

半導體高分子奈米顆粒之開發與應用

The Development and Applications of Semiconducting Polymer Dots

吳佩靜、黃雅琦、詹揚翔

Pei-Jing Wu, Ya-Chi Huang, Yang-Hsiang Chan

半導體高分子奈米顆粒由於具備高螢光亮度、良好光穩定性、表面容易修飾官能基以及不具生物毒性等優點，近年來已經成為廣泛受到注目的新型高亮度螢光探針。本篇專題報導將統整介紹半導體高分子奈米顆粒的結構、合成方式、製備方法和光學性質，並詳細討論筆者實驗室近期在這方面的研究，分別探討其在離子感測器與近紅外光生物影像的研究與開發。

Semiconducting polymer dots (Pdots) have recently attracted considerable attention because of their extraordinary fluorescence brightness, good stability, facile surface functionalization, and low cytotoxicity. In this article, we will discuss the chemical structures, synthesis, preparation, and photophysical properties of Pdots. Additionally, we will investigate the development of NIR-emitting Pdots for bioimaging and their applications for the detection of ions based on the recent works in our lab.

一、前言

螢光顯影技術結合光學影像與螢光顯微鏡能提供良好的空間與時間解析度，所以廣泛應用在生物體系上。近年來，有科學家利用螢光顯影技術開發螢光圖像引導手術^(1, 2)，並進一步應用在人類卵巢癌⁽³⁾的治療。而所謂的螢光圖像引導手術是指利用螢光探針標記在腫瘤細胞上，藉由腫瘤細胞發出的螢光使醫生能夠更清楚辨識腫瘤的位置。此方式不僅可以更效率的清除癌細胞，同時能降低癌症的復發率，所以發展具光穩定性、高亮度和生物相容性的螢光探針具有其重大意義。

隨著時間的演進，科學家已經開發出各式各

樣的螢光探針。例如：有機染劑 (organic dye)、量子點 (quantum dots)、貴金屬奈米團簇 (noble metal nanoclusters) 和以矽為基底的奈米顆粒 (silica-based nanoparticles) 等探針。一般來說，奈米顆粒螢光探針 (包覆染劑的二氧化矽奈米顆粒、量子點) 具有較高的螢光亮度和光穩定性，所以廣泛地應用在生物體系上。但也有其缺點，像是染劑包覆的方式會有外漏的可能性^(4, 5)，而量子點則有對生物體具有毒性的無機物質 (例如：鎘)^(6, 7, 8)。

1. 半導體聚合物的化學結構與合成

近年來，半導體高分子奈米顆粒 (semiconducting polymer dots, Pdots) 由於具備高

螢光亮度、良好光穩定性、寬廣吸收峰、對稱又窄的放射峰、表面容易修飾官能基，以及不具毒性等優點⁽⁹⁻¹⁶⁾，所以成為廣泛注目的新型高亮度螢光探針。其骨架是由有機 π 共軛單體所組成 (homoaromatic or heteroaromatic compounds) 的共軛系統，使電子可以透過穿隧、跳躍或其他機制在骨架移動。所以當一個消光團 (quencher) 鍵結上共軛聚合物的其中一個重複單體，此消光團就能藉由聚合物的骨架而有效地抓取能量，進而放大共軛聚合物的消光結果⁽¹⁷⁾，因此基於 Pdots 有能量放大的優勢，所以能有多方面的發展。

一般而言，Pdots 通常由有機合成方式使供體 (donor) 與受體 (acceptor) 結合成共軛聚合物，分子量大於 10,000，依照供體與受體兩者單體結構上的特性，來決定高分子的性質，例如：fluorene 是電子豐富的基團，在紫外-可見光範圍有高的吸收截面，所以在合成上通常會取 fluorine 當作供體，同時其結構具有長碳鏈，可以避免半導體高分子製備成奈米顆粒時，因 π - π stacking 而造成的螢光消光 (quench)。

目前一系列在光譜上由藍到紅不同吸收與放光的 Pdots 已經合成出來，常見用來製備 Pdots 的半導體聚合物之化學結構如圖 1(a) 所示，有 polyfluorene (PFO)、poly (phenylene ethynylene) (PPE) 或是供體 (fluorene/thiophene) 結合受體 (phenylenevinylene/benzothiadiazole/benzoselenadiazole) 形成的共聚合物 (PFPV、PFBT、PFBS、PF-BTDBT)。採取的合成方式有 Suzuki coupling⁽¹⁸⁾、Glich polymerization^(19, 20) 或 Sonagashira coupling⁽²¹⁾ 等 (圖 1(b))。一般來說，以 *E*-alkene 為架構的半導體聚合物是由 Gilch polymerization^(22, 23) 所合成，而如果是供體與受體形成的共聚合物，則是由 palladium-catalyzed coupling reactions 所合成。

結構對高分子的光學性質有很大的影響，像是發出藍色螢光的 PFO，在 440 nm 有最大放出波長，當改變其結構上的共振系統，就會放出不同波長。而 PFPV 就是將 fluorine 與 1,4-Bis(octyloxy)-2-vinylbenzene 串連而成的高分子，其最大的放光會紅移至 500 nm，進而發出綠光。如果進一步在結

構上設計一個電子豐富的基團與缺電子的基團，則可大幅地影響紅移的程度，例如高分子 Poly[(9,9-dioctyl-fluorenyl-2,7-diyl)-co-1,4-benzo-[2,1,3]-thiadiazol)] (PFBT) 是由電子豐富基團—fluorene 與強拉電子基團—BT 所串連而成的高分子，其螢光放光約在 540 nm 的黃綠光。

2. 製備方式

Pdots 的製程有微乳液法 (mini-emulsion) 以及再沉澱法 (reprecipitation)⁽²⁴⁾。所謂微乳液法 (圖 2(a)) 是指把共軛高分子溶於非質子性溶劑 (aprotic solvent) 中，例如 CH_2Cl_2 或 CHCl_3 ，再加入可高分子化的界面活性劑或乳化劑，經由超音波震盪或激烈攪拌下，疏水性的共軛高分子會被包覆在表面活性劑內，形成穩定的微胞或反微胞，即為奈米顆粒。而再沉澱法 (圖 2(b)) 則是把有機高分子溶於可和水互溶的有機溶劑 (例如：THF、Acetonitrile) 中，在超音波震盪下，快速把有機高分子溶液注入水中，此時因為有機高分子的溶解度快速下降，使分子間藉由疏水性作用力產生聚集，形成奈米顆粒。最後再加熱將有機溶劑去除，即製備出有機高分子奈米顆粒水溶液。由於再沉澱法不需添加對人體具毒性的表面活性劑，所以我們通常會選取簡單又方便快捷的再沉澱法來製備 Pdots⁽⁶⁾。

3. 半導體高分子奈米顆粒的光物理特性

圖 3 為不同 Pdots 的吸收光譜與放光光譜⁽²⁴⁾，由吸收光譜可看出 Pdots 具有寬廣的吸收峰 (300 nm—650 nm) (圖 3(a))，隨著化學結構的不同，有著多變的螢光顏色 (400 nm—700 nm) (圖 3(b))。Pdots 一般具有高吸收截面和螢光量子產率，藉由每個奈米顆粒的吸收截面和螢光量子產率，即可計算出螢光亮度。以下將統整不同的 Pdots 光物理特性 (如表 1 所示)，在已知 Pdots 濃度下，利用紫外-可見範圍的吸收去計算單一顆粒的吸收截面 (平均直徑約 20 nm)，而螢光量子產率則用積分球得知。

Pdots 的單顆粒亮度在螢光影像的應用與生物檢測都有其應用性。常見的 PFBT 螢光量子產率約為 31%。除此之外，由文獻得知，以 PFBT 為基

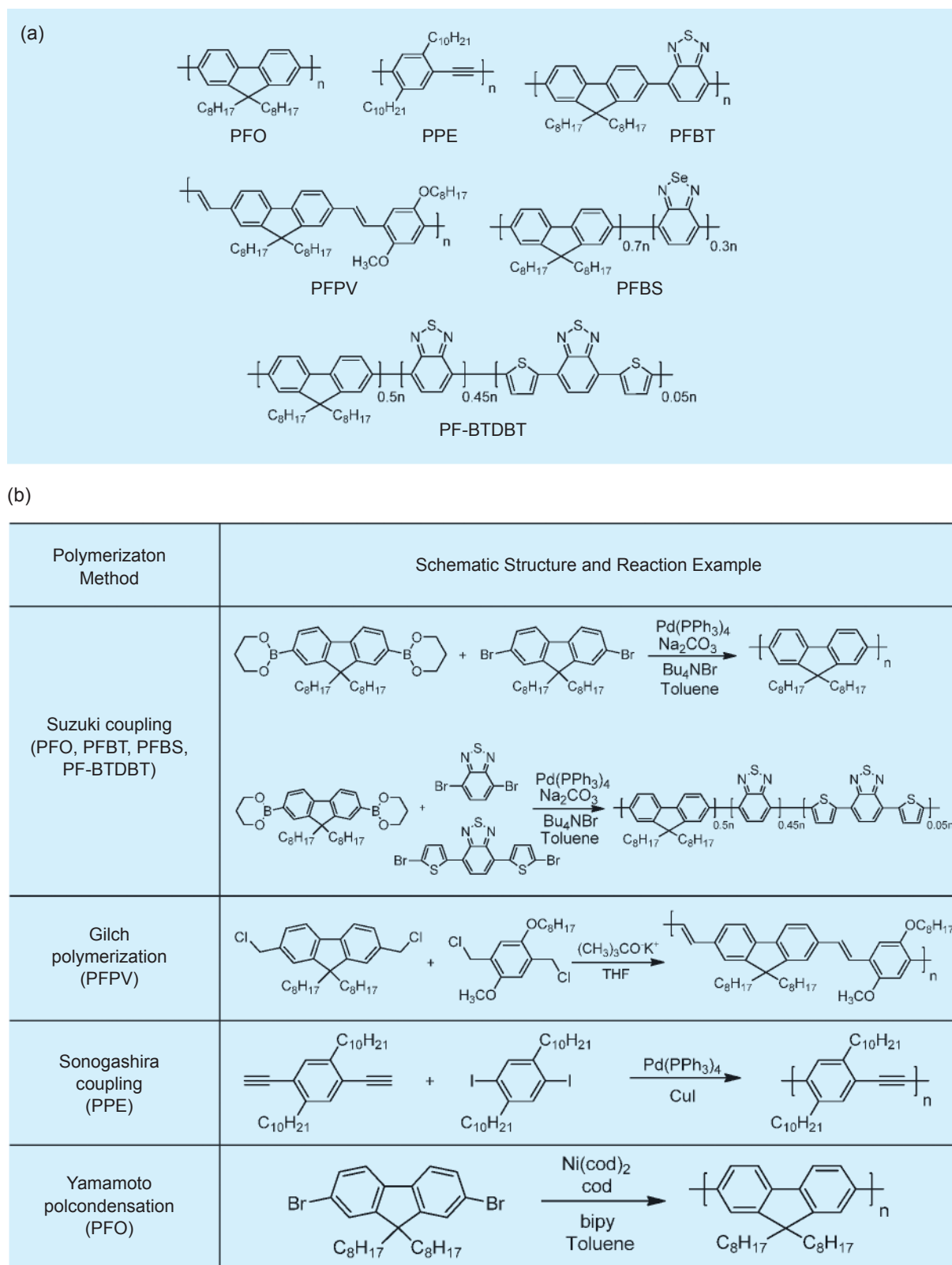


圖 1. (a) 各種螢光半導體高分子聚合物的化學結構。(b) 半導體聚合物高分子化方法。

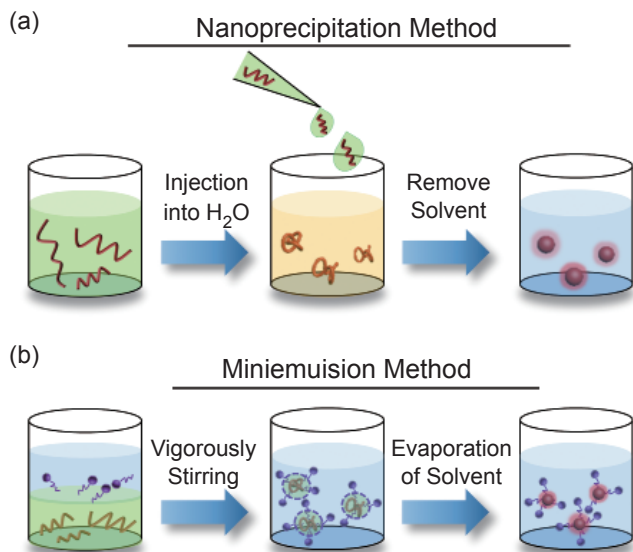


圖 2. (a) 微乳液法。(b) 再沉澱法。

底的放紅光 PBdots，螢光亮度為 Qdot 655 的十五倍，如圖 4(a)⁽²⁵⁾。近期我們團隊合成相較於 PFBT 的放光紅移 40 nm 的 PFBS⁽²⁶⁾，由圖 4(b) 中，比較 PFBS Pdots 和 PFBT Pdots 的單顆粒亮度，可以推測得知 PFBS Pdots 比 Qdot 655 亮三十倍。

