

第二章

羰基取代的拉電子效應

研究動機

已知九號位置為拉電子取代基的 BMVC 衍生物螢光強度在 DNA 的環境下並沒有增強很多，有可能是由於拉電子螢光分子 9N-BMVC 在九號位置有 NO_2 取代，這個取代基的氧原子上有多對孤對電子，很有可能這些孤對電子會對於分子的螢光造成影響。於是提出羰基取代的分子進行討論。因為羰基也是屬於拉電子取代基，並且具有較單純的孤對電子結構，由此可以確認是否拉電子取代會造成分子和 DNA 作用後螢光增強的程度降低。

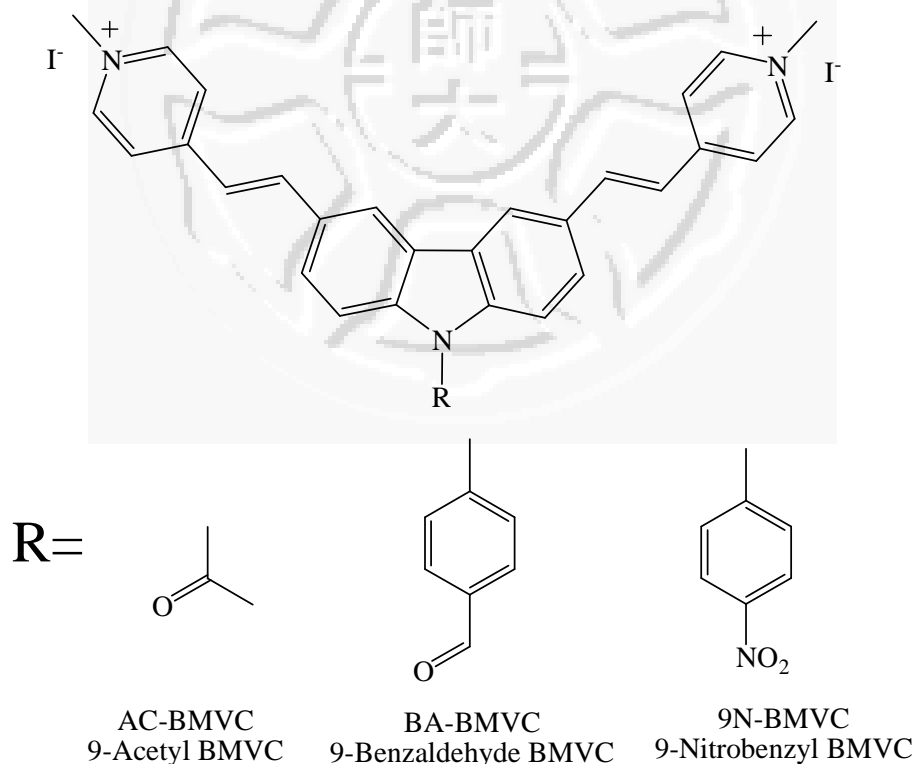
另外羰基的取代和 BMVC 分子九號位置的氮原子會形成氨基化合物(Amide)，這種取代基對於環境的酸鹼會很敏感。如果是一般的 Amide 分子，在酸性或者鹼性的情況下都會分解成為酸類和氨類，是否 BMVC 的衍生物在酸鹼的情況下也會分解，在這個部份也會進行深入的討論。最後經由實驗發現，AC-BMVC 分子在微鹼的環境下或者 protic 的溶劑中，照光也可能造成類似分解的效果，在吸收光譜上看到明顯的紅位移，我們可以藉此設計新的藥物載體(Drug carrier)，這樣的特質對於設計新的雙分子化合物會有很大的幫助。

實驗：

1. 合成步驟：

本部份在 BMVC 九號位置增加羰基的拉電子取代基，分別為 **AC-BMVC** – 直接在 BMVC 分子九號位置增加拉電子取代；以及 **BA-BMVC** – 經由苯環結構共振後接上甲醛的拉電子取代，和第一部分的 9N-BMVC 一起比較，三者皆為拉電子取代的 BMVC 衍生物。

