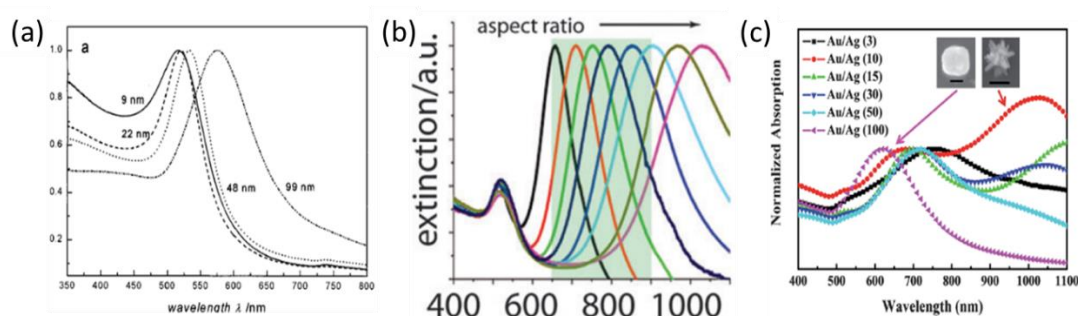


圖 1-5 不同形貌之金奈米粒子表面電漿共振峰(a)不同大小之球狀金奈米粒子^[28]、(b)不同徑長比之棒狀金奈米粒子^[29]與(c)不同徑長比之星狀奈米粒子。^[30]

1.2.2 光熱治療(Photothermal therapy; PTT)

對於大多數癌症，主流治療方式包含腫瘤切除、化學治療及放射性治療，然切除方式易受限於腫瘤之大小及位置^[31]，化學治療伴隨許多副作用^[32]，而放射性治療則易使健康組織受放射線之影響。^[33]基於上述治療方式之缺陷，光熱治療則提供較溫和之方式且可避免以上治療之缺點以達到癌症治療之效果。

光熱療法乃指透過光熱轉換劑達到局部環境加熱之效果，當光熱轉換劑吸收電磁輻射時，電子將由基態被激發至激發態，隨後透過非輻射鬆弛(non-radiative relaxation)之形式回至基態，即以熱之形式釋放能量，而此熱能將造成局部細胞或組織之破壞。^[34-36]光熱轉換劑之種類可以為活體組織內部之發光團(chromophores)^[37-39]，或額外注射有機染料分子，常見之有機光熱轉換劑如：靛氰綠(indocyanine green)^[40,41]、萘酞菁(naphthalocyanine)^[42]與紫質 (porphyrins)金屬錯化物^[43]，然生物體內發光團之光吸收率極低，造成光熱轉換效率不佳，有機染

料分子於高熱情況下較不穩定而造成光漂白(photobleaching)之缺點，故近年將光熱治療著眼於無機奈米材料。

貴金屬奈米粒子具高吸收截面積與高化學穩定性之優點，其中金奈米粒子由表面電漿共振所吸收之能量除可透過散射衰退外，亦可藉由一連串之光物理過程，包含電子-電子、電子-聲子與聲子聲子間之碰撞而產生熱能^[44]，若熱能沉積相較於晶格冷卻之速度快，則將導致奈米粒子表面之配位基脫落甚至本身之形變或熔化^[45]，若熱沉積速度較慢，熱能可透過聲子-聲子間之能量傳遞將熱量逸散至周圍環境，於生物組織中則可導致周圍細胞死亡而達到治療之效果。更進一步，金奈米粒子之吸收係數較有機分子高出四到五倍之數量級，因此可大幅降低雷射光源之強度以避免破壞生物組織。^[46-48]此外，金奈米粒子之高生物相容性、高分散性與其表面易於修飾官能基之特性，使其於光熱治療領域具高度應用潛力。^[49]

近年各種不同形貌之金奈米粒子已被成功應用於光熱治療領域，El-Sayed 等人^[50]合成 40 nm 大小之球狀金奈米粒子並以波長 514 nm 之雷射做為光源，利用球狀金奈米粒子於 520 nm 之表面電漿共振提供光熱轉換之能量，如圖 1-6(a)可發現於 HOC 口腔癌細胞實驗中，經雷射照射區域之細胞具明顯死亡現象，然因可見光之能量較高，長時間照射可能導致細胞損傷，若應用於活體實驗則可能破壞正常組織而影響光熱治療效果。因此，金奈米粒子之光熱治療逐漸著眼於能量較低且穿透度高之近紅外光雷射光源之研究，由上圖 1-5 之表面電漿共振圖譜可發現，棒狀金奈米粒子與星狀金奈米粒子皆可透過調整徑長比，達到調控表面電漿共振峰於近紅外光區之特性，根據此特性，Huang 等人^[51]成功合成表面電漿共振峰於 800 nm 之棒狀金奈米粒子，並以 800 nm 之雷射提供光熱轉換之光源，於圖 1-6(b) HOC 口腔癌細胞實驗中可觀察，隨雷射光源強度增加，光熱治療效果亦更為顯著。除此之外，Cheng 等人^[30]以理論計算得到星狀金奈米粒子之放熱區域大部分集中於其尖端，如圖 1-6(d)。基於此特性，將具寬帶表面電漿共振峰之星狀金奈米粒子以 800 nm 之雷射激發，利用光熱轉換之效果成功導致 SAS 口腔癌細胞之死亡，於圖 1-6(c)可發現於同功率之雷射光源照射下，含星狀金奈米粒

子之細胞與其對照組(without nanoparticles; W/O NPs)具相當明顯之差異。

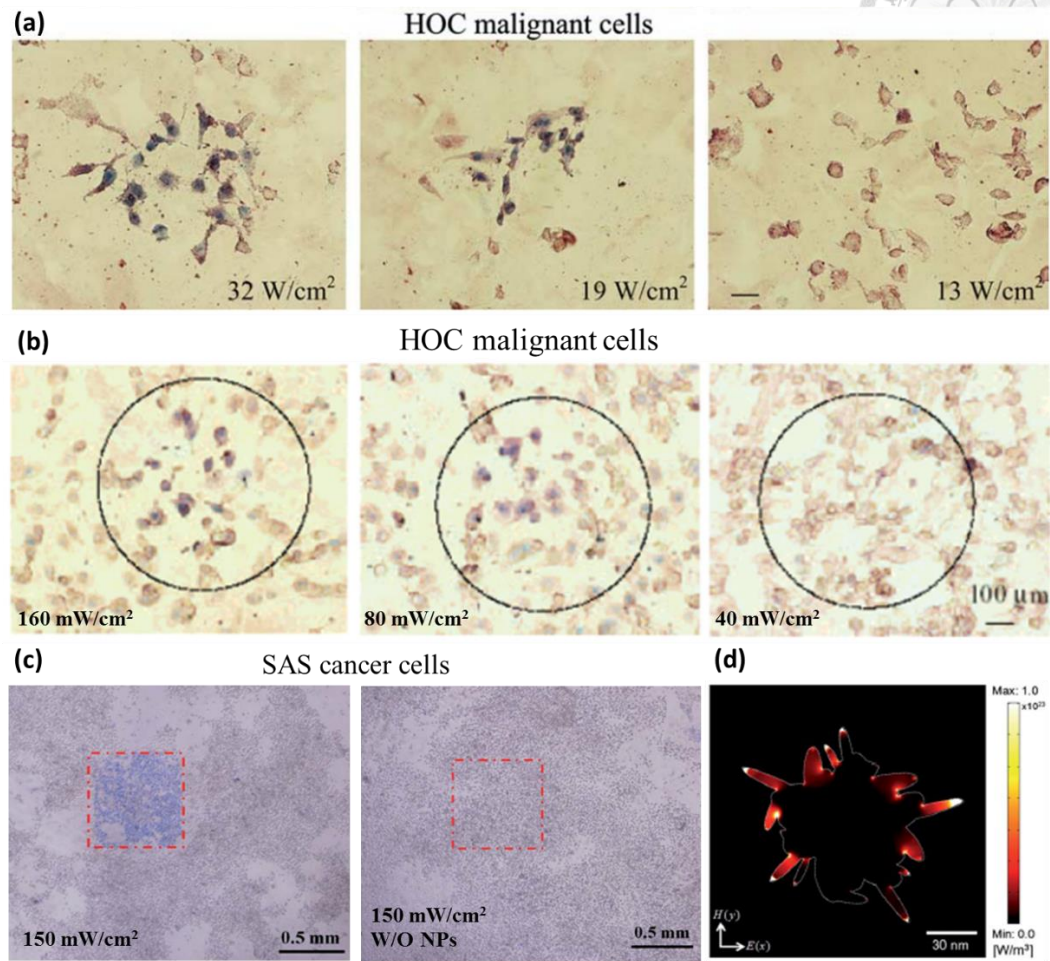


圖 1-6 不同形貌之金奈米粒子於細胞之光熱治療結果(a)球狀金奈米粒子^[50]、(b)棒狀金奈米粒子^[51]、(c)星狀金奈米粒子與(d)星狀金奈米粒子放熱之理論計算結果。^[30]

1.3 上轉換奈米粒子之簡介

利用奈米材料作為細胞或生物之標定或照影已被廣泛地研究。常利用於該領域之材料舉如繁星，然最常見亦最廣泛地被研究之材料為有機螢光(organic fluorophores)與半導體量子點(semi-conductor quantum dot)。有機螢光作為生物內部之標定材料係由於其為一非侵入性之生物相容性材料。其廣泛之應用，涵蓋生物體外實驗(*in vitro*)、生物體內實驗(*in vivo*)、基礎生物藥理、臨床研究等，然有

機螢光材料仍具許多無可避免之限制與缺點。該材料之螢光訊號常具較廣泛之半高寬，且提高其照光時間，該材料受熱而型變之現象愈明顯，限制該材料於生物上之應用。相反地，半導體量子點材料成為生物體內標定具有高量子效率、較窄半高寬之放光範圍、尺寸可調性、光學可調性與高光能穩定性等優點。^[52,53]然無可避免地，使用半導體量子點作為標定材料時，同時存在高毒性、高環境污染性與高爭論性之缺點。除此之外，有機螢光與半導體量子點材料常利用之螢光激發波長為紫外光或可見光，該區段之激發光源常導致生物自體螢光之產生，而影響觀測訊號準確度，短波長之激發光源具高能量之疑慮，導致生物體受高能電磁輻射而產生型變或死亡，同時，短波長之激發光源穿透率較低，無法進行較深入之器官標定。

鑑於有機螢光材料與半導體量子點材料於生物領域研究之缺點，具鑷系金屬摻雜(lanthanide-doped)之上轉換螢光奈米材料(upconversion nanoparticles; UCNPs)應運而生。相較於上述之材料，上轉換螢光材料藉由近紅外波段之激發光源照射，經過反斯托克斯(anti-stokes)放射波長較短之可見光，由於其激發之波長較長，可穿透至皮下組織較深層之內部。該材料同時具有窄半高寬、長生命週期、光學可調性、尺寸可調性、高光學穩定性與低生物毒性優點^[54]，如圖 1-7 所示，極適用於生物相關領域之應用與研究。

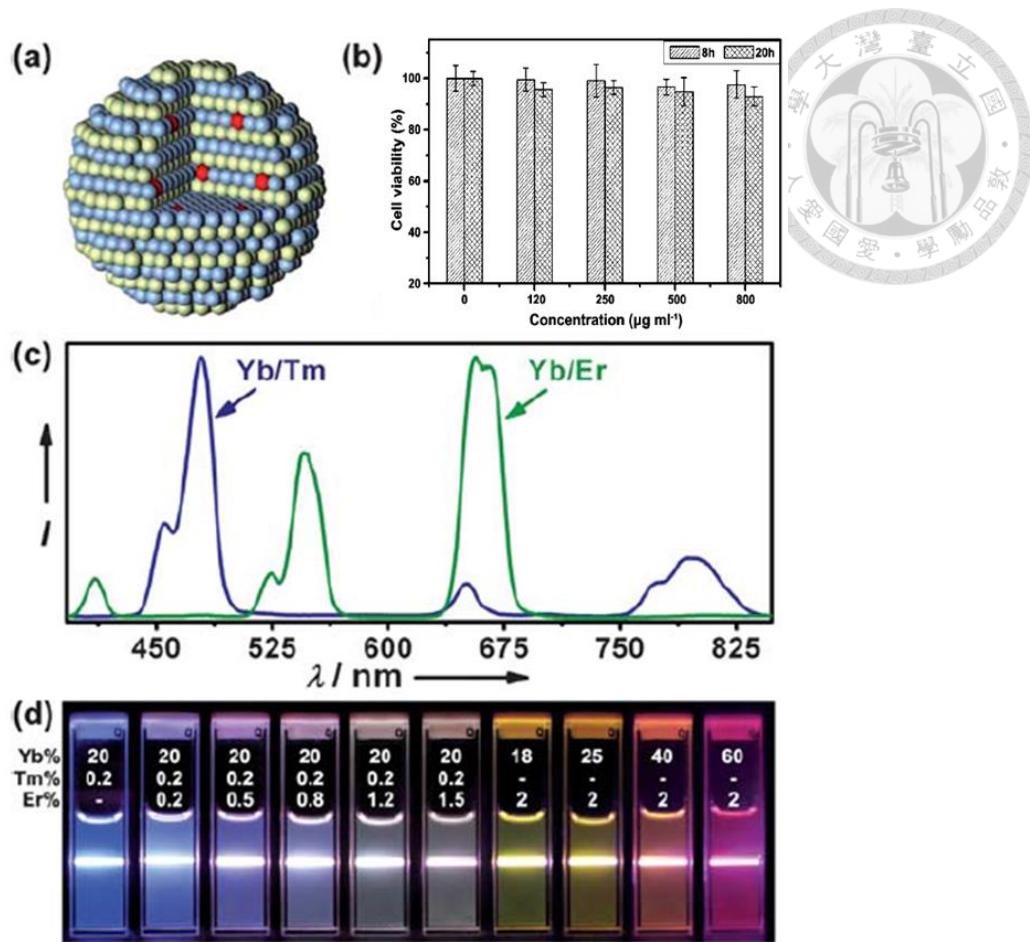


圖 1-7 (a)上轉換奈米粒子結構示意圖、(b)上轉換奈米粒子於細胞毒性之測試、(c)不同活化劑之特性放光光譜與(d)調控敏化劑與活化劑比例控制上轉換奈米粒子之放光顏色。[54]

1.3.1 上轉換奈米粒子之組成

鑷系元素具有豐富之軌域組態，特別適合用做為發光材料，而鑷系離子通常以三價為較穩定之價態，各鑷系離子能階分布圖如圖 1-8。三價鑷系離子中， Y^{3+} 無 $4f$ 電子， Lu^{3+} 之 f 軌域則為全填滿，此二離子無法產生 $f-f$ 軌域間之電子躍遷 [55]，因此適合用做主體(Host)材料，避免造成與摻雜離子間之能量傳遞而影響發光效率，其餘三價鑷系離子則適合用做摻雜材料，如：敏化劑(sensitizer)及活化劑(activator)。

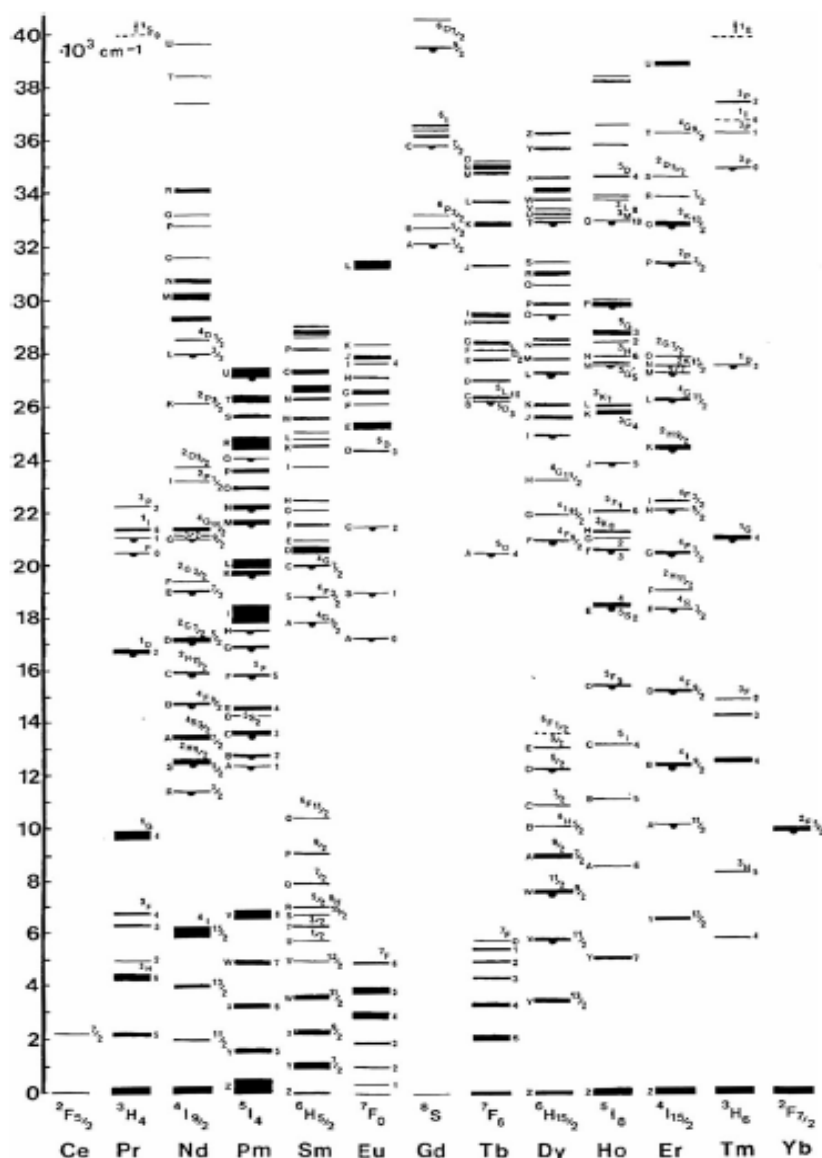


圖 1-8 三價鐳系離子能階分布圖。[55]

1.3.1.1 主體材料(Host)

理想之主體材料需具備高可見光穿透率與高光學穩定度之優點。除此之外，亦須較低之聲子能(phonon energy)以降低非輻射(non-radiative)能量之散失。鹵素元素如：氯、溴與碘具低於 300 cm^{-1} 之聲子能，然因穩定性較低而侷限其使用性。氧化物則具高化學穩定性之優點，然一般氧化物之聲子能皆高於 500 cm^{-1} ，能量傳遞上容易以振動之形式散失。與上述元素比較，氟化物兼具兩者之優點，具備高化學穩定性及位於 350 cm^{-1} 之聲子能，因此氟化物為較常見之主體材料。[56]

外，晶格結構對於上轉換發光之性質亦有相當大之影響，由於鐳系離子之能量傳遞為 $f-f$ 禁制躍遷，故須具非對稱中心之晶格以提高 f 軌域電子躍遷之機率，而緊密且高密度排列之主體材料則可減少晶格缺陷避免能量傳遞之消耗。[57]

1.3.1.2 活化劑(Activator)

活化劑乃指上轉換過程中負責放光之離子，其特性通常須具豐富之能階，此些能階於上轉換之過程中能扮演中繼能階(intermediate level)之角色，暫時儲存被激發之電子，提高隨後再被激發至更高能階之機率，然摻雜過多活化劑不但不會使放光效率提高，反因活化劑彼此產生交叉鬆弛過程(cross-relaxation process)使能量散失而降低轉換效率，故活化劑之摻雜比例通常維持於 2%，然大部分之鐳系離子之吸收截面積皆很低，因此單摻雜活化劑之上轉換系統中，光轉換之效率皆受到相當大之侷限。

1.3.1.3 敏化劑(Sensitizer)

為彌補活化劑之缺點，常於主體材料中摻入敏化劑以增強上轉換之放光效率，而其能階分布之特色與活化劑不同，為避免交叉鬆弛之現象發生，敏化劑之選擇以能階分布簡單、吸收截面積大及可匹配之能量傳遞原則為主，如圖 1-8 鐳系離子能階分布中，可發現 Yb^{3+} 具上述之特性， Yb^{3+} 僅有一激發態 $^2\text{F}_{5/2}$ ，吸收及放出能量時並無其餘 f 軌域之交互作用而使能量散失之疑慮，而其由激發態 $^2\text{F}_{5/2}$ 回至基態 $^2\text{F}_{7/2}$ 之能量與常見活化劑 Yb^{3+} 及 Er^{3+} 之 $f-f$ 軌域躍遷，具能量共振之優勢，如圖 1-9，更進一步， Yb^{3+} 之能量吸收位於 980 nm 處(近紅外光區)具相當大之吸收截面積，使 Yb^{3+} 成為傑出之上轉換發光敏化劑。

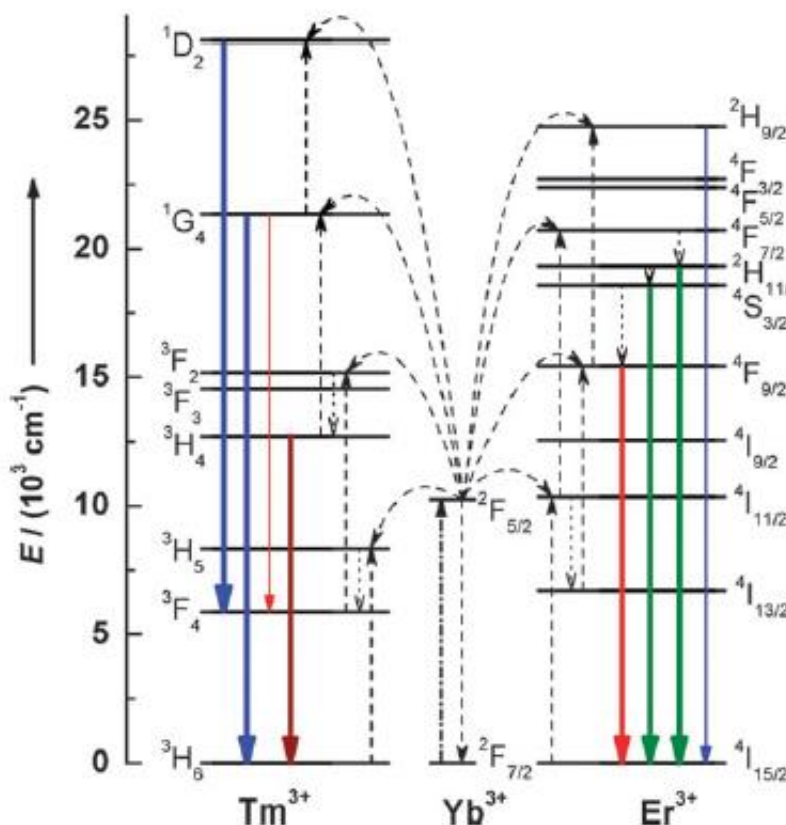


圖 1-9 上轉換奈米粒子之敏化劑與活化劑能量傳遞示意圖。[56]

1.3.2 上轉換奈米粒子發光之機制

稀土發光材料最引人注目之特性乃具上轉換與下轉換(down conversion)之性質，當材料吸收兩個或兩個以上之低能量之光子，放出一個較高能量之光子，此種光轉換之機制稱為上轉換。當材料吸收一高能量光子放出兩個以上之低能量光子，此種機制則稱為下轉換，亦稱為量子剪裁(quantum cutting)。而上轉換之能量轉移過程如圖 1-10 可簡單分為以下三種機制。[56]

1.3.2.1 激發態吸收(Excited state absorption; ESA)

此機制之發生僅牽涉單一離子，當離子吸收一低能量光子後，該離子由基態 G 被激發至第一激發態 E1，再吸收另一光子使該離子從 E1 至第二激發態 E2，隨後由 E2 回至 G 放出一高能量之光子，如圖 1-10(a)。

1.3.2.2 能量轉移上轉換(Energy transfer upconversion; ETU)

此種機制牽涉兩離子，分別吸收單一光子後被激發至 E1，其中一離子將能量轉移至另一離子，因此形成一位於 E2 之離子與位於 E1 之離子，隨後位於 E2 之離子以光之形式釋放較高能量之光子回至 G，如圖 1-10(b)。