二、半導體高分子奈米顆粒在生物影像及感測器的應用與發展

Pdots 由於具備能量放大的特性，並且有高螢光亮度、良好光穩定性、表面容易修飾官能基以及不具毒性等特性，所以持續發展中。下列將介紹我們團隊近期以 Pdots 為主體的研究探討，區分為離子偵測以及近紅外光 Pdots 的開發。

1. 半導體高分子奈米顆粒在離子偵測的開發

(1) 修飾上光控分子的半導體高分子奈米顆粒以螢光訊號比例的方式，對銅離子做偵測

銅離子 (Cu^{2+}) 是人體內前三大含量高的金屬離子 (另外分別為鋅離子、鐵離子)，在生物體系中扮演重要的角色，也常在環境檢測中當作金屬污染的指標。一般成人每日所需的銅離子含量為 0.8–0.9 毫克⁽²⁷⁾。根據世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 的報導，飲用水中含有適當濃度的銅離子有助於身體健康⁽²⁸⁾，但如果攝取過量的銅離子，則會引發貧血、心血管疾病等症狀，

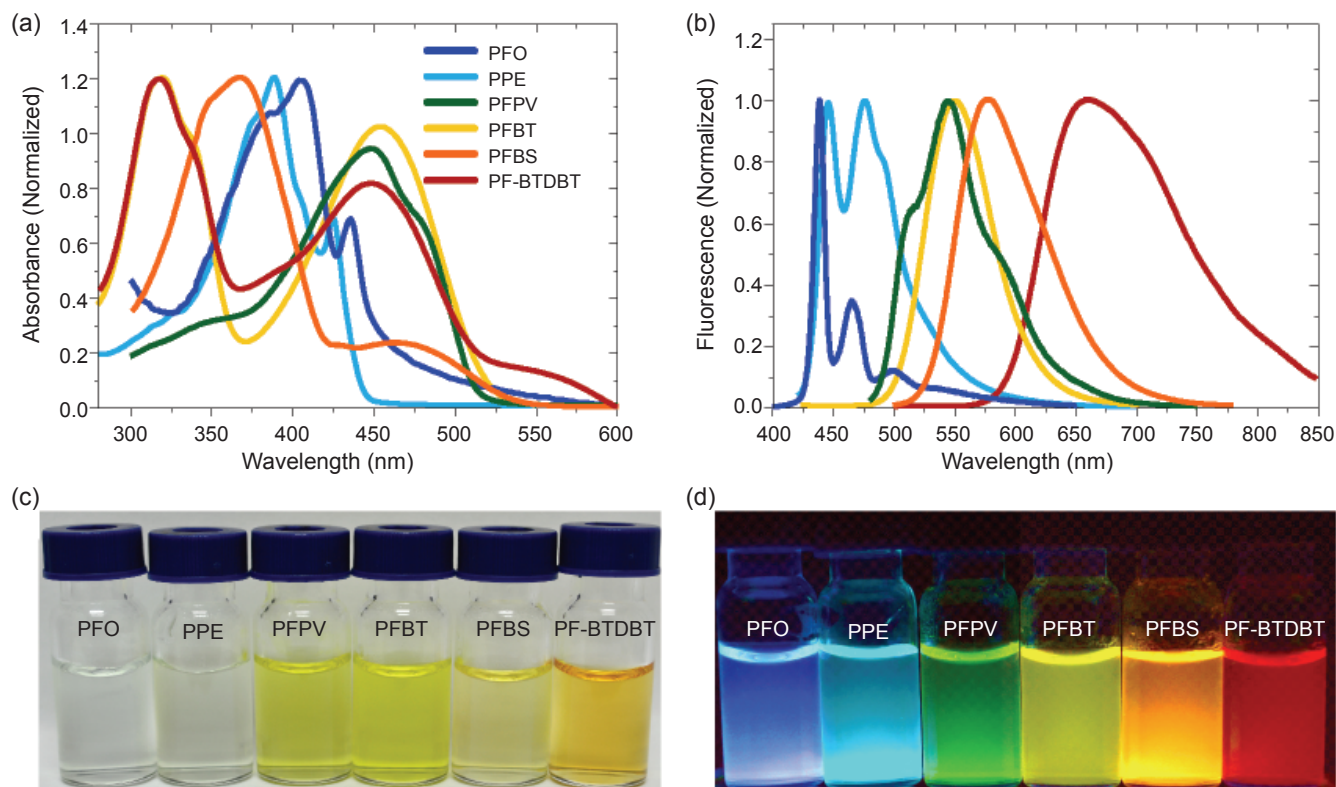


圖 3. 多種半導體高分子奈米顆粒的光譜圖。(a) 吸收光譜。(b) 螢光光譜。半導體高分子奈米顆粒在水溶液中的圖像。(c) 白光下。(d) 365 nm UV 光照射下。

表 1. 半導體高分子奈米顆粒的光物理特性統整表格。

Pdots (ave diameter 20 nm) (absorption/fluorescence max, nm)	PFO (375/440)	PPE (390/445)	PFPV (450/545)	PFBT (455/550)	PFBS (460/576)	PF-BTDBT (450/660)
absorption cross section (σ , 10^{-13} cm ²)	6.13	4.48	5.50	3.77	1.98	2.57
quantum yield (ϕ_F)	0.40	0.12	0.08	0.31	0.44	0.32
fluorescence lifetime (τ , ns)	0.27	0.24	0.13	0.59	1.50	4.82
radiative rate (k_r , s ⁻¹)	1.5×10^9	5.0×10^8	6.0×10^8	5.2×10^8	2.9×10^8	6.6×10^7

嚴重甚至會導致死亡；相反地，含量過少則會產生嘔吐、肝硬化等現象。綜觀來看，銅離子含量的多寡，對於環境以及生物體都有著不同的影響力⁽²⁹⁾，所以發展銅離子偵測系統有其必要性。

在本研究中，我們在 PPE Pdots 和 PFBT Pdots 上修飾光控分子 (spiropyran -CO-520, SP-CO-520)，藉由改變光源即可控制 SP-CO-520 的開環與合環，所以當 SP-CO-520 照射 UV 光 ($\lambda = 365$ nm，功率 = $3.5 \mu\text{W}$) 時，會開環成 merocyanine (MC) 結構，此時 SP-Pdots 會抓取 Cu^{2+} ，而照射白光 (混合光，波長為 450–750 nm) 時則會合環，可逆回原本的狀態 (圖 5)⁽³⁰⁾。

本實驗利用 SP-PPE 的放光光譜和 SP-PFBT 的吸收光譜有良好的光譜重疊 (圖 5)，引發螢光能量共振轉移 (Förster resonance energy transfer, FRET) 傳遞能量。經過實驗條件理想化後，我們以 SP-PPE 和 SP-PFBT 的比例為 3 : 0.7 來混合，添加銅離子，並照射 UV 光三十秒，然後靜置十分鐘，溶液由原本的藍色變黃綠色，並且由螢光光譜圖 6 (a) 得知，隨著 Cu^{2+} 濃度增加 (0–80 μM)，SP-PPE 放光強度 ($\lambda = 446$ nm) 逐漸下降，SP-PFBT ($\lambda = 535$ nm) 則逐漸上升。

之後我們藉由兩種不同的放光波長，以螢光訊號比例 (ratiometric measurement) 的方式來探討，避免環境或裝置儀器所產生的干擾誤差，也可以免除樣品濃度的誤差。再來以濃度為 0–60 μM 的 Cu^{2+} 作校正曲線圖 6(b)，其 $R^2 = 0.994$ 。最後探討

選擇性及可逆性，每種金屬離子以人類生理狀況下的標準濃度為基準，對偵測系統做選擇性探討圖 6(c)，可發現其他金屬的螢光比值和對照組 (blank) 是相同的，顯示此系統具高選擇性。而可逆性方面如圖 6(d) 所示，當加入 Cu^{2+} 後的溶液，調降溶液的 pH 值 (pH = 3)，放入 4 °C 的水浴十分鐘，再照射白光，發現用此方式可以達到可逆效果兩次。

我們利用 SP 開環成 MC 時，所產生的空間大小對銅離子具選擇性，並利用兩種 SP-Pdots 之間能夠藉由 FRET 機制傳遞能量，因此只需要簡單的改變照射光源，即可對銅離子進行偵測，並且以螢光訊號比例的方式探討偵測結果，以避免濃度和環境的干擾。我們所發展的偵測系統不只製備簡單，而且具靈敏性與選擇性，並且能重複使用，是一種具有經濟效益的系統，也具備應用於生物體系及環境中的能力。

(2) 發展包覆香豆素染劑的半導體高分子奈米顆粒，以螢光訊號比例方式偵測水溶液中的氟離子，並應用在生物影像

氟離子因為與許多人類疾病及使用在戰爭中的神經毒氣有所關聯，一直是科學家研究的目標。而在許多國家中，會在飲用水中添加氟離子來促進牙齒的健康，或者是使用含有氟離子的藥物來治療骨質疏鬆。但是過多的氟離子反而會造成氟中毒 (fluorosis)，並且可能導致骨肉瘤 (osteosarcoma)、尿石症 (urolithiasis) 甚至是癌症⁽³¹⁾。因此美國國家