本實驗部分探討在九號位置上的孤對電子是否是造成螢光分子和 DNA 作用後螢光消失的原因。另外也利用酸鹼反應探討羰基對於 BMVC 分子的影響。



AC-BMVC 是使用醋酸酐在三氟酸硼的環境下進行反應⁽²⁴⁾。取 2g 的 3,6-dibromo carbazole(0.006 mole)用 20ml 的醋酸酐溶解，再加

入 0.01ml 的 $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ 加熱回流反應半小時，得到的固體過濾後用管柱層析純化，再利用正己烷再結晶，即可得到 9-actyl3,6-dibromocarbazole，在使用 Heck 反應以及碘化甲烷甲基化，得到 AC-BMVC。反應過程如圖十一。

BA-BMVC 是 BMVC 在九號位置接上 benzaldehyde 取代，同第一部分是在九號位置接上苯環結構的取代，然而在這裡無法使用 Ulmann reaction，因為 4-iodobenzaldehyde 無法直接購買取得，因此由 4-bromobenzaldehyde 作為起始反應物。

文獻已知經由 Pd 催化可將溴化的苯環結構接上 Carbazole 的九號位置⁽²⁵⁾，然而 3,6dibromo carbazole 在 3,6 號位置上的溴對於反應會有所影響，因此這裡必須使用 carbazole 進行反應，再使用 NBS 將 carbazole 的 3,6 兩端溴化，使用 Heck 反應以及甲基化反應得到所最終產物。反應過程如圖十二。

取 0.5 克的 Carbazole 溶解於甲基苯(Toluene)中，加入 1 克的溴化苯甲醛(4-bromobenzaldehyde)、1 克的碳酸鉀(K_2CO_3)、0.02 克的醋酸鈀($\text{Pd}(\text{oAc})_2$)還有 0.05ml 的 $\text{P}(\text{t-Bu})_3$ 。氮氣下反應 24 小時，產物使用二氯甲烷和水萃取，再用正己烷再結晶，即可得中間產物 9-benzaldehyde carbazole。

取 1.14 克的 9-benzaldehyde carbazole，先溶解在 THF 中，再將

1.4 克的 NBS 用 DMF 溶解，冰浴下把 NBS 溶液緩慢滴入 THF 中，室溫下反應六小時，發生固體沉澱，過濾後的固體再結晶後即為 3,6-dibromo benzaldehyde carbazole。產物使用 Heck 反應並且甲基化，即可得到 BA-BMVC。

2. NMR :

得到的分子產物使用 Bruker AC300 MHz spectrometer 進行 NMR 圖譜的量測，得到的結果如下。

AC-BMVC :

$^1\text{H NMR}(\text{d-DMSO}) : \delta$ 8.895 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 4H), 8.772 (s, 2H), 8.327 (d, $J=8.7$, 2H), 8.262 (d, $J=6.6$, 4H), 8.16 (d, $J=16.2$, 2H), 7.884 (d, $J=8.7$, 2H), 7.746 (d, $J=16.2$, 2H), 4.286 (s, 6H), 2.94 (s, 3H)

BA-BMVC

$^1\text{H NMR}(\text{d-DMSO}) : \delta$ 10.19 (s, 1H), 8.868 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 4H), 8.767 (s, 2H), 8.276 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 4H), 8.251 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 4H), 7.995 (d, $J=4.2\text{Hz}$, 2H), 7.953 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 7.646 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 7.634 (d, $J=15.9\text{Hz}$, 2H), 4.273 (s, 6H)

3. 溶劑效應和 DNA 配置 :

如同第一章討論的配置方法。

4. PAGE

20% 丙烯醯胺加上 10mM Tris-HCl 製成膠，電泳在 4°C 下使用 150 伏特電壓跑 15 個小時，比較染料分子和 DNA 作用的特性和螢光表

現。Pre-stain是將DNA和染料分子1:1混合後再進行電泳；post stain是電泳實驗結束後，再使用BMVC溶液20um染色，將pre-stain沒有染到的DNA染色，以確認分子有和DNA作用。