1.3.2.3 光子雪崩(Photon avalanche; PA)

此機制之特色在於其對激發光之吸收並非共振吸收，即為激發光源之能量高於離子由 G 至 E1 所需之能量，此些多餘之能量使位於 E1 之離子再進行前述之激發態吸收至 E2，而位於 E2 之離子經過交叉鬆弛過程將能量傳遞至週圍處於基態之離子，激發此些基態之離子至 E1，而其本身亦回到 E1，因位於 E1 之離子分布(population)不斷累積，如此往復之過程使 E1 之電子數量如雪崩一般急遽增加，因此大幅提升電子被激發至 E2 之機率，如圖 1-10(c)所示。

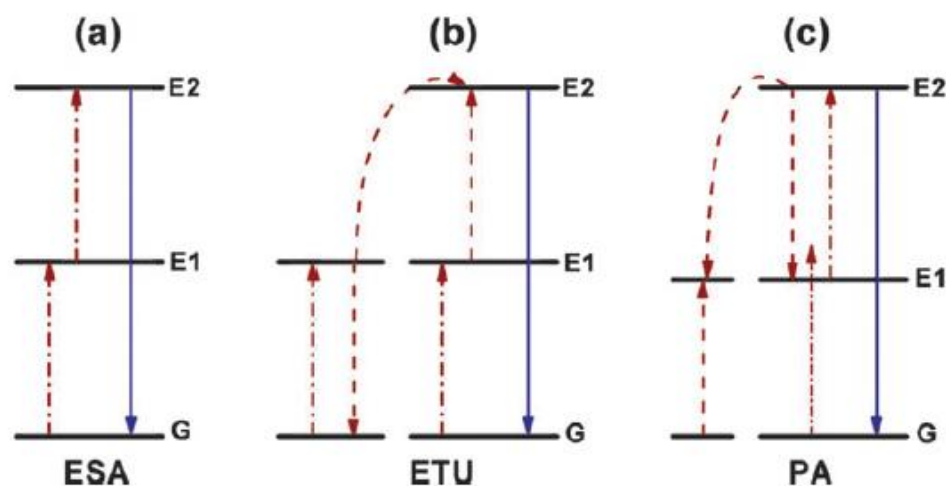


圖 1-10 上轉換奈米粒子能量傳遞機制示意圖，(a)激發態吸收(Excited state absorption; ESA)、(b)能量轉移上轉換(Energy transfer upconversion; ETU)與(c)光子雪崩(Photon avalanche; PA)。^[56]

1.4 文獻回顧

上轉換奈米材料經過科學家廣泛地研究後，其於生物領域之應用亦越趨廣泛與多樣化，如圖 1-11 所示，其應用可粗略分為三大部分，其包含光學成像(cell imaging)、發光檢測(luminescence assay)與光動力治療(photodynamic therapy)。

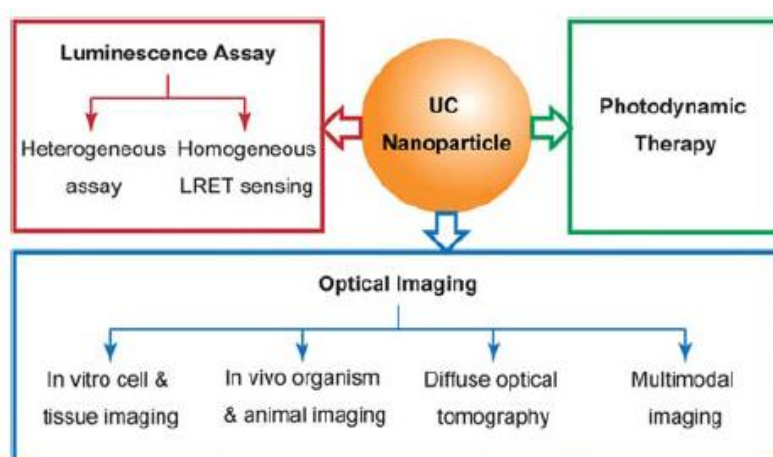


圖 1-11 上轉換奈米粒子於生物領域應用示意圖。[54]

上轉換奈米螢光材料如上所述，可藉長波長、高穿透率與低光破壞性特性之近紅外光雷射進行激發，以鑑定細胞內部、組織內部或生物體內部之標定，如圖 1-12(a)所示，於體外(*in vitro*)之細胞標定可得到相當清晰之螢光成像，故可用於生物體內之長期追蹤^[58]。除此之外，Yu 等人^[59]將上轉換奈米材料與有機螢光染料同時進行細胞標定，如圖 1-12(b)，與有機螢光(藍光及紅光)相比，同時於雷射激發下，經過長時間後可觀察上轉換發光(綠光)之放光依然相當穩定，而有機螢光之成像已相當不明顯，由此研究可了解上轉換奈米粒子受光照射後並無產生光閃爍或光降解之現象。更進一步，於生物體內(*in vivo*)之研究，Lim 等人^[60]將上轉換奈米粒子餵食於線蟲之簡單多細胞生物，除可證明上轉換奈米粒子之低生物毒性外亦得到清晰度極高之螢光成像如圖 1-12(c)。除此之外，Xiong 等人^[61]將標靶分子修飾於上轉換奈米粒子表面，成功地於小鼠體內標定腫瘤細胞，並透過螢

光顯影技術可得清晰之螢光成像，如圖 1-12(d)，由此可知，上轉換奈米粒子於活體螢光成像領域亦展現出優異之訊雜比(S/N ratio)。

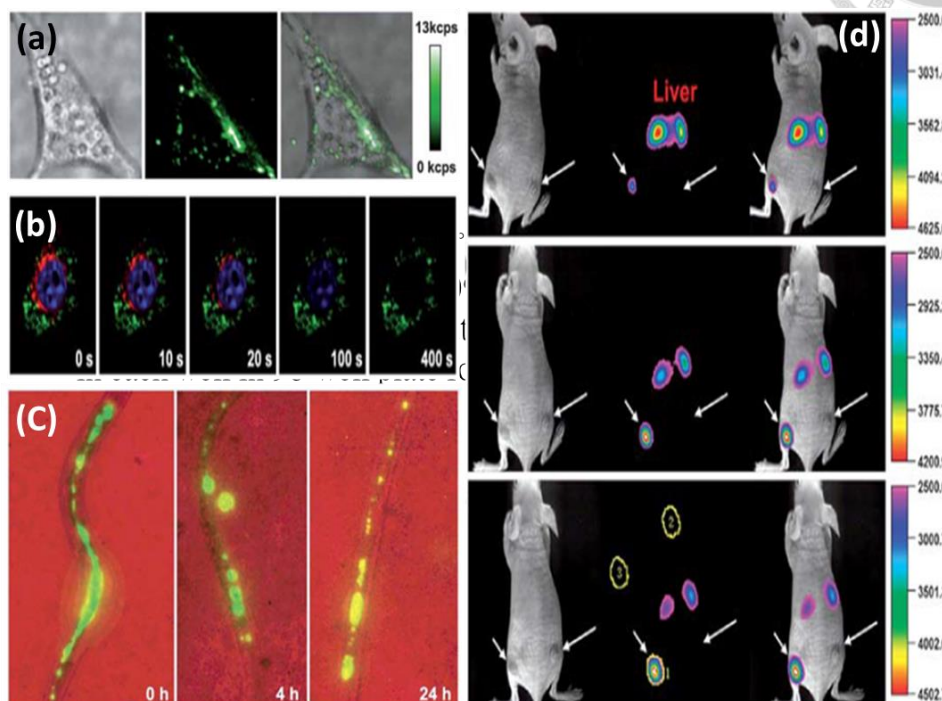


圖 1-12 上轉換奈米粒子於(a)細胞螢光成像圖^[58]、(b)與有機螢光成像之比較^[59]、(c)線蟲體內螢光成像圖^[60]與(d)小鼠體螢光成像圖。^[61]

除上述透過直接利用上轉換奈米粒子之放光以達細胞或組織之成像外，間接利用其放光達到螢光能量傳遞(fluorescent resonance energy transfer; FRET)或鐳系金屬共振能量傳遞(lanthanide resonance energy transfer; LRET)做為檢測或治療之研究亦受到矚目。Rantanen 等人^[62]以 980 nm 雷射激發上轉換奈米材料後，藉由鐳系金屬共振能量傳遞至表面連接之特殊螢光蛋白，此時，螢光蛋白受到激發而產生特定波長之螢光。藉鑑定此特殊螢光訊號，可確定該上轉換奈米材料確實地標定此特殊蛋白，並可作為未來長期追蹤之訊號，如圖 1-13(a)所示。除將上轉換奈米粒子用做生物檢測之外，近年來許多研究亦將上轉換奈米粒子與光動力(photo dynamic)療法結合。常見之光動力癌症治療可分為三步驟：奈米材料之表面須修飾標靶分子以標定特殊之腫瘤細胞組織，藉由光能之照射以活化光感藥物

導致活性氧物質(reactive oxygen species)生成，並以活性氧物質致使周圍腫瘤細胞之死亡^[54]，示意圖如圖 1-13(b)所示。Idris 等人^[63]利用上轉換奈米粒子之多重放光特性，於其表面修飾兩種符合其放光範圍之光感藥物，藉以增加活性氧物質之生成，於圖 1-13(c)之細胞存活率亦可發現，雙光感藥物之上轉換奈米材料具有較顯著之光動力治療結果。

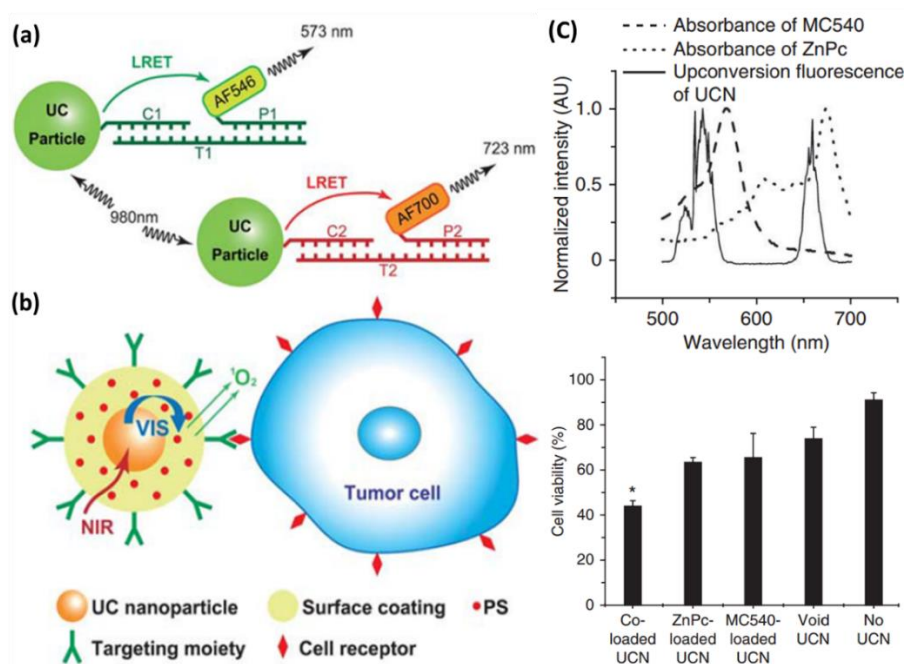


圖 1-13 (a)上轉換奈米粒子與螢光蛋白之 LRET 示意圖^[62]、(b)上轉換奈米粒子與光感藥物結合應用於 PDT 示意圖^[54]與(c)具雙光感藥物之上轉換奈米粒子與其細胞存活率之圖表。^[63]

1.5 研究動機與目的

目前上轉換奈米粒子於生醫領域之相關研究可分為兩大部分，第一部分為直接利用其放光特性應用於細胞、組織或活體之螢光成像，第二部分則為利用鐳系共振能量傳遞(LRET)之方式，透過轉換上轉換奈米粒子之光能以達其應用之目的，例如將上轉換奈米粒子與可吸收其放光之螢光分子結合，透過偵測螢光分子

之螢光達到檢測人體內重要蛋白或分子之目的。此外，於癌症治療之領域主要為透過與光敏劑結合進行光動力療法，利用光敏劑吸收上轉換奈米粒子之光能，產生活性氧物質以達致使腫瘤細胞死亡之療效。除光動力療法外，光熱療法於癌症治療領域之應用亦深具潛力，本研究基於金奈米材料之光熱轉換效應，將其與近紅外光驅動之上轉換奈米粒子結合，合成具多功能之形貌控制金奈米粒子與上轉換奈米粒子複合材料，利用上轉換奈米粒子發光具多重放光波長之特性，搭配不同形貌之金奈米材料具不同之表面電漿共振峰，觀察其不同形貌金奈米粒子之光熱轉換之效應，並結合上轉換奈米粒子之螢光成像，製備同時具細胞標定功能及光熱治療效果之奈米複合材料。

球狀金奈米粒子之表面電漿共振峰隨其顆粒大小具不同之共振吸收波長，本研究合成之 3.5 nm 金奈米粒子之表面電漿共振峰則位於 540 nm 左右，由於此特性，本研究選用放光波長位於 540 nm 及 645 nm 之上轉換放光活化劑 Yb^{3+} ，敏化劑 Er^{3+} ，期許球狀金奈米粒子可透過表面電漿共振將上轉換材料放光之光能轉換為熱能。除此之外，如先前所敘述，基於 Yb^{3+} 具有多重放光之性質，本研究亦合成與其放光波長媒合之棒狀金奈米粒子，期許利用棒狀金奈米粒子之雙重表面電漿共振峰與較高之消光係數，藉以提高光熱治療之效果。本研究之示意如圖 1-14。

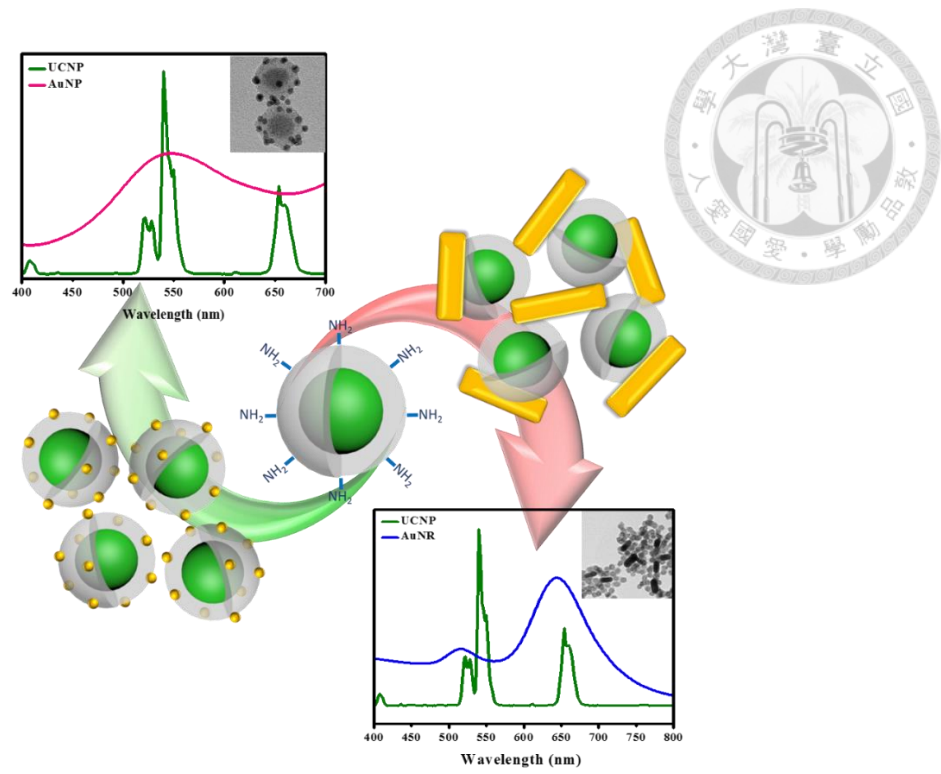


圖 1-14 本研究內容之示意圖。

第二章 實驗方法與儀器原理



2.1 化學藥品

本研究所使用之化學藥品皆為試藥級以上純度，故使用前不再進行純化，其藥品名稱、分子式、純度及供應商如表 2-1 所示：

藥品名稱	分子式	純度	供應商
四氯金酸 Hydrogen tetrachloroaurate trihydrate	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	99.9%	Acros
硝酸銀 Silver nitrate	AgNO_3	99%	Acros
抗壞血酸 Ascorbic acid (AA)	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	99%	Acros
甲殼素 Chitosan	$(\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{N}_2)_n$	99%	Aldrich
溴化十六烷基三甲銨 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$	99%	Acros
氫氧化鈉 Sodium hydroxide	NaOH	99%	Acros
氟化銨 Ammonium fluoride	NH_4F	98%	Merk
醋酸釔 Yttrium (III) acetate hydrate	$\text{Y}(\text{OAc})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	99.9%	Aldrich
醋酸鐳 Ytterbium (III) acetate hydrate	$\text{Yb}(\text{OAc})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	99.9%	Aldrich

Ytterbium (III) acetate hydrate				
醋酸鉕				
	$\text{Er}(\text{OAc})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	99.9%	Aldrich	
Erbium (III) acetate hydrate				
油酸				
	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	90%	Aldrich	
Oleic acid (OA)				
十八烯				
	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}=\text{CH}_2$	90%	Aldrich	
1-Octadecene (ODE)				
IGEPAL® CO-520	$(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n \cdot \text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}, n \sim 5$	95%	Aldrich	
矽酸乙酯				
	$\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$	98%	Aldrich	
Tetraethyl orthosilicate (TEOS)				
3-氨基丙基三乙氧基矽烷				
	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$	98%	Aldrich	
(3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES)				

表 2-1 本研究所使用之化學藥品。

2.2 實驗步驟

2.2.1 上轉換奈米粒子之製備

上轉換奈米粒子之製備如圖 2-1，首先秤取 0.64 mmol 醋酸鉕、0.144 mmol 醋酸鎢與 0.016 mmol 醋酸鉕之鹽類，加入 6 mL OA 與 14 mL ODE 於雙頸瓶中，於氮氣環境下加熱至 150°C 待醋酸鹽類完全溶解後降溫至 50°C，加入含氫氧化鈉 0.8 mg 與氟化銨 118 mg 之甲醇溶液，隨即加熱至 290°C 持溫 2 小時後降至室溫，即完成反應。所合成之上轉換奈米粒子以絕對酒精與環己烷 1:1 之比例離心收集，重複三次以除去表面多餘之 OA，最後分散於環己烷中保存。

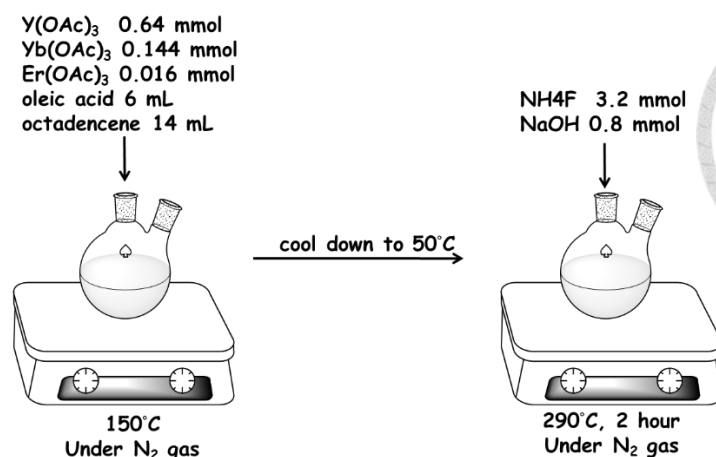


圖 2-1 上轉換奈米粒子合成示意圖。

2.2.2 球狀奈米金粒子之製備

取 91 mL 去離子水於燒杯中，加入 25 mM 之四氯金酸水溶液 1 mL，再加入 5 mL 之 5 mM 檸檬酸鈉水溶液，攪拌均勻，隨後加入 0.1 M 之硼氫化鈉水溶液 3 mL，待反應約三分鐘，至溶液顏色由金黃色轉紅酒紅色後停止攪拌，即合成 3.5 nm 之球狀金奈米溶液，製備過程如圖 2-2。

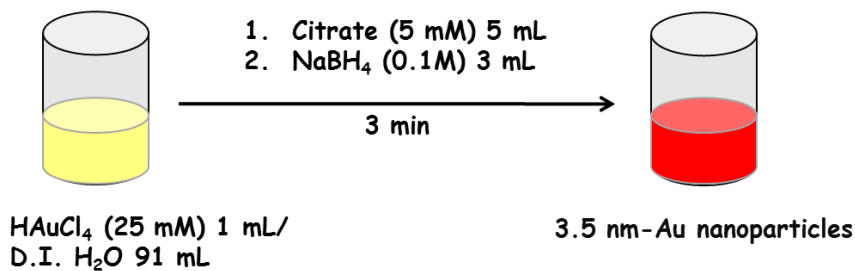


圖 2-2 球狀金奈米粒子合成示意圖。

2.2.3 棒狀金奈米粒子之製備

第一部分為合成晶種溶液，於 20 mL 樣品瓶中加入 0.36 g 之 CTAB 與 10 mL 之去離子水，隨後於 50°C 下加熱攪拌至 CTAB 完全溶解。隨後取 0.25 mL 之 10 mM 四氯金酸溶液與上述之 CTAB 溶液 7.5 mL 混合均勻，此時溶液之顏色呈現暗橘色。隨後取 0.03783 g 之硼氫化鈉溶於 100 mL 去離子水中，取 0.6 mL 之硼

氫化鈉溶液加入深橘色之四氯金酸溶液中，並於超音波震盪器中震盪約 3 分鐘，溶液呈現深褐色後即可停止振盪，靜置於 30°C 之烘箱內 2 小時，製備流程如圖 2-3。

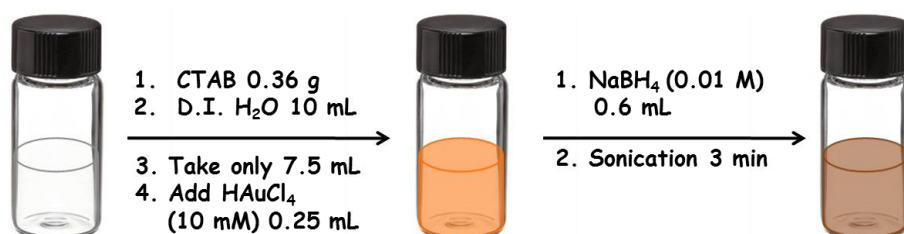


圖 2-3 金奈米粒子晶種合成之示意圖。

第二部分為合成棒狀金奈米粒子如圖 2-4，取 3.6 g 之 CTAB 於 100 mL 去離子水中加熱至 50°C 待其完全溶解後取 94.4 mL 與 10 mM 之四氯金酸溶液 4 mL 混合均勻，隨後取 0.01 M 之硝酸銀溶液 0.6 mL 加入上述之溶液，再取 0.1M 之抗壞血酸溶液 0.6 mL 加入其中，待溶液由深橘色漸漸轉變為透明之瞬間加入第一步所合成之晶種溶液，靜置於 30°C 之烘箱內 12 小時，即完成反應。

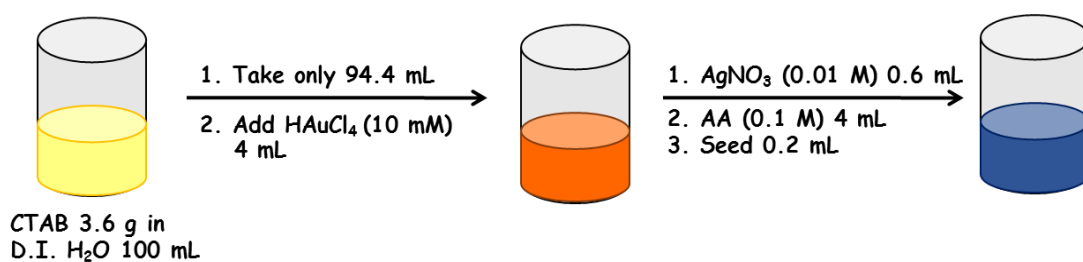


圖 2-4 棒狀金奈米粒子合成示意圖。

2.2.4 製備以甲殼素修飾之奈米複合材料

將上轉換奈米粒子以 pH = 4 之鹽酸水溶液酸洗後，以濃度 0.5 mg/mL 分散於水中，與 2 mg/mL 之甲殼素溶液以 1:1 之體積比混合攪拌 24 小時，再分別加入上述所合成之球狀金奈米溶液與棒狀金奈米溶液混合攪拌 24 小時，以離心之

