

第一章

BMVC 九號位置修飾推拉取代基

研究動機

BMVC 是由電子供給者與接收者組成的分子，因此具有分子內電荷轉移現象(Intramolecule charge transfer) ^(15~18)，並且在四股結構的 DNA 中會有很高的螢光強度。如果改變這些分子內電荷轉移的強度，必定對於 BMVC 的螢光表現有所影響。因此在 BMVC 的九號位置上增加推拉電子的取代，探討這些衍生物的螢光的波長或者極性的改變，或許可以讓我們更加了解 BMVC 分子的螢光表現，並且提供我們研發螢光探針分子更多的線索。

另外 BMVC 對於癌症細胞和正常細胞具有選擇性，我們可以利用這個特性設計新的 BMVC 衍生物，在 BMVC 的九號位置接上具有其他特質的分子，形成雙分子化合物，同時具有 BMVC 的選擇性以及其他分子的特殊功能，例如治療的藥物功能。兩種分子中的連接取代基不能破壞 BMVC 分子原有的特色，否則失去了合成雙分子化合物的原始目的，因此關於九號位置修飾的研究就更加重要，我們必須了解這些修飾是否會改變 BMVC 分子原先的特性。

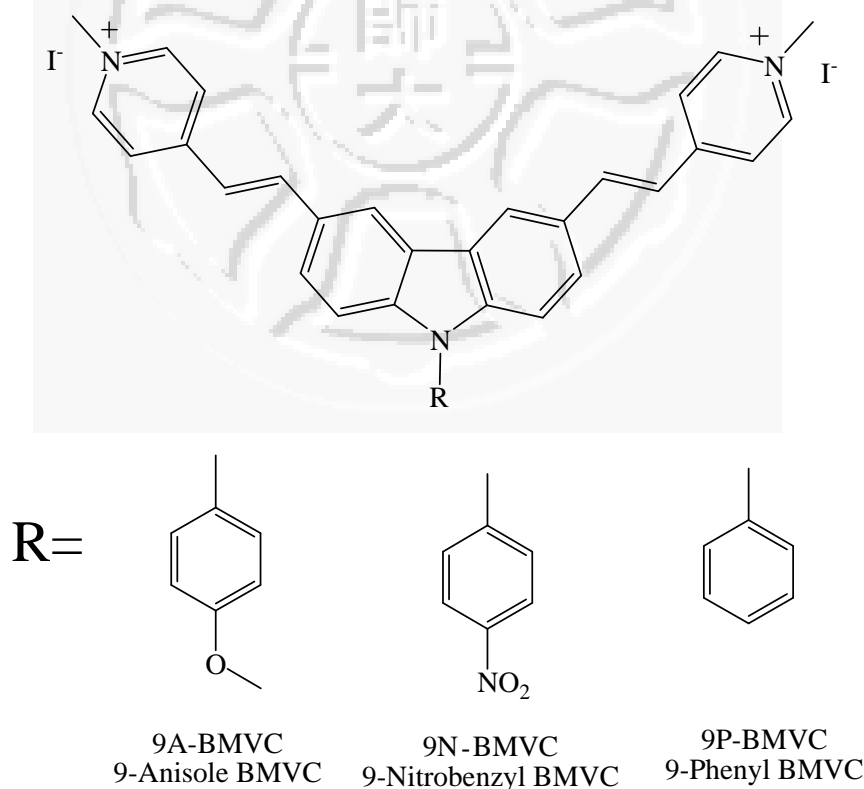
另外也希望經由這些衍生物的實驗，可以找到作用機制，將有助於合成其他更有效率的探針分子或者藥物的研究。

實驗

1. 合成與步驟：

在 BMVC 的九號位置上直接增加推拉電子取代基並不容易，尤其在氮上直接接上氧原子或者氮原子形成推拉電子取代是不可能的。因此在這個部份合成出三種 BMVC 衍生物，是經由苯環再接上推拉電子結構，進而研究對於 BMVC 所造成的影響。

這些衍生物分別為 9-Anisole-BMVC 屬於推電子取代以及 9-Nitrobenzene-BMVC 屬於拉電子取代，另外 9-Phenyl-BMVC 為對照組，不加推拉官能基。結構式分別如下：