5. 光化學反應

將染料溶解在不同溶劑下，進行光照實驗，照光一段時間後將樣品放入吸收光譜儀中進行量測，比較吸收光譜隨照光時間的變化量。

照光裝置使用汞燈作為光源，使用 400nm~450nm band pass 的濾鏡進行實驗。儀器架設如圖十三。

由汞燈作為光源，光源先通過聚光鏡片，進入盛裝水的玻璃容器，吸收燈光的熱，減少影響分子變化的變因。再通過一片聚光片讓光線聚集後，進入 400~450nm band pass 的濾片取我們需要的波長。最後再使用聚光鏡將光源集中，形成直徑兩公分的藍光，再使用石英槽盛裝樣品，進行光化學反應的測量。汞燈到樣品之間的距離為30cm，光照射到樣品的強度約 0.3mW。

實驗方法為將溶液盛裝在 1cm 的石英槽內，直接接受照光並且記錄時間，照光一定的時間後直接將石英槽放入吸收光譜儀內進行光譜量測，即可得到吸收光譜隨照光時間變化的圖形。

結果討論：

羰基取代屬於拉電子取代基，因此可以推測羰基取代的衍生物吸收與螢光光譜都有藍位移的情況，所以在這個部份首先要由吸收與螢光光譜的測試驗證拉電子取代的特性。

承接之前的研究結果，拉電子取代分子和 DNA 作用後螢光並沒有顯著的增強，所以將羰基取代的分子和 DNA 作用後量測光譜的變化，進一步確認拉電子取代的衍生物和 DNA 作用後的螢光是否和 9N-BMVC 一樣沒有明顯增強。

另外 AC-BMVC 九號位置的 Amide 結構有可能會因為環境酸鹼性改變而發生取代基脫離的現象，因此利用光譜量測以及 TLC 實驗，進而確認分子的變化。這種分子脫離的現象對於將 BMVC 和其他功能分子連接之間的 linker 設計有很大的幫助，它能夠幫助我們控制分子脫離的時機，達到其他的研究目的。

因此關於 AC-BMVC 在酸鹼環境下的變化是很值得討論的部份，如果利用酸鹼性的改變就可以破壞這個橋樑結構，對於新的染劑分子或者藥物分子設計會有很大的幫助。

1. 拉電子取代的衍生物的光譜比較：

承接第一部分，羰基取代亦為拉電子取代基，因此這個部份首先要確認拉電子取代基是否對於分子的吸收螢光光譜都有顯著的影

響。因此將分子溶解在 DMSO 中進行光譜的量測，為了方便比較不同衍生物吸收以及螢光波長的不同，這個部份將所有光譜標準化，比較波形與波長的不同。

圖十四可以看到這些拉電子取代的分子都和第一部分中的 9N-BMVC 有類似的表現，吸收螢光光譜都有藍位移的現象，吸收光譜的波形也比較單純，不像推電子取代的化合物似乎有兩個波峰堆疊而成。因此可以在一次確認拉電子取代基對於 BMVC 分子的螢光有所影響，尤其 AC-BMVC 會造成吸收與螢光波長明顯的藍位移，這表示拉電子效應越強，吸收與螢光光譜藍位移的現象也越顯著。

2. DNA 環境作用

如同第一部份，將 AC-BMVC 等拉電子取代的 BMVC 衍生物和 DNA 混合進行吸收以及螢光光譜的量測。得到的光譜圖如圖十五。

圖中顯示拉電子取代分子在 DNA 環境下螢光增強的程度都不如甘油的環境，這和 9N-BMVC 的結果類似。唯 BA-BMVC 和 DNA 作用後螢光仍有較明顯的增強，這很有可能是因為羰基取代透過苯環後對於 BMVC 的影響較少。然而仍然可以發現 BA-BMVC 在 Hum24 的環境螢光強度只有在甘油環境的一半，這部份仍然顯示拉電子取代基和 DNA 作用後螢光會減弱。