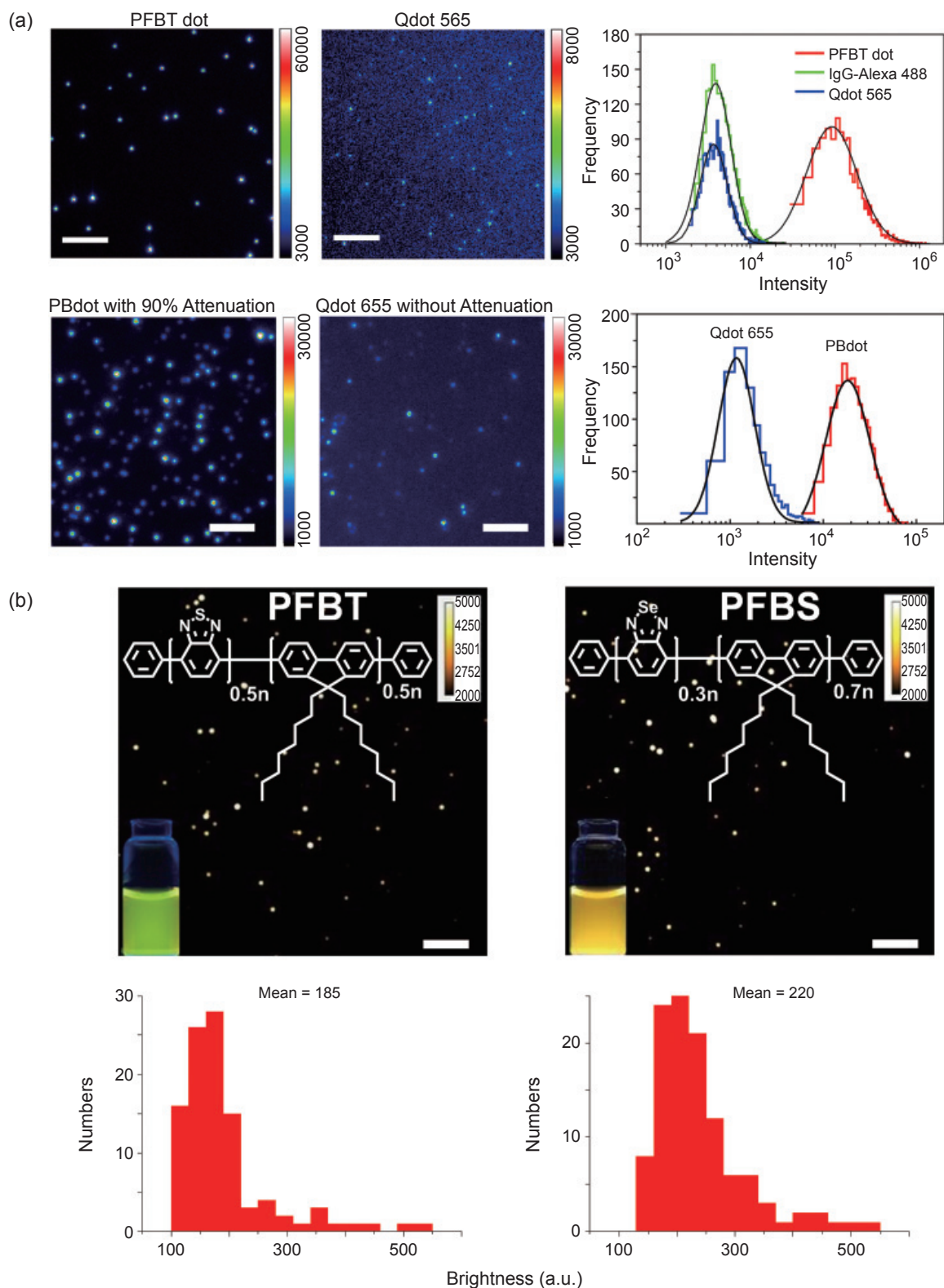


圖 4. 單顆粒螢光亮度的比較。(a) 在相同激發光 488 nm，PFBT Pdots 和 Qdot 565 的單顆粒螢光影像。比例尺為 $4\mu\text{m}$ ，右圖顯示單顆粒的螢光強度分布。(b) 上圖分別為 PFBT (左) 和 PFBS (右) 的單顆粒螢光影像，左下角則為 Pdots 水溶液在 365 nm 下拍攝的圖片。下圖則為相對的螢光強度分布，亮度由 imageJ software 所計算。比例尺為 4 μm 。

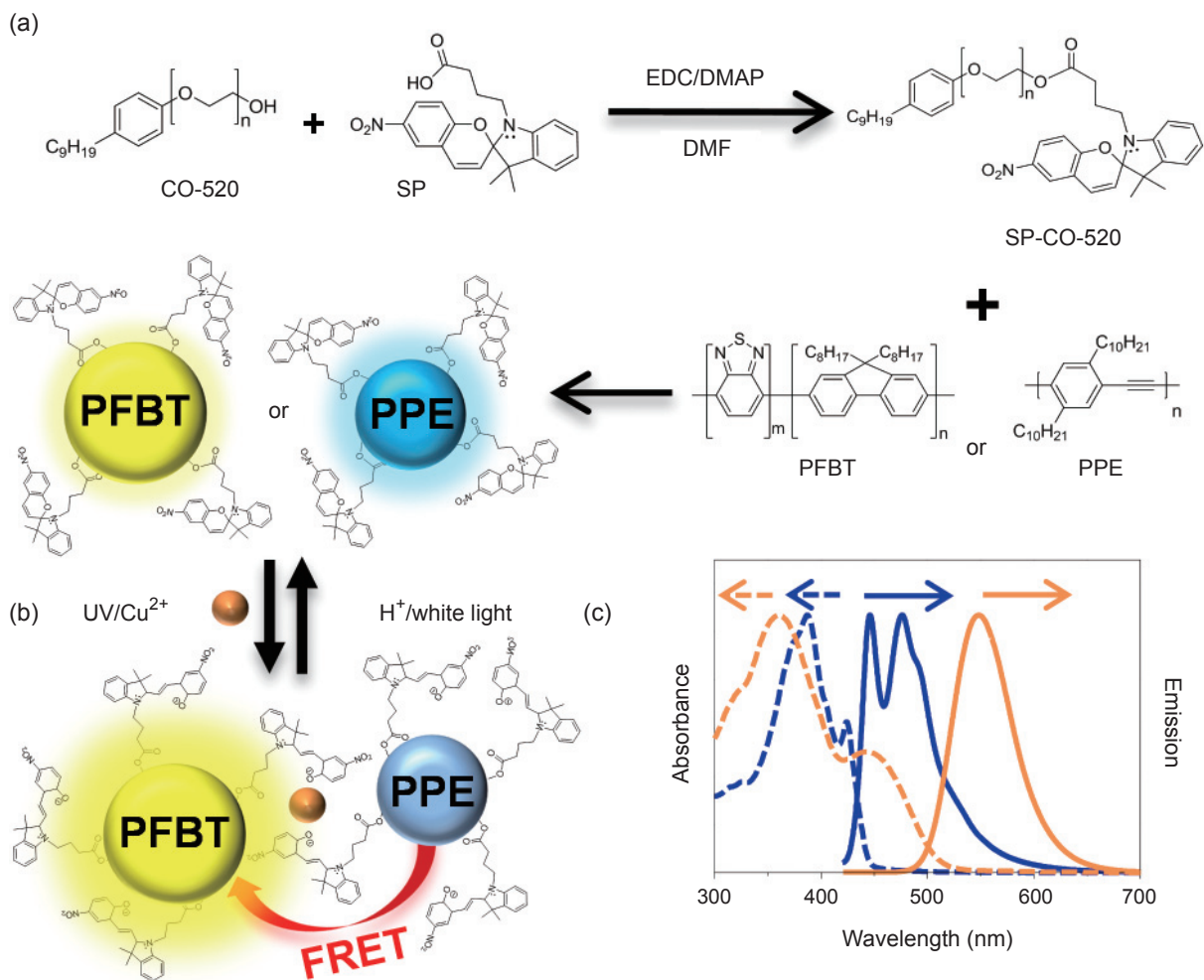


圖 5. 以 DMF 為溶劑，使 CO-520 和 Spiropyran 在 EDC、DMAP 催化下合成 SP-CO-520。SP-CO-520 分別和 PFBT 或 PPE 以再沉澱法製備成 SP-PFBT 或 SP-PPE 水溶液。SP-PFBT (黃球) 和 SP-PPE (藍球) 結合後，照射 UV 光，SP 開環成 MC 而對銅離子 (橘球) 作抓取，在 4 °C 且酸性狀態下照射白光則可逆回去。光譜重疊: donor 的放光光譜 (PPE, 藍色實線區域) 和 acceptor 的吸收光譜 (PFBT, 橘色虛線區)，藍色為 PPE，橘色為 PFBT，虛線為吸收光譜，實線為螢光光譜。

環境保護局強制規定飲用水中氟離子的濃度不得超過 4 ppm (95 μM)⁽³²⁾，所以科學家一直致力於更靈敏的氟離子偵測器⁽³³⁻³⁷⁾。然而在偵測氟離子的研究中，大多數的偵測器只能應用在有機相或是有機相與水相混合的溶液中來偵測四丁基氟化胺 (tetrabutylammonium fluoride, TBAF)⁽³⁴⁻³⁶⁾，然而使用以水為媒介的偵測器，才是主要能應用在生物與環境的領域中，特別是用於偵測水溶性的氟化鈉 (sodium fluoride, NaF)。

為了能在水中偵測氟離子，我們首先合成 triisopropylsilyl- 與 tert-butylphenylsilyl-protected 7-hydroxy-4-trifluoromethyl coumarin (TIPSCA / TBDPSCA) (圖 7(a))⁽³⁸⁾，再與 PPE 混合製備成 Pdots (圖 7(b))。然而在製備過程中發現 TIPSCA 的 Si-O 鍵會與水產生作用力造成斷鍵，無法應用於氟離子去保護的偵測系統中，所以本研究使用 TBDPSCA 當作染劑。接下來，我們使用 diacetylenes 經由照射 254 nm 的 UV 光形成聚二乙

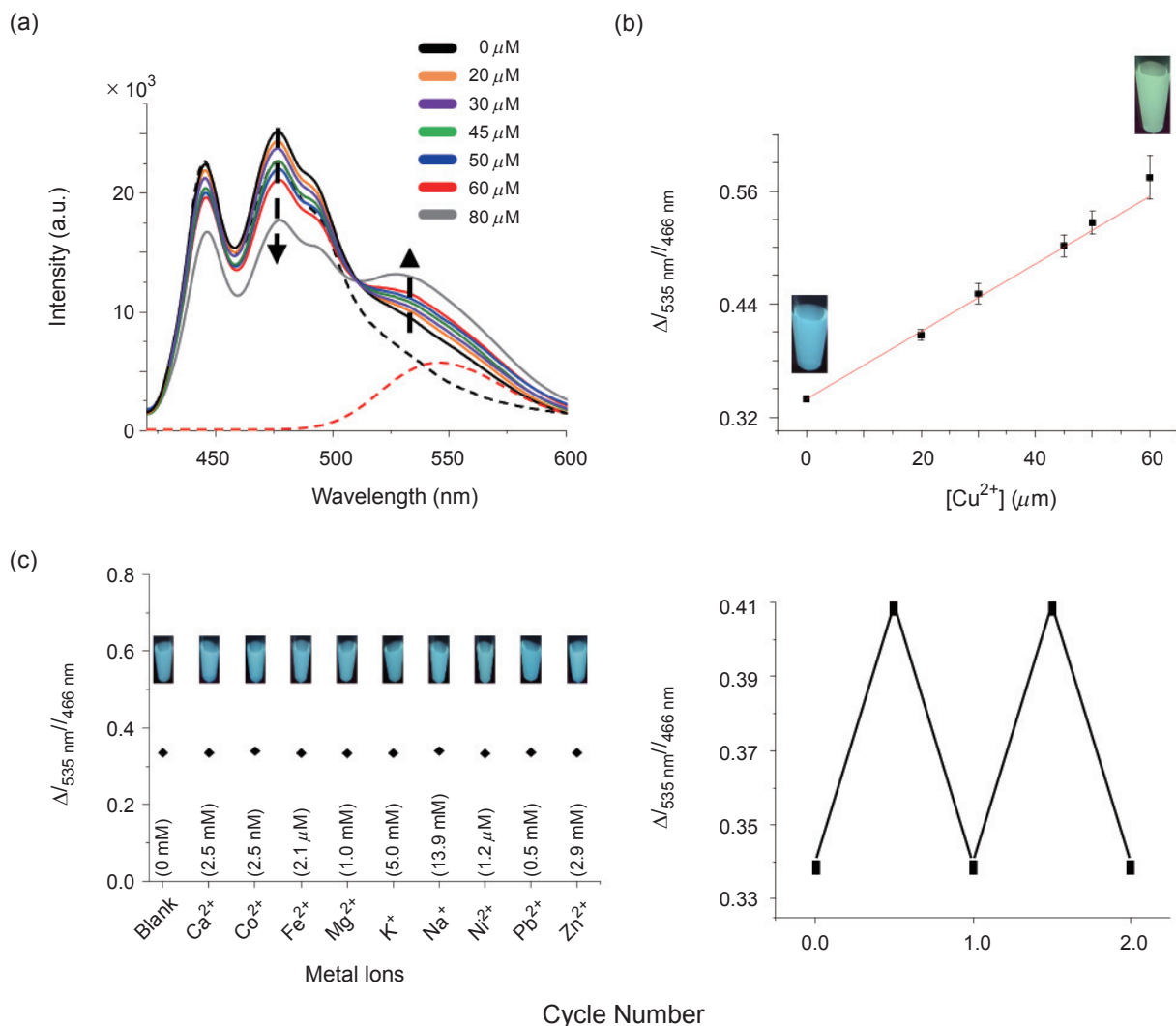


圖 6. (a) 不同銅離子濃度對 SP-PPE/SP-PFBT Pdots 水溶液的影響，銅離子濃度範圍為 0 到 80 μM 。黑色虛線表示單純的 SP-PPE 之放光光譜，紅色虛線表示單純的 SP-PFBT 之放光光譜。(b) 放光峰為 535 nm (SP-PFBT) 和 446 nm (SP-PPE) 所做成的校正曲線，銅離子濃度為 0 到 60 μM ，紅色線為 fitting 後所得到的直線 ($R^2 = 0.994$)，圖片分別為 $[\text{Cu}^{2+}] = 0 \mu\text{M}$ (左下，藍色溶液)， $[\text{Cu}^{2+}] = 60 \mu\text{M}$ (右上，綠黃色溶液)。(c) 偵測系統選擇性。SP-PPE/SP-PFBT 水溶液測試不同陽離子所得到的螢光強度比值 ($\Delta I_{535 \text{ nm}} / I_{466 \text{ nm}}$)，上部的圖片為每種樣品在 365 nm 照射下所拍攝。(d) SP-PPE 和 SP-PFBT 在照射 UV 光並加入銅離子後，以 pH = 3 且 4 $^{\circ}\text{C}$ 的條件下，然後照射白光，所得到的螢光強度比值，可逆性兩次。