方法收集產物。

2.2.5 製備以二氧化矽修飾之奈米複合材料

將 1 mL IGEPAL® CO-520 加入 10 mL 之環己烷攪拌 2 小時後加入濃度為 10 mg/mL 之上轉換奈米粒子攪拌 12 小時，隨後加入 0.5 mL 之 30-33% 氨水溶液反應 1 小時，再以 200 μ L/hour 之速度加入 20 μ L 之 TEOS 反應 16 小時。收集產物時，首先以丙酮清洗並離心，分散於水中後再加入同體積之乙醇清洗三次，隨後加入 200 μ L 之醋酸溶液，緩慢地加入 50 μ L 之 APTES 攪拌反應 4 小時後，同樣以酒精清洗三次後分散於水中保存。隨後分別將上述之球狀與棒狀奈米金溶液加入混合攪拌 24 小時，並以離心收集產物。

2.2.6 細胞毒性之測試

本研究所選用之腫瘤細胞皆為口腔癌細胞，分別為 Tu 183 與 Cal 27。兩株細胞均培養於混合 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum) 與 PSG (penicillin/streptomycin L-glutamine) 之 RPMI-1640 溶液，皆於 37°C 與 5% 二氧化碳環境中培養。於 96 孔盤中加入 1, 3, 9, 27, 81 與 250 μ g/mL 濃度之奈米材料於個別孔盤中，72 小時後加入染劑 alamar blue 進行染色，以螢光盤式儀偵測 alamar blue 之螢光強度進行細胞存活率之統計。

2.2.7 光熱治療之測試

於 12 孔盤中種入 Cal 27 口腔癌細胞，加入濃度為 100 μ g/mL 之奈米複合材料，於 37°C 與 5% 二氧化碳環境中培養 12 小時後，以 1.7 W/cm² 功率之 980 nm 雷射分別照射 3 分鐘，隨後以 trypan blue 染劑進行染色，並於光學顯微鏡下觀察細胞死亡之情形。

2.3 儀器原理

2.3.1 穿透式電子顯微鏡(Transmission electron microscope; TEM)

穿透式電子顯微鏡儀器構造如圖 2-5 所示，其影像形成原理與光學顯微鏡相似，主要為電子光源經過聚焦線圈系統及其孔徑聚集成幾乎平行之電子束，此入射電子束撞擊於晶體薄膜試片上，經物鏡、中間鏡及目鏡改變放大倍率，最後投射於螢光幕上再觀察，此時一部份電子無角度偏離地直接穿過試片，此乃直射電子，其餘大部分電子則與薄膜產生交互作用而偏離，即為散射與繞射電子。

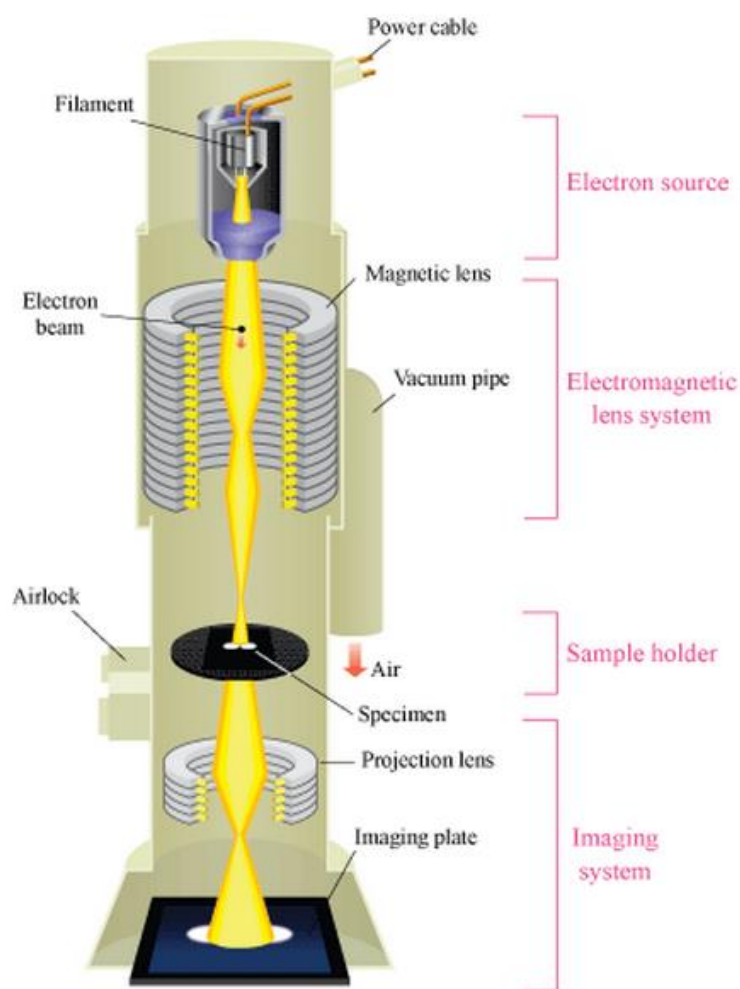


圖 2-5 穿透式電子顯微鏡之儀器架構示意圖。 [64]

有關電子與物質作用所產生訊號如圖 2-6 所示，其中 TEM 主要觀察透過樣品之穿透電子束。而繞射電子以非常小之角度偏離直射電子方向，其遵循布拉格繞射定律，與直射電子束偏離特定小角度傳遞。電子繞射與 X 光繞射(X-ray diffraction; XRD)之不同在於電子與物質作用力較強，繞射效率亦較好，故可分析 XRD 無法分析之微結晶與微小結構。

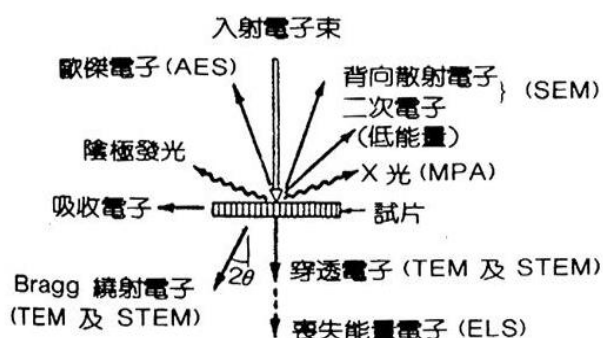


圖 2-6 電子與物質作用所產生之訊號。[65]

本研究所使用之 TEM 型號為 JEOL JEM-1200EX II，分析時利用電子成像之繞射對比(diffraction contrast)，作成明場視野或暗場視野影像，並配合繞射圖樣進行觀察。繞射電子經過物鏡系統聚焦後，於後聚焦面上形成點狀之圖譜，即所謂繞射圖譜，於後聚焦面上具物鏡孔徑，用以隔絕繞射電子束之繞射點，而僅讓直射電子束通過物鏡孔徑，可於第一中間鏡成像平面產生高對比之影像，經投影鏡放大，即所謂明場視野影像(bright field imaging)。若後聚焦面上之物鏡孔徑，隔絕直射電子束，且僅允許繞射電子束通過，產生影像則為暗場視野影像(dark field imaging)，於暗場視野中之影像具強烈明暗對比，乃因無法產生繞射作用之區域即無法產生影像而呈現黑色，可產生繞射作用之區域則呈現明亮。繞射呈像之關係如圖 2-7 所示。

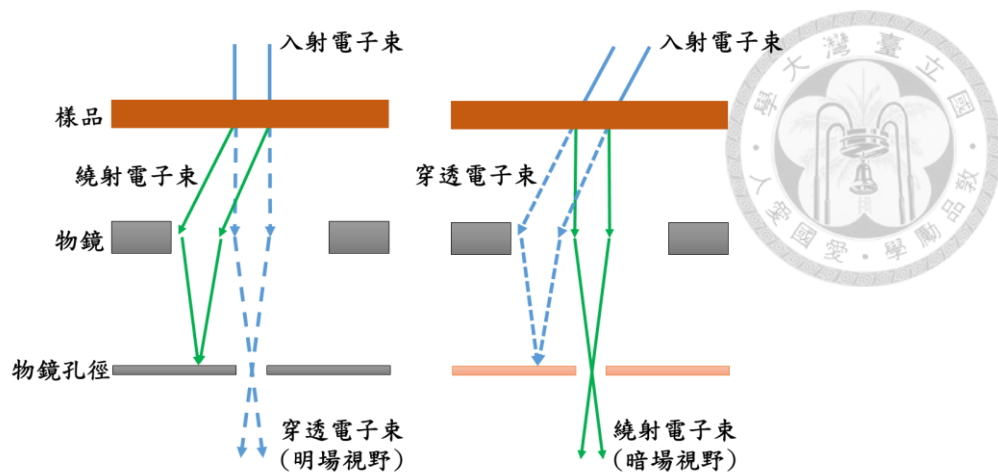


圖 2-7 繞射成像與明、暗場視野示意圖。

因電子束須穿透物質而顯影，故一般而言，較厚之試片難以穿透觀察，厚度通常以微米(μm)為限。此外維持燈源之壽命與電子束穩定之入射角度，樣品必須處於高度真空之狀態。一般 TEM 僅可提供材料內部型態、晶體原子結構，較難得知組成成分或鍵結之關係，可經加裝 X 光能量散布光譜儀(energy dispersive X-ray spectroscopy; EDS)偵測放射之 X 光或電子能量損失光譜儀(electron energy loss spectroscopy; EELS)偵測電子損失之能量，結合此些相關技術，不僅可分析材料內部原子結構並定量材料內部之成分與鍵結分佈。

2.3.2 X 光能量散布光譜(Energy Dispersive X-ray Spectrum; EDS)

電子束入射於固態材料表面時會引發之一連串彈性及非彈性碰撞，其中除可激發前述之二次電子和背向散射電子作為掃描式電子顯微鏡的成像之外，另有特性 X 光、歐傑電子(Auger electron)等訊號的產生，而各種訊號皆可作為該固態材料分析之用。所得到之 X 光訊號可區分為兩種，一種為連續 X 光，另一種為特性 X 光，典型 X 光圖譜如圖 2-8 所示，由特性 X 光譜線(如圖中 K_{α} 、 K_{β})疊加於連續 X 光譜線上。

連續 X 光乃由於入射電子接近材料原子中心部位時，受到庫倫電場作用而被減速，損失之動能以 X 光輻射散出，故其為連續光譜，其能量由零一直延伸至

入射電子所具有之能量，於光譜化學組成分析技術中，此連續 X 光譜線乃背景雜訊之主要來源。

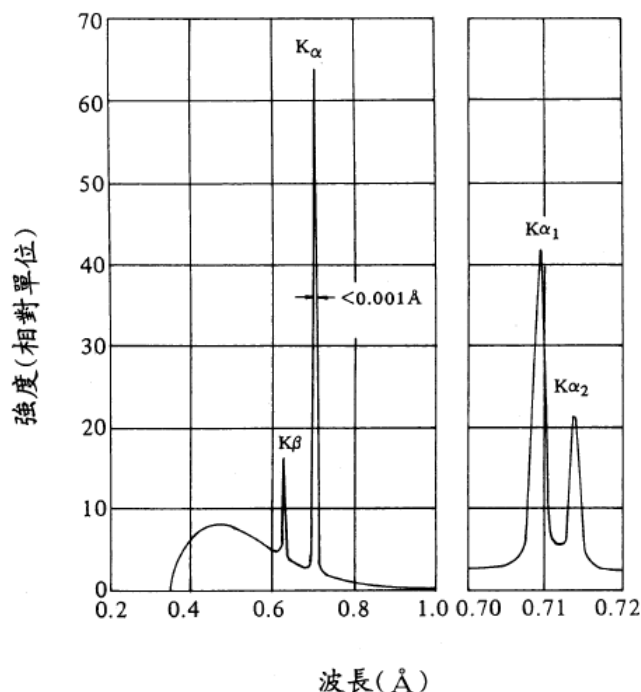


圖 2-8 連續 X 光與特徵 X 光之光譜圖。[66]

特性 X 光和歐傑電子之機制十分類似，如圖 2-9(a)所示，當原子內層電子受到外來能量源(如：電子束、離子束或者光源)激發而脫離原子時，原子之外層電子將迅速地遷降至內層所空出之軌域並釋放出兩能階差之能量。被釋出之能量可能以 X 光形式釋出，如圖 2-9(b)，由於各元素之能階差不同，因此分析此 X 光能量或波長即可鑑定試片之組成元素，或者如圖 2-9(c)，此釋出之能量轉而激發另一外層電子使其脫離原子，即為歐傑電子，此電子同樣具有代表該原子特性的能量，因此分析歐傑電子亦可得到材料的成份組成。

週期表上之各種元素經外來能量激發產生特性 X 光與歐傑電子之機率係與其原子序有關，一般說來輕元素較易產生歐傑電子，而相對的重元素則較易產生特性 X 光。特性 X 光的命名方式見圖 2-9(d)，相鄰軌域間所產生之 X 光稱為 α ，如 L 層軌域至 K 層軌域稱為 K_α ，M 層軌域至 L 層軌域為 L_α ，若相隔兩軌域間

所產生之 X 光則稱為 β ，如 M 層軌域到 K 層軌域為 K_β ，N 層軌域到 L 層軌域為 L_β ，依此類推。

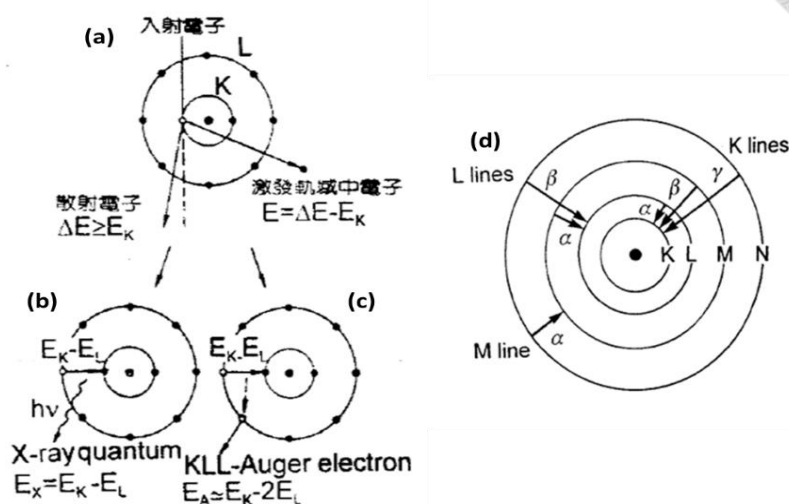


圖 2-9 高能電子與原子作用示意圖。[67]

2.3.3 X 光粉末繞射(X-ray powder diffraction; XRD)

1913 年 W. L. Bragg 父子從事晶體結構分析實驗中，由散射 X 光之分布情形，發現可將繞射現象視為入射光被晶面反射，遵守反射原理之入射角等於反射角。於某些散射角下，由相鄰晶面散射之波長彼此相位相同，光程差為波長之整數倍，因而產生建設性干涉，其公式如式 2-1，滿足此條件便可產生繞射圖譜，稱為布拉格定律。

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (2-1)$$

式中 n = 正整數。

λ = 入射波長。

d = 為晶格間距。

θ = 入射角度。

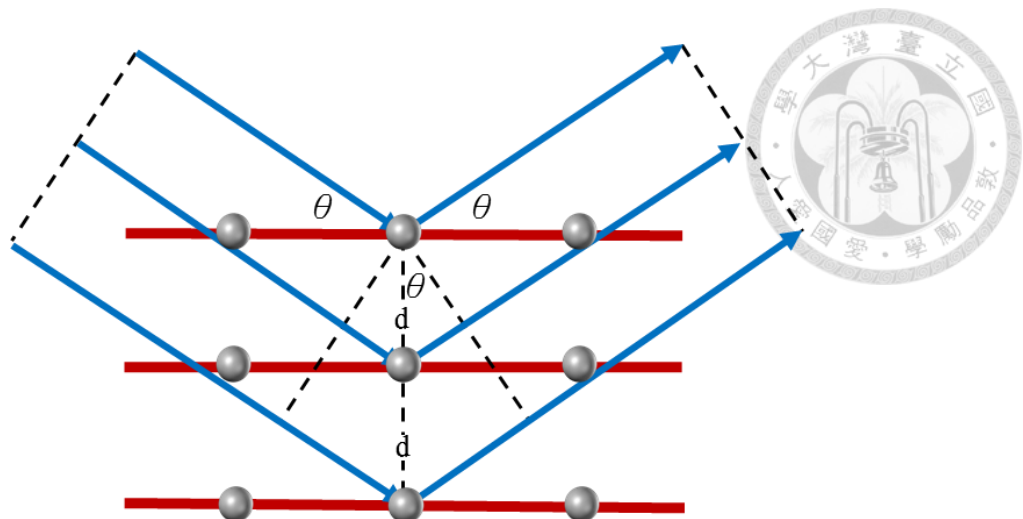


圖 2-10 X 光繞射示意圖。

不同之晶體結構晶面間距 d 會有所差異，因此會有不同組合之繞射角，繞射之發生除必須滿足布拉格條件外，亦受晶體對稱性影響，當晶胞內所含原子束不只一個時，由於原子間彼此之對稱關係，而限制某些繞射之產生，被稱為消光條件(extinction conditions)，故當近乎單色光之 X 光照射晶體時，僅於某些特定之入射角才會產生繞射波，主要是決定於晶胞之形狀、大小及對稱性。此外，晶胞內組成原子不同時，由於各原子對 X 光散射能力不同，故雖結構相同亦將造成不同之繞射強度。

基本上晶體之 X 光繞射實驗提供兩項重要訊息，一為繞射峰之位置 2θ ，二為繞射峰之強度 I ，第一項訊息提供晶體晶胞之形狀大小(晶格參數)，第二項訊息提供晶體內部組成原子種類及位置之資料。隨材料之晶體結構與組成之變化，每一晶體此兩項資料各不相同，正如人類指紋一般，因此可利用 X 光之繞射分析決定材料屬於何種晶體。

粉末繞射之原理與上述相同，但由於晶體粒徑小，於樣品中各晶體方向不固定，故所形成之繞射圖譜成環狀而非單晶時之點狀，於環上之繞射光點依然遵守布拉格定律，X 光粉末繞射之重要應用之一便是利用國際繞射資料中心(International Center for Diffraction Standard, ICDD)亦即原粉末繞射標準聯合委員

會(Joint Committee on Powder Diffraction Standard, JCPDS)所出版之粉末繞射資料檔(Powder Diffraction File, PDF)搜尋比對做晶相鑑定，目前該中心已收集六萬多組結晶物質之繞射資料。本研究所使用之粉末 X 光繞射儀為 Bruker D2 phaser Diffractometer，其外觀如圖 2-11 所示：

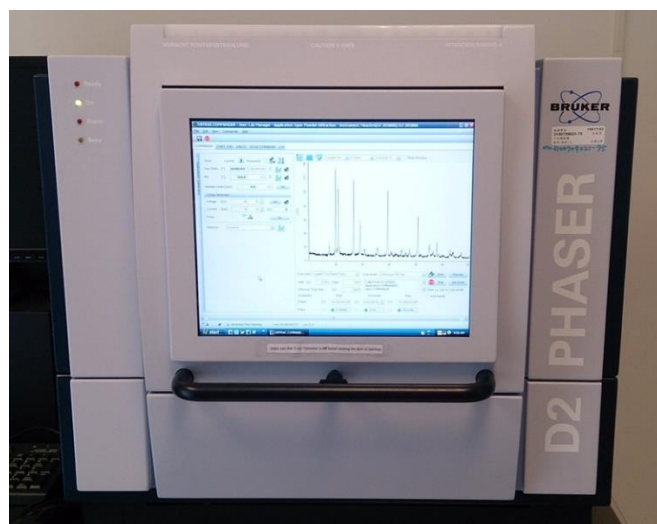


圖 2-11 本研究所使用之粉末 X 光繞射儀。

2.3.4 紫外光/可見光吸收光譜(UV/Vis absorption spectrum)

光譜儀之偵測原理乃為觀測電磁波與物質作用前後其強度之改變量，以探討其光學性質待測物之濃度與其吸收值，依照比爾定律(Beer's law)表示如下：

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc$$

式中 A = 吸光度。

I_0 = 吸收前之光強度。

I = 吸收後之光強度。

ϵ = 吸收係數(absorption coefficient)。

b = 光徑長度。

c = 待測物之濃度。

紫外光至可見光之波長為 200 至 800 nm，其能量將可激發化合物之鍵結電子或外層軌域電子，使其達較高之電子能態，故紫外光/可見光光譜又稱為電子吸收光譜。造成紫外光至可見光區吸收之電子，可分為三大類。



2.3.4.1 σ 、 π 或 n 電子之吸收

由量子化學中電子轉移之選擇律(selection rule)可知電子轉移具以下四種方式： $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 、 $n \rightarrow \sigma^*$ 、 $n \rightarrow \pi^*$ 與 $\pi \rightarrow \pi^*$ ，如圖 2-12。 σ 電子為構成單鍵之鍵結電子，其激發能態為 σ^* ，電子轉移須較高之激發量，相當於真空遠紫外光區之輻射頻率(波長 <185 nm)，大部分之化合物於此區皆具吸收，固測定紫外光/可見光光譜時僅偵測大於 185 nm 之波長。 n 電子為化合物之未鍵結電子對，具 σ^* 與 π^* 兩激發能態，其中 $n \rightarrow \sigma^*$ 之電子轉移所需之能量較 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 少，吸收波長約 150 至 200 nm，大部分之吸收峰皆小於 200 nm。 π 電子為存在於雙鍵或參鍵中 π 軌域之鍵結電子，其激發能態為 π^* ，其電子激發能量 $\pi \rightarrow \pi^*$ 與 $n \rightarrow \pi^*$ 皆位於可見光範圍(約 200 - 700 nm)，而使化合物呈色，故稱此為不飽和之吸收中心為發色團(chromophore)。

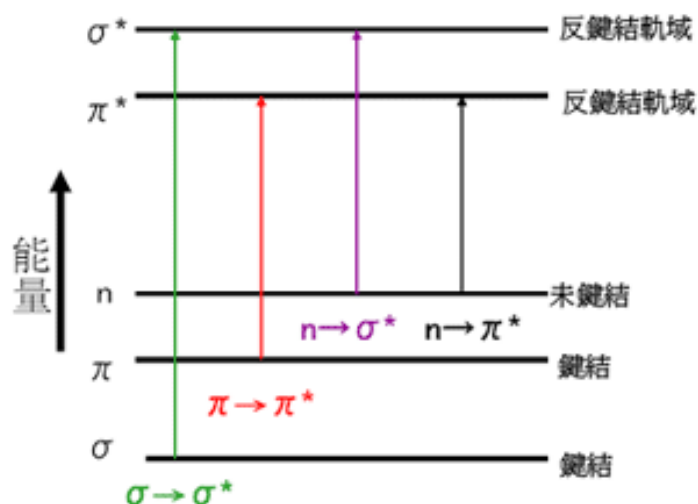


圖 2-12 紫外光/可見光之電子躍遷圖。

2.3.4.2 d 、 f 軌域電子之吸收

大部分之過度金屬離子於紫外光/可見光區具吸收現象，第一與第二過度金屬元素乃以 $3d$ 與 $4d$ 之電子激發為主，其吸收帶一般較寬且易受化學環境因素之影響。鑼系元素則以 $4f$ 與 $5f$ 為主，其吸收光譜狹長且明確之吸收峰所組成，不因配位激之不同而改變。