會造成螢光減弱的原因有很多，因此必須先確認分子和 DNA 有

作用，於是使用 T_m 的數據進行佐證，確認分子和 DNA 之間的作用，並探討螢光減弱的原因。

T_m 的結果得知 AC-BMVC 增加了 Hum24 解旋溫度 3.5°C ；BA-BMVC 增加了 5°C 。這得到了初步的證明分子和 Hum24 有所作用，但是作用力並沒有像 BMVC 這麼明顯，很有可能分子和 DNA 是屬於 Groove binding，所以作用力不強，於是造成螢光增強的效果不明顯，於是進一步使用電泳確認分子和 DNA 的作用以及螢光表現。

圖十六為拉電子的衍生物和 Hum24 或者 LD 之間的電泳比較圖。分別為預先染色(Pre-stain)和事後使用 BMVC 染色(Post-stain)。Pre stain 的結果可以發現分子和 Hum24 作用有產生微弱的螢光，這證明了分子和 DNA 有所作用，然而螢光強度減弱。

然而這個部份發現 BA-BMVC 和 LD 作用後，在溶液中的表現和 GEL 中的表現很不一樣。這可能是因為分子和 LD 的作用方式受到取代基的影響，而改變了螢光的表現。然而不論是 GEL 或者 T_m 的結果，都可以證明 BA-BMVC 以及其他拉電子取代的衍生物都會和 G-四股結構的 Hum24 有作用，卻沒有螢光增強的現象，因此這個部份再度的確認拉電子取代基會影響分子和 DNA 作用的螢光表現。唯 BA-BMVC 和 LD 之間的作用模式仍需要其他的研究來討論。

實驗證明分子和 DNA 之間有相互的作用。但是分子的螢光表現

卻不如推電子取代分子的增強，由結構上的差異探討，似乎可以將原因歸咎於拉電子取代基上的孤對電子。

可能由於孤對電子屬於未鍵結電子對，當 BMVC 衍生物分子和 DNA 作用後，能階的順序會因此改變，促使分子放出螢光的過程受到影響，導致螢光強度降低。然而會造成螢光減弱的現象還可能會有許多種其他的原因，但是在此能夠歸納出一個結論：大部分的拉電子取代基都具有未鍵結電子對，這些電子很有可能會因為分子的構形變化而發生能階的改變，導致螢光消失。不過這仍需要計算化學或者進一步的研究來進行佐證，因此在這裡只能提出未成對電子影響螢光強度的假設。

不過由本實驗得知，拉電子取代基的修飾會改變分子的螢光表現，因此在合成或者設計新分子的時候，必須要考慮這些影響的因素。

3. 酸鹼環境影響：

DNA 是一種磷酸根組成的雙股結構，是否這樣的磷酸根會對於 BMVC 等分子的吸收螢光表現有所影響？於是將分子溶解在甘油和水 1:1 的混合溶液中進行磷酸鈉的滴定實驗，甘油的目的是作為螢光增強劑，方便進行螢光光譜的量測。