炔 (polydiacetylenes, PDAs) 將 Pdots 包覆住，預防 TBDPSCA 從 Pdots 中漏出 (圖 7(b))。而 Pdots 尺寸由原本的 9 nm 增加至 17 nm (圖 7(c))。當加入氟化鈉之後，TBDPSCA 會被去保護形成 CA，PPE 經由 365 nm 的 UV 光激發後，能量會透過 FRET 機制傳遞給 CA，使得螢光圖譜上 PPE 的放光強

度 (440 nm) 下降，而 CA 的放光 (520 nm) 上升 (圖 8(b))，因此可透過螢光顏色，由藍變綠的轉變來偵測氟離子，並利用螢光訊號比例的方式定量 (圖 8(c))。同時此偵測器亦有良好的選擇性 (圖 8(a))。

在生物體應用方面，我們將此偵測器應用在 HeLa 細胞上。首先，藉由內吞作用 (endocytosis)

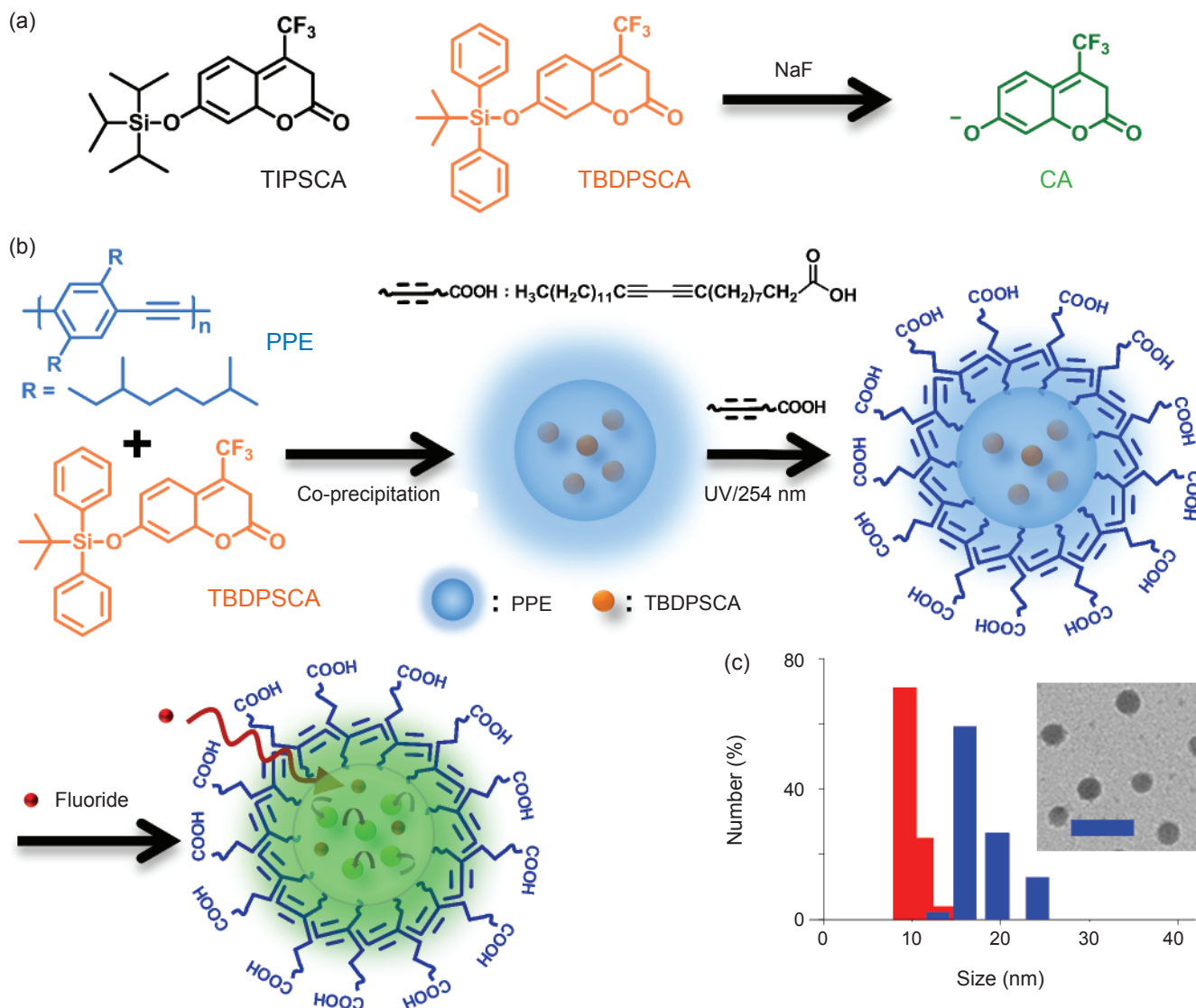


圖 7. (a) TIPSCA 與 TBDPSCA 的分子結構，以及偵測 NaF 的感測機制。(b) 半導體奈米高分子-PPE 與 TBDPSCA 染劑一起溶於 THF，利用再沉澱法在超音波震盪下加入水中形成 TBDPSCA-embedded PPE Pdots，之後再包覆上一層 PDAs 來預防 CA 染劑外漏。但是尺寸小的氟離子依舊能穿透 Pdots 基質中去保護 TBDPSCA 的 silyl group，使 PPE 的能量轉移給 CA 來發出螢光。(c) CA-doped PPE Pdots 在包覆 PDAs 的前 (紅色) 後 (藍色) 的粒徑大小。右上插入圖是 PDA-enclosed Pdots 的 TEM 圖，其中比例尺為 100 nm。

的方式，把 TBDPSCA-doped PPE Pdots 餵入 HeLa 細胞內，再加入 NaF 水溶液，此時整體氟離子濃度為 25 mM，經過兩小時以後，以螢光共軛聚焦顯微鏡觀察，可清楚的看出 CA (綠色螢光) 的放光訊號明顯增加，而 PPE (藍色螢光) 則減弱 (圖 9(a)–(f))，由此可知，此偵測系統能適用於

生物體系中。同時為了能應用於環境上，我們將 TBDPSCA-doped PPE Pdots 滴在濾紙上做成試紙，並加入氟化鈉，迅速地得到綠色的螢光變化 (圖 9(h))，證明 TBDPSCA-doped PPE Pdots 在生物與環境研究中都有其發展潛力。

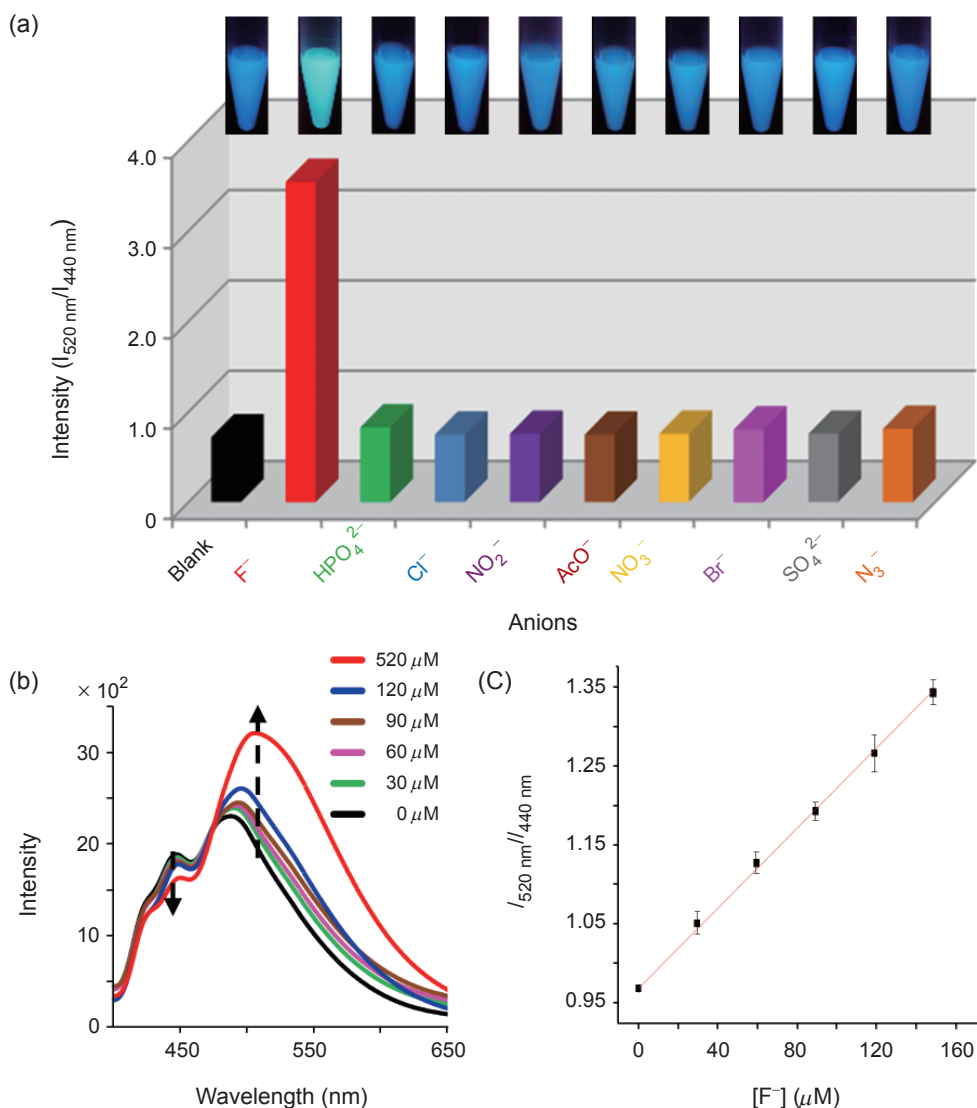


圖 8. (a) PDA-coated PPE/TBDPSCA Pdots 加入不同離子 (25 mM) 的螢光強度。上圖是每一個樣品經由 365 nm 光源激發下的螢光顏色。(b) PDA-coated PPE/TBDPSCA Pdots 加入不同濃度的氟離子的螢光圖譜。 $[F^-] = 0 - 520\text{ }\mu\text{M}$ (0–6.7 ppm), $\text{ex} = 405\text{ nm}$, $[\text{Pdots}] = 30\text{ nM}$, $\text{pH} = 6.7$ 。(c) 以 CA (520 nm) 與 PPE (440 nm) 的螢光強度比值所做的校正曲線。紅線為 fitting 後所得到的直線, $R^2 = 0.9992$ 。

2. 發展近紅外光的高分子奈米顆粒，並應用於生物影像

近年來許多科學家致力於發展近紅外光 (near-infrared, NIR, 650–900 nm) 的螢光探針，這是因為近紅外光具有高穿透性、由背景產生的螢光干擾小，以及對生物體有較低傷害性等優點^(39,40)，所

以成為熱門研究目標。最常見的近紅外螢光探針為有機染劑，但由於有機染劑光穩定性差、亮度低，且不溶於水等缺點，所以在應用上面臨許多挑戰。以下列分別舉出以合成與能量轉換的方式來製備近紅外光高分子奈米顆粒的研究。