2.3.4.3 分子電荷轉移之吸收

此乃一分子內涉及電荷由一原子或官能基轉移至另一原子或官能基之行為，此類化合物稱為電荷轉移錯體(charge transfer complex)。錯合物吸收能量後，電子由施體(donor)轉換至受體(acceptor)，激發態為內部氧化還原之產物。本實驗所使用之紫外/可見光吸收光譜儀為 UV-1700，購買自 Shimadzu 公司，儀器外觀如圖 2-13 所示：

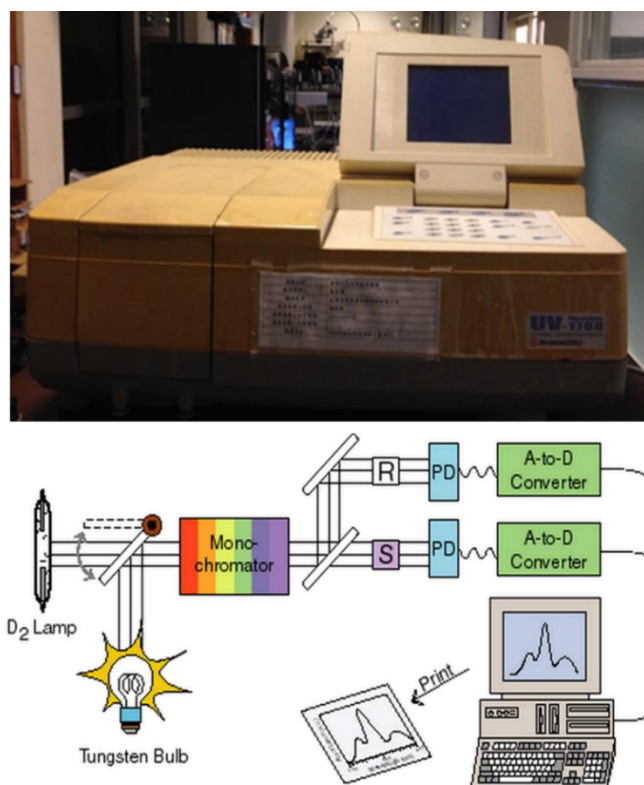


圖 2-13 本研究所使用之紫外/可見光吸收光譜儀。[68]

2.3.5 光激發放光光譜(photoluminescence spectrum; PL)

在一般溫度下，大多數分子處於基態之最低振動能級。基態之分子吸收能量(電能、熱能、化學能或光能等)後被激發為激發態。激發態迅速地釋放出能量重新躍遷回基態。若分子返回基態時以電磁輻射之形式釋放能量，即稱為放光。而放光之過程可分為螢光及磷光。

分子中都具有一系列相隔之電子能階，而相隔之電子能級中包含一系列振動能階和轉動能階。分子中電子之運動狀態除電子所處之能階外，亦包含電子之多重態，用 $M = 2S + 1$ 表示， S 為各電子自旋量子數之代數和，其數值為 0 或 1。根據 Pauli 不相容原理，分子中同一軌道所佔據之二電子必須具有相反自旋方向，即自旋配對。若分子中所有電子都是自旋配對，則 $S = 0$ 而 $M = 1$ ，該分子便處於單重態，用符號 S 表示。大多數有機化合物分子基態皆處於單重態。基態分子吸收能量後，若電子於躍遷過程中，不發生自旋方向之變化，此時仍然是 $M = 1$ ，若電子於躍遷過程中伴隨自旋方向變化，此時分子中便具有二自旋不配對的電子，即 $S = 1$ 、 $M = 3$ ，分子處於激發之參重態，用符號 T 表示。圖 2-14 為電子重態示意圖。

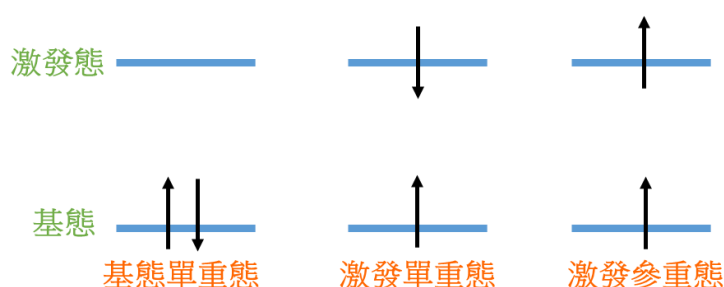


圖 2-14 單重態與參重態激發示意圖。

處於分立軌道上之非成對電子，將根據 Hund's rule 選擇平行自旋之排列以達到較穩定之狀態，因此在同一激發態中，參重態能階較單重態能階略低。圖 2-12 為能階及躍遷示意圖，其中 S_0 、 S_1 和 S_2 分別表示分子之基態、第一和第二電

子激發之單重態， T_1 和 T_2 則分別表示分子第一和第二電子激發之參重態。 $v=0, 1, 2, 3, \dots$ 表示基態和激發態之振動能階。

處於激發態之分子較不穩定，可透過輻射鬆弛(radiation relaxation)和非輻射鬆弛(non-radiation relaxation)之形式釋放出多餘能量而返回基態。輻射弛豫主要涉及到螢光，延遲螢光或磷光之放光，非輻射弛豫則以熱之形式釋放多餘能量，包括振動弛豫、內部轉移、系統間跨越及外部轉移等過程。

2.3.5.1 振動鬆弛(Vibration relaxation)

當分子吸收光輻射(圖 2-15 之 λ_1, λ_2)後可能從基態之最低振動能階($v=0$) 躍遷到激發單重態 S_n (圖 2-15 之 S_1, S_2)之較高振動能階上。隨後因液相或壓力足夠高之氣相中，分子間碰撞幾率較大，分子可將過剩之振動能量以熱之形式傳遞至周圍環境，而自身從激發態之高振動能階躍遷至該電子能階之最低振動能階上，這個過程稱為振動弛豫。發生振動弛豫之時間約為 10^{-12} 秒。

2.3.5.2 內部轉移(Internal conversion)

當較高電子能階中之低振動能階與低電子能階中之高振動能階發生重疊時，常發生電子從高電子能階以非輻射躍遷形式轉移至低電子能階。如圖 2-15 中， S_2 和 T_2 之低振動能階與 S_1 和 T_1 中之高振動能階重疊，電子可通過振動能階之重疊由 S_2 躍遷至 S_1 ，或由 T_2 躍遷至 T_1 。此過程稱為內部轉移。內部轉移時間約須 10^{-11} 秒至 10^{-13} 秒。振動弛豫及內部轉移之速率比較高激發態直接放射光子之速率快許多，故分子吸收輻射能後不管激發至任何一個激發單重態，皆能通過振動弛豫及內部轉移而躍遷到最低激發單重態之最低振動能階。

2.3.5.3 螢光(Fluorescence)

處於激發單重態之電子經振動弛豫及內部轉移後到達第一激發單重態 S_1 之最低振動能級後，以輻射形式躍遷回基態 S_0 之各振動能階，此過程稱為螢光。

由於經過振動弛豫和內部轉移之能量損失，因此螢光之能量較分子吸收之能量小，螢光之波長較分子吸收之波長要長(即 $\lambda_2' > \lambda_1, \lambda_2$)。第一激發單重態最低振動能階之平均壽命約為 10^{-9} 至 10^{-4} 秒，因此螢光壽命亦位於此一數量級。

2.3.5.4 系統跨躍(Intersystem crossing)

系統跨躍乃指不同多重態之間之非輻射躍遷過程，涉及受激發電子自旋狀態之改變。如由第一激發單重態 S_1 躍遷至第一激發參重態 T_1 ，使原來兩自旋配對之電子不再配對。此種躍遷不符合光譜選擇律，為禁制(forbidden)躍遷，但若兩能階有較大重疊時，如圖 2-15 中 S_1 之最低振動能階與 T_1 較高振動能階重疊，即有可能通過自旋軌道耦合作用實現此一躍遷。系統跨躍之速度較慢，經歷之時間較長。

2.3.5.5 磷光(Phosphorescence)

激發態之電子經系間跨躍後到達激發三重態，經過迅速之振動弛豫而躍遷至第一激發三重態之最低振動能階，隨後以輻射形式躍遷回基態之各振動能階，此過程稱為磷光。磷光發射之躍遷亦為自旋禁制(spin forbidden)，故放光速度較慢。磷光之壽命約為 10^{-4} 至 10 秒。因此當激發光源照射停止後，磷光仍可持續一段時間。由於經過系間跨躍及 T_1 中振動弛豫損失部分能量，故磷光波長比螢光波長要長，即 $\lambda_3 > \lambda_2'$ 。

值得注意的是 T_1 亦可能通過非輻射躍遷而重新回至 S_1 ，隨後再由 S_1 經輻射躍遷回 S_0 ，即發出螢光，此種螢光稱為延遲螢光，其壽命與磷光相近，但波長較磷光短。

2.3.5.6 外部轉移(External conversion)

激發態分子與溶劑分子或其它溶質分子相互碰撞，並發生能量轉移之過程稱為外部轉移。外部轉移能使螢光或磷光之強度減弱甚至消失，此現象稱為淬

滅(quench)。

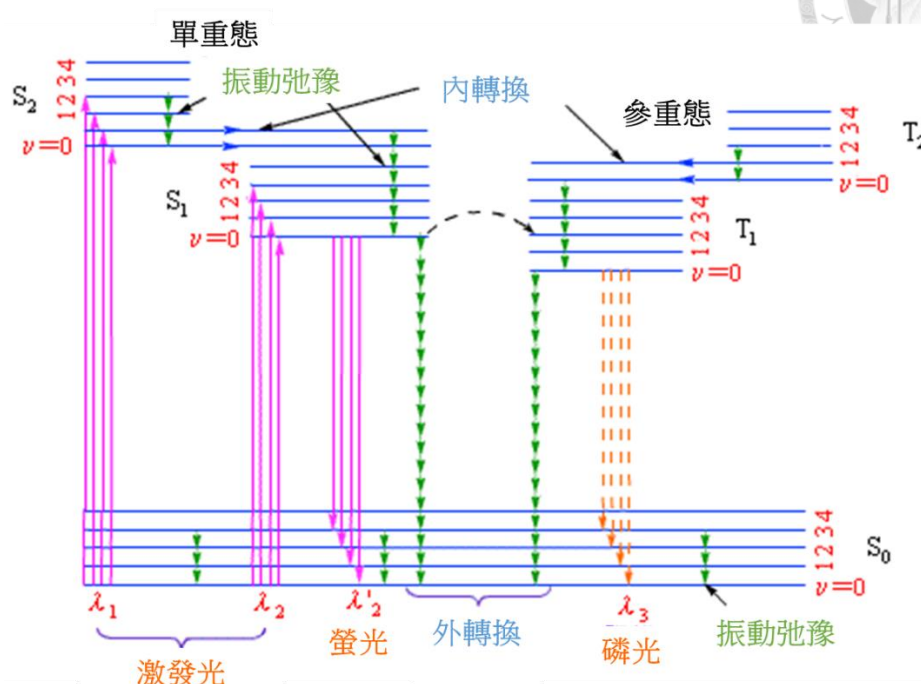


圖 2-15 螢光及磷光產生之示意圖。

2.3.6 紅外光振動光譜(Infrared spectrum; IR)

紅外線光譜學為研究某一化學分子或化學物種因吸收紅外線輻射而於某些振動模式下產生振動或轉動能量之變化，紅外線光譜涵蓋範圍為 12800 至 10 cm^{-1} ¹。可分為近、中、遠紅外線等三區域，近紅外光譜區域為 12800 至 4000 cm^{-1} ，此光譜區域可偵測分子某些振動模式(vibrational mode)之倍頻(overtone)及組合譜帶(combination band)之吸收，尤其為涉及—OH 與—NH 伸縮振動之倍頻與—CH 伸縮振動與變形振動之組合譜帶。

中紅外光譜涵蓋 4000 至 200 cm^{-1} 之範圍，此光譜區域為一般所指之紅外線光譜區域，依分子振動特性可再細分為(1)特性頻率區(characteristic group frequency region: $4000\sim 1300\text{ cm}^{-1}$)，以顯現分子之某些特性官能基之吸收頻率，(2)為於 1300 cm^{-1} 以下之指紋區(finger print region)以顯示分子結構之細微差異。

遠紅外線光譜區域則涵蓋 200 至 10 cm^{-1} 之範圍，此光譜區域可偵測分子內

涉及重原子之某些伸縮或彎曲振動(如有機金屬化合物之振動)之能量變化。^[68]紅外線光譜一般以穿透度對波數作圖，用以表示分析物對紅外光輻射吸收之情形，被吸收之輻射頻率為分子振動所吸收之能量，分子振動時，分子內各原子不斷地對其平衡位置作振動，振動模式之數目隨分子所含原子之數目而增多，且越趨複雜。若分子為線性結構，則此分子具 $3N-5$ 種基本振動模式(fundamental vibrational mode)，其中 N 表示分子所含之原子數目。若分子為非線性結構，則具 $3N-6$ 種基本振動模式，其振動模式如圖 2-16 所示：

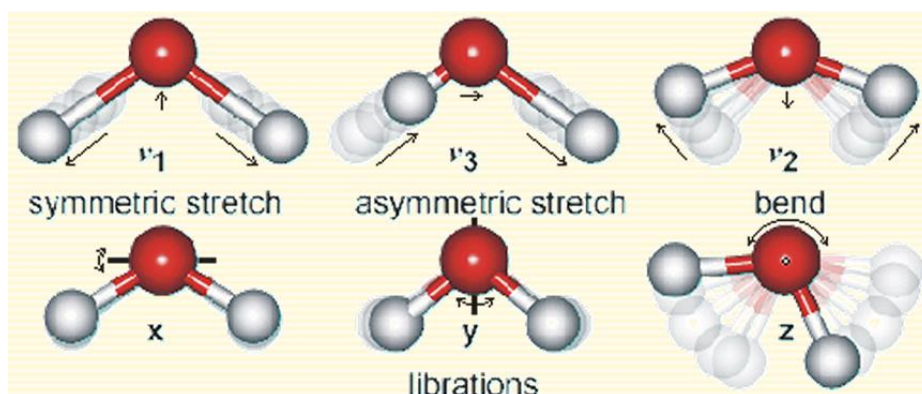


圖 2-16 分子各種振動模式。^[69]

2.3.7 雷射掃描共軛聚焦顯微鏡(Laser scanning confocal microscopy)

共軛焦(confocal)一辭，乃形容光源於接物鏡所形成之焦點，和光電倍增管 (photomultiplier tube)所偵測之光點，來自相同之物鏡焦點，亦為照明點與探測點於光學成像上共軛。利用通過光學針孔光圈(pinhole)蒐集來自樣品聚焦面之光線，將非同一聚焦面之光線排除於光學針孔光圈外，所形成之影像即稱為共軛焦點影像。共軛焦顯微鏡所觀察之影像僅為一極小亮點，而非傳統顯微鏡所觀測之二維空間影像。利用共軛焦顯微鏡內建之掃描器，可將影像由多點組成線，多線組成面，取得由點厚度所組成之單一平面影像，稱為光切片(optical sections)。光切片配合電腦輔助運算處理，可呈現出兼具高解析度與低背景雜訊之二維空間相片，或將多張同平面不同螢光探針之相片重疊，可研究其相對部位之關係，或

由一系列不同平面之相片，可組合成三維空間的立體影像，再加入時間因子，可創造出動態之 4D 影像。

LSCM 之組成如圖 2-17，其具備倒置或正立螢光顯微鏡、掃描頭(照明針孔、探測針孔、螢光濾片系統、鏡掃描系統和光電倍增管)、掃描頭控制電路、電腦與影像輸出設備。

LSCM 乃近代生物醫學影像儀器之最重要發展之一，其於螢光顯微雷射掃描裝置，使用紫外光或可見光激發螢光探針，利用電腦進行影像處理，從而得到細胞或組織內部微細結構的螢光影像，LSCM 與傳統光學顯微鏡相比優點明顯，分辨率、靈敏度、放大率與螢光檢測訊雜比皆相對提高。

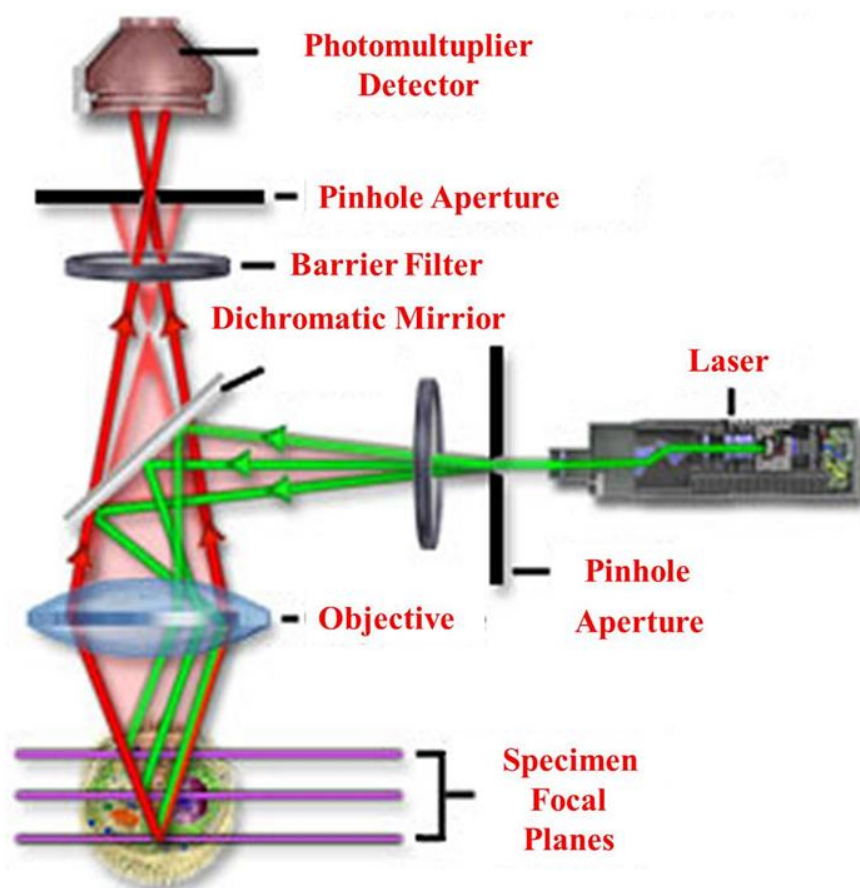


圖 2-17 雷射掃描共軛聚焦顯微鏡之儀器架構示意圖。 [70]

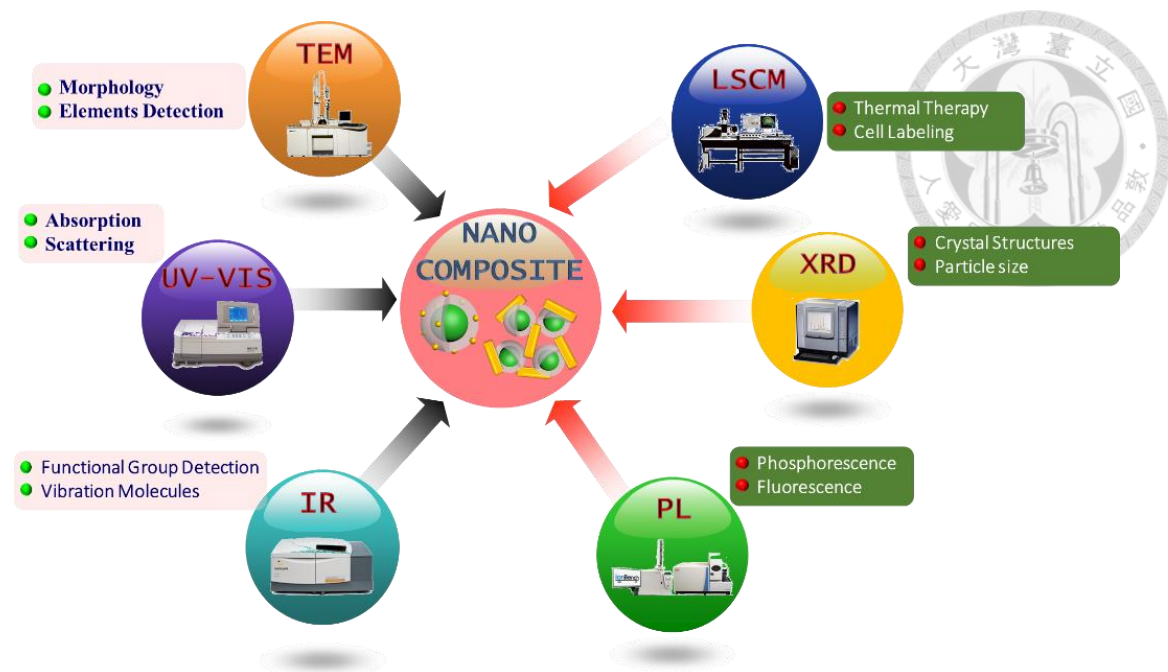


圖 2-18 本研究所使用儀器及其應用之示意圖。

第三章 結果與討論



3.1 上轉換奈米粒子之合成與鑑定

上轉換奈米粒子(upconversion nanoparticle; UCNP)所使用之材料種類繁多，表 3-1 列舉數種較常見之材料與其晶格結構及外貌形狀^[71]，其中放光效率最佳之主體晶格材料為 NaYF_4 ^[72]，故本研究所採用 NaYF_4 作為上轉換奈米粒子之主體材料，而 NaYF_4 之晶相具立方相(cubic phase; $\alpha\text{-NaYF}_4$)及六方相(hexagonal phase; $\beta\text{-NaYF}_4$)兩種，由 Wang 等人^[73]之文獻提及 $\beta\text{-NaYF}_4$ 之放光強度高出 $\alpha\text{-NaYF}_4$ 數個數量級，其原因乃為立方相之晶格堆積較六方相鬆散，使得晶格缺陷較多，而晶格缺陷易造成活化劑與敏化劑間能量傳遞之散失，致使發光效率降低。

	Samples	Crystal structure	Morphology	Application
core@shell	$\text{CeO}_2\text{Ce}_{1-x}\text{Zr}_x\text{O}_2$	cubic	hollow	catalysis
hydroxides	$\text{Ln}(\text{OH})_3$, (Ln = Y, La, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Dy, Tb, Ho, and Tm)	hexagonal	nanowires	catalysis
oxides	Ln_2O_3 , (Ln = Y, La, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Dy, Tb, Ho, and Tm)	cubic	nanowires	catalysis
	CeO_2	cubic	nanoflowers	
fluorides	$\text{NaYF}_4\text{:Ln}^{3+}$ (Ln = Eu, Yb^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Gd^{3+} , and Ce^{3+})	hexagonal	nanoparticles	biology
		cubic	nanoparticles	
	LaF_3 , CeF_3 , PrF_3 , and NdF_3	hexagonal	nanoparticles	
	SmF_3 and EuF_3	hexagonal	microparticles	
	GdF_3	orthorhombic	microparticles	



	YF ₃	orthorhombic	nanorices	
	CaF ₂ :Yb ₃₊ /Er ₃₊	cubic	nanoparticles	
	BaF ₂ :Eu ₃₊	cubic	nanoparticles	
		orthorhombic	nanorods	
orthophosphate	LaPO ₄	monoclinic	nanowires	lasers and
		hexagonal	nanorods	biology
	YPO ₄	hexagonal	nanorods	
		tetragonal	nanoparticles	
	CePO ₄	monoclinic	nanowires	
	NdPO ₄	monoclinic	nanorods	
	PrPO ₄ , EuPO ₄ , and TbPO ₄	hexagonal	nanorods	
	SmPO ₄ and GdPO ₄	hexagonal	nanowires	
	DyPO ₄ and LuPO ₄	tetragonal	nanoparticles	
orthovanates	LnVO ₄ (Ln = Y and lanthanides)	tetragonal	nanosheets	solar cells and biology

表 3-1 不同上轉換奈米材料之晶格結構與外貌形狀。[71]