三種 BMVC 九號位置修飾不同推拉電子的衍生物，圖四的反

應過程，用 Ullmann Reaction⁽¹⁹⁾，利用 K_2CO_3 當鹼並且以 Cu 催化反應，將苯環衍生物接上 3,6 雙溴化咪唑(3,6 dibromocarbazole)的九號位置，再經由 Heck 反應接上烯化砒定⁽⁷⁾，最後甲基化使分子帶正電荷。

使用三頸瓶進行合成的反應，目的是因為可以在其中一個瓶口插入溫度計，確認溫度是否足夠。實驗在 100 毫升的三頸瓶中加入 10ml 的 nitrobenzene，再加入 0.625g(0.002mole)的 3,6-dibromocarbazole，以及二倍量(0.004mole)的碘化苯衍生物(a~c)。攪拌均勻後加入 0.3g 的銅粉末以及 1.12g (0.008mole)的 K_2CO_3 當作催化劑，使用溫度計確認系統加熱到 $170^\circ C$ 後放置反應隔夜。

得到的產物使用管柱層析法純化，使用 n-hexane 和 ethyl acetate 10:1 的衝提液將產物分離出。得到的產物使用 n-hexane 再結晶，即可得到 3,6-dibromocarbazole 接上苯環衍生物取代的產物。

接著將產物進行 Heck 反應。在高壓瓶容器中，取 0.001mole 的 (2,a-c)，使用 Acetonitrile 和 Triethyl amine 3:1 的溶劑溶解，加入 5mg 的 $Pd(OAc)_2$ 以及 30mg 的 Tri-o-tolylphosphine 在氮氣的環境下。緩慢滴入過量的 4-vinylpyridine 液體 (1ml)，高壓瓶 $80^\circ C$ 下反應超過 72 小時，產物直接過濾後使用二氯甲烷和水萃取，去除 Pd 等無機催化劑，再用乙酸乙酯再結晶即可得到產物。

Heck 反應得到的產物(3,a-c)使用碘甲烷甲基化⁽⁷⁾，即可得到最終

產物。將(3,a-c)加入圓底瓶，用 15ml 的丙酮加上 1ml 的 DMF 溶解後，加入過量的碘甲烷(1ml)40°C 下反應 6 小時，會有紅色固體析出，加入大量丙酮熱過濾，即可得到最終產物。

所有的衍生物都經由前面所敘述相同的 Heck 反應造成分子都具有 vinyl group 的官能基，並且經由甲基化反應讓分子皆帶有正電荷的官能基在分子的兩端，致使分子皆具有分子內電荷轉移(intramolecule charge transfer, ICT)的現象。

2. 溶劑效應與光譜

先將化合物用 DMSO 配置成高濃度的 Stock solution。再由此溶劑稀釋至不同的溶劑中，進行溶劑效應的光譜測試。所有 Stock solution 佔最後溶劑的比率低於百分之五。配製成的溶劑使用紫外-可見光吸收光譜儀以及螢光光譜儀取得光譜，再進行比對。

我們使用 Hitachi U3200 UV-visible spectrophotometer 的紫外-可見光吸收光譜儀，以及 Perkin Elmer LS55 Luminescence spectrometer 螢光光譜儀進行光譜量測。

3. DNA 效應

使用端粒的序列 d(TTAGGG)₄(H24)的 DNA，還有雙股螺旋 DNA d(ATGCGCA₂T₂GCGCAT)₂ (LD16) 作為量測的標準 DNA 序列。並且使用緩衝溶劑(Applied Biosystems. Buffer solutions) 10mM 的

Tris-HCl (pH7.5)以及 150mM NaCl 將 DNA 溶解，再加熱到 90°C 後冷卻靜置，配製成 DNA 序列的溶液。

測試光譜都是將染劑和 DNA 以 1 : 1 的比例混合後，進行光譜量測。

4. 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。

9A-BMVC:

^1H NMR(d-DMSO) : δ 8.85 (d, J=6.3Hz, 4H), 8.74(s, 2H), 8.257 (d, J=16.5Hz, 2H), 8.24 (d, J=6.3Hz, 4H), 7.93 (d, J=8.7Hz, 2H), 7.736 (d, J=12.6Hz, 2H), 7.712 (d, J=12.3Hz, 2H), 7.599 (d, J=16.2Hz, 2H), 7.504 (d, J=8.7Hz, 2H), 3.7 (s, 3H), 4.26 (s, 3H)

9P-BMVC :