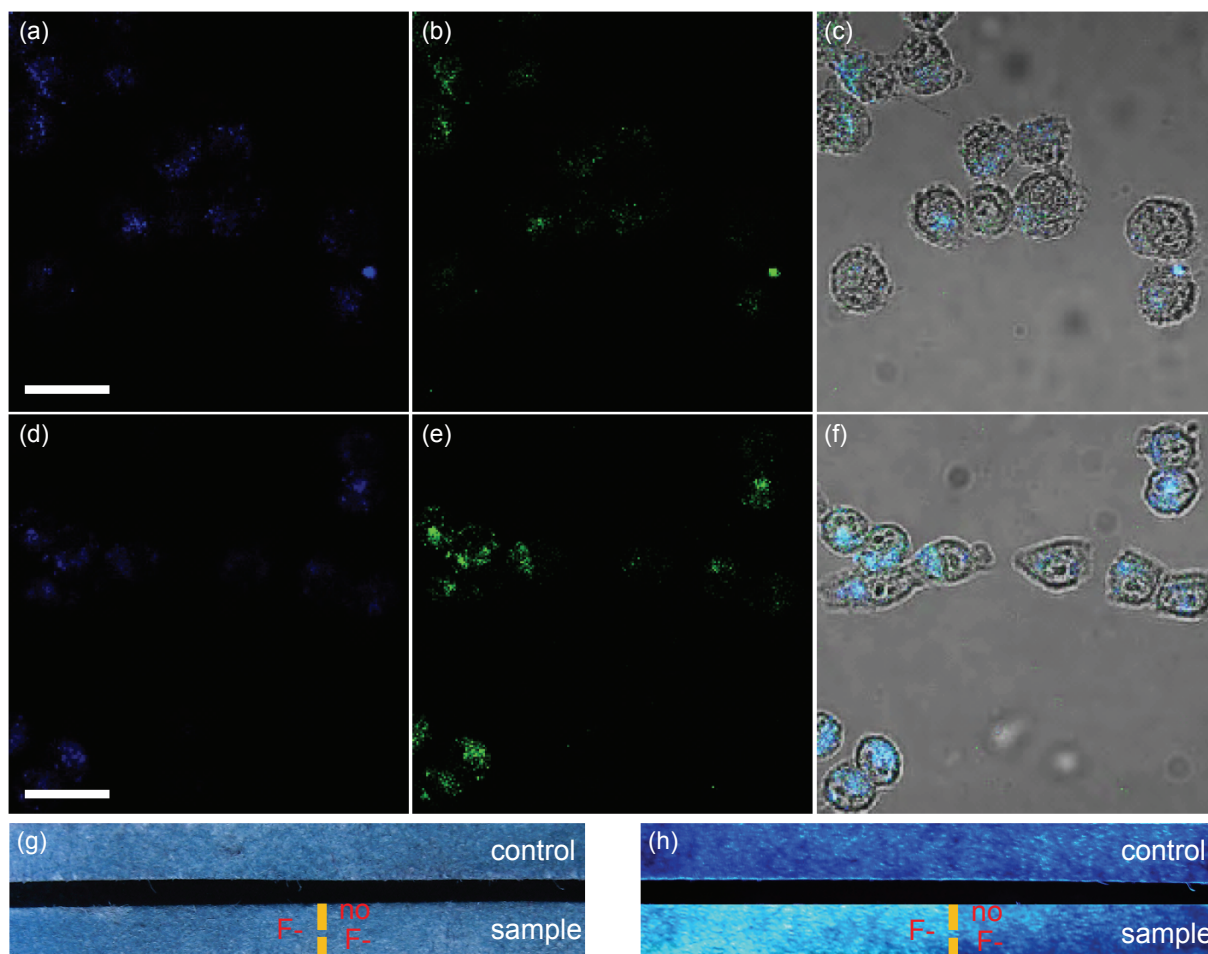


圖 9. 共軛聚焦顯微鏡影像圖：HeLa 細胞以 TBDPSCA-doped PPE Pdots 進行標記。(a)–(c) 為加入氟離子前。(d)–(f) 為加入氟離子後在 37 °C 的水浴中培養兩小時。(c) 與 (f) 為兩中螢光與明視野疊圖。比例尺為 20 μm 。試紙：將試紙浸入 TBDPSCA-doped PPE Pdots 後風乾，再加入 1 mM 的氟離子，等 30 秒後的結果。(g) 為白光下，(h) 為 365 nm UV 光下。

(1) 設計與發展近紅外光的高分子半導體點奈米顆粒，並應用在生物顯影

PFBT Pdots 是目前最廣為研究的 Pdots 之一，擁有極佳的亮度及優異的光穩定性，其吸收與放光波長分別在 450 nm 及 540 nm 左右，但為了應用在生物領域上，需要研發出更加紅移、甚至是近紅外光的高分子。為了解決這項問題，Chiu 團隊在 PFBT 中加入少量的近紅外光高分子來製備 Pdots，透過能量的轉移改變放光波長⁽⁴¹⁾。但是並不能同時讓吸收波長紅移，因為近紅外光的螢光分子都是利用延長共軛系統，增加共振效果來達到紅移目的，所以當加入過多的近紅外光高分子會有良好的 π - π stacking 導致螢光消光，使量子產率下降

(42, 43, 44)。再者由於缺乏穩定的共價鍵結，被包覆的高分子有漏出來的可能性。

為了解決上述問題，我們將 PFBT 中 BT 的 S 取代成 Se 合成出 benzoselenadiazole (BS) 單體，並與 fluorene 高分子化合成 PFBS (圖 10)⁽⁴⁵⁾，利用 Se 提供更窄的 π - π^* band gap 與提供相鄰 BS 單體鏈間的更強作用力，讓吸收與放光波長能紅移，同時維持 PFBT 原有的亮度。之後我們改變 fluorene 與 BS 的比例，合成一系列的高分子，探討所製成的 Pdots 相對應的光學性質 (圖 11 與表 2)，成功讓螢光放光紅移約 40 nm，其中 PFBS30 在 488 nm 的雷射光源激發下，其螢光亮度能與 PFBT 媲美。

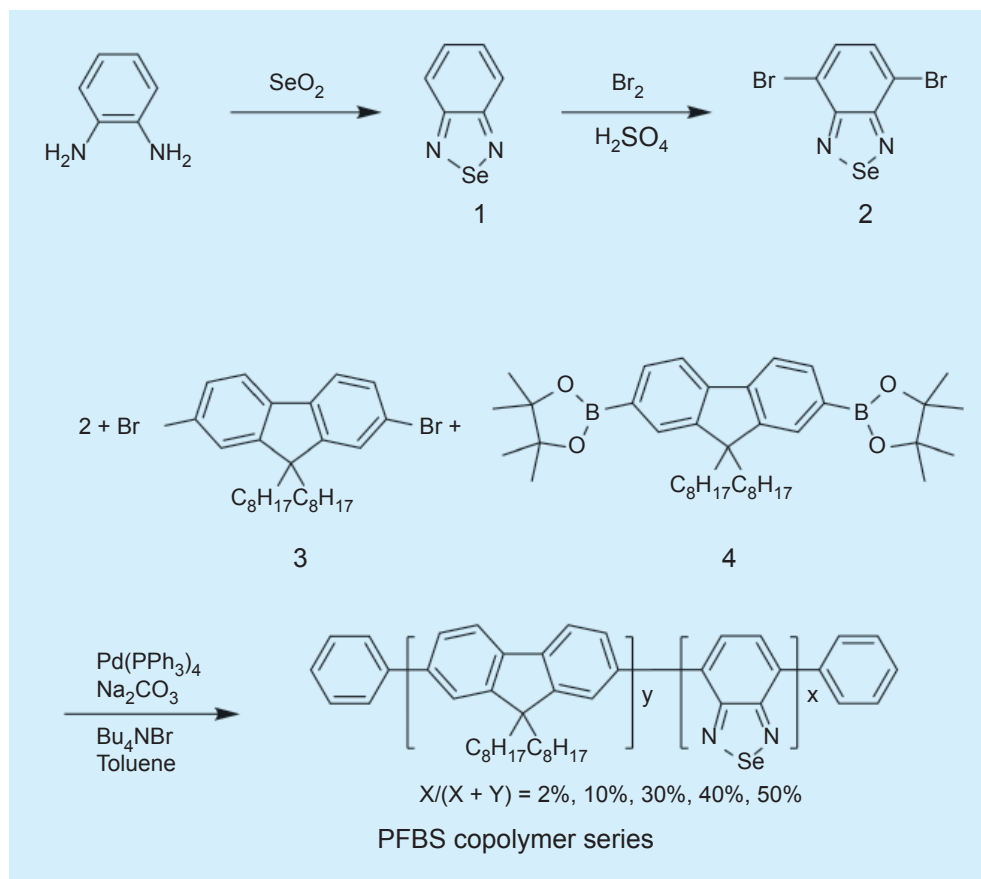


圖 10.
PFBS 結構與合成比例。

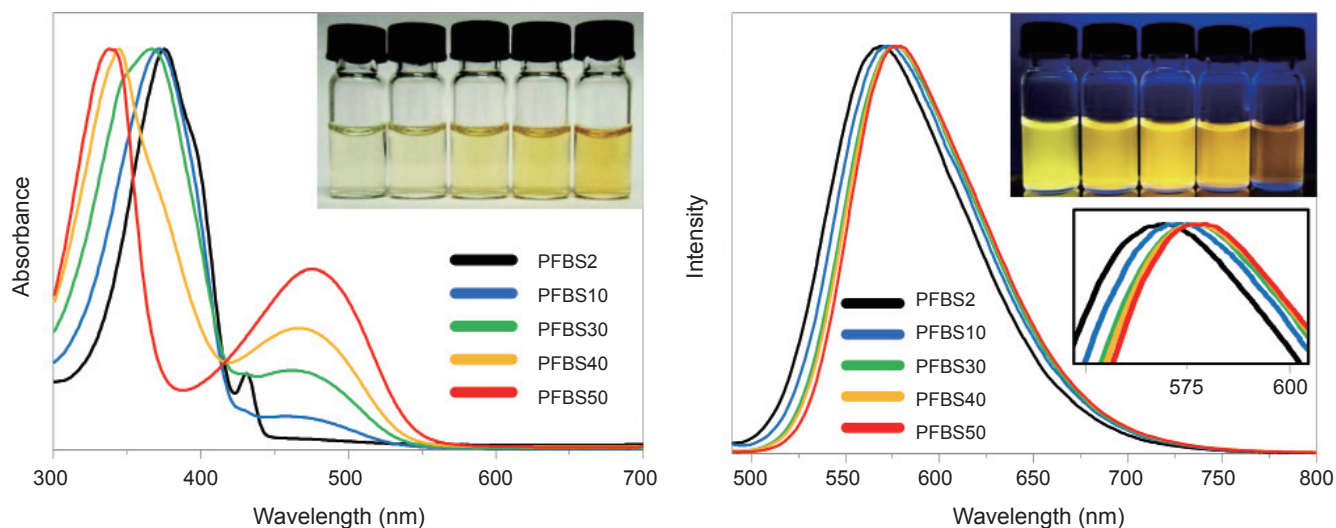


圖 11. PFBS Pdots 不同比例下的吸收光譜與螢光光譜圖。左邊插入圖為 Pdots 溶液在白光下的顏色，由左至右為 PFBS2 至 PFBS50。右邊插入圖為 Pdots 溶液在 365 nm UV 燈下的螢光，由左至右為 PFBS2 至 PFBS50。

表 2.