3.1.1 上轉換奈米粒子之 XRD 圖譜

圖 3-1 顯示上轉換奈米粒子以 XRD 鑑定之圖譜，本研究所合成之上轉換奈米粒子之特徵繞射峰與 β -NaYF₄ 之標準圖譜(JCPDS 16-0334)相同，於 30°處之兩根繞射峰分別對應於 β -NaYF₄ 晶相中(110)與(101)之晶面，於 43°之繞射峰為(201)之晶面，55°處之標準圖譜具兩根繞射峰，然 XRD 圖譜中僅顯示一根繞射峰之原因乃為奈米粒子粒徑較小，而造成寬化(broaden)效應使兩根繞射峰重疊，此兩根繞射峰分別對應於(300)與(211)之晶面，除上述強度較強之特徵繞射峰外其餘之繞射峰亦與標準圖譜之繞射峰相符，故可判定本研究所合成之上轉換奈米粒子為六方晶相之 NaYF₄。

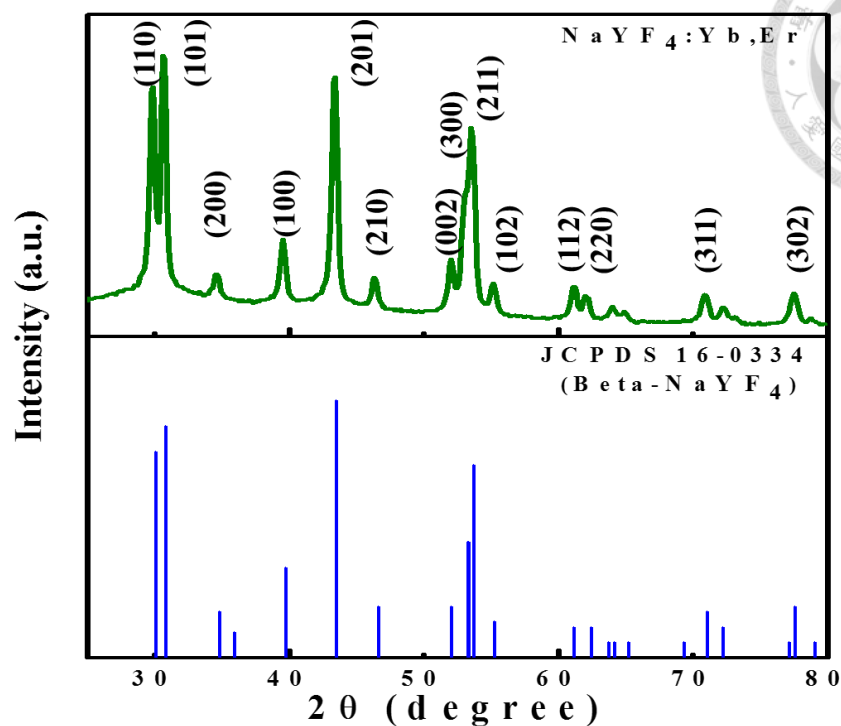


圖 3-1 上轉換奈米粒子之 XRD 圖譜。

3.1.2 上轉換奈米粒子之 TEM 影像

由圖 3-2(a)之影像可觀察本研究所合成之上轉換奈米粒子於寬廣視野下呈現單顆均勻分散，並無聚集之現象發生。於圖 3-2(b)較大倍率之影像可觀察上轉換奈米粒子皆呈現均勻之圓球狀，並無尺寸不一之情形。圖 3-2(c)為 HR-TEM 之影像，可觀察上轉換奈米粒子之直徑約為 20 nm，且具明顯之晶面排列。進一步放大倍率，如圖 3-2(d)及其左上角之插圖，可觀察上轉換奈米粒子之晶面距離(d-spacing)為 0.258 nm，與 β-NaYF₄ 晶格中之晶面間距(200)相符，進一步驗證上述 XRD 鑑定為 β-NaYF₄ 之結果。

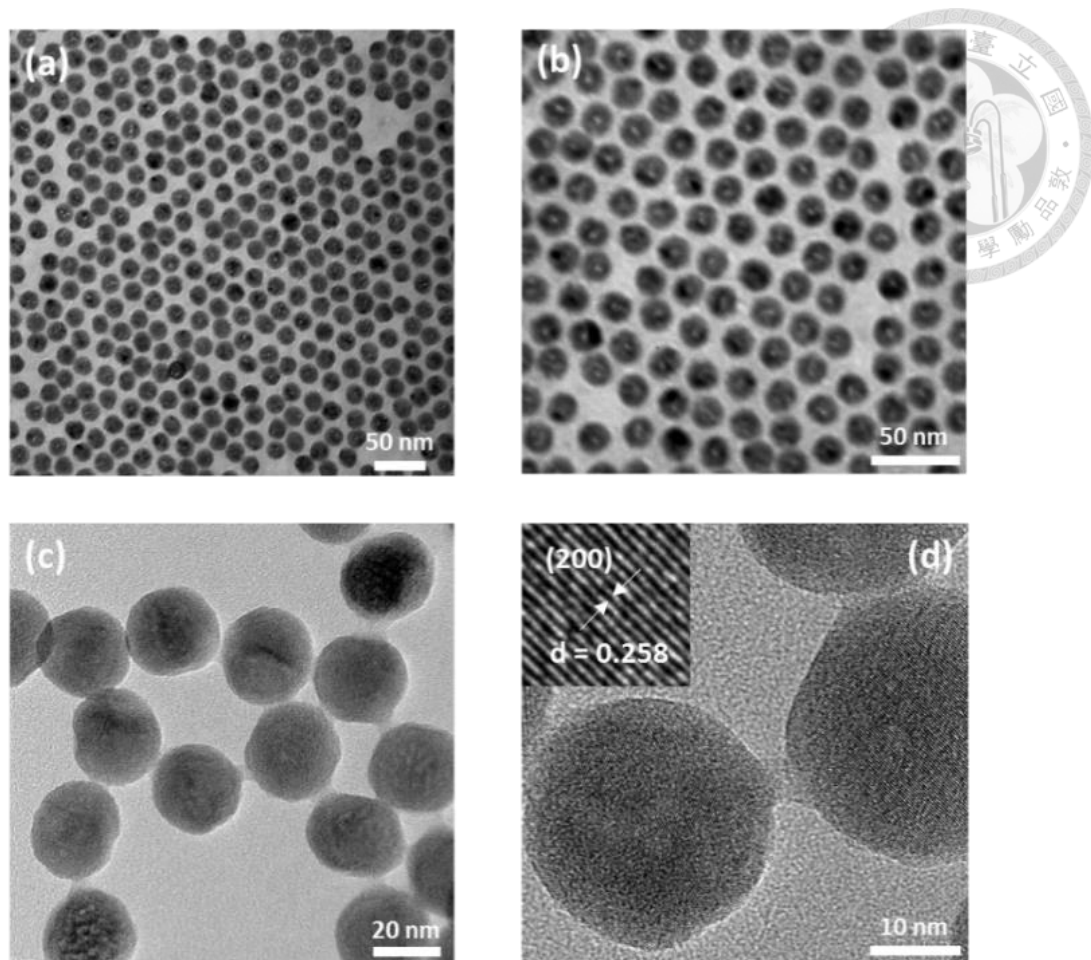


圖 3-2 上轉換奈米粒子之 TEM 影像。

3.1.3 上轉換奈米粒子之 PL 光譜

由於本研究所合成之上轉換奈米粒子為 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ ，所摻入之敏化劑為 Yb^{3+} ，活化劑為 Er^{3+} ，其能量轉移與能階示意圖如圖 1-9，可發現於 Yb^{3+} 、 Er^{3+} 之能量傳遞系統中， Er^{3+} 共具四道特性放光，能量由高至低分別為 $^2\text{H}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ 、 $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ 、 $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ 與 $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ ，此四道特性放光可藉由光激發放光光譜量測而得。如圖 3-3，本研究所合成之上轉換奈米粒子亦具有四道特性放光之波長位置，且其能量與 Er^{3+} 之能階差能量相互匹配，首先位於 408 nm 處之放光為 $^2\text{H}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ 所放出之光子造成，其次 $^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ 放出之光子能量位於 522 nm，而 $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ 所放出之光子則位於 540 nm，最後 654 nm 處之放光為 $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ 所放出之光子造成，由此可知，本研究所合成之上轉換奈米粒子確實摻雜

Yb^{3+} 與 Er^{3+} 做為其發光來源。圖 3-3 之左上角插圖為上轉換奈米粒子受 980 nm 雷射激發所呈現之顏色，由光圖譜可發現位於綠光波段(495 nm-570 nm)之放光強度較強，故於肉眼所呈現綜合之顏色為綠色。

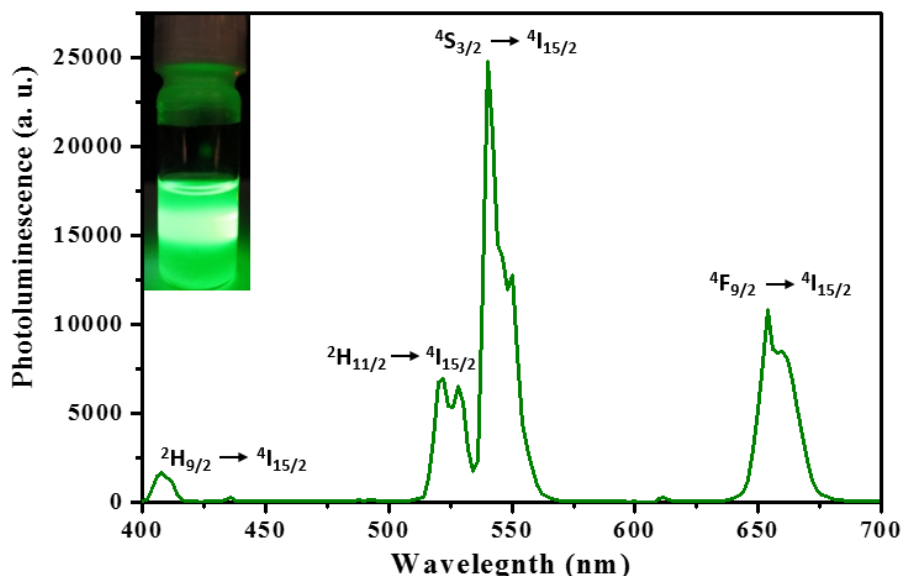


圖 3-3 上轉換奈米粒子於光激發放光之圖譜。

3.2 金奈米粒子之合成與鑑定

3.2.1 球狀金奈米粒子之 UV/Vis 吸收光譜

球狀金奈米粒子之表面電漿共振峰將因其尺寸大小不同而有所位移，如圖 1-5(a)，表面電漿共振峰之位置將隨顆粒增大而隨之紅位移，為與所合成之上轉換奈米粒子特性放光匹配，故本研究所合成球狀金奈米粒子之表面電漿共振峰位於 540 nm 處，其大小約為 3.5 nm，其紫外光/可見光吸收之圖譜與上轉換奈米粒子之光激發放光圖譜疊合如圖 3-4，於圖中可觀察金奈米粒子之表面電漿共振峰確實與上轉換奈米粒子於綠光波段之 522 nm 及 540 nm 處之特性放光相互匹配，因此球狀金奈米粒子可藉由上轉換奈米粒子於此波段之特性放光所提供之光子產生表面電漿共振，進而導致光熱轉換產生熱能提供後續光熱治療之應用。

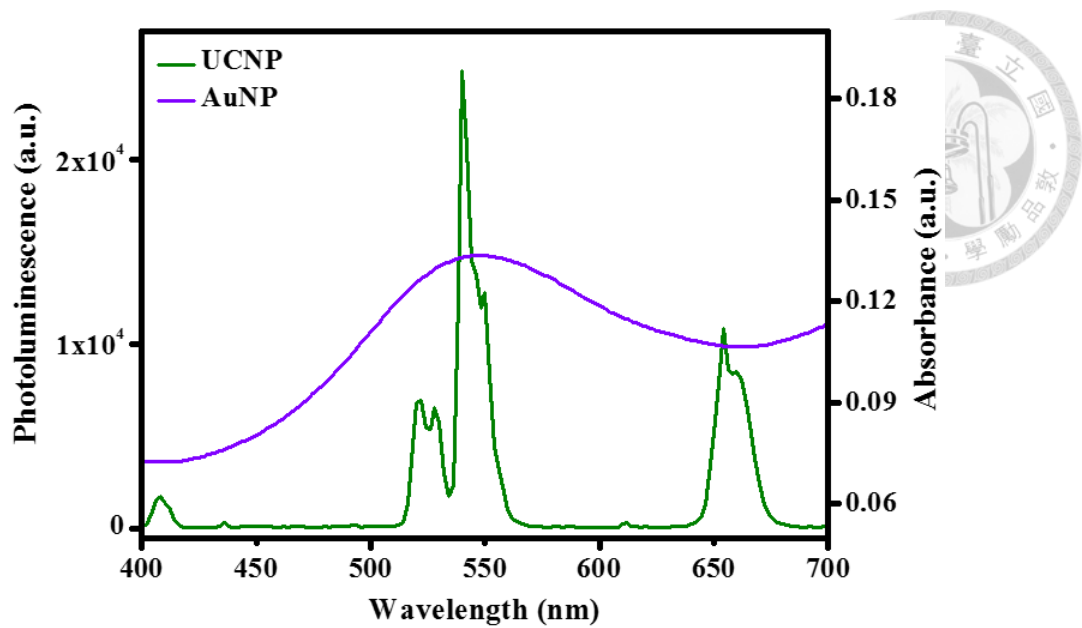


圖 3-4 球狀金奈米粒子之表面電漿共振峰與上轉換奈米粒子放光之疊合圖。

3.2.2 棒狀金奈米粒子之成長機制

本研究所採用之棒狀金奈米合成法為晶種合成法，其合成過程可分為兩大步驟，首先以硼氫化鈉還原四氯金酸形成晶種並加入介面活性劑 CTAB 作為保護劑，以穩定晶種避免聚集。其次為加入硝酸銀與還原劑抗壞血酸於含四氯金酸之 CTAB 溶液中，於晶種表面進行還原，最後成長為棒狀金奈米粒子。

溶液中之介面活性劑 CTAB 以類似磷脂之雙層結構吸附於金奈米棒之表面，不僅作為保護劑，亦扮演控制晶種成長方向之角色，如圖 3-5，CTAB 所形成之雙層結構附著於金奈米粒子之(110)晶面，進而限制金奈米粒子於此方向之成長，最終成長為棒狀金奈米粒子。

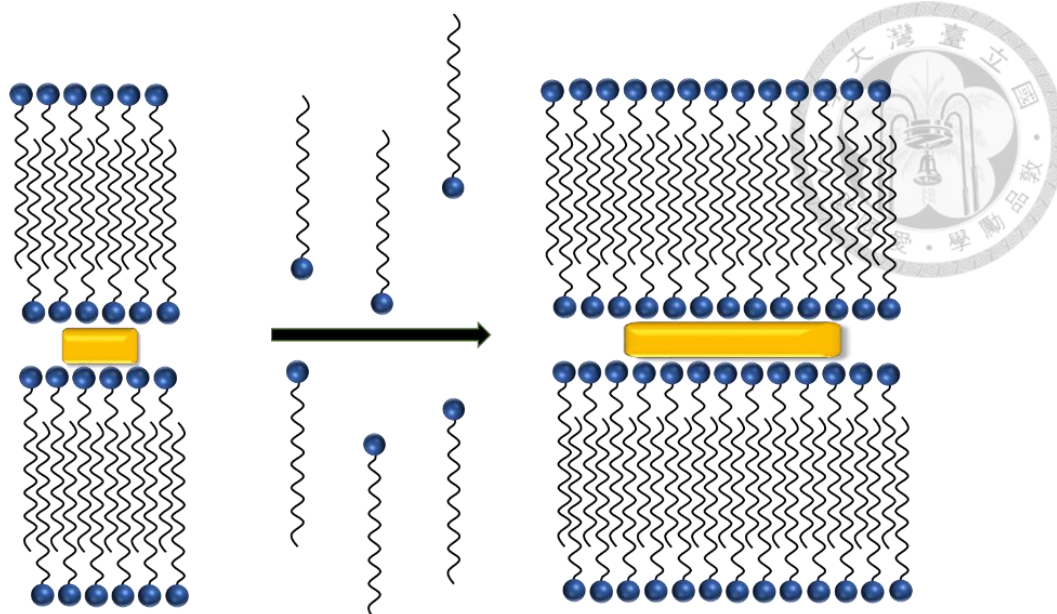


圖 3-5 棒狀金奈米粒子成長示意圖。

3.2.3 棒狀金奈米粒子之 UV/Vis 吸收光譜

本研究調整金奈米粒子晶種與硝酸銀間不同之比例以調控棒狀金奈米粒子之長度，藉由固定四氯金酸、抗壞血酸與硝酸銀之比例僅調整晶種所加入之含量即可得不同徑長比之棒狀金奈米粒子，由圖 3-6 之紫外可見光吸收光譜，可發現隨徑長比增大其長軸之表面電漿共振峰亦隨之紅位移。

Au NR-1 為加入 0.2 mL 之晶種溶液，其長軸表面電漿共振峰位於 644 nm 處；Au NR-2 為加入 0.5 mL 之晶種溶液，其長軸表面電漿共振峰位於 684 nm 處；Au NR-3 為加入 1.0 mL 之晶種溶液，其長軸表面電漿共振峰位於 710 nm 處；Au NR-4 為加入 2.0 mL 之晶種溶液，其長軸表面電漿共振峰位於 762 nm 處；Au NR-5 為加入 3.0 mL 之晶種溶液，其長軸表面電漿共振峰位於 790 nm 處。

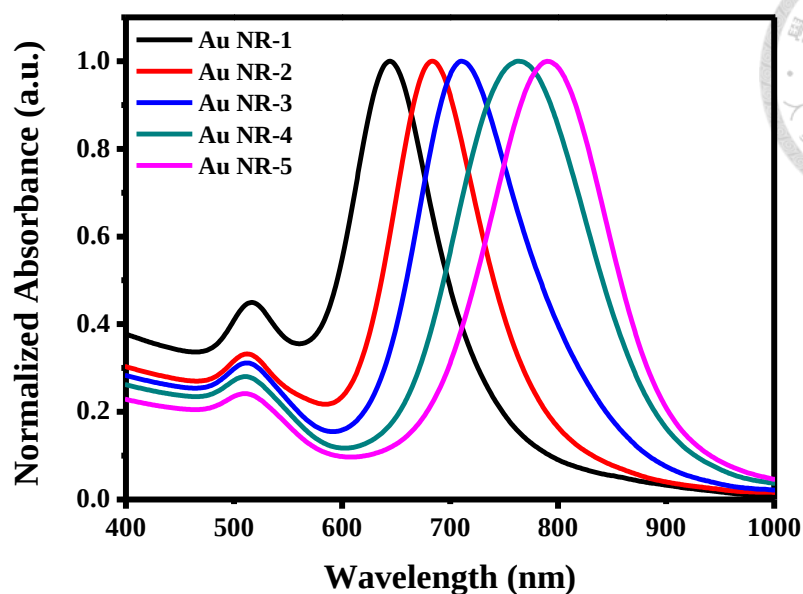


圖 3-6 不同徑長比之棒狀金奈米粒子其表面電漿共振峰。

由於上轉換奈米粒子於紅光波段之特性放光位於 654 nm 處，故本研究選用與其特性放光匹配之棒狀金奈米粒子 Au NR-1 如圖 3-7，藉由上轉換奈米粒子所放出之光子提供棒狀金奈米粒子行表面電漿共振之能量，進而轉換為熱能提供光熱治療之熱量來源。

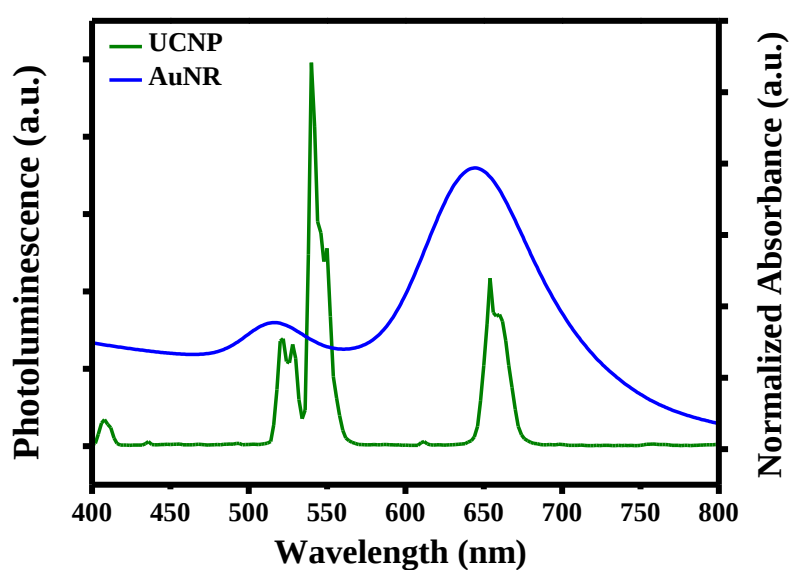


圖 3-7 棒狀金奈米粒子之表面電漿共振峰與上轉換奈米粒子放光之疊合圖。

3.2.4 棒狀金奈米粒子之 TEM 影像

棒狀金奈米粒子 Au NR-1 之 TEM 影像如圖 3-8，可觀測其長軸約為 40 nm，短軸約為 15 nm，徑長比為 2.6，且皆均勻分散於水溶液中並無聚集之現象。

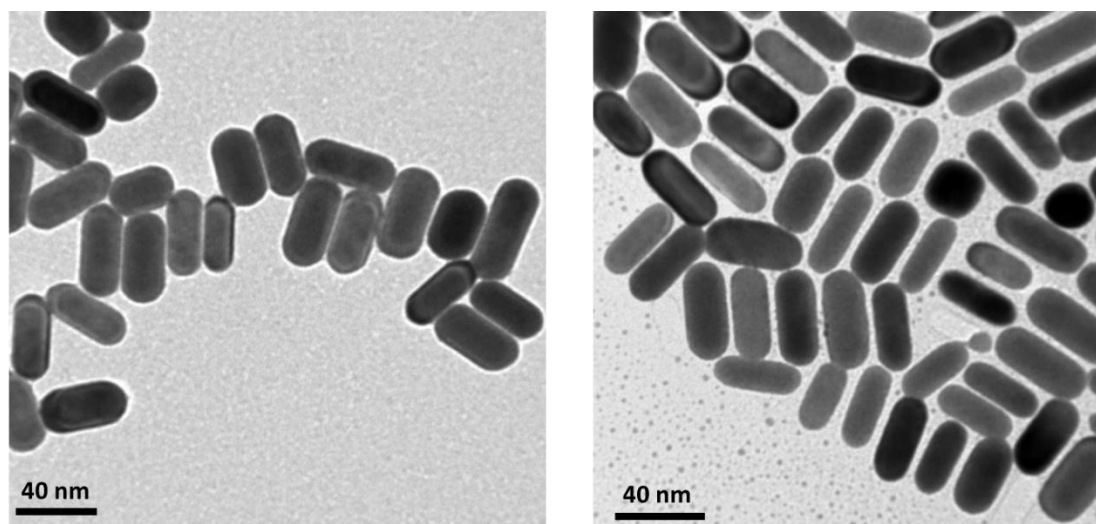


圖 3-8 棒狀金奈米粒子之 TEM 影像。

3.3 奈米複合材料之合成與鑑定

利用油相合成法所合成上轉換奈米粒子，其表面具油相之配位基，若後續欲應用於生醫領域，須將其表面之配位基進行置換或再修飾，使上轉換奈米粒子可均勻分散於水溶液中，以利往後於體外(*in vitro*)或體內(*in vivo*)之各種測試，因此上轉換奈米粒子之表面修飾乃成為一關鍵之重點。

上轉換奈米粒子之相轉換(phase transfer)修飾方法及種類如表 3-2 所示，配位基置換法(ligand exchange)乃利用配位基與奈米粒子間結合能力或特殊之選擇性將表面之油相官能基置換為親水之官能基。配位基氧化法(ligand oxidation)則利用有機化學反應，氧化奈米粒子表面具有雙鍵之油酸，形成羧基(carboxylic group)或其他親水官能基。聚合物包覆法(polymer encapsulation)乃利用具有親水與親油端之聚合物，使奈米粒子表面之油相官能基與聚合物之親油端以疏水作用