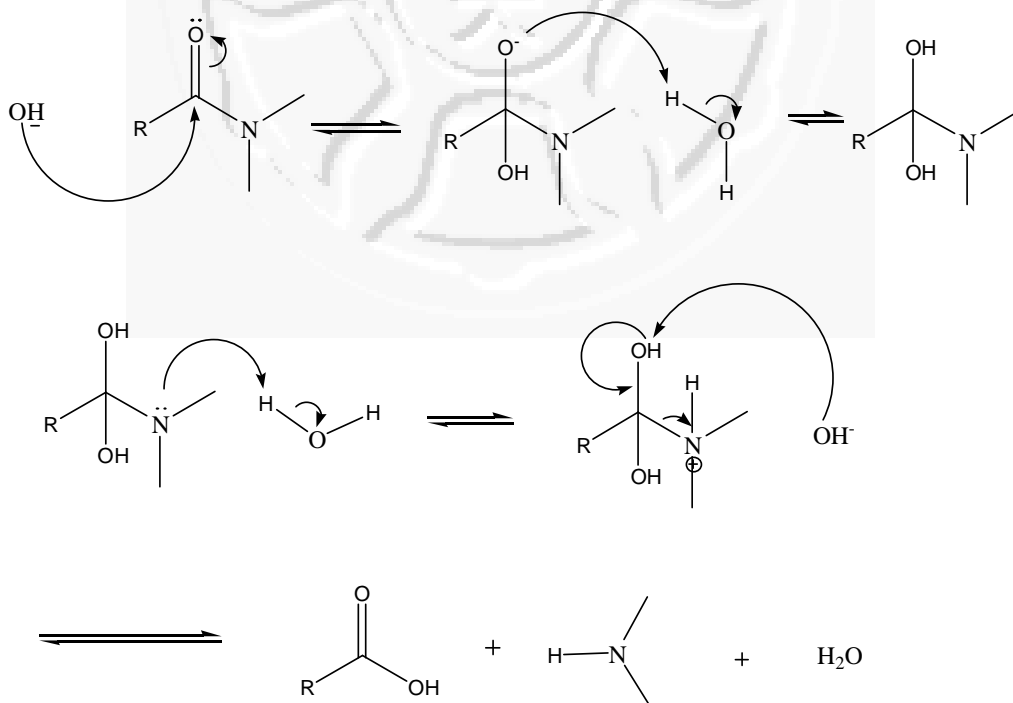
結果顯示 BMVC 分子的吸收螢光光譜並不容易受到磷酸鈉的影響，磷酸鈉的滴定只會造成 BMVC 的吸收峰微弱地降低，但是並沒

有顯著的影響。然而 AC-BMVC 的光譜卻會隨著磷酸鈉的增加而發生顯著的變化。如圖十七。

由圖十七可以觀察到，AC-BMVC 加入磷酸鈉後，吸收光譜從 380nm 移至 450nm，並且在 430nm 也有吸收峰，也就是原本屬於拉電子取代特性的吸收光譜變成了推電子取代的特性。這樣顯著的改變很值得進一步去討論，是否因為酸鹼性的改變造成九號位置取代的反應。

AC-BMVC 的九號位置上 carbazole 的氮和 carbonyl 的羰基組合可以視為 Amide 官能基，這種官能基會隨著環境的酸鹼發生變化。

鹼性的反應機構如下⁽²⁶⁾：



Amide 的反應機構似乎可以解釋 AC-BMVC 鹼性滴定的實驗結

果，拉電子取代的羰基受到鹼性環境的影響而離去，分子結構即變回推電子取代的 BMVC，於是光譜有如此顯著的變化。而且 BA-BMVC 的吸收光譜在鹼性環境下並沒有如此變化，因此推測 AC-BMVC 九號位置類似 Amide 的結構很有可能受到環境酸鹼影響而發生反應。

然而這只是由光譜的結果得到的推測，還需要進一步的研究確認是否分子發生脫離的反應。

為了確認九號位置的羰基是否會離去，利用薄層層析法(TLC)比較分子的變化。由於混合物中的各個組成份對固定相的吸附能力不同，當移動相(Mobil phase)流經固定相(Stationary phase)時，便會發生無數次的吸附解析。吸附力弱的組成份隨流動相迅速向前移動，吸附力強的組成份滯留在後，由於各組成份具有不同的移動速率，最後得以在固定相上分離。因此 TLC 可以快速的確定分子是否為同一化合物。

然而 BMVC 及其衍生物都是經過甲基化而帶正電荷的分子，這種分子對於一般有機溶劑的溶解度很差，而且和固定相的矽膠(silica gel)吸附力也比較大，導致衝提液無法將樣品分子，所以無法使用 TLC 進行 BMVC 等衍生物的層析實驗，於是比較甲基化以前的 AC-BVC 加入鹼的前後和 BVC 的 TLC，若 AC-BVC 在九號位置的羰基結構會和鹼性反應後發生取代機離去的反應，加入鹼後 AC-BVC