PFBS Pdots 系列在水中的顆粒大小與物理光學性質。

copolymers	$\lambda_{\text{abs,max}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{FL,max}}/\text{nm}$	$\sigma (10^{-13} \text{ cm}^2)$	$\Phi (\%)$	Size (nm)
PFBS6	452	570	0.60	16	27
PFBS16	456	572	1.29	23	27
PFBS30	460	576	1.98	44	26
PFBS40	467	578	3.44	17	27
PFBS50	475	579	5.11	8	29

之後我們進一步把 PFBS30 修飾上 streptavidin，然後以特異性標記的方式應用在人類子宮頸癌細胞 (HeLa) 上。由圖 12 可看出，圖 12 (a) 至 (c) 的樣品組與圖 12(d) 至 (f) 的負樣品組有明顯差異，而細胞有被修飾抗體的樣品組，證明 PFBS30 確實能專一性標記在所設計的位置上，並發出橘色螢光，而且沒有非專一性吸附。負樣品組則沒有任何橘色螢光的訊號，由此可證實 PFBS30 成功運用於生物影像中。

然而 PFBS 的紅移效果有限，特別是在吸收

波長的部分，為了使 Pdots 的放光達到近紅外光範圍，同時吸收亦能夠紅移，因此首先在 BS 上修飾兩個 thiophene 合成出 4,7-di (thiophene-2-yl) benzo[c][1,2,5]selenadiazole (DBS)，期望增加共振的效果來影響紅移的程度。再來以 BT 作為供體，讓激發波長由 fluorene 的 380 nm 紅移至 455 nm，而高分子鏈中的 fluorene 仍然保持 50% 的比例，以避免 π - π stacking 造成的聚集 (圖 13)。接著以不同比例的 BT 與 DBS 高分子化，並製備成 Pdots，探討其光學性質 (圖 14(a)、(b))。

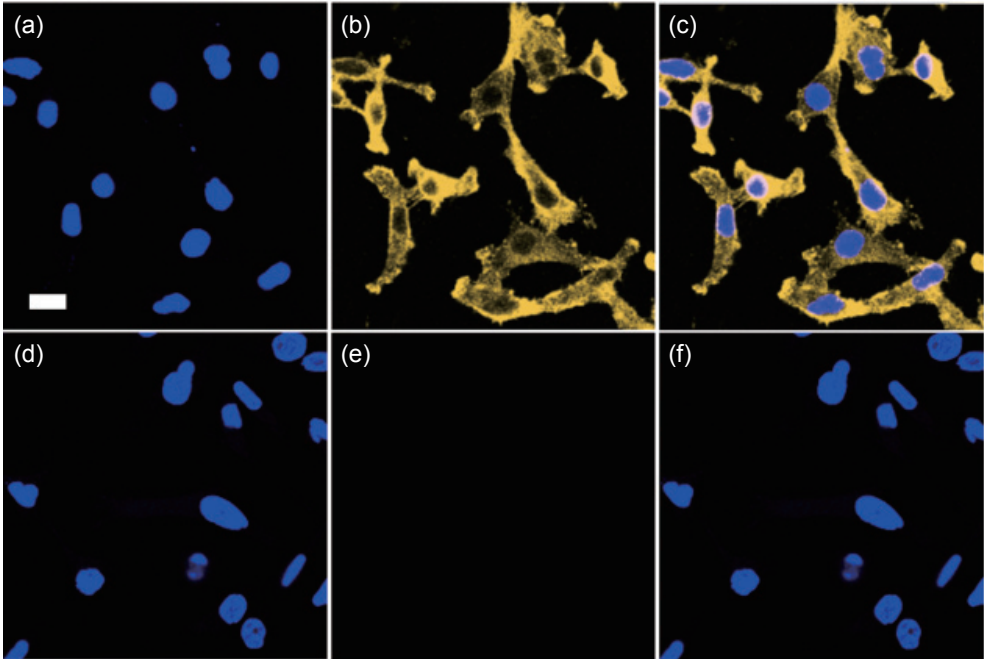


圖 12. 共軛聚焦顯微鏡影像圖：人類子宮頸癌細胞以 PFBS30-streptavidin 進行特異性標定。(a)–(c) 正樣品組 (positive samples): 藍色螢光來自於 Hoechst34580 $\lambda_{\text{ex}} = 408 \text{ nm}$ ，filter = 450/35 band-pass)，橘色螢光來自 PFBS30-streptavidin $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ，螢光濾片 = 570 long-pass)，右圖為兩種螢光與明視野 (Bright view) 疊圖 (d)–(f) 負樣品組 (negative control samples)：與 (a)–(c) 圖差別在於沒有修飾抗體。比例尺為 $20 \mu\text{m}$ 。

但隨著 DBS 在高分子中的比例上升，量子產率也隨著下降 (表 3)。因此為了避免螢光消光發生，分別在 thiophene 的第三及第四的位置修飾上長碳鏈合成出 DBSOC6 與 DBSIC6 (圖 13 中下)，利用長碳鏈增加立體障礙來減少聚集，以利提升 DBS 在高分子中比例。再分別用不同比例的 BT 與 DBSIC6/DBSOC6 合成高分子，並製成 Pdots (表 3) 來探討其光學性質。而我們成功地讓 DBS 含量可超越總體比例的 10%，同時能使用波長為 488 nm，甚至是更長波長的雷射光源激發 Pdots，並且提供良好的光穩定性。此外，我們在 fluorene 單體的側鏈上修飾 carboxylic acid groups 來提供生物耦合與感測上的應用。由圖 15 可看出，當我們把 Pdots-streptavidin 修飾至有抗體的 HeLa 細胞上，成功地形成特異性標記，而負樣品組則無任何 Pdots 的螢光產生，證明 DBS-based NIR-emitting Pdots 能在基礎生物研究及在生物影像和生物分析上有更寬廣的應用。

表 3. PFBT-DBS Pdots 系列在水中的物理光學性質。

Copolymers	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ (%)
PFBT-DBS1	320, 452	709	20
PFBT-DBS4	323, 450, 566	719	6
PFBT-DBS10	324, 445, 567	730	2
PFBT-DBS33	394, 568	747	2
PFBT-DBS50	397, 570	760	1
PFBT-DBSOC ₆ 1	321, 458	701	36
PFBT-DBSOC ₆ 4	322, 453, 543	711	29
PFBT-DBSOC ₆ 10	323, 453, 550	715	15
PFBT-DBSOC ₆ 33	354, 552	720	3
PFBT-DBSOC ₆ 50	367, 557	724	2
PFBT-DBSIC ₆ 1	322, 450	672	12
PFBT-DBSIC ₆ 4	341, 448	680	11
PFBT-DBSIC ₆ 10	342, 455	684	8
PFBT-DBSIC ₆ 33	349, 472	690	2
PFBT-DBSIC ₆ 50	373, 500	702	2

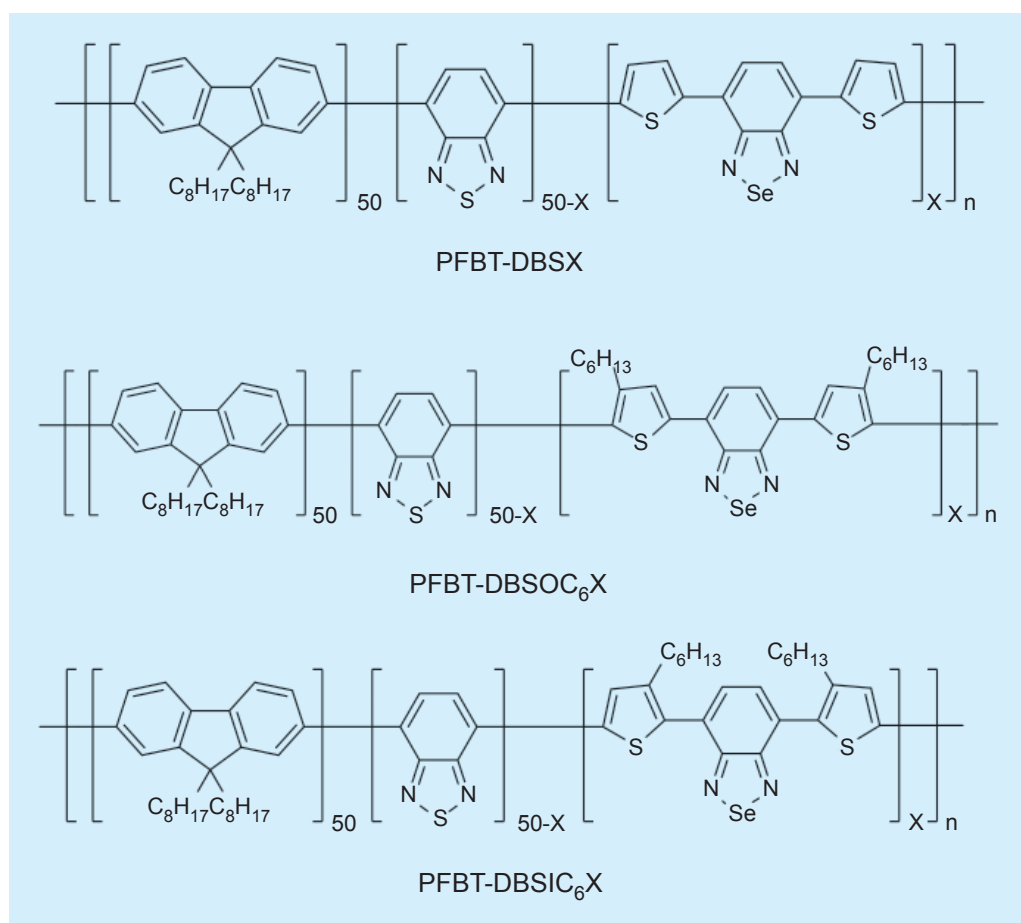


圖 13.
PFBT-DBS 系列結構圖。

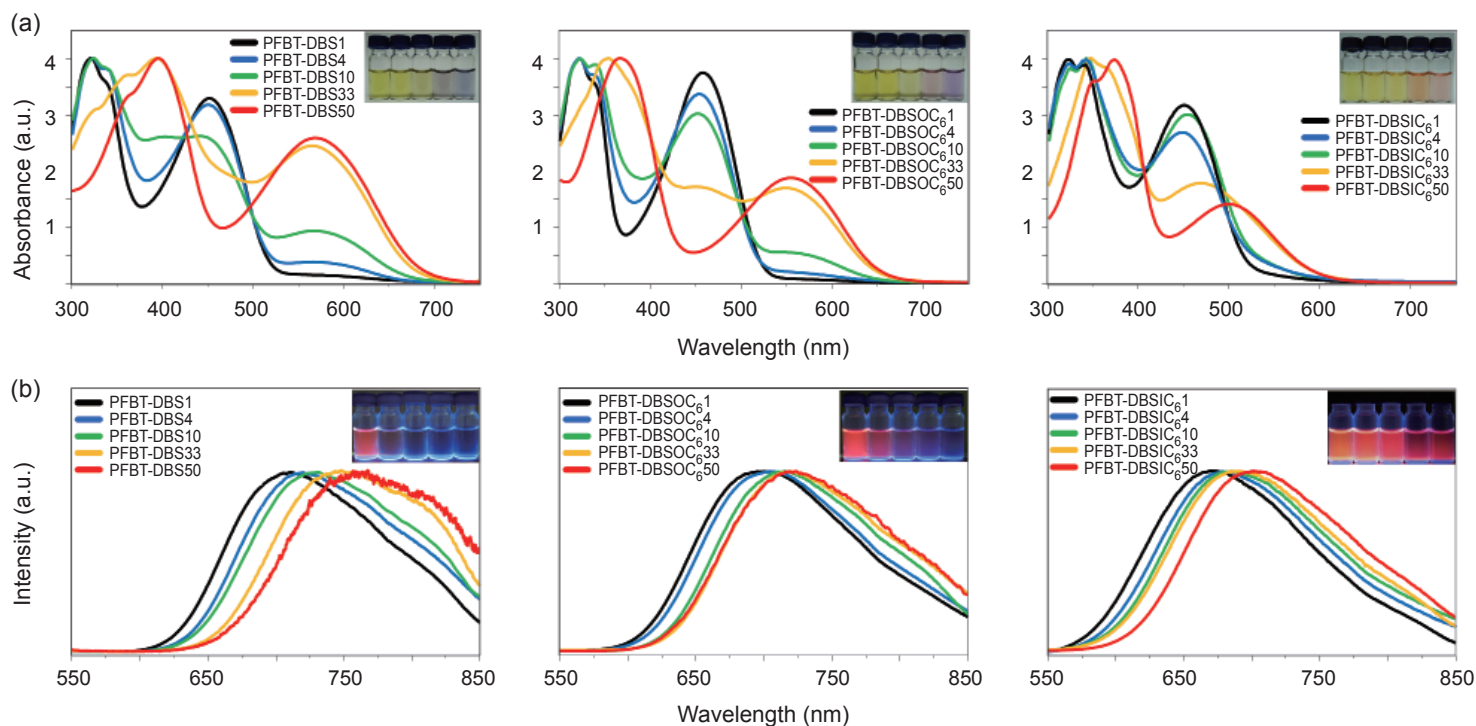


圖 14. PFBT-DBS Pdots 系列的 (a) 吸收光譜與 (b) 螢光光譜圖。(a) 之右上角插入圖為 Pdots 溶液在白光下的顏色，DBS 比例由左至右上升。(b) 之右上角插入圖為 Pdots 溶液照射 365 nm UV 光的螢光，DBS 比例由左至右上升。