力結合，而親水端將會環繞於奈米粒子之表面以增加其水溶性。二氧化矽包覆法(SiO₂ encapsulation)之作法則為將矽酸已脂與氨水反應，使其奈米粒子表面成長為二氧化矽殼層結構，包覆原本之油相官能基，並於表面產生羥基(hydroxyl group)提高水溶性。

表面修飾之方法	上轉換奈米粒子組成與其修飾之分子	參考文獻
ligand exchange	NaGdF ₄ :Ho,Yb@PAA poly(acrylic acid); PAA	[74]
ligand oxidation	mPEG-LaF ₃ :Yb,Er polyethylene glycol monomethyl ether; mPEG	[75]
polymer encapsulation	SOC-NaYF ₄ :Yb,Er N-succinyl-N-octyl chitosan; SOC	[76]
SiO ₂ encapsulation	NaYF ₄ :Yb,Er Tetraethyl orthosilicate (TEOS)	[63]

表 3-2 上轉換奈米粒子表面修飾之方法。

3.3.1 以甲殼素修飾奈米複合材料之合成與鑑定

甲殼素亦稱為幾丁質，為一含胺基(amine group)之多醣類物質，由於甲殼素之高穩定性、高生物相容性與高生物降解性，故常被用作於奈米粒子之穩定劑，且其易進行官能基修飾，基於以上之優點，本研究將甲殼素進行羧基(carboxylic group)化之修飾以提高其水溶性並將羧基化之甲殼素修飾於上轉換奈米粒子之表面。

由圖 3-9 之 IR 振動光譜可觀察，未修飾羧基之甲殼素於 3100 cm⁻¹ 至 3500 cm⁻¹ 處具寬帶吸收，此吸收乃因甲殼素分子本身之羥基與氨基造成，而位於 2800 cm⁻¹ 至 2900 cm⁻¹ 之吸收則為碳氫鍵之振動所導致。羧基化甲殼素之 IR 振動光譜

可發現於 1700 cm^{-1} 處具相當明顯之吸收，此吸收為羧基之 $\text{C}=\text{O}$ 雙鍵振動所造成，而羧基化後亦使甲殼素分子之羥基增加，導致於 3100 cm^{-1} 至 3500 cm^{-1} 處之寬帶吸收具增強效果，因此由 IR 振動光譜可推論羧基確實修飾於甲殼素分子上。

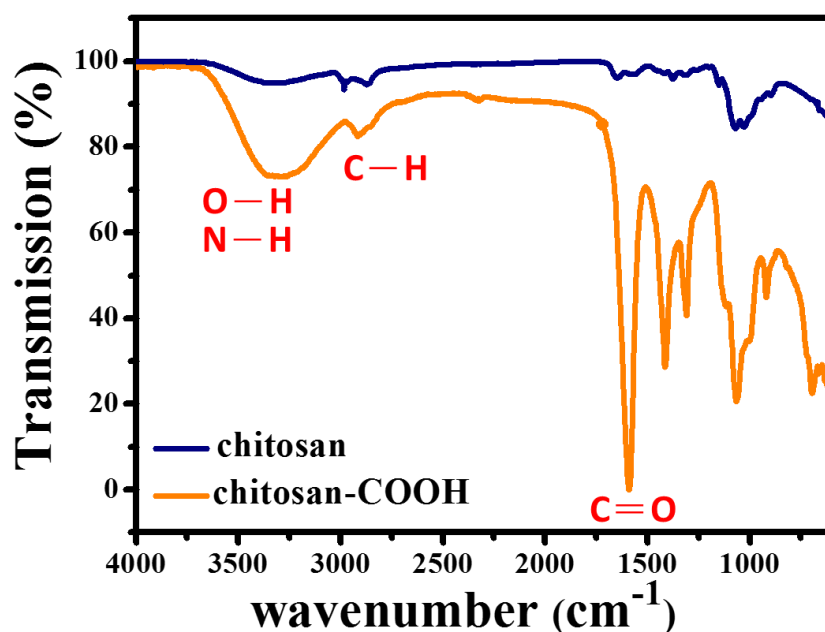


圖 3-9 羧基化前後之甲殼素 IR 光譜。

以甲殼素修飾之奈米複合材料製備流程如圖 3-10，其作法與上述之聚合物包覆法略有差別，於甲殼素包覆之前，先以鹽酸將上轉換奈米粒子進行酸洗，此步驟可除去 UCNP 表面多餘之油酸，避免油酸導致細胞毒性造成細胞死亡而影響生物實驗結果。隨後加入羧基化之甲殼素，利用甲殼素之羧基端與上轉換奈米粒子表面之銅系金屬之螯合能力，將甲殼素修飾於上轉換奈米粒子之表面。

隨後進行金奈米粒子之修飾，本研究所合成之球狀金奈米粒子(Au nanoparticle; Au NP)其表面保護劑為檸檬酸，檸檬酸為三元酸分子，故可利用甲殼素本身之胺基與檸檬酸羧基之鍵結能力，將球狀金奈米粒子修飾於上轉換奈米粒子表面。

棒狀金奈米粒子(Au nanorod; Au NR)之保護劑為 CTAB，棒狀金奈米粒子合成後，可透過多次離心清洗，降低附著於棒狀金奈米粒子表面之 CTAB 濃度，隨

後甲殼素可利用本身之胺基藉由共價鍵結將棒狀金奈米粒子修飾於上轉換奈米粒子表面。

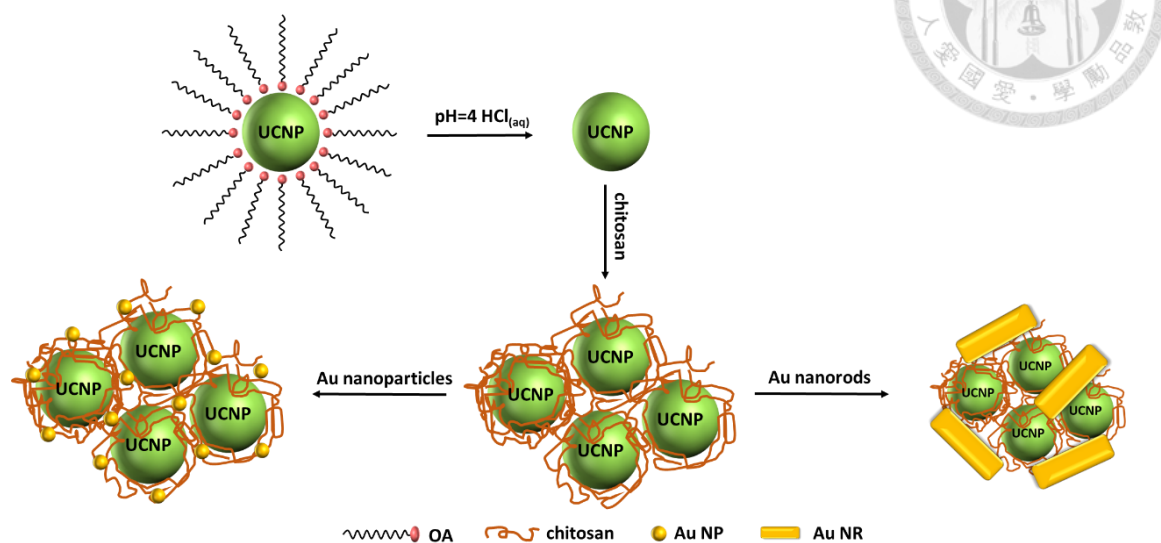


圖 3-10 甲殼素修飾之奈米複合材料合成示意圖。

3.3.1.1 以甲殼素修飾奈米複合材料之 TEM 影像

經上述之合成步驟後，於電子顯微鏡下觀察所合成之奈米複合材料如圖 3-11，可發現經甲殼素修飾之上轉換奈米粒子其大小約為 20 nm，於水相中均呈現單顆之均勻分散，並無團聚之情形發生，圖 3-11(a)顯示球狀金奈米粒子確實連接於上轉換奈米粒子之表面，且分布相當均勻，圖 3-11(b)為加入較多之球狀金奈米粒子，可發現其分布較為密集，圖 3-11(c)則為高解析電子顯微鏡之成像圖，可觀察球狀金奈米粒子之大小約為 5 nm，進一步放大觀察可發現其具良好之結晶性，經計算後可得晶面間距為 0.2 nm，可對應於金奈米粒子之(200)晶面，進一步證實確實為金奈米粒子，於圖 3-11(d)可觀察棒狀金奈米粒子之短軸約為 15 nm，長軸長約為 40 nm，藉由甲殼素修飾於上轉換奈米粒子後，與原先之形貌並無差別。

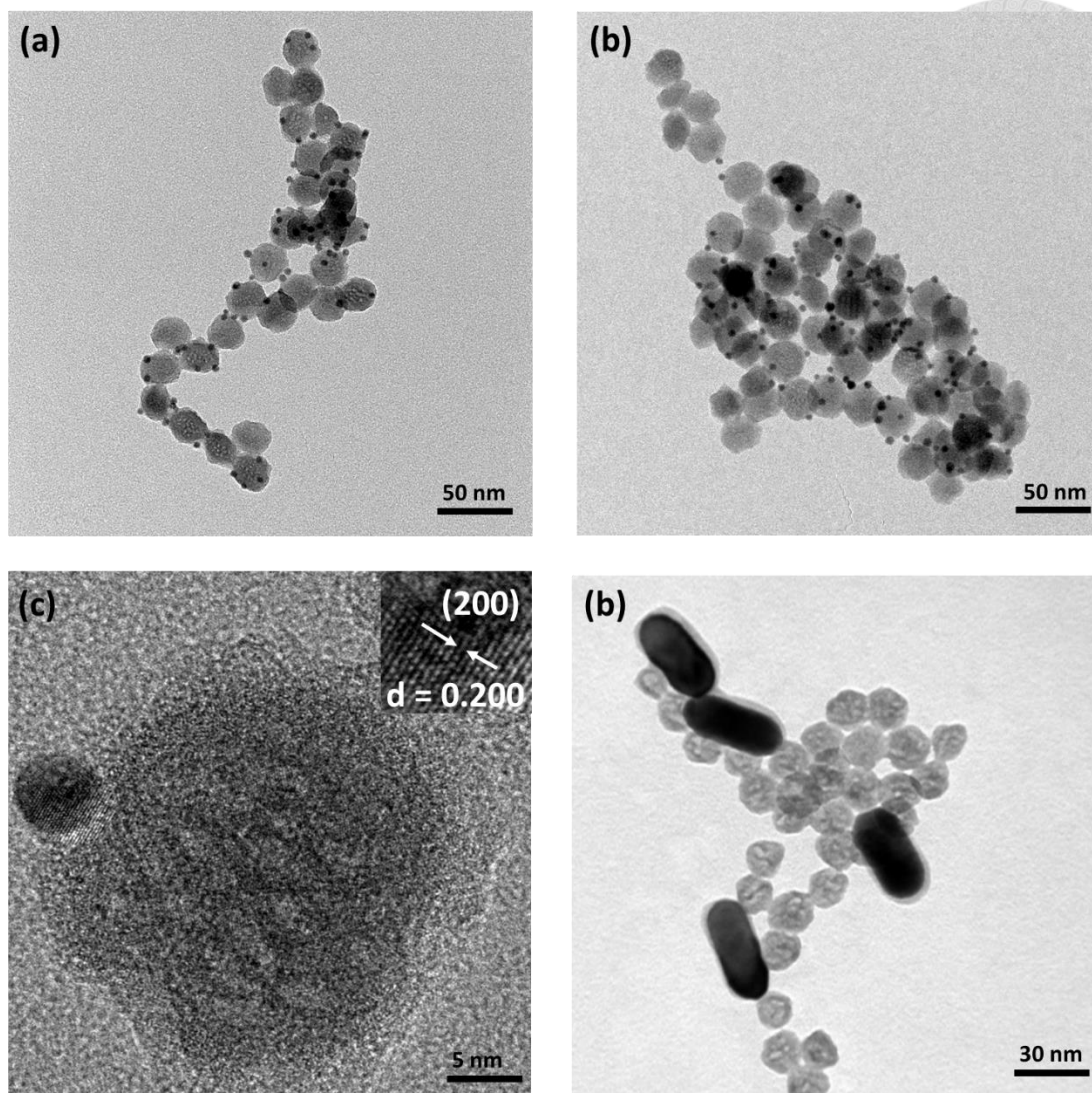


圖 3-11 以甲殼素修飾之奈米複合材料 TEM 影像。

3.3.1.2 以甲殼素修飾奈米複合材料之特性放光圖譜

將球狀金奈米粒子利用甲殼素修飾於上轉換奈米粒子(UCNP@chi-AuNP)之 PL 光譜圖如圖 3-12，而修飾棒狀奈米粒子(UCNP@chi-AuNR)之 PL 光譜如圖 3-13，於兩圖中皆可發現無論修飾何種金奈米粒子，皆造成上轉換奈米粒子放光強度大幅下降，此現象於 Saboktakin 等人^[77]之研究中亦有所提及，此篇參考文獻將上轉換奈米粒子與金、銀金屬奈米粒子鋪灑於基板上，若其間為直接接觸，將造成螢光淬滅之結果，原因乃為處於激發態之鐳系離子欲回至基態能階時，所放出之電子過度接近金屬表面之電子所造成之電場影響，無法順利回至基態，而造成

放光效率下降。於此篇參考文獻中，亦提及須透過添加一介電物質於上轉換奈米粒子與金屬奈米粒子之間，避免上述之情形發生。

於本研究中亦發生螢光淬滅之現象，推測其原因為甲殼素修飾之上轉換奈米粒子表面之厚度僅為分子鍵長短之大小，使得上轉換奈米粒子與金奈米粒子之距離過近，使得金奈米粒子之電場影響上轉換奈米粒子放光機制，導致鐳系離子之電子無法順利由激發態回至基態。

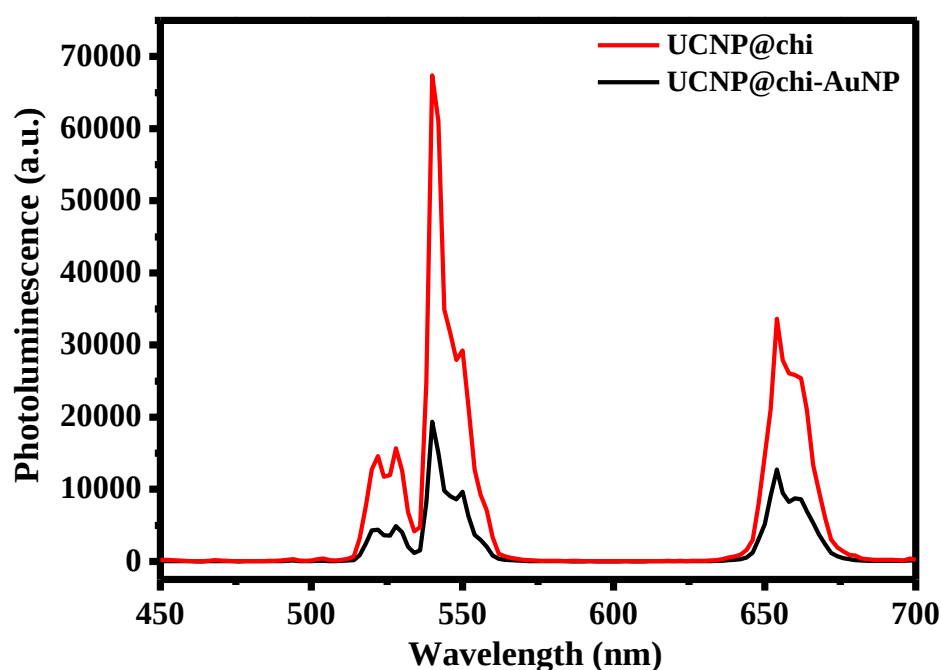


圖 3-12 球狀金奈米粒子以甲殼素連接於上轉換奈米粒子之放光光譜。

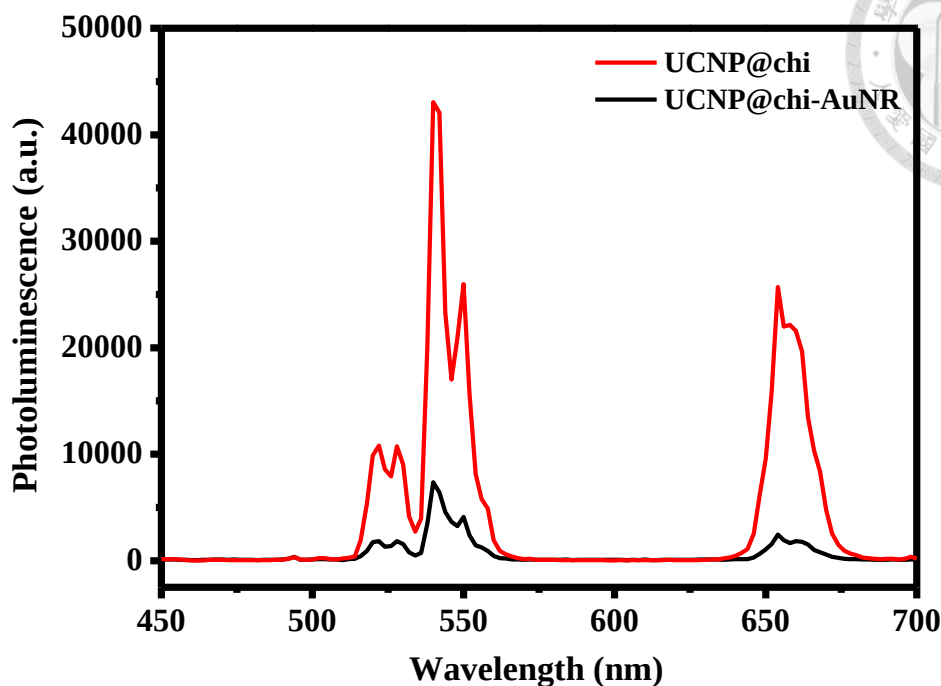


圖 3-13 棒狀金奈米粒子以甲殼素連接於上轉換奈米粒子之放光光譜。

為避免上轉換奈米粒子發生螢光淬滅而造成其放光強度降低，本研究選擇於上轉換奈米粒子表面修飾二氧化矽殼層，二氧化矽殼層具備厚度可調控性、表面易於官能基化與高生物相容性之優點，因此希望藉由包覆二氧化矽於上轉換奈米粒子表面，增加金奈米粒子與上轉換奈米粒子間之距離，避免金奈米粒子之電場影響上轉換奈米粒子之放光強度。

3.3.2 以二氧化矽修飾奈米複合材料之合成與鑑定

二氧化矽殼層包覆於上轉換奈米粒子之流程如圖 3-14，首先將具有親油端與親水端之聚合物 CO-520 加入環己烷中，待其形成微胞之形態後加入之上轉換奈米粒子，上轉換奈米粒子將被包覆於微胞中，隨後加入氨水與 TEOS，使 TEOS 進行水解反應形成二氧化矽殼層結構，而二氧化矽殼層之厚度可藉由加入 TEOS 之多寡調控。

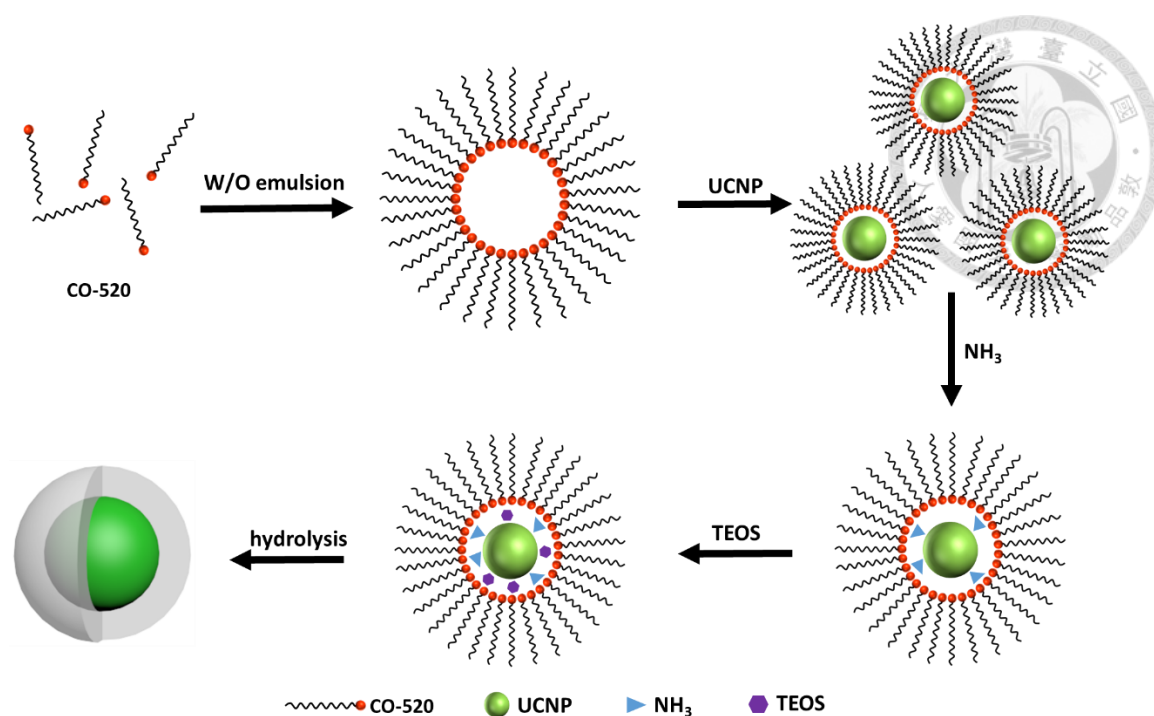


圖 3-14 二氧化矽包覆上轉換奈米粒子之流程示意圖。

3.3.2.1 以二氧化矽修飾奈米複合材料之 TEM 影像

圖 3-15(a)為寬廣視野下所呈現之 TEM 影像，可發現二氧化矽殼層皆均勻包覆於上轉換奈米粒子之表面，彼此之間並無交連或者聚集之現象，且皆以單顆均勻分散於水相中。圖 3-15(b)為加入 20 μL TEOS 反應之結果，經過計算後二氧化矽殼層之平均厚度為 $3 \pm 0.5 \text{ nm}$ ，圖 3-15(c)為加入 30 μL 之 TEOS，其殼層厚度經計算後為 $5 \pm 0.8 \text{ nm}$ ，圖 3-15(d)為加入 40 μL 之 TEOS，經計算後其殼層平均厚度為 $6 \pm 0.5 \text{ nm}$ 。

經由 TEM 影像鑑定，可得知藉由加入不同體積之 TEOS 可調控二氧化矽殼層之厚度，隨加入之 TEOS 體積越多，二氧化矽殼層之厚度亦隨之增大，其原因乃為 TEOS 分子藉由水解之過程逐漸成長於奈米粒子表面，因此控制 TEOS 量之多寡乃為控制二氧化矽殼層厚度之關鍵步驟。