會變成 BVC 的結構，TLC 上會看到加入鹼的 AC-BVC 和 BVC 有相同的 Rf 值。

因此將分子溶解在 1ml 的甲醇中，分別配置了三種樣品，(1)為 AC-BVC 溶解在甲醇中，(2)為(1)再加入 0.1 克的氫氧化鈉(NaOH)，(3)則為 BVC 溶解在甲醇中。使用 CH_2Cl_2 : n-hexane:Methanol = 10 : 5:1 的衝提液進行 TLC 實驗。實驗結果如圖十八。

圖的左側比較溶劑的螢光顏色，編號(1)是 AC-BVC 在加入鹼之前，發出藍色且強度偏弱的螢光。然而在溶劑中加入 0.1g 氫氧化鈉(NaOH)，可以看到螢光顏色立刻轉變如編號(2)；將(2)溶液和(3)BVC 的甲醇溶液比較，可以看到兩者具有類似的螢光顏色以及強度。這就初步的證明了 AC-BVC 加入鹼後，很有可能因為羰基取代離去而出現 BVC 分子。

右側圖的 TLC 結果可以更加確定羰基取代因為鹼的加入而離開 carbazole 九號位置。編號(2)的樣品和編號(3)具有相同的 Rf 值，而且螢光顏色也相同。可以確定分子和鹼性反應後，出現了 BVC 的結構。這樣的結果證明了甲基之化前的 AC-BMVC 九號位置的羰基取代在鹼性的催化下會發生離去的反應。

然而重複同樣的實驗，在(2)號的系統中加入 0.5ml，3M 的 HCl 水溶液進行酸性環境下的 TLC 實驗，確認酸性環境是否會造成九號

位置的羰基取代離去。

酸性 TLC 實驗的結果發現，AC-BVC 九號位置的羰基取代並不會受到酸性的環境影響而發生離去反應，所以 AC-BVC 只對於鹼性環境會有所反應。理論上來說，Amide 的官能基應該在酸性或者鹼性的環境下都會有所反應，但是實驗卻只有在鹼性環境下發生變化，這和實驗的溶劑環境或者分子本身的 pK_a 值有關係。

然而在這個部分我們可以證明 AC-BMVC 的前驅物加入鹼後九號位置的羰基取代會發生離去的反應，這樣的機制可以提供未來分子設計更多的線索。

4. 羰基取代的特殊光化學變化：

AC-BMVC 九號位置的羰基會隨著環境酸鹼性改變而發生斷裂，這樣的表現對於未來實驗的合成設計提供很重要的資訊。因為對於設計二元系統分子(binary compound)的研究，雙分子之間的連接者(linker)是很重要的，如果可以控制連接者斷裂，即可讓雙分子化合物有更多利用的空間，例如藥物的攜帶或者螢光探針的設計。

研究發現除了酸鹼反應外，光化學反應也有可能造成 AC-BMVC 發生九號位置脫離的現象。研究這樣的機制可以幫助我們計分子攜帶藥物，經過照光後將藥物釋放，成為新的藥物攜帶分子(Drug carrier)。而且使用照光將雙分子化合物之間的連接者切斷，可以讓我們更容易

控制分子的表現，對於未來設計新的化合物會有很大的貢獻。

實驗結果顯示分子在弱鹼或具有活性氫的環境下，受到照光的影響，吸收光譜會產生明顯的變化：分別將 AC-BMVC 溶解在甲醇中並加入少量的自來水(如圖十九 A)；以及 DMSO 中，並且加入少量的磷酸鈉水溶液提供弱鹼性環境以及水 (如圖十九 B) ，同樣進行照光實驗。可以看到 AC-BMVC 的吸收光譜在 30 分中在 450nm 的位置產生了吸收峰。這些表現和 AC-BMVC 在鹼性環境下光譜的變化很類似，表示分子很有可能受到光照的催化，分子發生了取代基離去的反應。