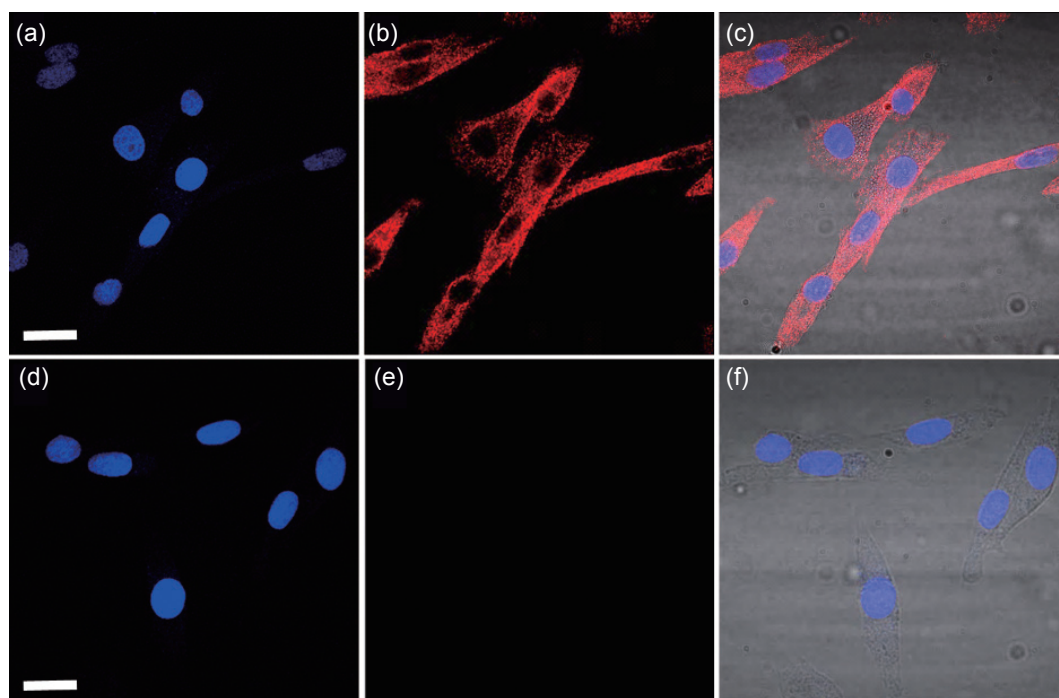


圖 15. 共軛聚焦顯微鏡影像圖：人類子宮頸癌細胞以 PFBT-DBSOC610-COOH Pdots 進行特異性標定。(a)－(c) 正樣品組 (positive samples)：藍色螢光來自於 Hoechst34580 ($\lambda_{\text{ex}} = 408 \text{ nm}$ ，filter = 450/35 band-pass)，紅色螢光來自 Pdots ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ，螢光濾片 = 570 long-pass)，右圖為兩種螢光與明視野疊圖 (d)－(f) 負樣品組 (negative control samples)：與 (a)－(c) 圖差別在於沒有修飾抗體。比例尺為 $20 \mu\text{m}$ 。

(2) 發展聚二乙炔包覆近紅外光半導體高分子奈米顆粒，並應用在生物影像，以及感測器

近期，我們團隊以 PFBT-DBT Pdots 包覆不同的 NIR 染劑，藉由 Pdots 以 FRET 方式傳遞能量給染劑來產生 NIR 放光，藉此製備出 NIR-emitting Pdots (圖 16)⁽⁴⁶⁾。但由於會有染劑外漏的問題，所以我們在 Pdots 外部修飾聚二乙炔 (polydiacetylenes, PDAs) 來多一道牆防止 NIR 染劑露出。首先，我們探討 PDA enclosed NIR695-doped Pdots 在人類生理條件下 (37 °C) 的穩定性，結果顯示在 PDAs 的保護下，NIR695-doped Pdots 在浸泡 37 °C 的水浴中 24 小時，所得到的螢光強度變化微小，表示 PDAs 確實能避免染劑外漏。確立好此 Pdots 的光學特性及穩定性，我們後續分別以內吞作用以及特異性標記來探討生物體系方面的應用。把製備好的 PDA enclosed NIR695-doped

Pdots 以內吞作用的方式餵入 HeLa 細胞中，發現細胞內的酸性環境並不會使 Pdots 的螢光變弱 (圖 17)。

另外，以人類乳癌細胞 (MCF-7) 來進行細胞特異性標記，藉由 EDC 催化，使聚二乙炔上的 carboxylic acid groups 與 streptavidin 鍵結，然後再與已修飾抗體的 MCF-7 上作結合，結果顯示 Pdots 確實能夠在特定位置發出螢光，並無任何非專一性吸附 (圖 18)。最後利用 PDA 的比色法 (colorimetry) 特性，來製備成一種隨手可得的偵測型試紙。

首先，我們把製備好的試紙浸泡在 90 °C 的熱水中 5 秒，此時因為 PDAs 的結構受到破壞，而使共軛長度縮短或扭曲，所以試紙則由藍色變成紅色 (圖 19(a))。由於 PDA 結構受破壞，導致 NIR 染劑從 PFBT-DBT 漏出，而使 PFBT-DBT 的螢光強度增加，雖然在紅色狀態時，試紙應呈現明顯的紅

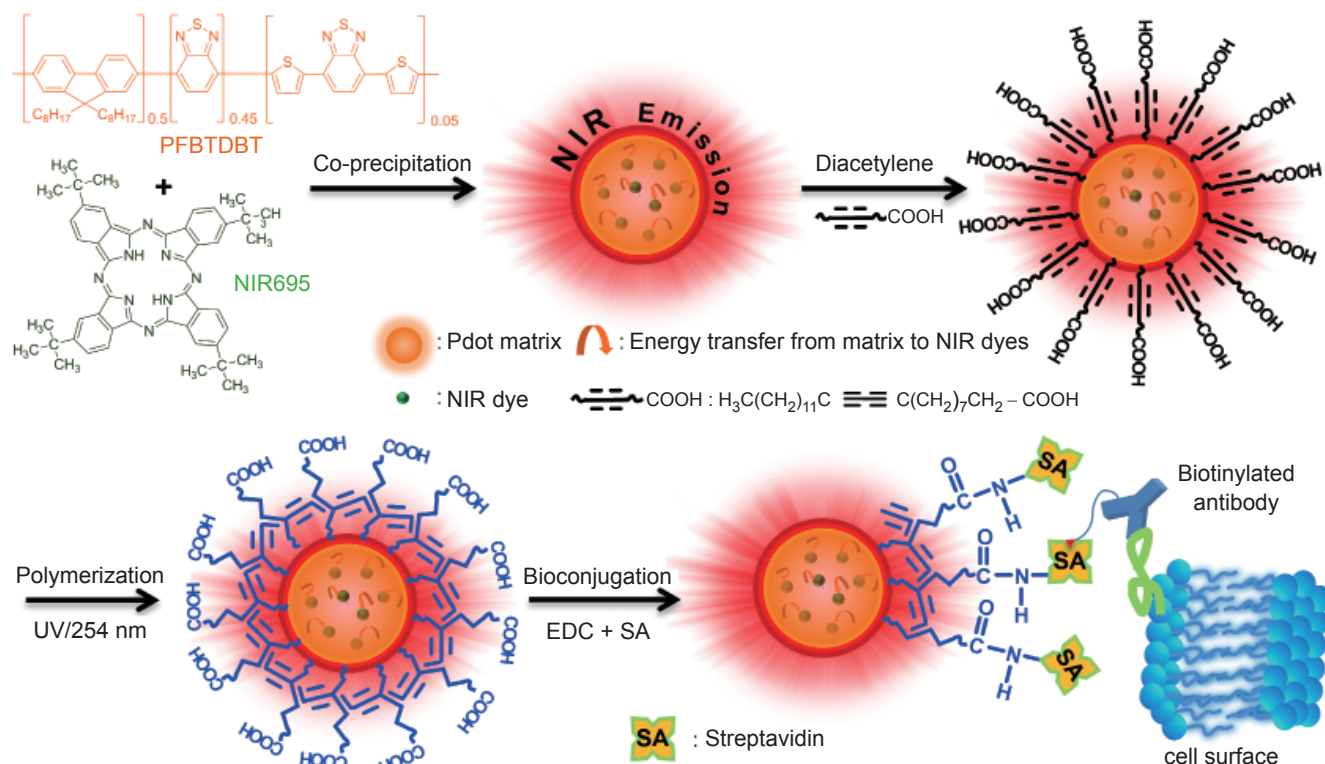


圖 16. 製備 NIR 半導體高分子奈米顆粒，並使用 polydiacetylene 包覆，以及藉由 bioconjugation 進行特異性細胞標記。半導體高分子奈米顆粒 PFBT-DBT 以再沉澱法包覆 NIR695 染劑形成 Pdts 基質 (橘色球)，此時 PFBT-DBT 會以 FRET 方式 (橘色箭頭) 傳遞能量給 NIR695 染劑 (綠色球)，而放出近紅外光，然後修飾上 diacetylene，並以 254 nm UV 高分子化成 PDA，最後在以 EDC 催化使 COOH 和 streptavidin (SA) 結合，利用細胞表面所修飾的 biotinylated antibody 和 Pdot-SA 鍵結而標記在細胞上。

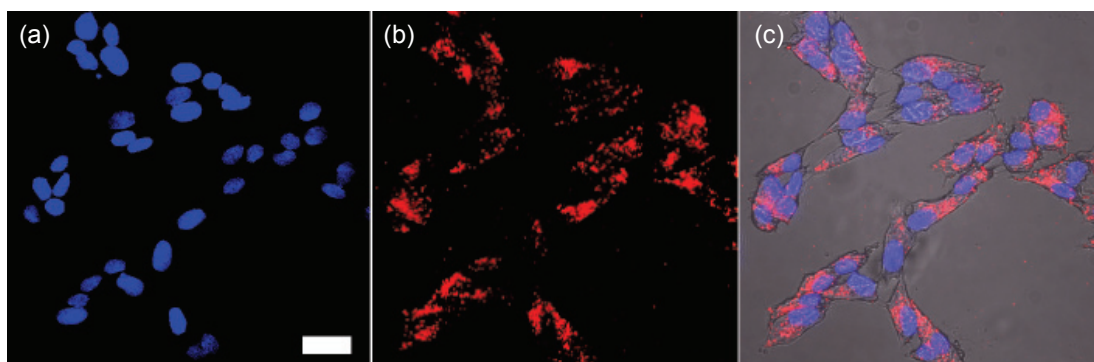


圖 17. 共軛聚焦顯微鏡影像圖：子宮頸癌細胞以 0.75% PDA-enclosed NIR695-embedded Pdots 進行內吞作用。(a) 藍色螢光來自於 Hoechst34580, $\lambda_{\text{ex}} = 408 \text{ nm}$, filter = 450/35 band-pass (b) 紅色螢光來自 0.75% PDA-enclosed NIR695-embedded Pdots, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, 螢光濾片 = 570 long-pass (c) (a)、(b)、明視野疊圖，比例尺為 $30 \mu\text{m}$ 。