^1H NMR(d-DMSO) : δ 8.85 (d, J=6.3Hz, 4H), 8.71 (s, 2H), 8.26 (d, J=16.5Hz, 2H), 8.24 (d, J=6.3Hz, 4H), 7.94 (d, J=9Hz, 2H), 7.73 (d, J=12.6Hz, 2H), 7.71 (d, J=12.6Hz, 2H), 7.586 (d, J=16.5HZ, 2H), 7.53 (d, J=12.6Hz, 1H), 7.51 (d, J=9HZ, 2H), 4.27 (s, 6H)

9N-BMVC :

^1H NMR(d-DMSO) : δ 8.868 (d, J=4.9Hz, 4H), 8.75 (s, 2H), 8.575 (d, J=9Hz, 2H), 8.264 (d, J=14.7Hz, 2H), 8.5 (d, J=6.9, 4H), 8.065 (d, J=9Hz, 2H), 7.97 (d, J=8.7Hz, 2H), 7.687 (d, J=8.7Hz, 2H), 7.628 (d, J=14.7Hz, 2H), 4.273 (s, 6H)

結果討論：

BMVC 九號位置接上了不同的推拉電子取代，必定會對於分子的表現有所影響，由肉眼可以觀察到不同推拉電子取代的衍生物顏色會有所不同，這主要是因為共軛長度受到取代基影響造成。

九號位置取代基的推拉效應和 BMVC 的 dipole 方向成一直線，因此取代基的推拉電子效應必定會對於分子的 dipole 有所影響，當分子的 dipole 受到影響，必然會影響分子內電荷轉移(ICT)的效率，因此利用溶劑效應探討分子的基態以及激發態之間 dipole 的變化量，進一步證明推拉電子取代對於分子的 dipole 有所影響。

然而更重要的是探討推拉電子取代基是否會造成衍生物失去原本 BMVC 在高黏度或者剛性的環境下螢光增強的特質。於是改變環境的黏度以及溫度進行討論，確認衍生物仍具有分子轉子的效應，最後經由衍生物和 DNA 結構作用，進行吸收以及螢光的光譜量測，進而來討論取代基是否會影響該分子和 DNA 之間作用後的螢光表現。

1. BMVC 衍生物的吸收與螢光光譜：

BMVC 在九號的位置加上不同推拉電子取代的衍生物，最大的不同就在於分子的吸收和螢光光譜的改變。因為九號位置推拉電子的效應會直接影響 BMVC 分子原本的分子內電荷轉移的方向。

另外實驗觀察發現 9A-BMVC 或者 9P-BMVC 推電子取代或者不加推拉電子的參考分子，在甘油的環境中皆有類似的螢光強度，但是 9N-BMVC 的螢光強度就較低，很有可能是因為拉電子取代的 NO_2 上的孤對電子對於螢光強度的影響。

於是將吸收與螢光的光譜標準化，直接比較吸收螢光的波長位移。如圖五。可以看到拉電子取代基能夠向原本分子內電荷轉移(ICT)的反方向吸引電子，造成有效共軛長度縮短，能量升高，於是吸收和螢光的光譜都有明顯藍位移。

不過推電子取代基的吸收與螢光光譜就大致上與原本的 BMVC 的光譜類似。這些都可以證明 BMVC 分子在兩端 Pyridinium 的正電荷是一強大的拉電子官能基，造成分子內具有由電子提供者咔唑 Carbazole 往兩端拉電子的碇定方向的強大極性，增加推電子取代並不會影響這樣的極性改變。

另外拉電子取代的吸收光譜也和推電子取代或者 BMVC 有所不同，比較偏向只有單一吸收峰，而不像其他衍生物似乎有兩個以上的吸收峰所組成，這樣的光譜表現有可能是因為拉電子取代基造成光譜藍位移，造成吸收峰變成比較單純。由於分子的 dipole 和基態或者激發態的能階高低有密切的關係，因此這樣的現象亦可以證明分子的 dipole 會受到推拉電子取代基的影響，造成不同衍生物會有不同的吸

收光譜波形。因此關於能階的變化在後面會更加詳細討論。

BMVC 的九號位置加上拉電子的取代可以造成光譜的改變。而這種推拉電子的取代會影響和分子的 ICT 方向有直接的關係，因此對於 BMVC 分子的極性必定有所影響，於是我們必須更由溶劑效應進一步去探討分子的極性變化。