然而仔細觀察圖十九 A,B 兩圖，可以發現兩者仍有些許的不同。B 圖中鹼性環境發生的光化學變化在 410nm 的位置有一個等吸收點，這表示鹼性環境中照光會造成 AC-BMVC 九號位置的羰基取代離去，發生兩種結構的轉換，造成等吸收點的出現。然而 A 圖可能屬於酸性環境下的變化，因此 410nm 的位置並沒有等吸收點，光譜較不像是兩種結構的互變，而是有其他的反應機制發生。

已知 Amide 在酸鹼環境下的分離反應機構很不相同，因此圖十九 A,B 之間的差異很有可能是這種原因所造成的結果。可以由此推測，光照很有可能催化 Amide 的反應，發生取代基離去的效果。然而只有光譜上的變化，不足以證明分子會如同鹼性環境發生取代基脫離的

效應。因此仍需要進一步實驗證明。

將 AC-BMVC 甲基化以前的分子 AC-BVC 同樣進行照光反應，並使用 TLC 鑑定比較，看光照是否會造成九號位置取代基的離去。然而 TLC 實驗的結果顯示照光後 AC-BVC 並不會受到照光而發生結構的變化。這是因為 AC-BVC 兩端沒有被甲基化，也就是沒有帶正電荷的電子接收者造成 ICT 的效應，這樣會造成羰基取代更容易離開 carbazole 九號位置上氮原子。

於是我們可以推測，AC-BMVC 具有特殊的光化學反應，九號位置的取代很有可能因為光化學的反應而斷裂離去。這樣特殊的光化學反應對於未來的合成設計有很大的幫助，因此在 BMVC 九號位置直接增加 carbonyl 的取代很有可能是光敏感的取代基分子。

然而當 AC-BMVC 和 DNA 四股結構作用後，這些光化學變化也受到 DNA 的保護而消失，如圖二十。AC-BMVC 的吸收光譜隨著照光時間增加，並沒有明顯的變化，因此當 AC-BMVC 和 DNA 作用後，光化學反應的效果會消失，這個線索也是未來合成設計需要考慮的部份。

結論：

BMVC 對於癌症細胞和正常細胞有很好的選擇性，因此可以進行其他的修飾。然而 BMVC 分子如果接上拉電子取代基，很有可能因為孤對電子的存在而造成螢光強度和 DNA 作用後變弱，失去原本 BMVC 的螢光特性。

而 AC-BMVC 因為在九號氮上直接修飾，造成分子對於酸鹼性敏感，在鹼性環境下可以看到吸收光譜發生極大的變化，由類似推電子取代變成拉電子取代。

這樣的效應很是因為羰基和九號位置的氮形成 Amide，這種結構會因為酸性或者鹼性的環境而發生分離的反應，也許是因為拉電子取代的羰基結構分離，造成分子變回推電子取代，所以吸收光譜才会有如此明顯的改變。

關於羰基取代分子的研究能夠討論拉電子取代造成的螢光改變以及分子對於環境酸鹼性的變化，這些研究都可以幫助我們去合成具有其他用途的有機分子。

而實驗也發現，羰基取代的分子在弱酸性或者是弱鹼性的環境下會有特殊的光化學反應，這個特性可以造成分子在不同的環境下顯著地改變顏色，作為對特定環境的追蹤和討論；或者羰基取代的分子也有可能讓九號位置的羰基取代基脫去，讓 BMVC 衍生物具有攜帶其他

分子進入特殊的部位然後將分子釋放的功能。這些都是很值得研究的部份。

如果能設計出取代基對於酸鹼環境敏感，或者經過照光後造成分子產生分離的反應。我們就能夠使用此分子攜帶藥物，配合癌症細胞和正常細胞不同的酸鹼強度，或者進行光化學催化，有效率地將藥物分子攜帶進入癌細胞而不會進入正常細胞，這樣的結果必定能夠對於癌症治療有很大的貢獻。