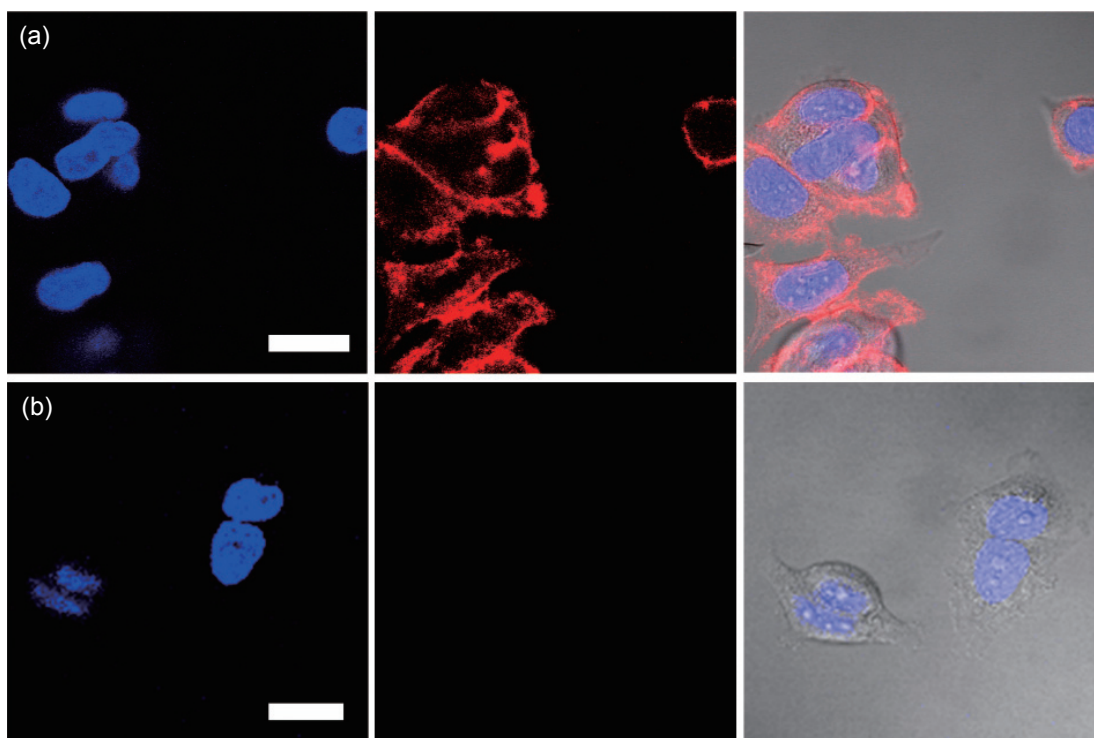


圖 18. 共軛聚焦顯微鏡影像圖：人類乳癌細胞 MCF-7 以 PDA-coated 0.75% NIR695-PF-BT-DBT 進行特異性標定。(a) 正樣品組 (positive samples)：藍色螢光來自於 Hoechst34580 $\lambda_{\text{ex}} = 408 \text{ nm}$, filter = 450/35 band-pass, 紅色螢光來自 PDA-coated 0.75% NIR695-PFBT-DBT $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, 螢光濾片 = 570 long-pass, 右圖為兩種螢光與明視野疊圖 (b) 負樣品組 (negative control samples)：與 (a) 圖差別在於沒有修飾抗體。比例尺為 $20 \mu\text{m}$ 。

色螢光 (圖 19(b))，但比較量子產率，紅色狀態時 ($QY = 1\%$) 比單純 PFBT-DBT ($QY = 30\%$) 低。

我們成功地製備出具雙偵測系統 (比色法 (colorimetry)/螢光) 的近紅外光 Pdots 螢光探針，不僅成功地運用在生物影像，也可製備成偵測型試紙，在未來可藉由修飾不同官能基來設計具專一性的偵測試紙。

三、結論

Pdots 因為具有高螢光亮度、良好光穩定性與生物相容性，並且具備能量放大的特質，所以為廣泛應用於生物影像及偵測的新型螢光探針。到目前為止，我們團隊運用不同的 Pdots 成功設計出各種感測系統。在偵測離子方面，製備出對氟離子與銅離子具選擇性、靈敏性的偵測系統。另一方面，以有機合成方式或能量轉換概念來開發不同的近紅外光 Pdots，並成功應用於偵測以及細胞生物影像上。在未來的發展中，我們將朝向可以製備出尺寸更小的 Pdots，以便於增加與其他物質的結合率。除此之外，我們也期望可以開發吸收光和放射光皆在近紅外範圍的 Pdots，使 Pdots 能廣泛的運用到各層面。

參考文獻

1. J. V. Frangioni, *J. Clin. Oncol.*, **26**, 4012 (2008).
2. A. L. Vahrmeijer, M. Hutteman, J. R. v. d. Vorst, C. J. H. v. d. Velde, and J. V. Frangioni, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **10**, 507 (2013).
3. G. M. V. Dam, G. Themelis, L. M. A. Crane, N. J. Harlaar, R. G. Pleijhuis, W. Kelder, A. Sarantopoulos, J. S. d. Jong, H. J. G. Arts, A. G. J. v. d. Zee, J. Bart, P. S. Low, and V. Ntziachristos, *Nat. Med.*, **17**, 1315 (2011).
4. J. Peng, X. He, K. Wang, W. Tan, Y. Wang, and Y. Liu, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**, 645 (2007).
5. H. S. Peng, J. A. Stolwijk, L. N. Sun, J. Wegener, and O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 4246 (2010).
6. A. M. Delfus, W. C. W. Chan, and S. N. Bhatia, *Nano Lett.*, **4**, 11 (2004).
7. V. Brunetti, H. Chibli, R. Fiammengo, A. Galeone, M. A. Malvindi, G. Vecchio, R. Cingolani, J. L. Nadeau, and P. P. Pompa, *Nanoscale*, **5**, 307 (2013).
8. K. M. Tsoi, Q. Dai, B. A. Alman, and W. C. W. Chan, *Acc. Chem. Res.*, **46**, 662 (2013).

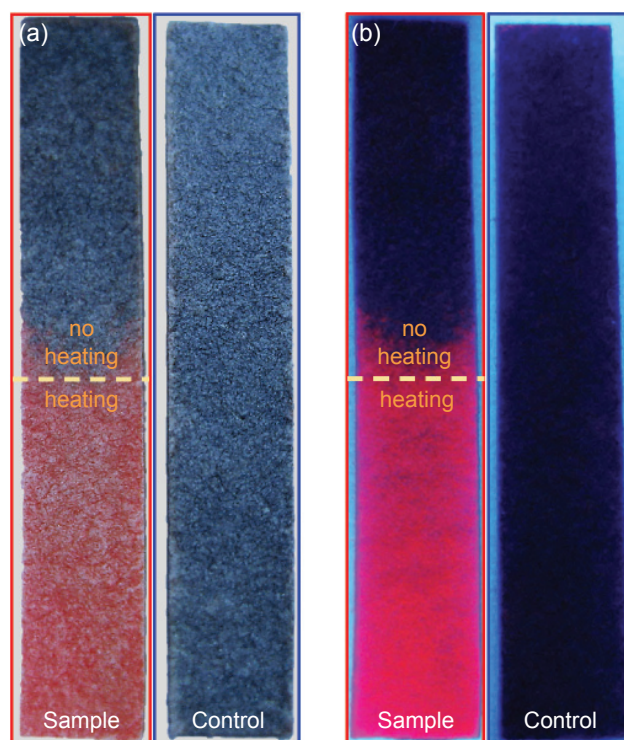


圖 19. 由 PDA-enclosed PFBT-DBT-0.75% NIR695 Pdots 所製備的試紙，再浸泡至 90 °C 熱水五秒後所產生的顏色變化。(a) 白光下 (b) 在 365 nm UV 光下。

9. C. Wu, B. Bull, C. Szymanski, K. Christensen, and J. McNeill, *ACS Nano*, **2**, 2415 (2008).
10. Z. Tian, J. Yu, C. Wu, C. Szymanski, and J. McNeill, *Nanoscale*, **2**, 1999 (2010).
11. J. Pecher and S. Mecking, *Chem. Rev.*, **110**, 6260 (2010).
12. A. Kaeser, A. P. H., and J. Schenning, *Adv. Mater.*, **22**, 2985 (2010).
13. D. Tuncel and H. V. Demir, *Nanoscale*, **2**, 484 (2010).
14. K. Li and B. Liu, *J. Mater. Chem.*, **22**, 1257 (2012).
15. K. Y. Pu and B. Liu, *Adv. Funct. Mater.*, **21**, 3408 (2011).
16. C. Wu and D. T. Chiu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 3086 (2013).
17. X. Feng, L. Liu, S. Wang, and D. Zhu, *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 2411 (2010).
18. M. S. Liu, X. Jiang, S. Liu, P. Herguth, and A. K. Y. Jen, *Macromolecules*, **35**, 3532 (2002).
19. H. G. Gilch and W. L. Wheelwright, *J. Polym. Sci. Part A*, **4**, 1337 (1996).
20. S. H. Jin, S. Y. Kang, M. Y. Kim, Y. U. Chan, J. Y. Kim, K. Lee, and Y. S. Gal, *Macromolecules*, **36**, 3841 (2003).
21. J. H. Moon, W. McDaniel, P. MacLean, and L. F. Hancock, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 8223 (2007).
22. B. Francois, S. Izzillo, and P. Irtacabal, *Synth. Metals*, **102**, 1211 (1999).

23. B. J. Laughlin and R. C. Smith, *Macromolecules.*, **43**, 3744 (2010).
24. Y. H. Chan and P. J. Wu, *Part. Part. Syst. Charact.*, **1** (2014).
25. C. Wu, S. J. Hansen, Q. Hou, J. Yu, M. Zeigler, Y. Jin, D. R. Burnham, J. D. McNeill, J. M. Olson, and D. T. Chiu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 3430 (2011).
26. C. P. Chen, P. J. Wu, S. Y. Liou, and Y. H. Chan, *RSC Adv.*, **3**, 17507 (2013).
27. P. Trumbo, A. A. Yates, S. Schlicker, and M. Poos, *J Am Diet Assoc.*, **101**, 294 (2001).
28. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf (accessed October 26, 2012)
29. E. L. Que, D. W. Domaille, and C. Chang, *J. Chem. Rev.*, **108**, 1517 (2008).
30. P. J. Wu, J. L. Chen, C. P. Chen, and Y. H. Chan, *Chem. Commun.*, **49**, 898 (2013).
31. E. B. Bassin, D. Wypij, and R. B. Davis, *Canc Causes Contr.*, **17**, 421 (2006).
32. <http://water.epa.gov/action/advisories/drinking/upload/dwstandards2012pdf>, assessed January 09 (2014).
33. M. Cametti and K. Rissanen, *Chem. Commun.*, 2809 (2009).
34. E. J. Cho, J. W. Moon, S. W. Ko, J. Y. Lee, S. K. Kim, J. Yoon, and K. C. Nam, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12376 (2003).
35. S. Guha and S. Saha, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 17674 (2010).
36. C. R. Wade, I. S. Ke, and F. P. Gabbaï, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **51**, 478 (2012).
37. S. Y. Kim, J. Park, M. Koh, S. B. Park, and J. I. Hong, *Chem. Commun.*, 4735 (2009).
38. Y. C. Huang, C. P. Chen, P. J. Wu, S.Y. Kuo, and Y. H. Chan, *J. Mater. Chem. B*, **2**, 6188 (2014).
39. Y. Jin, F. Ye, M. Zeigler, C. Wu, and D. T. Chiu, *ACS Nano.*, **5**, 1468 (2011).
40. L. Yuan, W. Lin, S. Zhao, W. Gao, B. Chen, L. He, and S. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 13510 (2012).
41. C. Wu, S. J. Hansen, P. Q. Hou, J. Yu, M. Zeigler, Y. Jin, D. R. Burnham, J. D. McNeill, J. M. Olson, and D. T. Chiu, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **50**, 3430 (2011).
42. Y. Jin, F. Ye, M. Zeigler, C. Wu, and D. T. Chiu, *ACS Nano*, **5**, 1468 (2011).
43. M. Johansson and R. M. Cook, *Chem.-Eur. J.*, **9**, 3466 (2003).
44. S. W. Thomas III, G. D. Joly, and T. M. Swager, *Chem. Rev.*, **107**, 1339 (2007).
45. C. P. Chen, Y. C. Huang, S. Y. Liou, P. J. Wu, S.Y. Kuo, and Y. H. Chan, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **4**, 21585 (2014).
46. P. J. Wu, S.Y. Kuo, Y. C. Huang, C. P. Chen, and Y. H. Chan, *Anal. Chem.*, **86**, 4831 (2014).



吳佩靜小姐為國立中山大學化學碩士，現任國立中山大學化學系研究助理。

Pei-Jing Wu received her M.S. in analytical chemistry from National Sun

Yat-sen University. She is currently a research assistant at National Sun Yat-sen University .



黃雅琦小姐為國立中山大學化學系學士，現任國立中山大學化學系研究助理。

Ya-Chi Huang received her Bachelor's degree in analytical chemistry from

National Sun Yat-sen University. She is currently a research assistant at National Sun Yat-sen University.



詹揚翔先生為美國德州農工化學博士，現任國立中山大學化學系助理教授。

Yang-Hsiang Chan received his Ph.D. in analytical chemistry from Texas A&M

University, USA. He is currently an assistant professor in the Department of Analytical Chemistry at National Sun Yat-sen University.