2. 溶劑效應

已知 BMVC 及其衍生物皆具有分子內電荷轉移效應(ICT)，由 Carbazole 的部分提供電子源(donor)到兩端 Pyridium 的接收端(acceptor)，這樣的電荷轉移造成分子具有強大的極性。因此溶劑環境對於分子極性表現會有很大的影響，溶劑的極性會促進分子的極性改變，有 dipole induce dipole 或者其他效應。因此將 BMVC 及其衍生物溶解在不同的溶劑，可以比較推拉電子對於 BMVC 分子吸收以及螢光光譜表現的影響。

實驗將三種 BMVC 衍生物溶解在十種不同的溶劑環境下進行吸收螢光光譜的量測，討論分子的吸收以及螢光的光譜。在此僅以 9P-BMVC 的吸收與螢光光譜作為代表，如圖六。可以觀察到分子在不同的溶劑中的吸收與螢光的波長以及強度都會有所不同，這是由於溶劑提供了不同的環境所造成的差異。在 DMSO 和水的環境下，分子的螢光波長都較偏紅邊，而且波形都較為寬，這是因為溶劑環境的

高極性引誘分子的極性變化量變大導致的現象。

另外水的黏度較低，因此 BMVC 衍生物的 3,6 兩端單鍵旋轉自由度增加，於是分子在激發態時會發生其他的鬆弛，分子在激發態能夠藉由改變分子的構形而達到鬆弛的效果，藉由此效果讓分子激發態的能階降低，再放出螢光回到基態，這樣的機制會造成 stoke shift 變大，於是我們可以從吸收以及螢光光譜看見這個效應。

經由 Lippert-Mataga equation 的計算，我們能夠進一步比較衍生物的基態和激發態之間的極性變化量，了解推拉電子取代基對於分子極性的影響。由 Lippert-Mataga equation 可以得到分子在不同溶劑環境下的 Stoke shift 值和分子的極性變化量之間的關係。^(20~21)

Lippert-Mataga 方程式如下：

$$v_{\text{abs}} - v_{\text{em}} = 2 (\mu_e - \mu_g)^2 [(\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1) - (n^2 - 1)/(2n^2 + 1)] / hca^3$$

$$\Delta v = 2 (\Delta\mu)^2 f(\epsilon, n) / hca^3$$

其中 $v_{\text{abs}} - v_{\text{em}}$ 為 Stoke shift 的值，也就是吸收和螢光的波長換算成波數後相減得到差值。 $\mu_e - \mu_g$ 代表激發態與基態之間極性的差值，另外 $f(\epsilon, n)$ 為溶劑的極性與光學性質，可經由查表得到。

由方程式整理可得到 Stoke shift 對於不同溶劑的極性作圖可以得到一線性關係，可以經由斜率(如圖七 A~C)換算得到不同衍生物基態和激發態之間極性的變化量。

圖中可以發現在質子溶劑中，BMVC 衍生物的 Stokes shift 在不

同溶劑極性的環境中並沒有太大的變化。然而在非質子溶劑中，這些變化量就和分子的結構有比較明顯的關係。利用 Hyper chem 軟體的 PM3 計算方式估計 BMVC 衍生物的大小，設定分子半徑大約 7.0 Å，即可求出極性變化量。由非質子溶劑作圖得到的數據計算得知 BMVC 的極性變化量為 19.8D；9P-BMVC 為 23.3D；9A-BMVC 為 21.4D；9N-BMVC 為 18.6D。BMVC 和 9P-BMVC 的極性變化量不同主要的原因是因為分子由 V 型結構變成了 Y 型結構，dipole 的變化量必然不同，因此在此部份只討論 9P-BMVC，9A-BMVC 以及 9N-BMVC 等分子的 dipole 變化。

我們已知基態以及激發態的能階高低和分子的極性有很密切的關係，不同的分子 dipole 可以對應到不同的能階高度，所以當分子進行推拉電子取代基的修飾後，造成分子在基態以及激發態下的極性有所不同，因此經由 Lippert-Mataga equation 計算可以看到拉電子取代基的 9N-BMVC 在基態與激發態之間的極性變化量較小，這是由於拉電子取代基和原本分子的 dipole 方向相反，造成衍生物 9N-BMVC 的 dipole 變小，於是基態和激發態之間的 dipole 變化量也相對變小，讓我們得到了以上的數據。