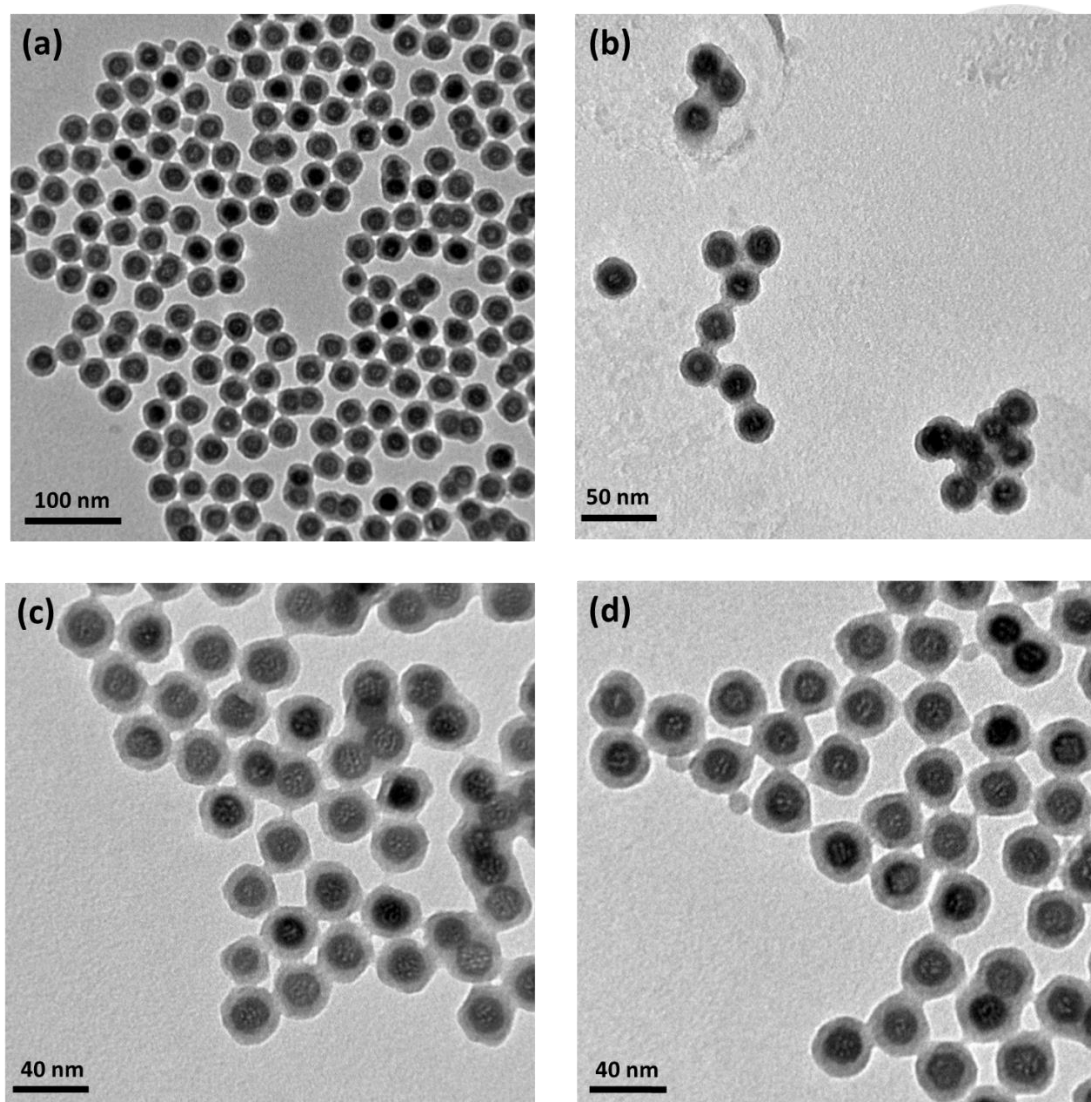


圖 3-15 上轉換奈米粒子包覆不同厚度二氧化矽殼層之 TEM 影像

包覆二氧化矽於上轉換奈米粒子表面後，須修飾胺基以將金奈米粒子連接於其表面，其流程如圖 3-16 所示。首先加入具胺基之矽烷基 APTES 將二氧化矽殼層胺基化，胺基之功能與上述甲殼素所具有之功能相同，作為與金奈米粒子連接之官能基。二氧化矽殼層胺基化後，分別加入球狀及棒狀金奈米粒子，即可將其修飾於上轉換奈米粒子之表面。

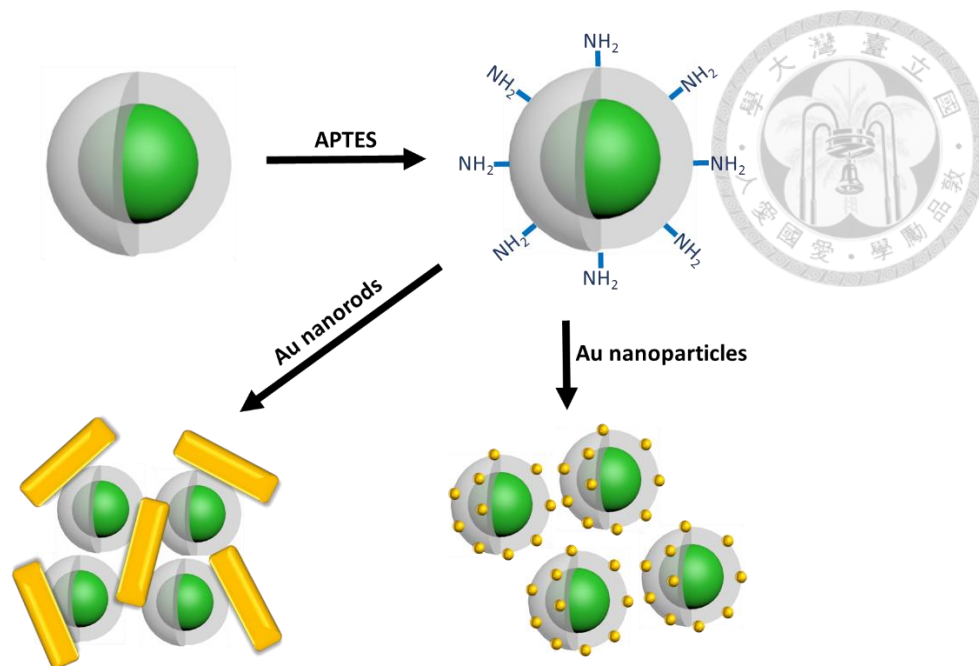


圖 3-16 胺基化之二氧化矽修飾奈米複合材料合成示意圖。

圖 3-17 為金奈米粒子修飾於上轉換奈米粒子之 TEM 影像，由圖中可觀察二氧化矽殼層胺基化後形貌並無改變，依然均勻包覆於上轉換奈米粒子之表面，於圖 3-17(a)、(b)可發現球狀金奈米粒子藉由胺基之連接，均勻分布於二氧化矽殼層表面，且並無聚集之現象，由圖 3-17(d)、(c)可觀察棒狀金奈米粒子亦可藉由胺基化之二氧化矽殼層修飾於上轉換奈米粒子表面，且棒狀金奈米粒子間並無聚集之情形發生。

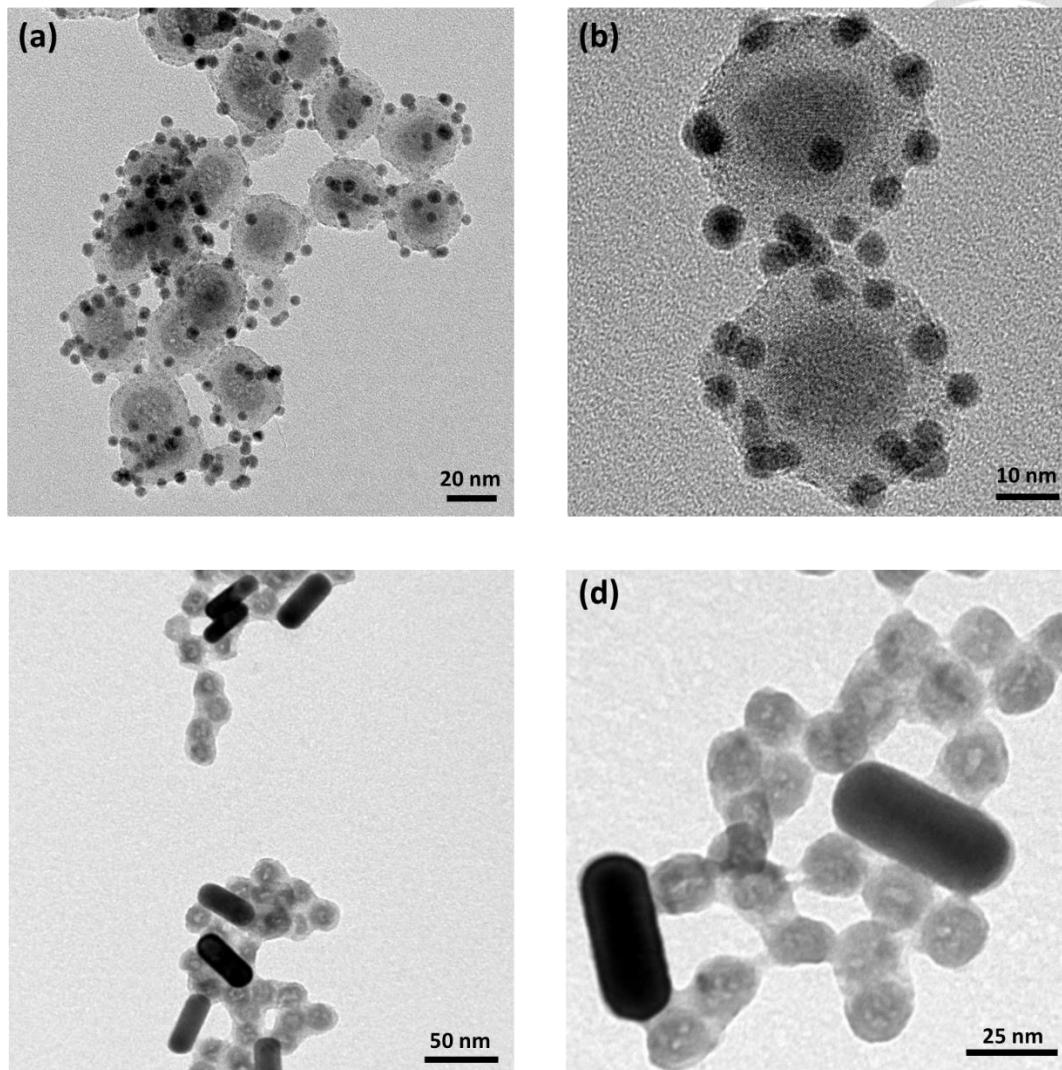


圖 3-17 (a)、(b)為球狀金奈米粒子分布於上轉換奈米粒子表面之 TEM 影像，
(c)、(d)為棒狀金奈米粒子分布於上轉換奈米粒子表面之 TEM 影像。

3.3.2.2 以二氧化矽修飾奈米複合材料之 PL 光譜

將球狀金奈米粒子修飾於二氧化矽($\text{UCNP@SiO}_2\text{-AuNP}$)表面後，測量其特性發光之光譜，可發現與前述之甲殼素修飾奈米複合材料之光譜特性具相當大之不同，修飾上金奈米粒子後，上轉換奈米粒子之放光強度並未大幅下降，推測其原因乃為二氧化矽殼層之絕緣性與其所提供之殼層厚度，壁面鐳系離子於放光時受金奈米粒子電場之影響，而順利由激發態回至基態，並放出光子。

如圖 3-18 所示，可發現於 540 nm 處， $\text{UCNP@SiO}_2\text{-AuNP}$ 之放光強度較未

修飾之上轉換奈米粒子(UCNP@SiO₂)略低，而其餘之放光並無明顯變化，推測其原因為金奈米粒子於此波段具表面電漿共振之效應，上轉換奈米粒子所放出之光子將與其產生表面電漿共振之交互作用，進而吸收部分光子之能量導致 PL 光譜強度下降，至於 654 nm 處之特性放光與球狀金奈米粒子之表面電漿共振峰並無重疊，故此波長之光子與球狀金奈米粒子之交互作用較弱，因此放光強度並無明顯之差別。

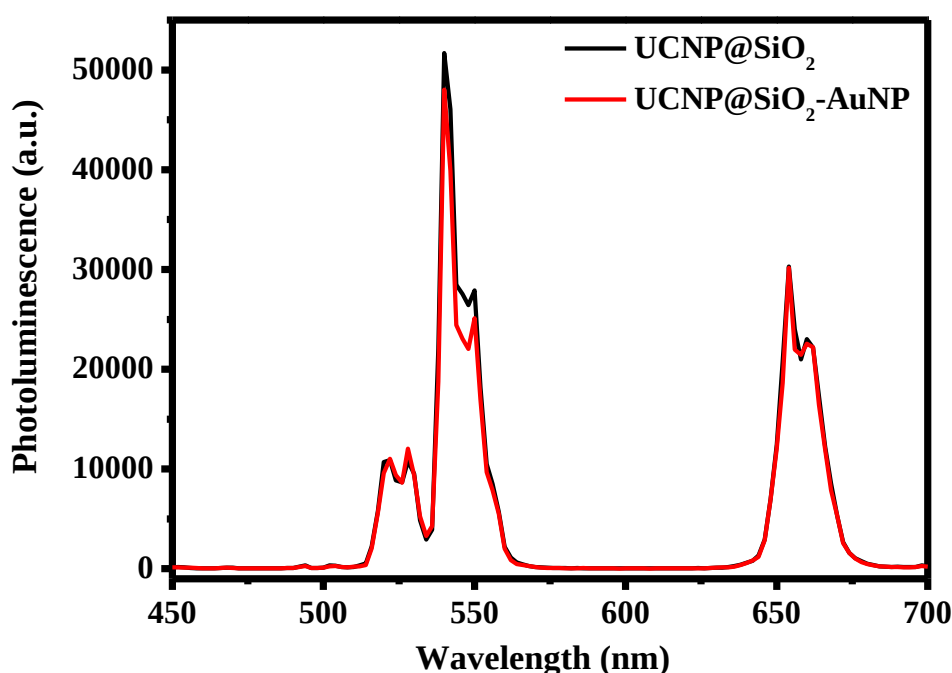


圖 3-18 球狀金奈米粒子以氨基化之二氧化矽殼層連接於上轉換奈米粒子之放光光譜。

圖 3-19 為棒狀金奈米粒子與上轉換奈米粒子以氨基化之二氧化矽殼層連接(UCNP@SiO₂-AuNR)之光譜圖，於圖中可觀察位於 540 nm 與 654 nm 處之放光強度皆稍微降低，推測原因為 UCNPs@SiO₂-AuNR 之所放出之光子能量部分提供棒狀金奈米粒子行表面電漿共振之原故，因棒狀金奈米粒子之長軸吸收係數較短軸高，如圖 3-8，導致 654 nm 處之放光強度下降較多。

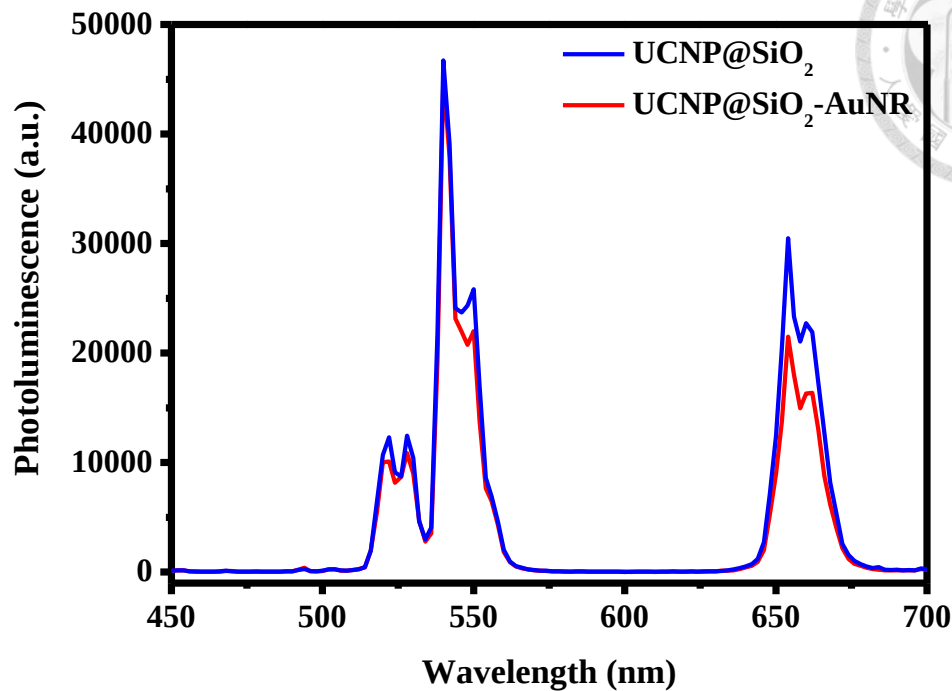


圖 3-19 棒狀金奈米粒子以氨基化之二氧化矽殼層連接於上轉換奈米粒子之放光光譜。

3.4 奈米複合材料於生物應用之結果與討論

與上轉換奈米粒子於生醫領域之相關研究主要以直接利用鐳系離子之特殊發光性質，應用於細胞組織與活體動物體內之螢光成像，另外則為間接利用其放出之光子能量，將能量傳遞至與其連接之有機分子或無機奈米粒子，此些分子及奈米粒子可利用上轉換奈米粒子所提供之光子，將光能轉變為其他不同類型之能量釋放，此過程即稱為鐳系金屬共振能量傳遞(lanthanide resonance energy transfer; LRET)，本研究基於此概念，利用金奈米粒子，透過其特殊之表面電漿共振效應，將上轉換奈米粒子之光能轉換為熱能，將以上轉換為主體之奈米複合材料應用於光熱治療之領域。

3.4.1 細胞毒性之測試

欲將所合成之奈米複合材料應用於生物領域前，必須確定其生物之毒性，因此細胞毒性測試之重要性亦顯得相當重要。本實驗所採用之細胞株皆為口腔癌細胞，分別為 Cal 27 與 Tu 183，細胞毒性測試之時間皆為 72 小時。

由二氧化矽修飾之奈米複合材料於細胞毒性測試之結果如圖 3-20 所示，圖 3-15(a)為 Cal 27 之細胞毒性測試結果，圖表中之 UCNP@SiO₂ 為單純包覆二氧化矽之上轉換奈米粒子，UCNP@ SiO₂-AuNP 為與球狀金奈米粒子連接之複合材料，而 UCNP@ SiO₂-AuNR 則為與棒狀金奈米粒子連接之複合材料，由圖表之結果顯示，每組樣品之所有濃度點其誤差值皆於信心區間內，且此三種組別由 1 µg/mL 低濃度至 250 µg/mL 之高濃度對於 Cal 27 細胞株均無顯著之毒性。

圖 3-20(b)為同樣之實驗條件於 Tu 183 之細胞毒性測試，由圖表顯示每組樣品之所有濃度點其誤差值皆於信心區間內，可觀察隨奈米材料濃度提高，對於 Tu 183 細胞之毒性亦越趨明顯，然於 250 µg/mL 之高濃度下，Tu 183 細胞之存活率依然超過八成，顯示二氧化矽修飾之奈米複合材料為低生物毒性之奈米材料。

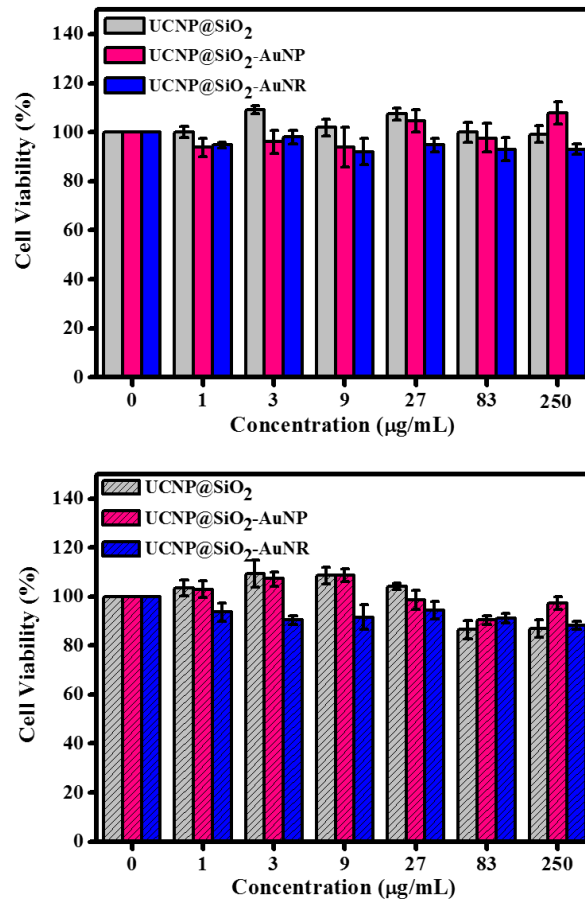


圖 3-20 二氧化矽修飾之奈米複合材料於(a) Cal 27 細胞與(b) Tu 183 細胞之毒性測試。

3.4.2 共軛聚焦顯微鏡之螢光成像

為確定本研究所合成之奈米複合材料之螢光標記效果，本研究於 cal 27 細胞中加入濃度為 250 µg/mL 之奈米複合材料，經過 12 小時後培養後加入 Hoshst 33342 藍色細胞核染劑，Hoshst 染劑之功用為標定細胞核位置，如圖 3-21 所示，Hoshst 於 30 分鐘內將細胞核均勻染為藍色，綠色部分為偵測上轉換奈米粒子於綠光波段(540 nm)放光訊號之結果，於疊合圖中可觀察於 cal 27 細胞核內部並無綠色螢光訊號，而部分細胞之細胞質區域具奈米複合材料之螢光訊號，顯示奈米複合材料確實與 cal 27 細胞作用並進入細胞質中，除驗證上一部分低毒性之結果外，並證實本研究所合成之奈米複合材料具細胞標定之功能。

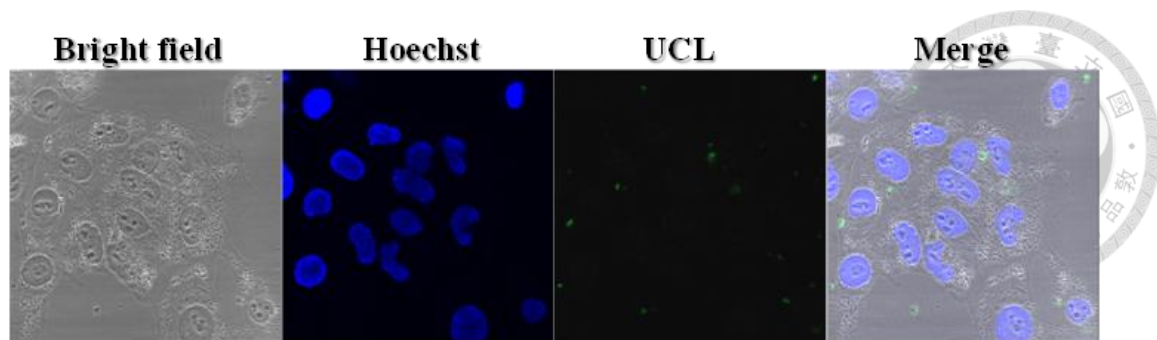


圖 3-21 共軛聚焦顯微鏡之螢光成像圖。

3.4.3 光熱治療於 Cal 27 細胞之測試

確定本研究所合成之奈米複合材料均無細胞毒性之疑慮後，將利用金奈米粒子之光熱轉換特性，應用於光熱治療，藉由光熱轉換所產生之熱能導致細胞死亡。光熱治療所選用之細胞株為對二氧化矽修飾之奈米複合材料具較良好細胞存活率之口腔癌細胞 Cal 27。實驗過程如圖 3-22 所示，將濃度為 100 $\mu\text{g/mL}$ 奈米複合材料餵食於 Cal 27 細胞後，以功率為 1.7 W/cm^2 之 980 nm 紅外光雷射照射一分鐘後，加入台盼藍(trypan blue)進行染色，破碎之細胞將殘留 trypan blue 染劑於其細胞質內，因此經光學顯微鏡觀察若具深藍色之區域即為細胞死亡之現象。