實驗證明九號位置增加的取代基會影響 dipole，也就是會改變分子在基態和激發態之間的 dipole 變化量。這個部份的實驗證明了推拉

電子會對於分子的極性有直接的影響。然而在質子溶劑環境下，推拉電子取代似乎對於極性的改變量較不顯著。

經由吸收螢光光譜以及溶劑效應的研究，可以發現推電子取代基對於 BMVC 分子本身的光譜影響並不大，然而拉電子取代基因為提供了和原本分子相反的極性(dipole)方向，因此對於分子有明顯的影響。

3. 螢光強度和環境

除了溶劑的極性，黏度、環境的剛性以及溫度也都是影響分子的螢光強度的因素。我們已知 BMVC 分子螢光的大量增強主要是因為環境的黏度影響⁽⁴⁾。值得討論的是 BMVC 加上推拉電子取代後是否仍維持對於黏度敏感的特性。

因此使用用甘油(Glycerol)和水在不同比例下配成不同黏度的環境，可以觀察分子在不同黏度中的表現。由於 BMVC 衍生物在 3,6 位置皆具有可以旋轉的 vinyl 官能基，這些官能基的旋轉會造成分子有不同的能量⁽²²⁾，環境的黏度可以限制 vinyl 官能基的自由度，造成分子對於黏度具有敏感性。於是可以將 BMVC 分子歸類於分子轉子 (molecule rotor)^(7~12)，這種類型的分子通常可經由 Förster-Hoffmann 方程式⁽²³⁾得到螢光強度和環境的黏度呈一個線性的分布。

$$\log(\Phi_F) = B + x \text{Log}(\eta).$$

圖八 A~C 顯示 9P-BMVC 和 9A-BMVC 的吸收光譜由水中的 434nm 移動到甘油中的 450nm，這樣的表現和 BMVC 分子很類似；然而拉電子取代的 9N-BMVC 則具有較不同的現象。吸收峰僅由水中的 418nm 移動至甘油的 424nm，表示由於九號的拉電子取代部份，造成分子內的電荷轉移較不明顯，相對造成分子受到溶劑極性影響較弱，吸收位置沒有顯著的改變。

圖八 D 即為 $\log(\Phi_F)$ 對 $\log(\eta)$ 的作圖，大致上呈現線性的分布。只有拉電子取代的 9N-BMVC 具有比較不同的斜率。因此可以推論 BMVC 以及衍生物的分子中，vinyl group 的轉動仍然對於螢光強度變化扮演重要的角色。在此可以推論環境的黏度對於分子 molecule rotor 現象影響不大，BMVC 衍生物仍然對於環境敏感。

三種 BMVC 衍生物在九號位置都有取代，由原本 V 型的分子結構構成了 Y 型，因此進而探討溶劑的剛性對螢光的影響，我們將分子溶解在甘油中，改變溫度量測螢光強度的變化，探討溶劑的剛性和螢光的關係⁽²³⁾。如圖九。

圖九 A~C 分別為三種 BMVC 衍生物在甘油中隨溫度變化的光譜，溫度從零下十度逐漸上升，螢光降低。螢光產率和溫度黏度符合以下公式：

$$\Phi_F = B (\eta/T)^x$$

將螢光產率和黏度溫度比取對數作圖，即可得到圖九 D 的圖表，求得斜率即為方程式中的 x 。由圖表計算得到 x 值差異並不大， $9P\text{-BMVC} = 0.34$, $9A\text{-BMVC} = 0.41$, $9N\text{-BMVC} = 0.33$ 。

由此我們可以得知九號位置增加推拉電子取代對於分子的 molecule rotor 現象影響並不會很大，分子仍然對於環境的剛性或者黏度有敏感的表現。

4. DNA 環境影響：

由實驗得知改變九號位的官能基對於 BMVC 分子在高黏度或者高剛性的環境下螢光增強的效率之影響有限。接著我們探討 BMVC 接上推拉電子取代基的衍生物在 DNA 的環境下是否仍然具有螢光增強的特性。

圖十為 BMVC 衍生物和 DNA 作用的光譜圖，圖十 A 為拉電子取代基的 9N-BMVC 而圖十 B 為推電子取代基的 9A-BMVC，圖十 C 為參考的 9P-BMVC。可以看到 9A-BMVC 和 9P-BMVC 兩者個光譜非常類似，不論在四股結構或者雙股螺旋結構的環境下螢光都比在水中的環境要增強許多，這和 BMVC 分子比較類似，然而拉電子的 9N-BMVC 就有所不同。

將 BMVC 及其衍生物的吸收螢光波長以及螢光產率整理如下

表，可以比較在 DNA 的環境與在水中的環境下，吸收和螢光的波長也都會隨之改變，而且不論推電子或拉電子取代的吸收與螢光光譜，在各種不同環境之間的變化量都很接近。

	Absorption Wavelength (nm)				Emission wavelength (nm) (quantum yield)				Aprotic slope ($ \Delta \mu $)	Protic slope ($ \Delta \mu $)
	H2O	Glycerol	D16	H24	H2O	Glycerol	D16	H24		
BMVC	433	450	452	474	572 (0.002)	551 (0.25)	546 (0.23)	565 (0.24)	13839.5 (19.89)	32879.8 (30.65)
9P- BMVC	433	450	452	465	589 (0.005)	559 (0.29)	542 (0.55)	563 (0.38)	15945.6 (23.33)	36815.7 (35.45)
9N- BMVC	420	425	432	435	568 (0.003)	545 (0.12)	532 (0.032)	555 (0.033)	9752.25 (18.24)	35091.1 (34.6)
9A- BMVC	434	450	453	470	575 (0.002)	554 (0.23)	545 (0.41)	562 (0.26)	13389.5 (21.38)	36290 (35.2)

其中 9P-BMVC 與 9A-BMVC 都和 BMVC 有相同的現象，不論在 Hum24 四股結構或者 LD 雙股結構都有明顯的螢光增強。特別是 9P-BMVC 的螢光產率在甘油與 DNA 作用的環境下都具有更好的螢光強度，因此可以推測 9P-BMVC 可以當作更好的螢光顯示劑。

更值得注意的是，拉電子取代基的 9N-BMVC 在 DNA 的環境下螢光並不如 BMVC 有顯著的增強，造成這種現象的原因可能是染料分子和 DNA 沒有作用，以致螢光並沒有顯著增強。這樣的現象有可能是因為修改了分子結構造成分子不會和 DNA 作用，或者是因為分

子和 DNA 作用後螢光受到其他影響而減弱。因此必須先判斷 9N-BMVC 是否和 DNA 結構有相互作用。

於是進行 DNA 解旋溫度(T_m)變化的量測，確認分子是否一樣具有穩定 G 四股結構的能力。由實驗得知對照組的 Hum24DNA 解旋的溫度大約是 55°C ；BMVC 升高 T_m 約 12°C ，9P-BMVC 和 9ABMVC 皆升高約 4°C ，而 9N-BMVC 升高了 8°C 。研究結果可知這些 BMVC 的衍生物都和 DNA 有作用。尤其拉電子取代的 9N-BMVC 升溫效果比其他衍生物更加明顯，因此推測拉電子取代的螢光不強，並不是因為染料和 DNA 結構沒有作用，而應該是受到其他的影響。

9N-BMVC 的 NO_2 取代基上有很多孤對電子，可能因為和 DNA 作用後，這些孤對電子在共軛結構中扮演的角色改變，造成螢光表現改變。因此孤對電子在拉電子取代基的 BMVC 衍生物就有更多值得討論的地方。

結論：

BMVC 衍生物同樣對於環境的黏度很敏感，並且和 DNA 之間的作用都會造成螢光增強。經由改變環境的剛性以及黏度的實驗可以確認，BMVC 衍生物仍然具有分子轉子(molecule rotor)的效果。因此九號位置的推拉只會造成吸收螢光的波長改變，不會影響分子對於黏度的敏感性。如果在 BMVC 九號位置接上一種不同環境下推拉電子效

應會改變的取代基，這個分子就可能在不同的環境下有不同的顏色，可以當作更有效率的染料分子，因此接下來的研究也可以朝這個方向去發展。

然而更令人感興趣的是拉電子取代基的分子在 DNA 中的螢光卻不如 BMVC 或者其他衍生物的增強，又證明分子的確和 DNA 之間有相互作用，是否有其他反應機制影響螢光的表現。如果這是一種開關 (on-off) 效應，我們是否能夠利用這種性質，設計其他衍生物，讓我們能夠更直接的判斷想要追蹤的標的物是否存在。

另外若要將 BMVC 和其他功能的分子連接，中間所使用的官能基則必須有所選擇。從本實驗來看可以知道，如果是推電子取代的分子，將不會改變太多 BMVC 原有的螢光表現。因此若使用長碳鏈將兩種分子結合，也許能夠討論其他更複雜的螢光表現。

本部份研究結果發表於 *Journal of Luminescence* 127 (2007)

41 - 47，參見附錄。