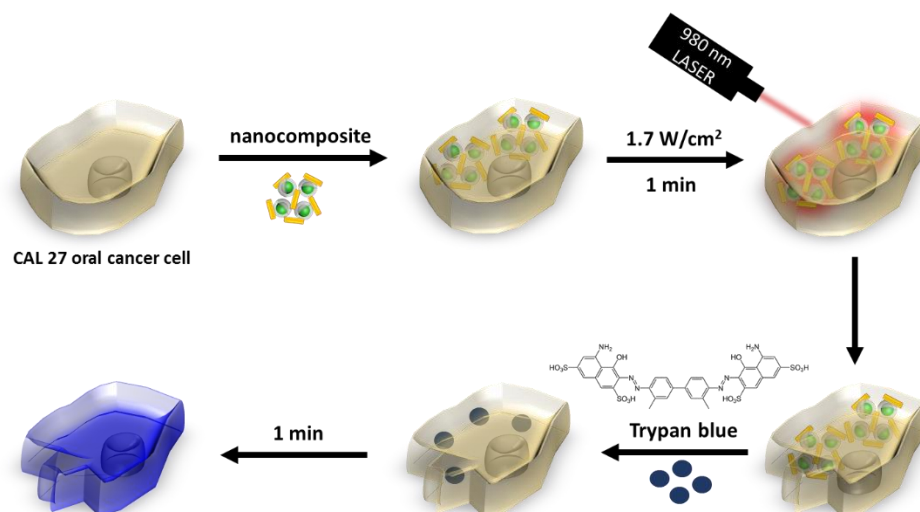


圖 3-22 光熱治療過程示意圖。

光熱治療之結果如圖 3-23 與圖 3-24 所示，圖 3-23 中之四組對照組分別為僅具 Cal 27 細胞、加入二氧化矽修飾之上轉換奈米粒子(UCNP@SiO₂)、加入球狀金奈米粒子(Au NP)與加入棒狀金奈米粒子(Au NR)之四種組別，雷射照射後並以台盼藍進行染色後於顯微鏡下觀察，可發現四組皆無細胞死亡之現象。

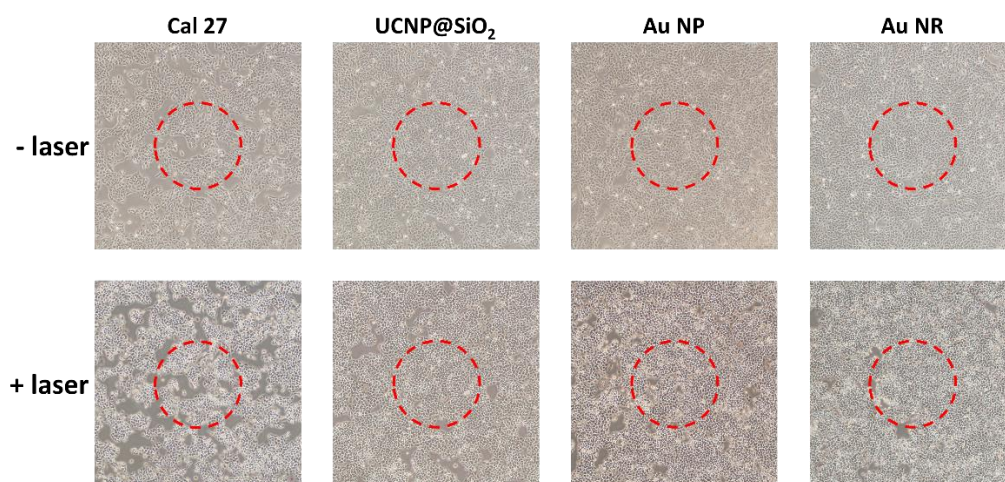


圖 3-23 光熱治療實驗於口腔癌細胞 Cal 27 之對照組結果。

圖 3-24 為修飾球狀金奈米粒子(UCNP@SiO₂-AuNP)及棒狀金奈米粒子(UCNP@SiO₂-AuNR)之組別，分別加入低濃度與高濃度之金奈米粒子，可發現 UCNP@SiO₂-AuNP 組別於雷射照射處具少數細胞死亡現象而添加較高濃度之球狀金奈米粒子後具稍大範圍細胞死亡之現象，此外 UCNP@SiO₂-AuNR 之組別則具相當明顯之細胞死亡現象，而添加高濃度之棒狀金奈米粒子後細胞呈現大範圍死亡之現象。由上述之結果可發現光熱治療之效果隨修飾較多金奈米粒子而提高，另一部分則為球狀金奈米粒子與棒狀金奈米粒子之差異，造成如此明顯差異之原因推測為棒狀金奈米粒子具較高之消光係數(extinction coefficient)，可吸收較多光能並轉換為熱能，藉以提供較高效率之光熱治療效果。

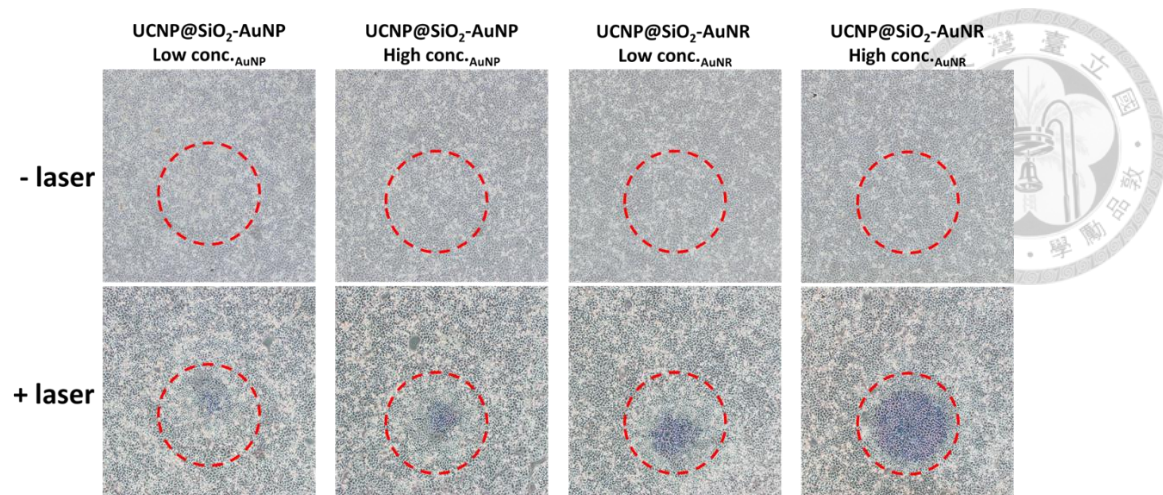


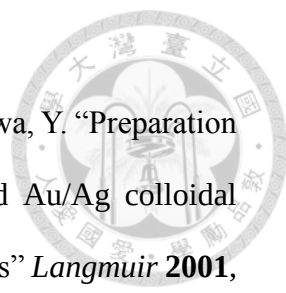
圖 3-24 光熱治療實驗於口腔癌細胞 Cal 27 之結果。

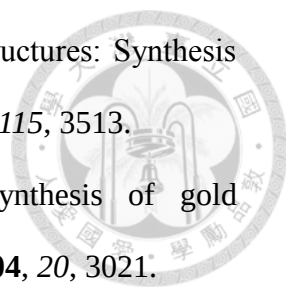
第四章 結論

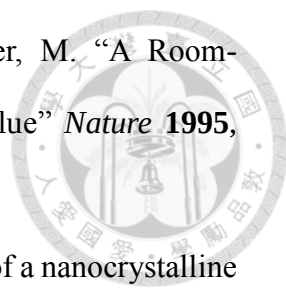


- (1) 本研究所製備之二氧化矽修飾之上轉換奈米粒子於水溶液中以單顆分散且無聚集之現象發生，無論修飾球狀金奈米粒子或棒狀金奈米粒子於其表面後亦呈現相當均勻之分散性，並於細胞毒性測試中證實本研究所合成之奈米複合材料具低生物毒性，對於往後於體內(in vivo)之研究具相當大潛力。
- (2) 本研究所製備之多功能奈米複合材料可透過 980 nm 之雷射激發，同時達到細胞標定與光熱治療之效果，上轉換奈米粒子之特性放光可透過共軛聚焦顯微鏡驗證其於細胞標定之能力。另一方面，透過表面修飾金奈米粒子，利用上轉換奈米粒子之特性放光與表面電漿共振峰相重疊之特性，將光能轉換為熱能以提供光熱治療之熱能來源致使細胞死亡。而本研究亦透過合成不同形貌之金奈米粒子以探討其光熱轉換之特性，於口腔癌細胞 cal 27 之光熱治療實驗中可發現，棒狀金奈米粒子之光熱治療效果較優於球狀金奈米粒子，且隨棒狀金奈米粒子比例增加，光熱治療之效果愈趨顯著。

參考文獻

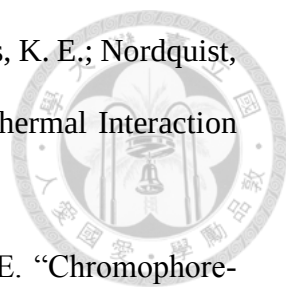
- 
- [1] Kometani, N.; Tsubonishi, M.; Fujita, T.; Asami, K.; Yonezawa, Y. "Preparation and optical absorption spectra of dye-coated Au, Ag, and Au/Ag colloidal nanoparticles in aqueous solutions and in alternate assemblies" *Langmuir* **2001**, *17*, 578.
- [2] Yee, C. K.; Ulman, A.; Ruiz, J. D.; Parikh, A.; White, H.; Rafailovich, M. "Alkyl selenide- and alkyl thiolate-functionalized gold nanoparticles: Chain packing and bond nature" *Langmuir* **2003**, *19*, 9450.
- [3] Kim, J. H.; Lee, T. R. "Thermo- and pH-responsive hydrogel-coated gold nanoparticles" *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3647.
- [4] Strimbu, L.; Liu, J.; Kaifer, A. E. "Cyclodextrin-capped palladium nanoparticles as catalysts for the Suzuki reaction" *Langmuir* **2003**, *19*, 483.
- [5] Jones, C. D.; Serpe, M. J.; Schroeder, L.; Lyon, L. A. "Microlens formation in microgel/gold colloid composite materials via photothermal patterning" *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5292.
- [6] Ivanisevic, A.; Reynolds, M. F.; Burstyn, J. N.; Ellis, A. B. "Photoluminescent properties of cadmium selenide in contact with solutions and films of metalloporphyrins: Nitric oxide sensing and evidence for the aversion of an analyte to a buried semiconductor-film interface" *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3731.
- [7] Gemeinhart, R. A.; Luo, D.; Saltzman, W. M. "Cellular fate of a modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles" *Biotechnol. Progr.* **2005**, *21*, 532.
- [8] Ash, B. J.; Siegel, R. W.; Schadler, L. S. "Mechanical behavior of alumina/poly(methyl methacrylate) nanocomposites" *Macromolecules* **2004**, *37*, 1358.

- 
- [9] Chen, H. M.; Liu, R. S. "Architecture of Metallic Nanostructures: Synthesis Strategy and Specific Applications" *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 3513.
- [10] Fleming, D. A.; Williams, M. E. "Size-controlled synthesis of gold nanoparticles via high-temperature reduction" *Langmuir* **2004**, *20*, 3021.
- [11] de Dood, M. J. A.; Berkhout, B.; van Kats, C. M.; Polman, A.; van Blaaderen, A. "Acid-based synthesis of monodisperse rare-earth-doped colloidal SiO₂ spheres" *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2849.
- [12] Murphy, C. J.; Jana, N. R. "Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires" *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 80.
- [13] Lee, K.; Seo, W. S.; Park, J. T. "Synthesis and optical properties of colloidal tungsten oxide nanorods" *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3408.
- [14] Sun, Y. G.; Gates, B.; Mayers, B.; Xia, Y. N. "Crystalline silver nanowires by soft solution processing" *Nano. Lett.* **2002**, *2*, 165.
- [15] Nishiyama, N.; Tanaka, S.; Egashira, Y.; Oku, Y.; Ueyama, K. "Vapor-phase synthesis of mesoporous silica thin films" *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1006.
- [16] Ma, R. Z.; Osada, M.; Hu, L. F.; Sasaki, T. "Self-Assembled Nanofilm of Monodisperse Cobalt Hydroxide Hexagonal Platelets: Topotactic Conversion into Oxide and Resistive Switching" *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 6341.
- [17] Li, Y.; Boone, E.; El-Sayed, M. A. "Size effects of PVP-Pd nanoparticles on the catalytic Suzuki reactions in aqueous solution" *Langmuir* **2002**, *18*, 4921.
- [18] Chao, M. C.; Lin, H. P.; Sheu, H. S.; Mou, C. Y. "A study of morphology of mesoporous silica SBA-15" *Stud. Surf. Sci. Catal.* **2002**, *141*, 387.
- [19] Gatteschi, D.; Sessoli, R. "Quantum tunneling of magnetization and related phenomena in molecular materials" *Angew. Chem. Int. Edit.* **2003**, *42*, 268.
- [20] Miller, J. S.; Epstein, A. J. "Organic and Organometallic Molecular Magnetic-Materials - Designer Magnets" *Angew. Chem. Int. Edit.* **1994**, *33*, 385.

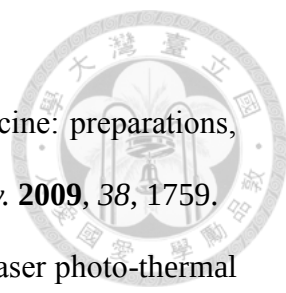
- 
- [21] Ferlay, S.; Mallah, T.; Ouahes, R.; Veillet, P.; Verdaguer, M. "A Room-Temperature Organometallic Magnet Based on Prussian Blue" *Nature* **1995**, 378, 701.
- [22] Ivanov, E. Y.; Suryanarayana, C.; Bryskin, B. D. "Synthesis of a nanocrystalline W-25 wt.% Re alloy by mechanical alloying" *Mat. Sci. Eng. a-Struct.* **1998**, 251, 255.
- [23] Peng, X. G.; Wickham, J.; Alivisatos, A. P. "Kinetics of II-VI and III-V colloidal semiconductor nanocrystal growth: "Focusing" of size distributions" *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5343.
- [24] Wood, R. W. "On the electrical resonance of metal particles light waves - Second communication." *Philos. Mag.* **1902**, 4, 425.
- [25] Hessel, A.; Oliner, A. A. "A New Theory of Woods Anomalies on Optical Gratings" *Appl. Optics* **1965**, 4, 1275.
- [26] Kottmann, J. P.; Martin, O. J. F.; Smith, D. R.; Schultz, S. "Plasmon resonances of silver nanowires with a nonregular cross section" *Phys. Rev. B* **2001**, 64.
- [27] Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. "The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment" *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 668.
- [28] Link, S.; El-Sayed, M. A. "Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles" *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 4212.
- [29] Dreaden, E. C.; Mackey, M. A.; Huang, X. H.; Kang, B.; El-Sayed, M. A. "Beating cancer in multiple ways using nanogold" *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 3391.
- [30] Cheng, L. C.; Huang, J. H.; Chen, H. M.; Lai, T. C.; Yang, K. Y.; Liu, R. S.; Hsiao, M.; Chen, C. H.; Her, L. J.; Tsai, D. P. "Seedless, silver-induced synthesis of star-shaped gold/silver bimetallic nanoparticles as high efficiency

photothermal therapy reagent” *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 2244.

- [31] Miller, A. B.; Hoogstraten, B.; Staquet, M.; Winkler, A. “Reporting Results of Cancer-Treatment” *Cancer* **1981**, 47, 207.
- [32] Hamilton, A.; Hortobagyi, G. “Chemotherapy: What progress in the last 5 years?” *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 1760.
- [33] Partridge, A. H.; Burstein, H. J.; Bluman, L. G.; Bunnell, C. A.; Winer, E. P. “Preferences and attitudes of patients with metastatic breast cancer regarding receiving results information following participation in a clinical trial.” *Breast Cancer Res. Tr.* **2001**, 69, 307.
- [34] Welch, A. J. “The Thermal Response of Laser Irradiated Tissue” *IEEE J. Quantum Elect.* **1984**, 20, 1471.
- [35] Jacques, S. L.; Prahl, S. A. “Modeling Optical and Thermal Distributions in Tissue during Laser Irradiation” *Laser Surg. Med.* **1987**, 6, 494.
- [36] Stureson, C.; AnderssonEngels, S. “A mathematical model for predicting the temperature distribution in laser-induced hyperthermia. Experimental evaluation and applications” *Phys. Med. Biol.* **1995**, 40, 2037.
- [37] Greenwald, J.; Rosen, S.; Anderson, R. R.; Harrist, T.; Macfarland, F.; Noe, J.; Parrish, J. A. “Comparative Histological Studies of the Tunable Dye (at 577 Nm) Laser and Argon-Laser - the Specific Vascular Effects of the Dye-Laser” *J. Invest. Dermatol.* **1981**, 77, 305.
- [38] Anderson, R. R.; Parrish, J. A. “Selective Photothermolysis - Precise Microsurgery by Selective Absorption of Pulsed Radiation” *Science* **1983**, 220, 524.
- [39] Morelli, J. G.; Tan, O. T.; Garden, J.; Margolis, R.; Seki, Y.; Boll, J.; Carney, J. M.; Anderson, R. R.; Furumoto, H.; Parrish, J. A. “Tunable Dye-Laser (577 Nm) Treatment of Port Wine Stains” *Laser Surg. Med.* **1986**, 6, 94.

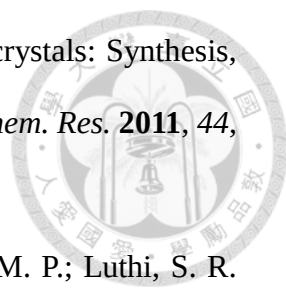
- 
- [40] Chen, W. R.; Adams, R. L.; Heaton, S.; Dickey, D. T.; Bartels, K. E.; Nordquist, R. E. "Chromophore-Enhanced Laser-Tumor Tissue Photothermal Interaction Using an 808-Nm Diode-Laser" *Cancer Lett.* **1995**, *88*, 15.
- [41] Chen, W. R.; Adams, R. L.; Bartels, K. E.; Nordquist, R. E. "Chromophore-Enhanced in-Vivo Tumor-Cell Destruction Using an 808-Nm Diode-Laser" *Cancer Lett.* **1995**, *94*, 125.
- [42] Jori, G.; Schindl, L.; Schindl, A.; Polo, L. "Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized processes in vivo" *J. Photoch. Photobio. A* **1996**, *102*, 101.
- [43] Jori, G.; Spikes, J. D. "Photothermal Sensitizers - Possible Use in Tumor-Therapy" *J. Photoch. Photobio. B* **1990**, *6*, 93.
- [44] Jain, P. K.; Huang, X. H.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. "Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine" *Accounts Chem. Res.* **2008**, *41*, 1578.
- [45] Link, S.; Burda, C.; Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. "How long does it take to melt a gold nanorod? A femtosecond pump-probe absorption spectroscopic study" *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *315*, 12.
- [46] Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. "Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine" *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238.
- [47] Urbanska, K.; Romanowska-Dixon, B.; Matuszak, Z.; Oszejka, J.; Nowak-Sliwinska, P.; Stochel, G. "Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas" *Acta. Biochim. Pol.* **2002**, *49*, 387.
- [48] Du, H.; Fuh, R. C. A.; Li, J. Z.; Corkan, L. A.; Lindsey, J. S. "PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry" *Photochem.*

Photobiol. **1998**, 68, 141.

- 
- [49] Boisselier, E.; Astruc, D. “Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity” *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 1759.
- [50] El-Sayed, I. H.; Huang, X. H.; El-Sayed, M. A. “Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles” *Cancer Lett.* **2006**, 239, 129.
- [51] Huang, X. H.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A. “Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods” *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2115.
- [52] Jaiswal, J. K.; Simon, S. M. “Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging” *Trends Cell Biol.* **2004**, 14, 497.
- [53] Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. “Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels” *Science* **1998**, 281, 2013.
- [54] Wang, F.; Banerjee, D.; Liu, Y. S.; Chen, X. Y.; Liu, X. G. “Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy” *Analyst* **2010**, 135, 1839.
- [55] van der Ende, B. M.; Aarts, L.; Meijerink, A. “Lanthanide ions as spectral converters for solar cells” *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 11081.
- [56] Wang, F.; Liu, X. G. “Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals” *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 976.
- [57] Heer, S.; Kompe, K.; Gudel, H. U.; Haase, M. “Highly efficient multicolour upconversion emission in transparent colloids of lanthanide-doped NaYF₄ nanocrystals” *Adv. Mater.* **2004**, 16, 2102.
- [58] Wu, S. W.; Han, G.; Milliron, D. J.; Aloni, S.; Altoe, V.; Talapin, D. V.; Cohen, B. E.; Schuck, P. J. “Non-blinking and photostable upconverted luminescence from single lanthanide-doped nanocrystals” *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, 106,

10917.

- [59] Yu, M. X.; Li, F. Y.; Chen, Z. G.; Hu, H.; Zhan, C.; Yang, H.; Huang, C. H. “Laser Scanning Up-Conversion Luminescence Microscopy for Imaging Cells Labeled with Rare-Earth Nanophosphors” *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 930.
- [60] Lim, S. F.; Riehn, R.; Ryu, W. S.; Khanarian, N.; Tung, C. K.; Tank, D.; Austin, R. H. “In vivo and scanning electron microscopy imaging of upconverting nanophosphors in *Caenorhabditis elegans*” *Nano Lett.* **2006**, *6*, 169.
- [61] Xiong, L. Q.; Chen, Z. G.; Tian, Q. W.; Cao, T. Y.; Xu, C. J.; Li, F. Y. “High Contrast Upconversion Luminescence Targeted Imaging in Vivo Using Peptide-Labeled Nanophosphors” *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8687.
- [62] Rantanen, T.; Jarvenpaa, M. L.; Vuojola, J.; Kuningas, K.; Soukka, T. “Fluorescence-quenching-based enzyme-activity assay by using photon upconversion” *Angew. Chem. Int. Edit.* **2008**, *47*, 3811.
- [63] Idris, N. M.; Gnanasammandhan, M. K.; Zhang, J.; Ho, P. C.; Mahendran, R.; Zhang, Y. “In vivo photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers” *Nat. Med.* **2012**, *18*, 1580.
- [64] 香港中文大學物理系網站
(http://www.hkphy.org/atomic_world/tem/tem02_e.html).
- [65] 陳力俊 “材料電子顯微鏡學”，行政院國家科學委員會精密儀器發展中心，**民 87**.
- [66] 高至均 “工業材料”，工業材料研究所，**民 87**.
- [67] 黃永勝 “科儀新知”，國家研究院醫器科技研究中心，**民 84**.
- [68] Shimadzu 公 司 網 頁
(<http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=uv1700>).
- [69] 倫敦南岸大學網頁(<http://www.lsbu.ac.uk/water/vibrat.html>).
- [70] Olympuse 公司網頁(<http://www.olympusfluoview.com/theory/index.html>).

- 
- [71] Wang, G. F.; Peng, Q.; Li, Y. D. "Lanthanide-Doped Nanocrystals: Synthesis, Optical-Magnetic Properties, and Applications" *Accounts Chem. Res.* **2011**, *44*, 322.
- [72] Kramer, K. W.; Biner, D.; Frei, G.; Gudel, H. U.; Hehlen, M. P.; Luthi, S. R. "Hexagonal sodium yttrium fluoride based green and blue emitting upconversion phosphors" *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 1244.
- [73] Wang, F.; Han, Y.; Lim, C. S.; Lu, Y. H.; Wang, J.; Xu, J.; Chen, H. Y.; Zhang, C.; Hong, M. H.; Liu, X. G. "Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping", *Nature* **2010**, *463*, 1061.
- [74] Naccache, R.; Vetrone, F.; Mahalingam, V.; Cuccia, L. A.; Capobianco, J. A. "Controlled Synthesis and Water Dispersibility of Hexagonal Phase NaGdF₄:Ho³⁺/Yb³⁺ Nanoparticles" *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 717.
- [75] Hu, H.; Yu, M. X.; Li, F. Y.; Chen, Z. G.; Gao, X.; Xiong, L. Q.; Huang, C. H. "Facile Epoxidation Strategy for Producing Amphiphilic Up-Converting Rare-Earth Nanophosphors as Biological Labels" *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 7003.
- [76] Cui, S. S.; Chen, H. Y.; Zhu, H. Y.; Tian, J. M.; Chi, X. M.; Qian, Z. Y.; Achilefu, S.; Gu, Y. Q. "Amphiphilic chitosan modified upconversion nanoparticles for in vivo photodynamic therapy induced by near-infrared light" *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 4861.
- [77] Saboktakin, M.; Ye, X. C.; Oh, S. J.; Hong, S. H.; Fafarman, A. T.; Chettiar, U. K.; Engheta, N.; Murray, C. B.; Kagan, C. R. "Metal-Enhanced Upconversion Luminescence Tunable through Metal Nanoparticle-Nanophosphor Separation" *ACS Nano* **2012**, *6*, 8758.